

Bakteri Endofit Penghasil AHL-Laktonase Asal Tanaman Pisang untuk Pengendalian Penyakit Darah

Endophytic Bacteria Producing AHL-Lactonase from Banana Plant to Control Blood Disease

Anugrawati Abidin, Giyanto*, Abdjad Asih Nawangsih

Departemen Proteksi Tanaman, Fakultas Pertanian, Institut Pertanian Bogor
Jalan Kamper, Kampus IPB Dramaga, Bogor 16680

(diterima Desember 2023, disetujui November 2024)

ABSTRAK

Penyakit darah yang disebabkan oleh *Ralstonia solanacearum* Phylotype IV merupakan penyakit penting pada pisang yang menyebabkan kehilangan hasil hingga 100%. Bakteri *R. solanacearum* mengekspresikan gen virulensi melalui mekanisme *quorum sensing* (QS) dengan menggunakan asil homoserin lakton (AHL) sebagai *autoinducer*. Enzim AHL laktonase diproduksi oleh bakteri dan memiliki potensi sebagai agens biokontrol bakteri patogen melalui anti-QS. Tujuan dari penelitian ini ialah memperoleh isolat bakteri endofit penghasil AHL laktonase untuk pengendalian *R. solanacearum* pada tanaman pisang. Tahapan penelitian mencakup isolasi dan seleksi bakteri endofit asal tanaman pisang sebagai penghasil AHL laktonase dengan *bioassay* maupun molekuler, uji keefektifan isolat bakteri dalam menekan faktor virulensi *R. solanacearum*, uji keefektifan pengendalian *R. solanacearum* *in planta*, dan identifikasi molekuler isolat bakteri potensial. Isolasi bakteri endofit berhasil dilakukan dari sampel pisang asal Bogor di tiga kecamatan, yaitu Cisarua, Dramaga, dan Jonggol yang terdiri atas lima jenis pisang masing-masing menghasilkan 152, 204, dan 130 isolat bakteri endofit. Uji lebih lanjut menggunakan *Chromobacterium violaceum* sebagai bioindikator menunjukkan lima isolat dengan aktivitas anti-QS. Deteksi gen *aiiA* dengan PCR menggunakan primer spesifik menunjukkan bahwa kelima isolat memiliki amplikon berukuran 753 pb dan telah dikonfirmasi melalui sekuensing sebagai gen *aiiA*. Kelima isolat bakteri tersebut CBP1, DBT17, DBT7, DBK2, dan CBN13 mampu menekan pembentukan ekstraseluler polisakarida (EPS) yang dihasilkan *R. solanacearum* dengan persentase penekanan masing-masing sebesar 75.67%, 90.81%, 87.67%, 92.72%, 81.08%, dan mampu menghambat gejala layu sebagai salah satu gejala penyakit darah pada tanaman pisang. Hasil peruntukan gen *aiiA* menunjukkan bahwa kelima isolat homolog dengan *Bacillus cereus*, *B. thuringiensis*, *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*.

Kata kunci: *autoinducer*, ekstraseluler polisakarida, gen virulensi, *quorum sensing*, *Ralstonia solanacearum*

ABSTRACT

Blood disease is an important disease in banana that caused 100% yield loss. The *Ralstonia solanacearum* Phylotype IV as the causal agent for this disease express their virulence genes through quorum sensing (QS) mechanism by using acylated homoserine lactone (AHL) as autoinducer. AHL-lactonase enzyme is produced by bacteria, and its potential as biocontrol agents performed through

*Alamat penulis korespondensi: Departemen Proteksi Tanaman, Fakultas Pertanian, Institut Pertanian Bogor
Jalan Kamper, Kampus IPB Dramaga, Bogor 16680.
Tel: +62 251 8629364, Faks: +62 251 8629364, Surel: giyanto@apps.ipb.ac.id.

anti-QS. This research was aimed to obtain endophytic bacteria isolates producing AHL lactonase for controlling *R. solanacearum* in banana plants. The research stages include isolation and selection of endophytic bacteria from banana plant as producer of AHL lactonase by using bioassay and molecular, the effectiveness testing of the bacterial isolates in suppressing *R. solanacearum* pathogenic virulence factors, *in planta* testing for controlling *R. solanacearum*, and molecular identification of potential bacterial isolates. We successfully explored endophytic bacteria from low-, medium-, and up-land consisted several varieties of banana, resulting 152, 204, and 130 isolates, respectively. Further selection using bioindicator showed five isolates with anti quorum sensing activity against *Chromobacterium violaceum*. Detection of *aiiA* gene by polymerase chain reaction using specific primer indicated all of five isolates AHL degradation activity resulted 753 bp amplicon that has been identified as *aiiA* gene. These isolates (CBP1, DBT17, DBT7, DBK2, and CBN13) were able to suppress the formation of extracellular polysaccharide (EPS) produced by *R. solanacearum* with suppression level of 75.67%, 90.81%, 87.67%, 92.72%, 81.08%, and were able to inhibit wilt symptom in banana plant. Nucleotide sequences of *aiiA* gene of these five isolates has homology with *aiiA* genes from *Bacillus cereus*, *B. thuringiensis*, *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*.

Keywords: autoinducer, extracellular polysaccharide, quorum sensing, *Ralstonia solanacearum*, virulence gene

PENDAHULUAN

Ralstonia solanacearum Phylotype IV merupakan penyebab penyakit darah yang menginfeksi tanaman pisang di Indonesia. Penyakit ini dapat menurunkan produksi pisang sampai 100% karena menyebabkan busuk pada buah, layu pada daun yang akhirnya daun patah menggantung, dan buah yang tidak dapat dikonsumsi (Edy *et al.* 2008).

