

Penapisan Bakteri Penghambat *Fusarium* yang Diisolasi dari Cairan Kantung Semar (*Nepenthes* sp.)

(Screening for *Fusarium* Inhibiting Bacteria Isolated from Monkey Cup (*Nepenthes* sp.) Fluid)

Siti Meliah^{1*}, Annisa Wahyu Hardiyanti², Ni'ma Haida², Gita Azizah Putri³, Erny Qurotul Ainy²

(Diterima September 2019/Disetujui Agustus 2020)

ABSTRAK

Cendawan dari marga *Fusarium* sp. merupakan patogen pada banyak tanaman budi daya. Bakteri yang diisolasi dari cairan kantung semar (*Nepenthes* sp.) memiliki kemampuan dalam menghasilkan enzim hidrolisis, seperti kitinase yang dapat dimanfaatkan untuk menghambat pertumbuhan miselia cendawan patogen. Penelitian ini bertujuan mengisolasi bakteri dari cairan tanaman kantung semar, menguji kemampuannya dalam menghasilkan enzim protease, kitinase, dan selulase, serta kemampuannya menghambat pertumbuhan *Fusarium*. Bakteri diisolasi dengan metode pengenceran berseri pada media Reasoner's 2A agar. Aktivitas enzimatik isolat bakteri ditentukan dengan menumbuhkan bakteri tersebut pada media uji yang mengandung protein kasein, kitin, dan selulosa, sedangkan aktivitas antifungi ditentukan dengan metode konfrontasi langsung antara isolat bakteri dengan cendawan patogen pada media Malt Ekstrak Agar. Identifikasi secara molekuler bakteri dengan aktivitas antifungi dilakukan melalui analisis urutan basa nukleotida gen 16S rRNA. Proses isolasi bakteri dari cairan kantung semar menghasilkan 99 isolat bakteri yang memiliki kemampuan untuk memproduksi enzim, baik protease, kitinase, dan/atau selulase. Sebanyak 37 isolat dari bakteri tersebut dapat memproduksi setidaknya dua macam enzim hidrolisis. Uji antifungi terhadap bakteri tersebut menunjukkan sebanyak 25 isolat memiliki kemampuan dalam menghambat pertumbuhan *Fusarium* sp.. Berdasarkan hasil analisis urutan basa nukleotida gen 16S rRNA diketahui bahwa isolat tersebut memiliki kekerabatan dengan tiga jenis *Burkholderia*, yaitu *B. arboris*, *B. contaminans*, dan *B. rijnensis*.

Kata kunci: antifungi, *Burkholderia*, kitinase, *Nepenthes*, protease, selulase

ABSTRACT

The genus *Fusarium* sp. is a pathogenic fungal for many cultivated plants. The bacteria isolated from monkey cup (*Nepenthes* sp.) fluid possess the ability to produce hydrolytic enzyme, such as chitinase which can be utilized to inhibit the growth of mycelia of pathogenic fungi. The aims of this study are to isolate bacteria from monkey cup liquid, to test their abilities to produce protease, chitinase, and cellulase, as well as their abilities to inhibit *Fusarium*. The bacteria were isolated using serial dilution method on Reasoner's 2A agar medium. Enzymatic activities of bacterial isolates were determined by inoculating them on tested medium supplemented with casein protein, chitin, and cellulose, whereas their antifungal activities were assayed using a direct confrontation method between tested bacterial isolates and pathogenic fungal on Malt Extract Agar medium. Molecular identification of bacteria with antifungal activity was performed by analyzing the 16S rRNA gene sequences. Isolation process of bacteria from monkey cup fluid resulted in 99 bacterial isolates with the ability to produce either protease, chitinase, and/or cellulose enzymes. A total of 37 bacterial isolates were capable of producing at least two hydrolytic enzymes. Antifungal assay of those bacteria showed that as many as 25 isolates have the ability to inhibit the growth of *Fusarium* sp. Based on the analysis of 16S rRNA gene sequences revealed that those isolates were closely related to three *Burkholderia* species, namely *B. arboris*, *B. contaminans*, and *B. rijnensis*.

Keywords: antifungal, *Burkholderia*, chitinase, cellulase, *Nepenthes*, protease

PENDAHULUAN

Fusarium sp. merupakan cendawan tular tanah yang menyebabkan penyakit pada banyak tanaman budi daya. Beberapa jenis *Fusarium* yang tergolong patogen tanaman di antaranya adalah *F. graminearum* yang menyerang tanaman gandum (Gilbert & Fernando 2004) serta *F. oxysporum* f.sp. *ubense* (Ploetz 2006), *F. solani* (Sari *et al.* 2018), dan *F. odoratissimum* (Maryani *et al.* 2019) yang menyerang

¹ Pusat Penelitian Biologi, Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia, Jl. Raya Jakarta-Bogor No. Km.46, Cibinong, Bogor, Jawa Barat 16911

² Departemen Biologi, Universitas Islam Negeri Sunan Kalijaga, Jl. Laksda Adisucipto, Papringan, Caturtunggal, Depok, Sleman, Daerah Istimewa Yogyakarta 55281

³ Program Studi Teknik Industri, Universitas Pancasila, Jl. Raya Lenteng Agung No. 56-80, Srengseng Sawah, Jakarta, Daerah Khusus Ibukota Jakarta 12640

* Penulis Korespondensi: E-mail: siti.meliah@lipi.go.id

tanaman pisang. Cendawan patogen tersebut mengakibatkan penurunan kualitas dan kuantitas produk tanaman yang terinfeksi. *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* yang menyerang tanaman tomat, diketahui dapat menurunkan produksi buah tomat hingga 60–70% (Srinivas *et al.* 2019). Tidak hanya menyebabkan kerugian secara ekonomi, beberapa *Fusarium* menghasilkan mikotoksin yang berbahaya bagi manusia dan hewan yang mengonsumsi produk tanaman tersebut, seperti trikotesena, fumonisin, moniliformin, dan fusarin (Dinolfo *et al.* 2017). Trikotesena diketahui dapat menyebabkan muntah, dermatitis kulit, dan lesi hemoragik (McCormick *et al.* 2011). Adhikari *et al.* (2017) juga melaporkan kelompok mikotoksin tersebut menyebabkan penurunan glukosa plasma, jumlah sel darah, dan bobot badan pada hewan.

