

EKSPLORASI BAKTERI ENDOFITIK DAN POTENSINYA DALAM PENGHAMBATAN JAMUR AKAR PUTIH (*RIGIDOPORUS MICROPORUS*)

Exploration of Endophytic Bacteria and Its Potency to Inhibit White Root Fungi (Rigidoporus microporus)

Budi SETYAWAN¹⁾, Intan BERLIAN dan Nur Eko PRASETYO

Balai Penelitian Getas, Pusat Penelitian Karet
Jalan Pattimura KM 6 Salatiga Jawa Tengah
Email: bud1se@yahoo.com

Diterima : 4 Agustus 2016 / Direvisi : 26 September 2016 / Disetujui : 25 Oktober 2016

Abstract

One of the control measures of white root disease which is promising to be developed in the future is biological control using microbial antagonists. Endophytic bacteria have been used to inhibit the growth of pathogens. Objective of this study were to explore and identify the endophytic bacteria from rubber and reveal its potency against R. microporus. Five bacterial strains with initial inhibition zone were isolated from endemic (strain A10, A14, A16) and non-endemic (strain GN1, GN2) areas of white root disease. Direct opposition test showed that isolate A10 has widest inhibition zone (0.3 cm) on 4 days after inoculation among isolates. Molecular identification based on 16S rRNA and gyrB gene sequences revealed that the selected isolate A10 belongs to the Bacillus cereus group. Protease enzyme activity on skim milk medium and the ability of gelatine liquefaction were demonstrated by B. cereus A10. Bacterial extracellular filtrate tested with paper disk method indicated a non-consistent inhibition zones on each concentration, there were no significant difference between treatments on 3 DAI. Further studies on B. cereus A10 needs to be reconsidered due to its weak antagonism against R. microporus, and its potency to be cause of the human disease.

Keywords: *Endophytic bacteria; White Root Disease; identification; inhibition; R. microporus*

Abstrak

Salah satu cara pengendalian jamur akar putih (JAP) yang memiliki potensi besar untuk dikembangkan di masa mendatang adalah secara biologi dengan memanfaatkan mikroba antagonis. Pada berbagai komoditas termasuk tanaman karet, bakteri endofitik antagonis telah dimanfaatkan untuk menghambat pertumbuhan patogen. Penelitian ini dilakukan untuk mengeksplorasi, mengidentifikasi bakteri endofitik dari tanaman karet serta menguji potensinya sebagai antagonis terhadap *Rigidoporus microporus*. Lima isolat berhasil diisolasi dari tanaman sehat di areal endemik JAP (isolat A10, A14, A16) dan areal non endemik JAP (isolat GN1, GN2). Uji oposisi langsung menunjukkan isolat A10 memiliki zona penghambatan terbesar (0,3 cm) pada 4 hari setelah inokulasi dibandingkan isolat lainnya. Identifikasi secara molekuler berdasarkan sekuens gen parsial 16S rRNA dan gen *gyrase* subunit B terhadap isolat A10 adalah *Bacillus cereus*. Aktivitas enzim protease ditunjukkan oleh isolat A10 pada medium *skim milk* dan kemampuannya mencairkan gelatin pada hari keenam setelah inokulasi. Kemampuan menghambat filtrat ekstraseluler yang diuji dengan metode *paper disk* belum menunjukkan zona penghambatan yang konsisten pada tiap konsentrasi filtrat ekstraseluler yang diberikan. Pada hari ketiga setelah inokulasi (HSI) tidak terdapat perbedaan nyata antar perlakuan. Pengujian

lebih lanjut terhadap *B. cereus* isolat A10 perlu dipertimbangkan kembali karena potensi antagonismenya yang masih lemah terhadap *R. microporus* dan adanya potensi lain sebagai penyebab penyakit bagi manusia.

Kata kunci: Bakteri endofit; Jamur Akar Putih; identifikasi; penghambatan; *R. microporus*

PENDAHULUAN

Penyakit Jamur Akar Putih (JAP) yang disebabkan oleh *Rigidoporus microporus* pada tahun 2014 mengakibatkan kerugian finansial yang dihitung secara nasional mencapai IDR 374 milyar dari luas serangan sekitar 87.599 Ha (Direktorat Jenderal Perkebunan [Ditjenbun], 2015). Upaya pengendalian yang dilakukan masih belum mampu mengatasi penyakit ini hingga tuntas dan membutuhkan asupan yang cukup besar sehingga tidak mampu diadopsi oleh masyarakat luas.

Salah satu cara pengendalian yang memiliki potensi untuk dikembangkan di masa mendatang yaitu dengan menggunakan agensia hayati. Pengendalian secara biologi ini memiliki banyak keuntungan, diantaranya ramah lingkungan, relatif murah, sesuai dengan konsep Pengendalian Hama Terpadu, terjaganya keseimbangan agro-ekosistem, dan mudah diaplikasikan baik di perkebunan besar maupun di tingkat petani. Agensia hayati yang paling banyak dimanfaatkan sebagai biofungisida saat ini adalah jamur dan bakteri. Di perkebunan karet, jamur adalah agensia hayati yang telah lama dikenal dengan potensinya sebagai biofungisida. Banyak jamur yang telah dijadikan sebagai biofungisida dan diproduksi secara komersial, salah satunya adalah *Trichoderma* spp. (Setyawan, Pawirosoemardjo, & Hadi, 2013). Sedangkan bakteri yang memiliki daur hidup relatif lebih cepat dan potensi besar untuk dikembangkan masih dalam tahap penelitian dan pengembangan. Salah satu jenis bakteri yang bersimbiosis dengan tanaman tersebut adalah bakteri endofitik (Kuklinsky-Sobral, Araujo, Mendes, Pizzirani-Kleiner, & Azevedo, 2005).