Ralstonia solanacearum diketahui mengeskpresikan ekstraseluler polisakarida (EPS) sebagai faktor virulensi melalui sistem *quorum sensing* (QS) dengan melibatkan protein PhcS/PhcR dalam transduksi sinyal (Garg *et al.* 2000). QS merupakan mekanisme komunikasi antara sel bakteri sebagai suatu regulasi ekspresi gen tertentu dengan memproduksi molekul sinyal *N-acyl homoserine lactone* (AHL).

Salah satu upaya pengendalian bakteri patogen tumbuhan adalah pemanfaatan antibiotik. Namun, senyawa yang terkandung dalam antibiotik memberikan tekanan genetik yang tinggi terhadap bakteri sasaran sehingga mudah memicu resistensi (White dan Finan 2009). Sebagai alternatif, cara pengendalian yang aman terhadap lingkungan dengan menggunakan agens hayati bakteri endofit penghasil AHL laktonase yang dapat mengganggu sistem QS yang berimplikasi pada ketidakmampuan patogen mengekspresikan faktor virulensinya

tanpa memengaruhi pertumbuhan bakteri tersebut.

Degradasi molekul sinyal AHL oleh enzim AHL laktonase merupakan cara yang efektif dalam menghambat proses QS. Pemanfaatan bakteri penghasil enzim AHL laktonase dalam mendegradasi AHL untuk menekan virulensi patogen di antaranya *Erwinia carotovora*, *Pseudomonas aureginosa*, dan *Aeromonas hydrophila* (Chen *et al.* 2010; Yin *et al.* 2010). AHL laktonase merupakan *metallo-beta-lactamase* (*metalloenzyme*) yang menonaktifkan AHL dengan mendegradasi ikatan cincin ester lakton pada AHL sehingga dapat mencegah pengenalan oleh protein regulator yang terlibat dalam mekanisme QS (Liu *et al.* 2008).

Penggunaan bakteri endofit penghasil AHL laktonase dapat direkomendasikan sebagai alternatif pengendalian *R. solanacearum* karena tidak menimbulkan resistensi seperti pada penggunaan antibiotik. Bakteri *Bacillus cereus* dan *B. thuringiensis* telah dilaporkan dapat menghasilkan enzim pendegradasi AHL (Chan *et al.* 2007). Namun, belum banyak laporan mengenai bakteri endofit penghasil AHL laktonase pada tanaman pisang dan keefektifannya sebagai agens hayati dalam menekan virulensi *R. solanacearum*. Penelitian ini bertujuan mendapatkan isolat bakteri endofit asal tanaman pisang yang menghasilkan AHL-laktonase untuk pengendalian penyakit

darah yang disebabkan oleh *R. solanacearum* pada tanaman pisang.

BAHAN DAN METODE

Isolasi dan Skrining Bakteri Endofit Penghasil AHL Laktonase

Isolasi Bakteri Endofit Penghasil AHL Laktonase. Bakteri endofit penghasil AHL laktonase diisolasi dari akar dan batang beberapa jenis tanaman pisang sehat di daerah Dramaga, Cisarua, dan Jonggol. Sterilisasi permukaan dilakukan berdasarkan metode Munif *et al.* (2012) yang telah dimodifikasi. Akar dan batang pisang dibersihkan dan dikeringkan menggunakan tisu, selanjutnya ditimbang sebanyak 1 g. Sterilisasi permukaan akar dan batang dilakukan dengan merendam akar dan batang pisang dalam alkohol 70% selama 1 menit, natrium hipoklorit 3% + Tween 20 0.05% selama 5 menit, dan dibilas dengan akuades sebanyak 3 kali.

Isolasi bakteri endofit dilakukan menurut metode Hallmann *et al.* (1997) menggunakan medium agar nutrisi (AN) untuk mendapatkan beberapa isolat bakteri yang berbeda. Batang dan akar disterilisasi permukaan dengan NaOCl 1% selama 2 menit, dilanjutkan dengan perendaman pada etanol 70% selama 1 menit dan dibilas dengan air steril 3 kali, kemudian digerus menggunakan mortar steril lalu ditambahkan 9 mL larutan fisiologi (NaCl 0.85%). Suspensi diencerkan secara berseri dan sebanyak 0.1 mL suspensi hasil pengenceran disebar pada medium AN dan diinkubasi pada suhu ruang. Koloni bakteri yang tumbuh digoreskan kembali pada medium yang sama dan disimpan sebagai isolat untuk pengujian lebih lanjut.

Uji Hipersensitivitas pada Daun Tembakau. Uji reaksi hipersensitif (HR) dilakukan pada daun tembakau sesuai metode (Schaad *et al.* 2001). Koloni tunggal bakteri endofit dibiakkan pada 3 mL medium kaldu nutrisi (KN) selama 24 jam pada inkubator bergoyang 100 rpm. Suspensi bakteri diinfiltrasikan pada daun tembakau. Reaksi hipersensitif diamati pada 24–48 jam setelah

inokulasi. Bakteri uji yang menunjukkan reaksi hipersensitif negatif digunakan untuk pengujian lanjut.

Uji Hemolisis pada Agar Darah. Isolat bakteri endofit yang menunjukkan hasil reaksi HR negatif digores pada medium agar darah (agar-agar 40 g L⁻¹, darah domba 70 mL L⁻¹) dan diinkubasikan pada suhu 37 °C selama 24–48 jam. Aktivitas hemolisis ditandai dengan pembentukan zona bening di sekitar koloni (Gerhardt *et al.* 1994). Isolat bakteri dengan aktivitas hemolisis negatif digunakan untuk pengujian selanjutnya.