Upaya pengendalian *Fusarium* sp. telah banyak dilakukan, mulai dari perbaikan pengelolaan tanah, penggunaan fungisida, hingga pemanfaatan agens pengendali hayati atau biokontrol. Keberadaan transposon pada sejumlah cendawan patogen, termasuk *Fusarium*, juga diketahui menambah tingkat plastisitas dan adaptabilitas cendawan tersebut (Santana & Queiroz 2015) sehingga sulit dikendalikan. Sejumlah studi mengenai pemanfaatan mikroorganisme lain untuk mengendalikan *Fusarium* patogen telah dilakukan, di antaranya menggunakan *Pseudomonas* untuk mengendalikan *Fusarium* penyebab busuk akar pada tomat (Lemanceau & Alabouvette 1991) dan *Bacillus subtilis* untuk mengendalikan layu *Fusarium* pada pisang (Sun *et al.* 2011; Bubici *et al.* 2019). Penggunaan agens pengendali hayati dalam menangani patogen tanaman dianggap sebagai upaya yang cukup efektif dan ramah lingkungan. Penemuan mikroorganisme penghambat *Fusarium* tersebut dari berbagai sumber lain diperlukan untuk memperkaya informasi dan memberikan alternatif dalam pengembangan produk biokontrol, salah satunya dengan memanfaatkan bakteri-bakteri pada cairan tanaman kantung semar (*Nepenthes* sp.).

Nepenthes sp. tergolong tanaman karnivora yang memiliki daun khusus berbentuk kantung yang berisi cairan untuk menjerat mangsa, berupa hewan invertebrata yang selanjutnya dicerna untuk mendapatkan nutrisi, terutama nitrogen. Kelompok tanaman ini dapat ditemukan pada lahan terbuka yang mendapat sinar matahari cukup, kecuali untuk jenis *N. ampullaria* yang lebih umum ditemukan pada hutan dengan kanopi tertutup (Moran *et al.* 2003). Bagian tanaman dan cairan dalam kantung semar *Nepenthes* sp. Merupakan habitat bagi mikroorganisme penghasil asam

dan enzim yang berperan dalam mencerna serangga yang terperangkap di dalamnya. Beberapa bakteri yang diisolasi dari cairan kantung semar diketahui memiliki aktivitas enzimatik, seperti kitinolitik, proteolitik, amilolitik, selulolitik, dan xilanolitik (Chan *et al.* 2016). Kemampuan bakteri penghasil enzim tersebut dapat dimanfaatkan untuk mengendalikan pertumbuhan cendawan patogen yang dinding selnya tersusun atas kitin, protein, dan selulosa. Oleh sebab itu, penelitian ini bertujuan untuk melakukan penapisan terhadap bakteri yang diisolasi dari cairan kantung semar (*Nepenthes* sp.) yang mampu menghambat pertumbuhan *Fusarium* penyebab penyakit pada tanaman.

METODE PENELITIAN

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini berupa cairan dalam tanaman Kantung Semar (*Nepenthes* sp.) yang dikoleksi dari Gunung Betina, Karimun Besar, Kepulauan Riau pada April 2017. Seluruh cairan dalam kantung semar mengandung berbagai serangga mati ketika diambil dari lapang. Rincian sampel yang digunakan disajikan pada Tabel 1. Sebanyak tiga galur *Fusarium*, yakni *F. solani* InaCC F76, *F. oxysporum* F78, dan *F. odoratissium* InaCC F988 digunakan dalam pengujian antifungi.

Isolasi Bakteri dari Cairan Kantung Semar

Sampel berupa tanaman Kantung Semar dari lapang dimasukkan ke dalam kantung plastik untuk keperluan identifikasi, sedangkan cairan dalam Kantung Semar yang mengandung serangga dimasukkan ke dalam tabung steril. Cairan tersebut langsung digoreskan pada media Reasoner's 2A agar (R2A, Oxoid) (Reasoner & Geldreich 1985) menggunakan loop steril dalam waktu kurang dari 12 jam. Proses isolasi awal ini dilakukan dalam *clean bench portable* dan kemudian diinkubasi pada suhu ruang ($\pm 25^\circ\text{C}$). Cawan agar tersebut dipindahkan ke laboratorium di InaCC untuk selanjutnya dilakukan inkubasi kembali pada suhu ruang hingga total lamanya waktu inkubasi adalah sebulan. Sel bakteri yang telah tumbuh pada media padat tersebut selanjutnya dikerok dan diencerkan secara serial hingga pengenceran 10^{-5} menggunakan larutan NaCl 0,85%. Suspensi bakteri yang telah diencerkan kemudian disebar di atas media R2A dan diinkubasi pada suhu 30°C selama dua hari. Koloni bakteri yang muncul dimurnikan dengan metode kuadran. Isolat bakteri yang telah murni tersebut

Tabel 1 Sampel dari Gunung Betina, Karimun Besar, Kepulauan Riau yang digunakan dalam penelitian

Sampel	Nama tanaman	Ketinggian (mdpl)	pH cairan
KR06	<i>Nepenthes gracilis</i>	38	2
KR07	<i>Nepenthes gracilis</i>	42	2
KR15	<i>Nepenthes ampullaria</i>	47	5
KR16	<i>Nepenthes rafflesiana</i>	47	5
KR17	<i>Nepenthes gracilis</i>	32	3

selanjutnya dipreservasi menggunakan larutan gliserol 10% dan disimpan dalam lemari pembeku pada suhu -80°C.

Uji Enzim Hidrolisis

Isolat bakteri yang diperoleh selanjutnya diuji kemampuannya dalam menghasilkan enzim hidrolisis, yakni protease, kitinase, dan selulase dengan menggosokkan sel bakteri tersebut sepanjang 1 cm pada media uji. Bakteri uji ditumbuhkan pada media lapis ganda untuk uji protease. Lapisan bawah media tersebut merupakan campuran glukosa 1 g, ekstrak khamir 2,5 g, dan agar-agar 20 g dalam 1 L akuades, sedangkan lapisan atas merupakan media yang sama dengan tambahan 1% kasein (Kiran *et al.* 2015). Untuk uji produksi kitinase, bakteri ditumbuhkan pada media garam mineral dengan penambahan koloid kitin menurut Amini *et al.* (2016) dengan modifikasi. Komposisi media terdiri atas K₂HPO₄ 0.7 g, KH₂PO₄ 0.3 g, MgSO₄.5H₂O 0.5 g, FeSO₄.7H₂O 0.08 g, ZnSO₄ 0.001 g, MnCl₂ 0,001 g, agar-agar 20 g, dan koloid kitin 2% dalam 1 L akuades. Untuk uji produksi selulase, bakteri ditumbuhkan pada media garam mineral dengan komposisi KH₂PO₄ 2 g, (NH₄)₂SO₄ 1,4 g, MgSO₄.5H₂O 0,3 g, CaCl₂ 0,3 g, yeast extract 0,4 g, FeSO₄.7H₂O 0,005 g, MnSO₄ 0,0016 g, ZnCl₂ 0,0017 g, CoCl₂ 0,002 g, carboxymethyl cellulose-Na 5 g, dan agar-agar 15 g dalam 1 L akuades dengan pH 5 (Liang *et al.* 2014). Bakteri pada masing-masing media uji tersebut diinkubasi pada suhu ruang selama 2 hari. Setelah inkubasi, cawan uji selulase diwarnai dengan larutan Congo red 0,1% dan diinkubasi kembali selama 10 menit. Pembilasan pewarna Congo red dilakukan menggunakan larutan NaCl 1 M. Pengujian ini dilakukan sebanyak dua kali. Semua isolat yang menghasilkan zona bening pada masing-masing media uji, dinyatakan menghasilkan aktivitas enzim hidrolisis.

Uji Antagonis Bakteri terhadap Galur *Fusarium* sp.

Uji antagonis antara isolat bakteri dengan galur *Fusarium* dilakukan pada media Malt Extract Agar (MEA, Oxoid). Isolat bakteri terpilih yang menghasilkan setidaknya dua jenis enzim hidrolisis ditumbuhkan secara bersamaan dengan masing-masing galur *Fusarium* dalam cawan agar yang sama dengan jarak antarbakteri dengan *Fusarium* sebesar 1,5 cm. Sebanyak empat isolat bakteri dapat diuji pada cawan yang sama secara bersamaan. Inkubasi dilakukan pada suhu 30°C. Pengamatan atas kemampuan bakteri menghambat pertumbuhan *Fusarium* dilakukan pada hari ke-7. Uji antagonis tersebut dilakukan dengan dua ulangan.

Identifikasi Molekuler Bakteri Penghasil Anti-*Fusarium*

Identifikasi molekuler dilakukan berdasarkan analisis urutan basa pada gen 16S rRNA. DNA genom bakteri diekstrak melalui metode pemanasan (*boiling*). Sel yang telah dilarutkan dalam 20 µL air bebas nuklease dipanaskan dalam mesin *heat-block* pada

suhu 98°C selama 10 menit (Meliah *et al.* 2020). Sel tersebut kemudian disentrifugasi secara singkat dan selanjutnya digunakan sebagai cetakan DNA untuk proses *Polymerase Chain Reaction* (PCR). Sepasang primer universal yang terdiri atas *primer forward* 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') dan *primer reverse* 1492R (5'-GGTTACCTTGTACGACTT-3') (Lane 1991) digunakan untuk mengamplifikasi gen 16S rRNA. Komposisi PCR untuk tiap reaksi terdiri atas GoTaq DNA polymerase 12,5 µL, primer 27F 1 µL, primer 1492R 1 µL, dimethyl sulfoxide (DMSO) 0,5 µL, dan cetakan DNA 1 µL dengan total volume sebanyak 25 µL. Kondisi reaksi PCR terdiri atas tahap pradenaturasi pada suhu 94°C selama 90 detik, denaturasi 94°C selama 30 detik, penempelan 50°C selama 30 detik, pemanjangan 72°C selama 90 detik yang dilanjutkan dengan tahap pemanjangan akhir pada suhu 72°C selama 10 menit. Siklus PCR yang dilakukan sebanyak 35 siklus. Produk PCR dianalisis melalui elektroforesis pada gel agarosa 1%. Produk PCR tersebut kemudian diurutkan basa nukleotidanya menggunakan ABI 3730xl DNA Analyzer oleh Macrogen, Inc (Korea Selatan).

Urutan basa gen 16S rRNA dianalisis menggunakan program BioEdit (Hall 1999). Urutan basa hasil analisis disejajarkan dengan urutan basa lainnya pada server EzTaxon (Yoon *et al.* 2017). Data fasta urutan basa nukleotida isolat bakteri dengan urutan basa nukleotida strain tipe selanjutnya disejajarkan menggunakan program MUSCLE (Edgar 2004) untuk menyusun pohon filogenetik. Penyusunan pohon filogenetik menggunakan metode Neighbor Joining (Saitou & Nei 1987) dengan model Kimura 2-parameter (Kimura 1980) sebanyak 1000 kali pengulangan yang dilakukan melalui program MEGA X (Kumar *et al.* 2018).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Isolasi Bakteri dari Cairan Kantung Semar

Total sebanyak 99 isolat bakteri berhasil diisolasi dari cairan 5 Kantung Semar asal Pulau Karimun, Kepulauan Riau. Proses isolasi menggunakan media R2A yang nutrisinya relatif rendah untuk memperbesar peluang didapatkannya bakteri-bakteri yang pertumbuhannya lambat. Secara morfologi, sebagian besar bakteri yang diperoleh memiliki koloni berbentuk bulat, tepi rata, dan berwarna putih atau kekuningan. Beberapa bakteri memproduksi lendir yang cukup banyak.

Cairan dalam kantung pada tanaman *Nepenthes* sp. diketahui berperan dalam proses mencerna mangsa berupa serangga karena kandungan enzim hidrolisis yang dimilikinya. Salah satu enzim dari tanaman kantung semar yang sudah dikarakterisasi dengan baik adalah nepentesin (Takahashi *et al.* 2005). Cairan kantung semar memiliki pH yang rendah sehingga bersifat asam. Kadar asam yang tinggi pada cairan kantung semar menghasilkan lingkungan yang

ekstrem bagi mikroorganisme. Cairan tersebut juga diketahui mengandung protein dengan aktivitas anti-mikroorganisme (Mithöfer 2011). Meskipun demikian, sejumlah komunitas bakteri, seperti kelompok Alfabroteobacteria, dilaporkan mampu hidup dengan baik di dalamnya (Chou *et al.* 2014).

Selain cairan dalam kantung, bagian lain dari tanaman kantung semar juga dilaporkan merupakan habitat bagi sejumlah bakteri yang bersifat endofit (Bhore *et al.* 2013). Adanya bakteri-bakteri tersebut diduga membantu tanaman dalam mencerna serangga. Keragaman dan kelimpahan bakteri tersebut dipengaruhi oleh pH cairan dalam kantung (Kanokratana *et al.* 2016) dan fase pertumbuhan tanaman. Fase pertumbuhan pada tanaman *Nepenthes* sp. menyebabkan perubahan pada komposisi cairan (Buch *et al.* 2013). Sampel berupa cairan kantung semar yang digunakan dalam penelitian ini berasal dari kantung semar yang sudah terbuka sepenuhnya dan mengandung serangga, terutama semut.