Uji Aktivitas Anti-QS terhadap *Chromobacterium violaceum*. Pengujian ini dilakukan dengan metode *disc diffusion assay* dengan teknik *double layer culture plate* (Song *et al.* 2012) dengan modifikasi, yaitu 5 µL suspensi bakteri diteteskan pada kertas saring berdiameter 6 mm pada permukaan medium agar Luria yang sebelumnya telah disebarkan 100 µL suspensi *C. violaceum* 1% (v/v). Bakteri dengan aktivitas penghambatan QS ditandai dengan tidak adanya warna ungu di sekitar kertas saring digunakan untuk uji lanjut.

Deteksi Gen Penyandi AHL-Laktonase (*aiaA* gen). Deteksi gen AHL laktonase menggunakan teknik PCR guna mengamplifikasi gen *aiaA* dengan panjang 753 pb. Ekstraksi DNA bakteri endofit penghasil AHL laktonase dilakukan mengikuti metode standar (Sambrook dan Russel 2001). Amplifikasi gen *aiaA* menggunakan primer *forward aiaA1* (5'-ATG ACA GTAAAR AAR CTT TAT TTC-3') dan *reverse aiaA2* (5'-TCA CTA TAT ATA YTC MGG GAA CTC-3) (Pan *et al.* 2008). Komposisi PCR per reaksi meliputi: 1 µL primer *aiaA1* dan *aiaA2* konsentrasi 10 pmol, 12.5 µL PCR *ready mix* (Dream Taq 2X, Thermo Scientific), 9.5 µL air bebas nuklease, dan 2 µL DNA templat. Proses PCR dilakukan dengan tahapan denaturasi awal (95 °C, 5 menit) diikuti dengan 30 siklus denaturasi (94 °C, 1 menit), *annealing* (55 °C, 2 menit), *extension* (72 °C, 2 menit). Siklus diakhiri dengan ekstensi akhir (72 °C, 5 menit). Produk PCR dielektroforesis dalam gel agarosa 1% pada tegangan 75 volt

selama 45 menit. Visualisasi DNA dilakukan dengan UV *transilluminator* (Sambrook *et al.* 1989).

Uji Penekanan Ekspresi Virulensi *Ralstonia solanacearum* *in vitro*

Isolat *R. solanacearum* ditumbuhkan dalam 10 mL medium 523 cair (sukrosa 10 g L⁻¹, kasein hidrolisat 8 g L⁻¹, ekstrak khamir 4 g L⁻¹, K₂HPO₄ 2 g L⁻¹, MgSO₄·7H₂O 0.3 g L⁻¹) yang telah ditambahkan 1 mL supernatan bakteri endofit kemudian digoyang selama 24 jam. Sebanyak 2 mL suspensi dipindahkan ke tabung mikro untuk disentrifugasi pada suhu 4 °C dengan kecepatan 6000 rpm selama 20 menit. Supernatan dipindahkan ke tabung mikro baru dan ditambahkan etanol dingin (95%) 2× volume supernatan dan didiamkan satu malam, dan kemudian disentrifugasi kembali pada kecepatan 6000 rpm (4 °C, 20 menit). Supernatan dibuang dan pelet dikeringkan dalam oven (55 °C) dan ditimbang berat keringnya (Nudyanto dan Zubaidah 2015). Persentase penekanan ekspresi ekstraseluler polisakarida dihitung dengan rumus

$$\frac{a}{b} \times 100\%, \text{ dengan}$$

a, bobot ekstraseluler polisakarida yang dihasilkan *R. solanacearum* yang ditumbuhkan pada medium tanpa penambahan filtrat bakteri endofit; dan b, bobot ekstraseluler polisakarida yang dihasilkan *R. solanacearum* yang ditumbuhkan pada medium dengan penambahan filtrat bakteri endofit.

Uji Keefektifan Bakteri AHL-Laktonase sebagai Pengendali *Ralstonia solanacearum*

Pengujian ini disusun dalam rancangan acak lengkap dengan tiga ulangan dengan empat bibit pisang dalam setiap ulangan. Uji ini mengikuti metode Marwan *et al.* (2011) yang telah dimodifikasi. Bibit pisang 'Cavendish' hasil perbanyakan dengan kultur jaringan dari BIOTROP Bogor yang telah diaklimatisasi selama 2 bulan direndam dalam 200 mL suspensi bakteri endofit selama 6 jam. Tanaman kontrol direndam dalam akuades steril. Bibit ditanam dalam pot plastik (diameter 17 cm) dan dipelihara selama

9 minggu untuk proses kolonisasi bakteri endofit pada bibit pisang dan dilakukan pengamatan terhadap pertumbuhan tanaman (pertambahan tinggi dan jumlah daun tanaman). Setelah proses kolonisasi bakteri endofit, inokulasi *R. solanacearum* pada akar dilakukan dengan melukai akar tanaman pisang dengan pisau skalpel steril dan menyiramkan sebanyak 25 mL suspensi bakteri 10⁸–10⁹ cfu mL⁻¹ ke tanah. Pengamatan dilakukan dengan menghitung persentase insidensi penyakit darah menggunakan rumus

$$IP = \frac{n}{N} \times 100\%, \text{ dengan}$$

IP, insidensi penyakit darah (%); n, jumlah tanaman yang menunjukkan gejala penyakit darah pada perlakuan; dan N, jumlah tanaman yang diinokulasi dengan *R. solanacearum* pada perlakuan yang sama.