Uji Enzim Hidrolisis

Berdasarkan uji kemampuan isolat bakteri asal cairan kantung semar dalam menghasilkan enzim hidrolisis diketahui sebanyak 48 isolat mampu menghidrolisis protein kasein, 10 isolat mampu menghidrolisis kitin, dan sebanyak 77 isolat mampu menghidrolisis selulosa yang ditandai dengan terbentuknya zona bening pada masing-masing media uji. Sebanyak 37 isolat atau 37% dari total bakteri yang diuji dapat menghasilkan setidaknya dua enzim (Tabel 2). Di antara bakteri tersebut, sebanyak 18 isolat diisolasi dari *N. gracilis*, sebanyak 16 isolat dari *N. ampullaria*, dan sebanyak 3 isolat diisolasi dari *N. rafflesiana*. Bakteri yang menghasilkan lebih dari satu jenis enzim kemudian digunakan dalam uji antifungi dengan beberapa *Fusarium*.

Enzim yang dihasilkan oleh bakteri dari cairan Kantung Semar tidak terbatas pada ketiga enzim yang diuji dalam penelitian ini. Studi metagenomik pada

komunitas bakteri pada kantung semar juga berhasil mendeteksi adanya gen yang menyandi lipase sehingga diduga bakteri pada cairan kantung semar tersebut mampu memproduksi enzim lipase pada kondisi asam (Morohoshi *et al.* 2011). Kontribusi enzim-enzim hidrolisis tersebut dalam mendegradasi eksoskeleton serangga sangat penting, terutama enzim kitinase karena kitin merupakan komponen terbesar penyusun eksoskeleton serangga.

Adanya kemiripan antara komponen penyusun eksoskeleton serangga dengan penyusun dinding sel sebagian besar cendawan menjadi dasar dilakukannya uji kemampuan bakteri asal cairan kantung semar melawan cendawan patogen tanaman. Aktivitas enzimatis yang dihasilkan oleh mikroorganisme banyak dimanfaatkan untuk melawan cendawan patogen tanaman, seperti enzim kitinase yang diproduksi oleh *Serratia plymuthica* untuk melawan *Botrytis cinerea* (Frankowski *et al.* 2001). Keterlibatan enzim lain yang dihasilkan mikroorganisme, yaitu β -1,3-glukanase juga mendukung aktivitas antifungi terhadap cendawan *F. oxysporum* f.sp. *cucumerinum* oleh *Paenibacillus* dan *Streptomyces* (Jeun *et al.* 2004).

Terkait dengan sampel yang digunakan dalam penelitian ini, sejumlah penelitian melaporkan bahwa cairan kantung semar memiliki kemampuan antifungi terhadap sejumlah khamir, seperti *Candida albicans*, *C. glabrata*, *C. Krusei*, dan *C. tropicalis* (Yolanda *et al.* 2015) dan cendawan, seperti *Aspergillus* sp. Kemampuan tersebut disebabkan oleh kandungan droseron, 5-O-metil droseron, dan naftokuinon yang dapat menghambat pertumbuhan mikroorganisme tersebut dalam konsentrasi rendah (Eilenberg *et al.* 2010). Secara spesifik, penelitian lain mengungkap potensi bakteri yang diisolasi dari cairan kantung semar sebagai penghasil senyawa antibakteri, terutama *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus* (Hidayat 2015). Akan tetapi, kajian mengenai peran bakteri dalam cairan kantung semar dalam mengendalikan cendawan patogen belum banyak dilakukan.

Tabel 2 Hasil uji kemampuan bakteri asal cairan Kantung Semar dalam menghasilkan enzim protease, kitinase, dan selulase

Isolat	Enzim			Isolat	Enzim			Isolat	Enzim		
	P	K	S		P	K	S		P	K	S
KR06-03	+	-	+	KR06-24	+	-	+	KR15-15	+	-	+
KR06-04	+	+	-	KR07-01	+	-	+	KR15-16	+	-	+
KR06-05	-	+	+	KR07-08	+	-	+	KR15-17	+	-	+
KR06-08	+	+	-	KR07-25	+	-	+	KR15-19	+	-	+
KR06-10	+	+	+	KR07-27	+	-	+	KR15-20	+	-	+
KR06-12	+	+	+	KR15-01	+	-	+	KR15-22	+	-	+
KR06-15	+	+	+	KR15-02	+	+	+	KR15-23	+	-	+
KR06-17	+	-	+	KR15-04	+	-	+	KR15-24	+	-	+
KR06-18	+	+	+	KR15-05	+	-	+	KR16-05	+	-	+
KR06-19	+	+	-	KR15-08	+	-	+	KR16-16	+	-	+
KR06-20	+	+	-	KR15-12	+	-	+	KR16-26	+	-	+
KR06-21	+	-	+	KR15-13	+	-	+				
KR06-22	+	-	+	KR15-14	+	-	+				

Keterangan: Tanda (+) menunjukkan isolat mampu memproduksi enzim P (protease), K (kitinase) atau S (selulase), sedangkan tanda (-) menunjukkan isolat tidak mampu memproduksi enzim.

Uji Antagonis Bakteri terhadap Galur *Fusarium* sp.

Uji antagonis dengan konfrontasi langsung antara sel bakteri dengan sel cendawan menunjukkan sebanyak 25 isolat mampu menghambat pertumbuhan *F. solani*, sebanyak 23 isolat mampu menghambat *F. oxysporum*, dan sebanyak 16 isolat mampu menghambat *F. odoratissimum*. Di antara isolat bakteri yang diuji, sebanyak 15 isolat mampu menghambat ketiga jenis *Fusarium* (Tabel 3). Besarnya kemampuan bakteri dalam menghambat pertumbuhan miselia cendawan tersebut bervariasi dan secara umum, *F. oxysporum* paling mudah dihambat oleh bakteri asal cairan kantung semar karena menghasilkan diameter

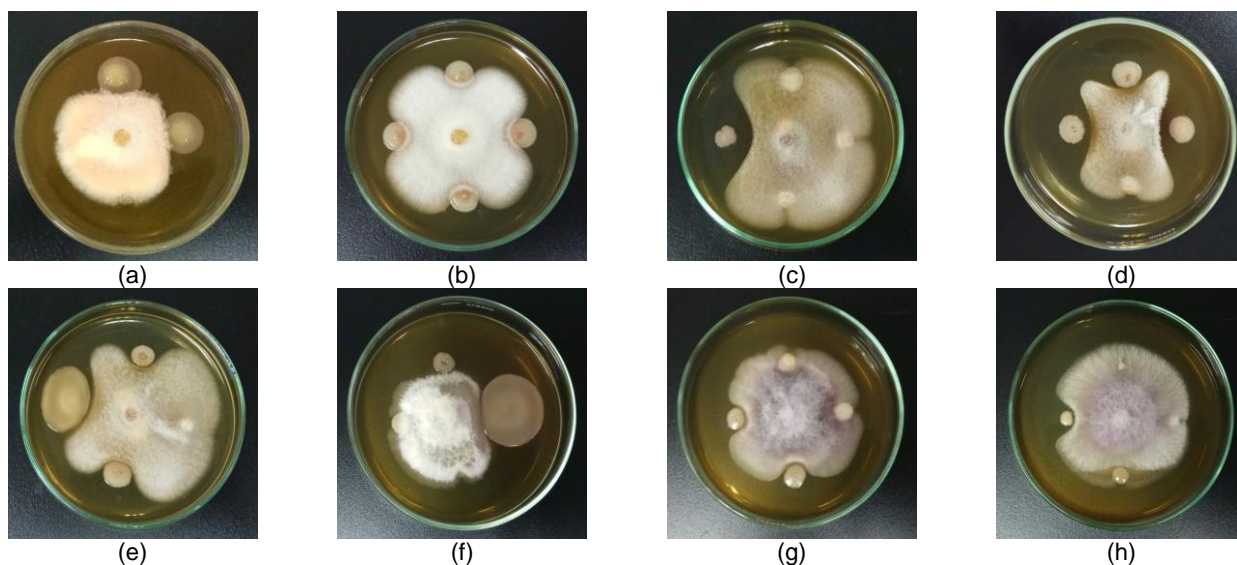
zona hambat yang paling besar (Gambar 1). Secara morfologi, bakteri dengan aktivitas antifungi tersebut menghasilkan lendir eksopolisakarida yang cukup banyak.

Berdasarkan hasil uji antagonis diketahui juga bahwa sebanyak 13 isolat penghasil enzim terbukti tidak memiliki aktivitas antifungi. Meskipun aktivitas enzimatik seperti kitinase dan glukonase diketahui berperan dalam menghambat pertumbuhan cendawan (Prapagdee *et al.* 2008), kemampuan dalam menghambat pertumbuhan cendawan tidak hanya disebabkan oleh kerja enzim. Senyawa lain yang diproduksi melalui metabolisme sekunder bakteri banyak dilapor-

Tabel 3 Kemampuan isolat bakteri asal cairan kantung semar dalam menghambat pertumbuhan *Fusarium* sp.

Isolat	Galur <i>Fusarium</i> sp.			Isolat	Galur <i>Fusarium</i> sp.		
	InaCC F76	InaCC F78	InaCC F988		InaCC F76	InaCC F78	InaCC F988
KR06-03	++	++	+	KR15-02	-	-	-
KR06-04	-	-	-	KR15-04	-	-	-
KR06-05	-	-	-	KR15-05	+	+++	-
KR06-08	-	-	-	KR15-08	+	+	-
KR06-10	-	-	-	KR15-12	+	-	-
KR06-12	-	-	-	KR15-13	+	+++	-
KR06-15	+	++	+	KR15-14	+	+++	+
KR06-17	++	++	++	KR15-15	+	+++	-
KR06-18	++	++	++	KR15-16	+	+++	-
KR06-19	-	-	-	KR15-17	+	+	+
KR06-20	++	++	+	KR15-19	-	-	-
KR06-21	+	++	++	KR15-20	+	+	-
KR06-22	++	++	+	KR15-22	+	+	+
KR06-24	-	-	-	KR15-23	+	+	+
KR07-01	+	+++	++	KR15-24	+	+	-
KR07-08	+	++++	++	KR15-25	-	-	-
KR07-25	+	+++	-	KR16-05	+	+++	++
KR07-27	+	+++	++	KR16-16	-	-	-
KR15-01	+	-	+	KR16-26	-	-	-

Keterangan: Tanda (+) menunjukkan bahwa isolat mampu menghambat pertumbuhan *Fusarium* sp. yang jumlahnya bertambah sesuai dengan pertambahan aktivitas penghambatan; tanda (-) menunjukkan isolat tidak dapat menghambat *Fusarium* sp.



Gambar 1 Aktivitas penghambatan galur *Fusarium* sp. oleh bakteri; A. KR06-3 dan KR06-20; B. KR15-13, KR15-14, KR15-15, dan KR15-16 terhadap *F. solani* InaCC F76; C. KR07-8; D. KR15-15, KR15-16, dan KR07-1; E. KR15-17, KR15-20, dan KR06-17 terhadap *F. oxysporum* InaCC F78; F. KR06-18; G. KR15-1 dan KR15-23; H. KR16-5 terhadap *F. odoratissimum* InaCC F988. Galur bakteri dan cendawan ditumbuhkan pada media MEA selama 7 hari.

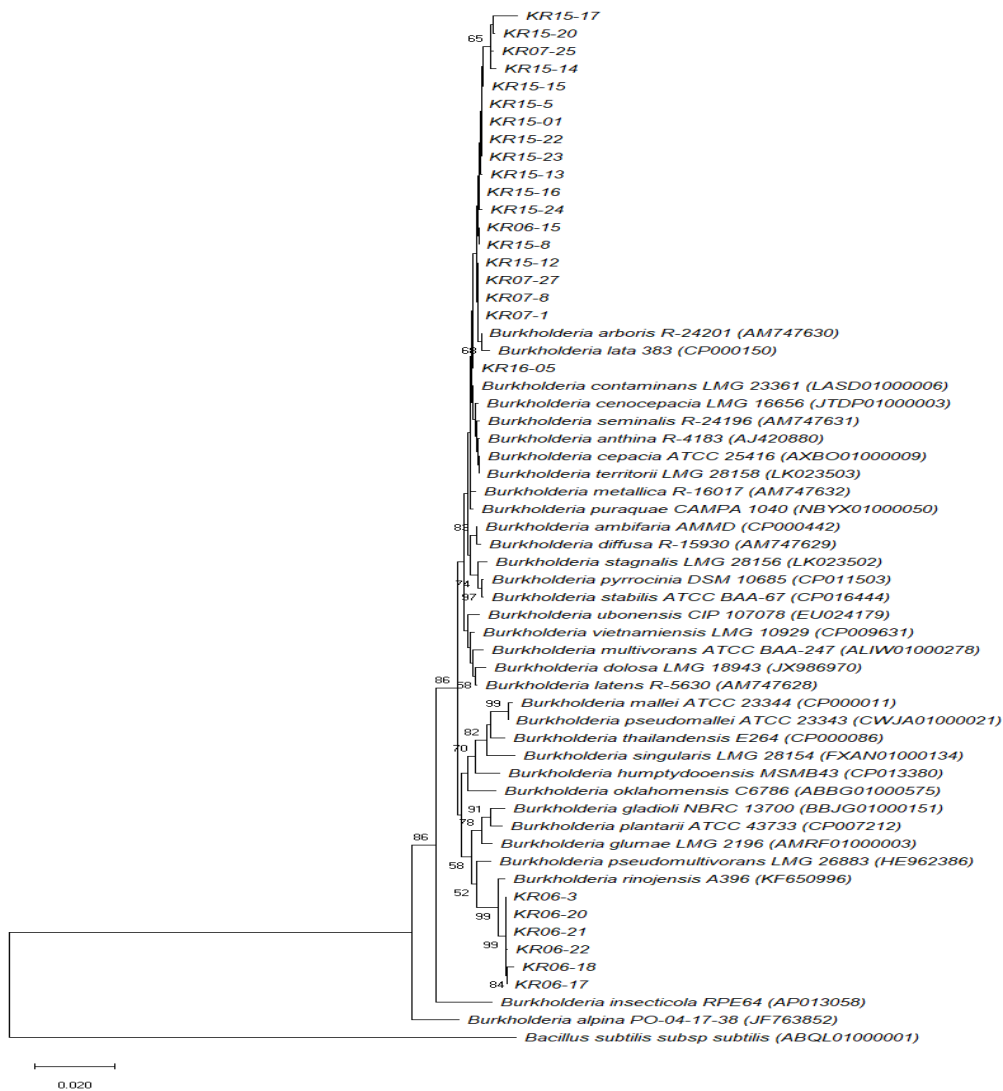
kan memiliki aktivitas antifungi, di antaranya fenazin dan pirolnitrin yang diproduksi oleh bakteri *Pseudomonas* sp. (Park *et al.* 2011).