Data hasil pengamatan pertumbuhan tanaman, insidensi penyakit darah dianalisis ragam dan perlakuan yang berpengaruh nyata dilakukan uji lanjut Dunnett pada taraf 5%.

Identifikasi Bakteri Endofit Penghasil AHL-Laktonase Potensial Sebagai Agens Hayati

Identifikasi dilakukan secara molekuler dengan perunutan gen *aiiA*. Tahapan perunutan nukleotida mencakup isolasi DNA, amplifikasi gen *aiiA* dan sekuensing. Runutan nukleotida kemudian dibandingkan dengan database yang tersedia pada NCBI *GenBank Database* menggunakan BLAST. Nukleotida disejajarkan dengan perangkat lunak Clustal W pada program *Bioedit Sequence Alignment Editor* v 7.0.5.3.

HASIL

Isolat Bakteri Endofit Penghasil AHL-Laktonase

Keberadaan bakteri endofit terbanyak ditemukan pada daerah Dramaga sebanyak 204 isolat dari 5 jenis pisang (117 dari akar dan 87 dari batang) (Tabel 1). Bakteri endofit asal tanaman pisang lebih banyak diisolasi dari bagian akar dibandingkan bagian batang.

Pengujian reaksi hipersensitif pada tanaman tembakau diperoleh 351 isolat menunjukkan

Tabel 1 Isolat bakteri endofit dari berbagai daerah dan varietas tanaman pisang
(Table 1 Endophytic bacterial isolates from various regions and banana plant varieties)

Asal sampel (Sample origin)	Jenis pisang (Type of banana)	Jumlah isolat (Number of isolates)		Total isolat (Total isolates)	Kode isolat* (Isolate code)
		Akar (Root)	Batang (Stem)		
Jonggol	Ambon	18	14	32	JAA/JBA
	Kepok	16	8	24	JAK/JBK
	Nangka	15	13	28	JAN/JBN
	Raja	22	10	32	JAR/JBR
	Uli	19	17	36	JAU/JBU
Dramaga	Ambon	21	14	35	DAA/DBA
	Kepok	24	17	41	DAK/DBK
	Raja	29	19	48	DAR/DBR
	Tanduk	27	16	43	DAT/DBT
	Uli	16	21	37	DAU/DBU
Cisarua	Ambon	21	9	30	CAA/CBA
	Kepok	9	5	14	CAK/CBK
	Nangka	17	8	25	CAN/CBN
	Papan	16	12	28	CAP/CBP
	Uli	19	14	33	CAU/CBU
Total		289	197	486	

*Pemberian kode pada isolat berdasarkan daerah asal sampel tanaman, bagian tanaman, jenis tanaman.
(*The code given to the isolate is based on the sample's origin region, plant part, and plant type).

reaksi negatif yang ditandai dengan tidak adanya gejala nekrosis di sekitar daun yang diinjeksi bakteri endofit. Seluruh isolat tersebut diuji lanjut pada medium agar darah dan diperoleh 188 isolat menunjukkan reaksi hemolisis negatif. Dari 188 isolat yang telah diuji HR dan hemolisis, diperoleh 5 isolat bakteri yang memiliki aktivitas degradasi AHL yang diinduksikan pada *C. violaceum* ditandai dengan tidak terbentuk warna ungu di sekitar kertas saring atau koloni bakteri yang diduga menghasilkan AHL-laktonase. Untuk memastikan bahwa tidak terbentuknya warna ungu di sekitar kertas saring tersebut bukan sebagai hasil senyawa antibiosis yang dilepaskan bakteri endofit dan menekan pertumbuhan *C. violaceum*, maka dilakukan uji penekan pertumbuhan *C. violaceum* dengan filtrat bakteri endofit dan hasilnya menunjukkan bahwa filtrat tersebut tidak menekan pertumbuhan *C. violaceum* (Tabel 2).

Berdasarkan hasil uji di atas, terkonfirmasi bahwa pertumbuhan *C. violaceum* tidak

terganggu oleh keberadaan isolat bakteri endofit. Keberadaan bakteri endofit di sekitar *C. violaceum* yang menyekresikan AHL laktonase akan mendegradasi senyawa AHL yang dihasilkan oleh *C. violaceum* sehingga proses *quorum sensing* pada bakteri tersebut terganggu yang mengakibatkan ekspresi senyawa *violacein* yang menggunakan mekanisme *quorum sensing* juga terganggu. Proses ini disebut sebagai *quorum quenching*. Konfirmasi molekuler dengan deteksi gen *aiiA* sebagai pengkode AHL laktonase didapatkan bahwa lima isolat bakteri positif terdeteksi memiliki gen *aiiA* dengan ampikon 753 pb (Gambar 1).

Uji Penekanan Ekspresi Virulensi *Ralstonia solanacearum* *in vitro*

Lima isolat bakteri endofit penghasil AHL (CBP1, DBT17, DBT7, DBK2, dan CBN13) dapat menghambat produksi ekstraseluler polisakarida (EPS) yang dihasilkan oleh *R. solanacearum*. Kemampuan bakteri endofit penghasil AHL dalam menghambat produksi

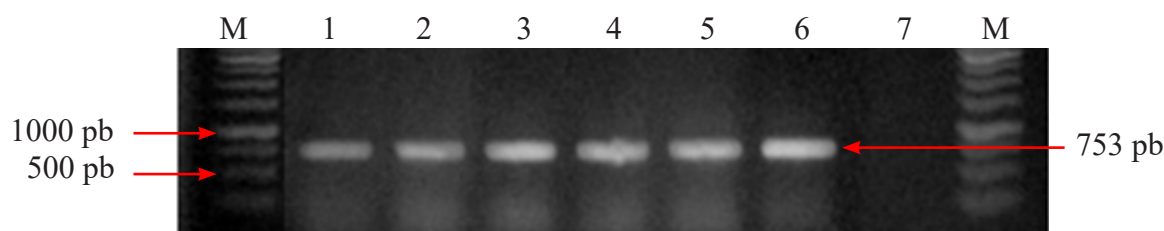
Tabel 2 Pengaruh penambahan filtrat beberapa bakteri endofit penghasil AHL laktonase terhadap potensi *quorum quenching* dan pertumbuhan *Chromobacterium violaceum*

(Table 2 The effect of adding filtrates from several AHL lactonase-producing endophytic bacteria on the *quorum quenching* potential and growth of *Chromobacterium violaceum*)

Isolat endofit ^a (<i>Endophytic isolate</i> ^a)	Potensi <i>quorum quenching</i> (<i>Quorum quenching potential</i>) (mm)	Pertumbuhan <i>Chromobacterium violaceum</i> (<i>Growth of Chromobacterium violaceum</i>) (OD ₆₀₀)
CBP1	9.3	0.51
DBT7	11.0	0.51
DBK2	11.3	0.53
DBT17	9.6	0.49
CBN13	8.3	0.48
Kontrol + (+ <i>Control</i>)	10.5	0.58

^aCBP1, isolat 1 asal pisang ‘Papan’ di Cisarua; DBT7, isolat asal pisang ‘Tanduk’ di Dramaga; DBK2, isolat 2 asal pisang ‘Kepok’ di Dramaga; DBT17, isolat 17 asal pisang ‘Tanduk’ di Dramaga; CBN13, isolat 13 asal pisang ‘Nangka’ di Cisarua.

(^aCBP1, isolate 1 from banana ‘Papan’ in Cisarua; DBT7, isolate from banana ‘Tanduk’ in Dramaga; DBK2, isolate 2 from banana ‘Kepok’ in Dramaga; DBT17, isolate 17 from banana ‘Tanduk’ in Dramaga; CBN13, isolate 13 from banana ‘Nangka’ in Cisarua).



Gambar 1 Visualisasi fragmen DNA pengkode gen *aiiA*. M, Penanda DNA 1 Kb; 1, kontrol positif (B37); 2 sampai 6, berturut-turut isolat CBN13, CBP1, DBT7, DBT17, DBK2; dan 7, kontrol negatif.

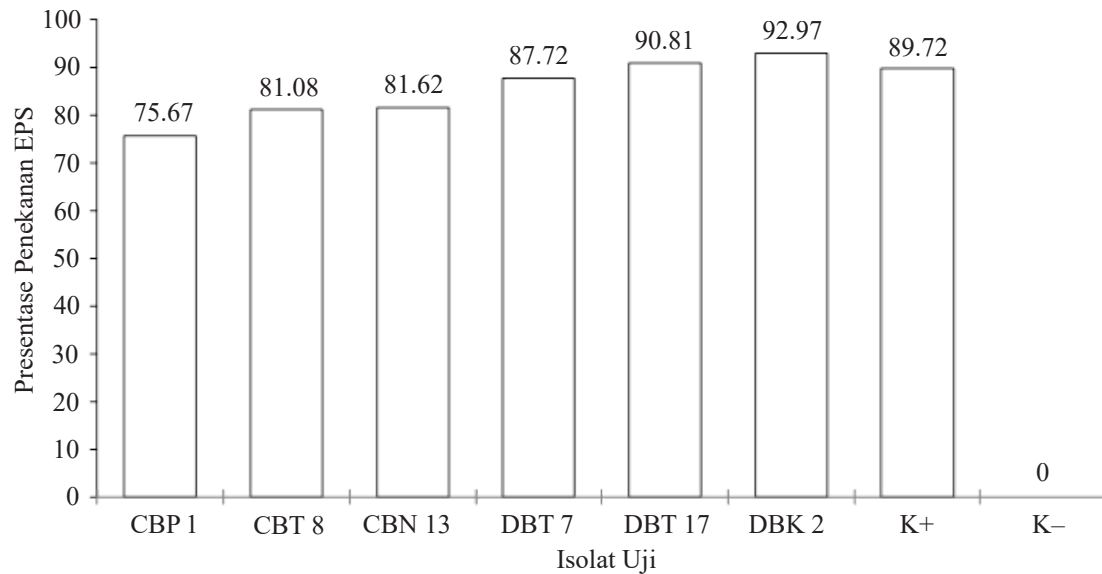
(Figure 1 Visualization of DNA fragments encoding the *aiiA* gene. M, 1 kb DNA marker; 1, positive control (B37); 2 to 6, isolates CBN13, CBP1, DBT7, DBT17, DBK2 respectively; and 7, negative control).

EPS sangat beragam. Persentase penghambatan EPS masing-masing sebesar 75.65%, 70.81%, 90.81%, 92.97%, dan 81.62% (Gambar 2). Nilai penekanan yang tinggi menunjukkan bakteri endofit tersebut mampu mencegah ekspresi faktor virulensi penting dari *R. solanacearum*, yaitu EPS yang diharapkan menjadi agens hayati efektif untuk pengendalian penyakit darah pada pisang.