Identifikasi Molekuler Bakteri Penghambat *Fusarium*

Analisis urutan basa nukleotida gen 16S rRNA dengan panjang berkisar antara 1282–1381 pb dari 25 isolat bakteri dengan kemampuan menghambat pertumbuhan cendawan menunjukkan bahwa semua isolat tersebut termasuk dalam genus *Burkholderia* yang merupakan anggota kelas *Betaproteobacteria* (Gambar 2). Keberadaan *Betaproteobacteria* diketahui melimpah pada cairan Kantung Semar *Nepenthes* sp., yaitu berkisar antara 1,9–24,6% dari total sel mikroorganisme, di samping kelompok *Alphaproteobacteria* yang mendominasi komposisi mikroorganisme pada habitat tersebut (Takeuchi *et al.* 2015).

Berdasarkan posisinya dalam pohon filogenetik, sebanyak 18 isolat memiliki kekerabatan dengan *B. arboris* strain R-24201 (nomor aksesori AM747630) dengan persentase kemiripan sebesar 99%, sebanyak 1 isolat memiliki kekerabatan dengan *B. contaminans* strain LMG 23361 (nomor aksesori LASD01000006) dengan persentase kemiripan sebesar 99%, dan sebanyak 6 isolat memiliki kekerabatan dengan *B. rijnensis* strain A396 (nomor aksesori KF650996) dengan persentase kemiripan sebesar 99%. *B. arboris* dapat ditemukan pada sampel lingkungan, seperti tanah dan rizosfer maupun dari sampel klinis (Vanlaera *et al.* 2008).

Bakteri dari genus *Burkholderia* banyak dilaporkan memiliki peran dalam meningkatkan pertumbuhan tanaman, terutama karena aktivitas antifungi yang dihasilkannya. Selain enzim hidrolisis, senyawa lain seperti pirolnitrin (Sultan *et al.* 2008), 1-metil-4-(1-metiletenil)-sikloheksana (Elshafie *et al.* 2012),



Gambar 2 Hubungan kekerabatan antara bakteri asal kantung semar yang memiliki kemampuan menghambat *Fusarium* dengan kelompok *Burkholderia* terdekat pada pohon filogenetik yang disusun menggunakan metode Neighbor Joining dengan model Kimura 2 parameter. Angka di depan nodus merupakan nilai bootstrap yang disajikan dalam persentase. Hanya nilai bootsrap lebih dari 50% yang ditampilkan.

burkholdin (Lin *et al.* 2012), dan ocidiofungin (Wang *et al.* 2016) yang dihasilkan oleh genus tersebut diketahui mampu menghambat pertumbuhan cendawan patogen tanaman, di antaranya *Rhizoctonia solani* dan *F. oxysporum*. Ocidiofungin yang diproduksi oleh *B. contaminans* juga dilaporkan sangat aktif terhadap cendawan patogen *Pythium spinosum* dan *Pythium ultimum*. Senyawa tersebut menarget integritas membran dengan cara mengganggu pembentukan dinding sel dan menghambat kerja enzim cendawan yang diuji (Lu *et al.* 2009). Selain memiliki kemampuan menghambat pertumbuhan cendawan, dalam laporan lain disebutkan bahwa *B. rijnensis* memiliki aktivitas insektisidal dan mitisidal (Cordova-Kreylos *et al.* 2013).

Pemanfaatan mikroorganisme untuk mengendalikan cendawan patogen merupakan upaya yang ramah lingkungan dibandingkan dengan menggunakan senyawa kimia sintetis. Pengungkapan potensi bakteri dari berbagai habitat dan wilayah di Indonesia sebagai penghasil senyawa penghambat *Fusarium* diharapkan dapat memberikan alternatif dalam pengembangan agens pengendali hayati untuk patogen tanaman budi daya tersebut. Penelitian lebih lanjut perlu dilakukan untuk

KESIMPULAN

Mikroorganisme berupa bakteri telah dikoleksi dari cairan dalam kantung semar (*Nepenthes* sp.) sebanyak 99 isolat. Bakteri tersebut menghasilkan enzim yang dapat menghidrolisis protein, selulosa, dan kitin pada media uji. Sebanyak 37 isolat bakteri menghasilkan lebih dari satu jenis enzim dan sebanyak 25 di antaranya memiliki kemampuan dalam menghambat pertumbuhan cendawan *Fusarium*. Identifikasi bakteri melalui analisis urutan basa nukleotida gen 16S rRNA menunjukkan bahwa bakteri tersebut merupakan anggota genus *Burkholderia*. Dengan demikian, bakteri yang diisolasi dari cairan kantung semar tersebut berpotensi sebagai agens pengendali hayati cendawan patogen pada tanaman.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini didanai melalui program DIPA untuk Pusat Penelitian Biologi dan PKT Kebun Raya Bogor, LIPI. Ucapan terima kasih kami ucapkan kepada Ruby Setiawan, Tri Ratna Sulistiyani, dan semua anggota tim ekspedisi KR Batam-Kepulauan Riau selama kegiatan pengambilan sampel, serta Rinatu Siswi atas asistensinya selama pekerjaan di laboratorium.