Keefektifan Bakteri AHL-laktonase untuk Pengendalian *Ralstonia solanacearum* pada Bibit Pisang

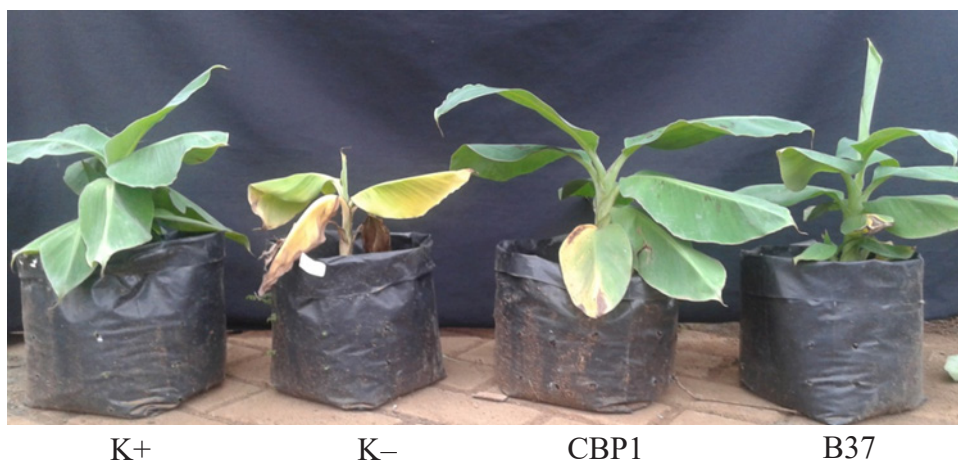
Gejala layu pisang pada kontrol negatif (bibit pisang tanpa perlakuan bakteri endofit dan diinokulasi dengan *R. solanacearum*) mulai terlihat pada hari ke 5, sedangkan pada

perlakuan inokulasi bakteri endofit penghasil AHL laktonase mulai terlihat pada hari ke-10. Aplikasi bakteri endofit penghasil AHL laktonase dapat menghambat timbulnya gejala penyakit layu. Hal ini diduga bahwa bakteri endofit penghasil AHL yang terdapat di dalam jaringan tanaman dapat menghambat pembentukan eksopolisakarida dari *R. solanacearum* pada saat melakukan infeksi pada tanaman pisang (Gambar 3). Inokulasi bakteri endofit penghasil AHL laktonase juga berpengaruh terhadap pertumbuhan tinggi dan jumlah daun tanaman pisang ‘Cavendish’. Hasil analisis data menunjukkan perlakuan bakteri endofit DBK2 berbeda nyata dengan isolat CBP1, CBN13, DBT7, DBT17, dan kontrol. Terlihat pada isolat DBK2 rata-rata tinggi tanaman dan



Gambar 2 Hasil uji penghambatan bakteri endofit penghasil AHL terhadap produksi eksopolisakarida oleh *Ralstonia solanacearum*.

(Figure 2 Inhibition test results of AHL-producing endophytic bacteria against exopolysaccharide production by *Ralstonia solanacearum*).



Gambar 3 Gejala penyakit darah (nekrosis pada daun) pada tanaman pisang 'Cavendish' setelah 5 hari inokulasi BDB. K+, tanpa perlakuan; K-, perlakuan BDB; CBP1, isolat uji; dan B37, kontrol bakteri penghasil AHL.

(Figure 3 Symptoms of blood disease (leaf necrosis) on 'Cavendish' banana plants 5 days after BDB inoculation. K+, no treatment; K-, BDB treatment; CBP1, test isolate; and B37, AHL-producing bacterial control).

jumlah daun tertinggi dibandingkan dengan isolat yang lain (Tabel 3).

Karakterisasi dan Identifikasi Bakteri AHL laktonase

Isolat bakteri CBP1, DBT7, DBT17, DBK2 memiliki bentuk koloni tidak beraturan, bentuk tepian bergerigi, koloni berwarna putih susu, sedangkan isolat CBN13 memiliki bentuk

koloni bulat, bentuk tepian rata, berwarna kuning. Ukuran koloni isolat bakteri berkisar antara 1.0 mm hingga 3.3 mm. Seluruh isolat bersifat Gram positif bentuk batang.

Hasil peruntukan gen *aiiA* kelima isolat bakteri yang disejajarkan dengan gen *aiiA* pada GenBank menggunakan BLAST-N menunjukkan bahwa isolat DBK2 dan DBT17 memiliki kemiripan tertinggi 99%

Tabel 3 Tinggi tanaman, jumlah daun dan insidensi penyakit tanaman pisang yang diberi perlakuan bakteri endofit penghasil AHL lactonase

(Table 3 Plant height, number of leaves, and disease incidence in banana plants treated with AHL lactonase-producing endophytic bacteria)

Isolat bakteri (Bacterial isolate)	Tinggi tanaman (Plant height) (cm)	Jumlah daun (Number of leaves)	Insidensi penyakit pada ... hari setelah inokulasi* (Disease incidence at ... days after inoculation*) (%)		
			5	10	15
CBP1	17.72 c	6.50 b	0.00 b	8.33 b	25.00 b
CBN 13	18.03 c	6.70 b	0.00 b	16.67 b	25.00 b
DBT 7	22.22 b	7.15 ab	0.00 b	16.67 b	16.67 b
DBT 17	21.52 b	7.41 ab	0.00 b	8.33 b	16.67 b
DBK 2	24.05 a	7.75 a	0.00 b	8.33 b	8.33 b
K ⁺ ^a	18.03 c	6.73 b	0.00 b	8.33 b	16.67 b
K ⁻ ^b	14.86 d	4.85 c	25.00 a	91.67 a	100.00 a

^aK⁺, Bibit pisang dengan perlakuan bakteri endofit; ^bK⁻, Bibit pisang tanpa perlakuan bakteri endofit. *Angka pada kolom yang sama yang diikuti huruf yang sama tidak berbeda nyata pada taraf 5%.