DAFTAR PUSTAKA

Adhikari M, Negi B, Kaushik N, Adhikari A, Al-Khedairy AA, Kaushik NK, Choi EH. 2017. T-2 mycotoxin:

toxicological effects and decontamination strategies. *Oncotarget*. 8(20): 33933–33952. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.15422>

Amini J, Agapoor Z, Ashengroph M. 2016. Evaluation of *Streptomyces* spp. against *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* for the management of chickpea wilt. *Journal of Plant Protection Research*. 56(3): 257–264. <https://doi.org/10.1515/jppr-2016-0038>

Bhore SJ, Komathi V, Kandasamy KI. 2013. Diversity of endophytic bacteria in medicinally important *Nepenthes* species. *Journal of Natural Science, Biology and Medicine*. 4(2): 431–434. <https://doi.org/10.4103/0976-9668.117022>

Bubici G, Kaushal M, Prigigallo MI, Gomez-Lama Cabanaz C, Mercado-Blanco J. 2019. Biological control agents against fusarium wilt of banana. *Frontiers in Microbiology*. 10: 1–33. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01290>

Buch F, Rott M, Rottloff S, Paetz C, Hillke I, Raessler M, Mithofer A. 2013. Secreted pitfall-trap fluid of carnivorous *Nepenthes* plants is unsuitable for microbial growth. *Annals of Botany*. 111(3): 375–383. <https://doi.org/10.1093/aob/mcs287>

Chan XY, Hong KW, Yin WF, Chan KG. 2016. Microbiome and biocatalytic bacteria in monkey cup (*Nepenthes pitcher*) digestive fluid. *Scientific Reports*. 6(1): 1–10. <https://doi.org/10.1038/srep20016>

Chou LY, Clarke CM, Dykes GA. 2014. Bacterial communities associated with the pitcher fluids of three *Nepenthes* (*Nepenthaceae*) pitcher plant species growing in the wild. *Archives of Microbiology*. 196(10): 709–717. <https://doi.org/10.1007/s00203-014-1011-1>

Cordova-Kreylos AL, Fernandez LE, Koivunen M, Yang A, Flor-Weiler L, Marrone PG. 2013. Isolation and characterization of *Burkholderia rijnensis* sp. nov., a non-*Burkholderia cepacia* complex soil bacterium with insecticidal and miticidal activities. *Applied and Environmental Microbiology*. 79(24): 7669–7678. <https://doi.org/10.1128/AEM.02365-13>

Dinolfo MI, Castañares E, Stenglein SA. 2017. *Fusarium*-plant interaction: state of the art-a review. *Plant Protection Science*. 53(2): 61–70. <https://doi.org/10.17221/182/2015-PPS>

Edgar RC. 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research*. 32(5): 1792–1797. <https://doi.org/10.1093/nar/gkh340>

Eilenberg H, Pnini-Cohen S, Rahamin Y, Sionov E, Segal E, Carmeli S, Zilberstein A. 2010. Induced production of antifungal naphthoquinones in the pitchers of the carnivorous plant *Nepenthes khasiana*. *Journal of Experimental Botany*. 61(3): 911–922. <https://doi.org/10.1093/jxb/erp359>

- Elshafie HS, Camele I, Racioppi R, Scranol L, Lacobellis NS, Bufo SA. 2012. In vitro antifungal activity of *Burkholderia gladioli* pv. *agaricola* against some phytopathogenic fungi. *International Journal of Molecular Sciences*. 13(12): 16291–16302. <https://doi.org/10.3390/ijms131216291>
- Frankowski J, Lorito M, Scala F, Schmid R, Berg G, Bahl H. 2001. Purification and properties of two chitinolytic enzymes of *Serratia plymuthica* HRO-C48. *Archives of Microbiology*. 176(6): 421–426. <https://doi.org/10.1007/s002030100347>
- Gilbert J, Fernando WGD. 2004. Epidemiology and biological control of *Gibberella zeae* /*Fusarium graminearum*. *Canadian Journal of Plant Pathology*. 26(4): 464–472. <https://doi.org/10.1080/07060660409507166>
- Hall TA. 1999. BIOEDIT: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/ NT. *Nucleic Acids Symposium Series*. 41(41): 95–98. <https://doi.org/10.22202/bc.2015.v1i1.1523>
- Hidayat Y. 2015. Isoalsi bakteri penghasil antibiotika dari cairan kantong semar (*Nepenthes* spp.) cagar alam lembah harau Sumatera Barat. *Bioconcetta*. 1(1): 20–31.
- Jeun YC, Park KS, Kim CH, Fowler WD, Kloepper JW. 2004. Cytological observations of cucumber plants during induced resistance elicited by rhizobacteria. *Biological Control*. 29(1): 34–42. [https://doi.org/10.1016/S1049-9644\(03\)00082-3](https://doi.org/10.1016/S1049-9644(03)00082-3)
- Kanokratana P, Mhuanthong W, Laothanacareon T, Tangphatsornruang S, Eurwilaichitr L, Krutreepradit T, Mayes S, Champreda V. 2016. Comparative study of bacterial communities in *Nepenthes* pitchers and their correlation to species and fluid acidity. *Microbial Ecology*. 72(2): 381–393. <https://doi.org/10.1007/s00248-016-0798-5>
- Kimura M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*. 16(2): 112–120. <https://doi.org/10.1007/BF01731581>
- Kiran T, Asad W, Siddiqui S, Ajaz M, Rasool SA. 2015. Industrially important hydrolytic enzyme diversity explored in stove ash bacterial isolates. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*. 28(6): 2035–2040.
- Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K. 2018. MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*. 35(6): 1547–1549. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>
- Lane DJ. 1991. 16S/23S rRNA sequencing. Stackebrandt E, Goodfellow M, Ed. In: *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. Chinchester (UK): John Wiley and Sons Ltd. p. 115–175
- Lemanceau P, Alabouvette C. 1991. Biological control of fusarium diseases by fluorescent *Pseudomonas* and non-pathogenic *Fusarium*. *Crop Protection*. 10(4): 279–286. [https://doi.org/10.1016/0261-2194\(91\)90006-D](https://doi.org/10.1016/0261-2194(91)90006-D)
- Liang YL, Zhang Z, Wu M, Wu Y, Feng JX. 2014. Isolation, screening, and identification of cellulolytic bacteria from natural reserves in the subtropical region of China and optimization of cellulase production by *Paenibacillus terrae* ME27-1. *BioMed Research International*. 2014: 1–13. <https://doi.org/10.1155/2014/512497>
- Lin Z, Falkinham III JO, Tawfik KA, Jeffs P, Bray B, Dubay G, Cox JE, Schmidt EW. 2012. Burkholdines from *Burkholderia ambifaria*: antifungal agents and possible virulence factors. *Journal of Natural Products*. 75(9): 1518–1523. <https://doi.org/10.1021/np300108u>
- Lu SE, Novak J, Austin FW, Gu G, Ellis D, Kirk M, Wilson-Stanford S, Tonelli M, Smith L. 2009. Occidiofungin, a unique antifungal glycopeptide produced by a strain of *Burkholderia contaminans*. *Biochemistry*. 48(35): 8312–8321. <https://doi.org/10.1021/bi900814c>
- Maryani N, Lombard L, Poerba YS, Subandiyah S, Crous PW, Kema GHJ. 2019. Phylogeny and genetic diversity of the banana fusarium wilt pathogen *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* in the Indonesian centre of origin. *Studies in Mycology*. 92: 155–194. <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2018.06.003>
- McCormick SP, Stanley AM, Stover NA, Alexander NJ. 2011. Trichothecenes: from simple to complex mycotoxins. *Toxins*. 3(7): 802–814. <https://doi.org/10.3390/toxins3070802>
- Meliah S, Kusumawati DI, Ilyas M. 2020. Preliminary study of myxobacteria as biocontrol agents for panama disease pathogen, tropical race 4 *Fusarium odoratissimum*. In IOP Conference Series: *Earth and Environmental Science*. 457(1): 012060 <https://doi.org/10.1088/1755-1315/457/1/012060>
- Mithöfer A. 2011. Carnivorous pitcher plants: insights in an old topic. *Phytochemistry*. 72(13): 1678–1682. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2010.11.024>
- Moran JA, Clarke CM, Hawkins BJ. 2003. From carnivore to detritivore? Isotopic evidence for leaf litter utilization by the tropical pitcher plant *Nepenthes ampullaria*. *International Journal of Plant Sciences*. 164(4): 635–639.
- Morohoshi T, Oikawa M, Sato S, Kikuchi N, Nato N, Ikeda T. 2011. Isolation and characterization of novel lipases from a metagenomic library of the microbial community in the pitcher fluid of the