(^aK⁺, banana seedlings treated with endophytic bacteria; ^bK⁻, banana seedlings without endophytic bacterial treatment. *Numbers in the same column followed by the same letter are not significantly different at the 5% level).

dengan gen *aiiA* *B. cereus*, *B. thuringiensis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. subtilis*, dan *B. cereus*. Isolat CBP1 homologi 98% dengan gen *aiiA* *B. cereus*, *B. thuringiensis*, dan *B. subtilis*. Isolat DBT7 memiliki kemiripan 82% dengan *B. cereus*, *B. thuringiensis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. subtilis*, dan *B. cereus*. Isolat CBN13 memiliki homologi 96% dengan *B. cereus*, *B. thuringiensis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. subtilis*, dan *B. cereus*.

PEMBAHASAN

Ralstonia solanacearum akan menginvasi ruang interseluler tanaman dan menyebar keseluruh bagian tanaman lain melalui jaringan xilem. Populasi bakteri yang tinggi dan keberadaan EPS yang diproduksi oleh bakteri pada bagian interseluler jaringan tanaman akan menyebabkan terganggunya sistem pengangkutan air pada tanaman yang terinfeksi sehingga akan terjadi kelayuan secara cepat. *Ralstonia solanacearum* akan menggunakan sistem *quorum sensing* untuk mengekspresikan EPS setelah populasi bakteri mencapai kepadatan sel tertentu. Pada saat kepadatan populasi bakteri minimum telah terpenuhi bakteri akan mengekspresikan gen virulennya untuk menginfeksi tanaman dan

menyebabkan penyakit. Regulasi gen virulen sebagian dimediasi oleh *Phc cell density sensing system*. *Phc* menggunakan molekul sinyal (3-OH PAME) sebagai molekul sinyal yang meregulasi produksi *PhcA*. *PhcA* berperan penting dalam regulasi rantai sinyal kompleks yang mengaktifasi ekspresi dari beberapa gen yang mengodekan faktor virulen (EPS) yang berperan penting dalam infeksi tanaman oleh *R. solanacearum* (Garg *et al.* 2000).

Pada penelitian ini, bakteri endofit dipilih sebagai agens hayati karena infeksi terjadi pada pembuluh xilem tanaman pisang. Keberadaan bakteri endofit lebih banyak ditemukan pada jaringan akar dibandingkan dengan jaringan batang pisang, hal ini memungkinkan adanya adaptasi antara akar tanaman dengan bakteri rizosfer yang masuk mengolonisasi jaringan pada akar tanaman (Amir 2015).

Seleksi bakteri endofit meliputi pengujian HR pada daun tembakau untuk memisahkan bakteri yang bersifat patogen. Pengujian hemolisis pada agar darah untuk mengetahui bakteri tidak berpotensi patogen pada mamalia. Indikator yang digunakan dalam pengujian aktivitas AHL, yaitu bakteri *C. violaceum* karena lebih mudah diamati fenotipnya. Selain itu *C. violaceum* memberikan pigmentasi yang

lebih gelap sehingga lebih mudah diamati (McLean *et al.* 2004). Kemampuan lima isolat dalam mendegradasi AHL *C. violaceum* berbeda-beda. Hal ini sesuai dengan yang dikemukakan Chong *et al.* (2012) bahwa bakteri asal tanah rizosfer memiliki aktivitas degradasi AHL yang berbeda.

Bakteri yang memiliki aktivitas Anti-QS banyak diidentifikasi dari Gram positif (Ma *et al.* 2013). Secara morfologi lima isolat bakteri endofit penghasil AHL laktonase merupakan bakteri berbentuk batang. Gen *aiiA* lima isolat mempunyai kesamaan dengan runutan gen *aiiA* yang dimiliki *B. cereus*, *B. thuringiensis*, *B. subtilis*, *B. cereus*, dan *B. amyloliquefaciens* yang telah banyak dilaporkan sebagai bakteri penghasil AHL laktonase.

Lima isolat bakteri endofit penghasil AHL laktonase (CBP1, CBN13, DBT7, DBT17, dan DBK2) berpotensi menghambat gejala penyakit layu pada tanaman pisang sehingga penggunaan agens hayati bakteri endofit penghasil AHL laktonase dapat dijadikan sebagai salah satu cara untuk mengendalikan *R. solanacearum* dan menghambat virulensi tanpa memengaruhi pertumbuhan bakteri tersebut, serta tidak menimbulkan kerugian terhadap inangnya. Bakteri endofit penghasil AHL juga tidak berdampak negatif terhadap lingkungan. Selain itu keberadaan gen *aiiA* dapat digunakan sebagai material genetik pada tanaman yang tahan terhadap infeksi patogen. Gen *aiiA* dari *Bacillus* sp. telah dikloning ke tanaman tembakau dan kentang menjadi tanaman transgenik yang tahan penyakit (Dong *et al.* 2001). Penelitian lebih lanjut perlu dilakukan terkait aplikasi praktis di lapangan berkaitan dengan waktu dan metode aplikasi pada bibit pisang. Ekspresi dan purifikasi AHL laktonase melalui teknik kloning juga memerlukan penelitian lanjutan yang mendalam.