- carnivorous plant *Nepenthes hybrida*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 112(4): 315–320. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2011.06.010>
- Park JY, Oh SA, Anderson AJ, Neiswender J, Kim JS, Kim YC. 2011. Production of the antifungal compounds phenazine and pyrrolnitrin from *Pseudomonas chlororaphis* O6 is differentially regulated by glucose. *Letters in Applied Microbiology*. 52(5): 532–537. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2011.03036.x>
- Ploetz RC. 2006. Fusarium-induced diseases of tropical perennial crops fusarium wilt of banana is caused by several pathogens referred to as *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense*. *Symposium: Fusarium-Induced Diseases of Tropical Perennial Crops*. 96(6): 653–656. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-96-0653>
- Prapagdee B, Kuekulvong C, Mongkolsuk S. 2008. Antifungal potential of extracellular metabolites produced by *Streptomyces hygroscopicus* against phytopathogenic fungi. *International Journal of Biological Sciences*. 4(5): 330–337 <https://doi.org/10.7150/ijbs.4.330>
- Reasoner DJ, Geldreich EE. 1985. A new medium for the enumeration and subculture of bacteria from potable water. *Applied and Environmental Microbiology*. 49(1): 1–7. <https://doi.org/10.1128/AEM.49.1.1-7.1985>
- Saitou N, Nei M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular biology and evolution*. 4(4): 406–425. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040454>
- Santana MF, Queiroz MV. 2015. Transposable elements in fungi: a genomic approach. *Scientific Journal of Genetics and Gene Therapy*. 1(1): 12–16. <https://doi.org/10.17352/sjggt.000003>
- Sari W, Wiyono S, Nurmansyah A, Munif A, Poerwanto R. 2018. Keanekaragaman dan patogenisitas *Fusarium* spp. asal beberapa kultivar pisang. *Jurnal Fitopatologi Indonesia*. 13(6): 216–228. <https://doi.org/10.14692/jfi.13.6.216>
- Srinivas C, Devi DN, Murthy KN, Mohan CD, Lakshmeesha TR, Singh B, Kalagatur NK, Niranjana RR, Hashem A, Alqarawi AA, Tabassum B, Abd Allah EF, NAYaka C, Srivastava RK. 2019. *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* causal agent of vascular wilt disease of tomato: biology to diversity-a review. *Saudi Journal of Biological Sciences*. 26(7): 1315–1324. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2019.06.002>
- Sultan MZ, Park K, Lee SY, Park JK, Varughese T, Moon SS. 2008. Novel oxidized derivatives of antifungal pyrrolnitrin from the bacterium *Burkholderia cepacia* K87. *Journal of Antibiotics*. 61(7): 420–425. <https://doi.org/10.1038/ja.2008.58>
- Sun JB, Peng M, Wang YG, Zhao PJ, Xia QY. 2011. Isolation and characterization of antagonistic bacteria against fusarium wilt and induction of defense related enzymes in banana. *African Journal of Microbiology Research*. 5(5): 509–515.
- Takahashi K, Athauda SB, Matsumoto K, Rajapakshe S, Kuribayashi M, Kojima M, Kubomura-Yoshida N, Iwamatsu A, Shiabata C, Inoue H. 2005. Nepenthasin, a unique member of a novel subfamily of aspartic proteinases: enzymatic and structural characteristics. *Current Protein & Peptide Science*. 6(6): 513–525. <https://doi.org/10.2174/138920305774933259>
- Takeuchi Y, Chaffron S, Salcher MM, Shimizu-Inatsugi R, Kobayashi MJ, Diway B, von Mering C, Pernhaller J, Shimizu KK. 2015. Bacterial diversity and composition in the fluid of pitcher plants of the Genus *Nepenthes*. *Systematic and Applied Microbiology*. 38(5): 330–339. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2015.05.006>
- Vanlaera E, LiPuma JJ, Baldwin A, Henry D, De Brandt E, Mahenthalingam E, Speert D, Dowson C, Vandamme P. 2008. *Burkholderia latens* sp. nov., *Burkholderia diffusa* sp. nov., *Burkholderia arboris* sp. nov., *Burkholderia seminalis* sp. nov., and *Burkholderia metallica* sp. nov., novel species within the *Burkholderia cepacia* complex. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 58(7): 1580–1590. <https://doi.org/10.1099/ijms.0.65634-0>
- Wang XQ, Liu AX, Guerrero A, Liu J, Yu XQ, Deng P, Ma L, BAird SM, Smith L, Li XD, Lu SE. 2016. Occidiofungin is an important component responsible for the antifungal activity of *Burkholderia pyrrocinia* strain Lyc2. *Journal of Applied Microbiology*. 120(3): 607–618. <https://doi.org/10.1111/jam.13036>
- Yolanda H, Makashinda IM, Aprilia M, Sanjaya N, Gunawan H, Dewi R. 2015. *Nepenthes rafflesiana* pitcher liquid has antifungal activity against *Candida* spp. *Mycoses*. 33(2): 83–90.
- Yoon SH, Ha SM, Kwon S, Lim J, Kim Y, Seo H, Chun J. 2017. Introducing EzBioCloud: a taxonomically united database of 16S rRNA gene sequences and whole-genome assemblies. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 67(5): 1613–1617. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001755>