DAFTAR PUSTAKA

- Amir L. 2015. Isolasi dan karakterisasi bakteri endofit pada tanaman *Acacia decurrens* (J.C. Wendl.) Willd [tesis]. Bogor (ID): Institut Pertanian Bogor.
- Chan KG, Tiew SW, Ng CC. 2007. Rapid isolation method of soil bacilli and screening of their quorum quenching activity. *Asia-Pacific Journal of Molecular Biology and Biotechnology*. 15(3): 153–156.
- Chen R, Zhou Z, Cao Y, Bai Y, Yao B. 2010. High yield expression of an AHL-lactonase from *Bacillus* sp. B546 in *Pichia pastoris* and its application to reduce *Aeromonas hydrophila* mortality in aquaculture. *Microbial Cell Factories*. 9:39. DOI: <https://doi.org/10.1186/1475-2859-9-39>.
- Chong TM, Koh CL, Sam CK, Choo YM, Yin WF, Chan KG. 2012. Characterization of quorum sensing and quorum quenching soil bacteria isolated from Malaysian Tropical Montane Forest. *Sensors*. 12(4): 4846–4859. DOI: <https://doi.org/10.3390/s120404846>.
- Dong YH, Wang LH, Xu JL, Zhang HB, Zhang XF, Zhang LH. 2001. Quenching quorum-sensing-dependent bacterial infection by a *N*-acyl homoserine lactonase. *Nature*. 411:813–817. DOI: <https://doi.org/10.1038/35081101>.
- Edy NP, Johanis, Baharuddin. 2008. Karakterisasi morfologi patogenisitas dan biokimia bakteri penyebab penyakit darah pada pisang di Lembah Palu. *Jurnal Agrisains* 9(2):65–72.
- Garg RP, Yindeeeyoungyeon W, Gilis A, Denny TP, Van Der LD, Schell MA. 2000. Evidence that *Ralstonia eutropha* (*Alcaligenes eutrophus*) contains a functional homologue of the *Ralstonia solanacearum* Phc cell density sensing system. *Molecular microbiology*. 38(2): 359–367. DOI: <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2000.02131.x>.
- Gerhardt P, Murray RGE, Wood WA, Noel NR. 1994. *Methods for General and Molecular Bacteriology*. Washington DC (US): American Society for Microbiology.
- Hallmann J, Quadts-Hallmann A, Mahaffee WF, Kloepper JW. 1997. Bacterial endophytes in agricultural crops. *Canadian Journal of Microbiology*. 43(10):895–914. DOI: <https://doi.org/10.1139/m97-131>.

- Liu D, Momb J, Thomas PW, Moulin A, Petsko GA, Fast W, Ringe D. 2008. Mechanism of the quorum-quenching lactonase (AiiA) from *Bacillus thuringiensis*. 1. Product-Bound Structures. *Biochemistry*. 47(29): 7706–7714. DOI: <https://doi.org/10.1021/bi800368y>.
- Ma A, Lv D, Zhuang X, Zhuang G. 2013. Quorum quenching in culturable phyllosphere bacteria from tobacco. *International Journal of Molecular Sciences*. 14(7):14607–14619. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms140714607>.
- Marwan H, Sinaga MS, Giyanto, Nawangsih AA. 2011. Isolasi dan seleksi bakteri endofit untuk pengendalian penyakit darah pada tanaman pisang. *Jurnal Hama dan Penyakit Tumbuhan Tropika*. 11(2):113–121.
- McLean RJC, Pierson III LS, Fuqua C. 2004. A simple protocol for the identification of quorum signal antagonists. *Journal of Microbiological Methods*. 58(3): 351–360. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2004.04.016>.
- Munif A, Wiyono S, Auwarno. 2012. Isolasi bakteri endofit asal padi gogo dan potensinya sebagai agens biokontrol dan pemacu pertumbuhan. *Jurnal Fitopatologi Indonesia*. 8(3):57–64. DOI: <https://doi.org/10.14692/jfi.8.3.57>.
- Nudyanto A, Zubaidah E. 2015. Isolasi bakteri asam laktat penghasil eksopolisakarida dari kimchi. *Jurnal Pangan dan Agroindustri*. 3(2):743–748.
- Pan J, Huang T, Yao F, Huang Z, Powell CA, Qiu S, Guan X. 2008. Expression and characterization of *aiiA* gene from *Bacillus subtilis* BS-1. *Microbiological Research*. 163(6):711–716. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.micres.2007.12.002>.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. 1989. *Molecular cloning*. New York (US): Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sambrook J, Russell D. 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. New York (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Schaad NW, Jones JB, Chun W. 2001. *Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria*. Minnesota (MN): APS Press.
- Song C, Ma H, Zhao Q, Song S, Jia Z. 2012. Inhibition of quorum sensing activity by ethanol extract of *Scutellaria baicalensis* Georgi. *Journal of Plant Pathology and Microbiology*. 2012(7):1–4. DOI: <https://doi.org/10.4172/2157-7471.S7-001>.
- White CE, Finan TM. 2009. Quorum quenching in *Agrobacterium tumefaciens*: chance or necessity?. *Journal of Bacteriology*. 191(4):1123–1125. DOI: <https://doi.org/10.1128/JB.01681-08>.
- Yin XT, Xu L, Fan SS, Xu LN, Li DC, Liu ZY. 2010. Isolation and characterization of an AHL lactonase gene from *Bacillus amyloliquefaciens*. *World Journal of Microbiology Biotechnology*. 26(8): 1361–1367. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11274-010-0308-8>.