Upaya pencegahan dan pengendalian yang telah dilakukan untuk pengendalian JAP dimulai dengan tindakan pencegahan melalui pembongkaran tunggul dan pembersihan sisa-sisa akar tanaman sebelumnya, pengolahan tanah, penggunaan bibit bebas JAP, penanaman tanaman penutup tanah kacang, penaburan belerang hingga tindakan pengendalian dengan menggunakan fungisida kimia maupun fungisida hayati atau biofungisida (Sujatno & Pawirosoemardjo, 2001; Situmorang *et al.*, 2007). Fakta di lapangan menunjukkan bahwa upaya tersebut masih banyak mengalami kendala, terutama dalam teknis pelaksanaan dan biayanya. Penelitian ini perlu dilakukan untuk mengeksplorasi potensi pengendalian secara biologi yang selama ini dikenal relatif murah dan mudah dalam pelaksanaannya.

Banyak penelitian yang mengindikasikan bahwa bakteri endofitik ada di berbagai macam jaringan pada banyak spesies tanaman. Bakteri endofitik hampir ada di setiap spesies tanaman dan dapat memberikan dampak positif bagi tanaman, misalnya untuk bertahan dari serangan patogen maupun memacu pertumbuhan tanaman misalnya sebagai pemicu pertumbuhan tanaman (*plant growth-promoting bacteria*) (Rashid, Charles, & Glick, 2012). Penggunaan bakteri endofitik pada tanaman semusim telah terbukti dapat menurunkan intensitas penyakit tertentu pada tanaman. Pereira, Nesci, dan Etcheverry (2007) dalam penelitiannya menyebutkan bahwa dengan perlakuan benih pada jagung menggunakan bakteri *Bacillus amyloliquefaciens* atau *Microbacterium oleovorans* pada konsentrasi 10^9 cfu/mL dapat menurunkan jumlah propagul *Fusarium verticillioides* di dalam jaringan akar tanaman jagung. Tan *et al* (2015) telah berhasil mengisolasi bakteri endofitik dari tanaman karet yang menunjukkan potensi penghambatan hingga 70% terhadap penyakit layu *Fusarium* pada pisang.

Populasi bakteri endofitik yang berasal dari populasi epifit pada permukaan akar maupun permukaan daun yang diketahui mampu masuk ke dalam jaringan tanaman (endofit) dapat diinvestasikan ke

bibit dan bahan tanam. Ketika berada di dalam jaringan tanaman, bakteri endofitik akan menempati bagian tertentu pada jaringan tanaman atau secara sistemik melakukan kolonisasi. Mikroorganisme tersebut dapat hidup di dalam sel, di ruang antar sel, atau pada sistem jaringan angkut tanaman. Beberapa genus yang dilaporkan sebagai bakteri endofitik yang diisolasi dari berbagai jenis tanaman antara lain *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Pantoea*, *Acinetobacter*, *Agrobacterium*, *Serratia*, *Burkholderia*, *Curtobacterium* dan *Sphingomonas* (Li *et al.*, 2008; Ulrich *et al.*, 2008).

Penelitian ini dilakukan untuk mengeksplorasi dan mengidentifikasi isolat bakteri endofitik dari perakaran tanaman karet serta menguji potensinya sebagai antagonis terhadap *R. microporus*. Potensi antagonis diketahui dengan uji oposisi langsung, ada tidaknya aktivitas enzim protease dan kemampuan penghambatan oleh filtrat ekstraseluler isolat bakteri dengan metode *paper disk*.

BAHAN DAN METODE

Bahan tanaman yang digunakan dalam penelitian ini adalah sampel akar tanaman karet Tanaman Menghasilkan (TM) yang sehat di areal endemik JAP (fenotip pohon menyerupai tanaman *seedling*) di daerah Sikijang Mati, Riau, serta sampel akar tanaman karet sehat klon GT 1 di areal non endemik JAP, di Getas, Jawa Tengah. Bahan utama lainnya antara lain medium *Tryptic Soy Agar* (TSA), sodium hipoklorit teknis konsentrasi 1%, isolat *R. microporus* SU-1 asal isolat Sumatera Utara, *aquadest*, medium *skim milk*, dan medium untuk uji pencairan gelatin. Bahan yang digunakan untuk mengekstraksi DNA kromosom bakteri yaitu larutan penyangga Tris-EDTA (100:50 mM), *sodium dodecyl sulfate* (SDS) 10%, NaCl 5M, CTAB + NaCl solution, *chloroform isoamyl alcohol* 24:1 (CIAA), *phenol chloroform N isoamyl alcohol* (PCIAA), isopropanol, dan etanol 70%. Bahan yang dipergunakan dalam proses amplifikasi/PCR meliputi DNA *template*, *DreamTaq Green mastermix* (*Thermo Scientific*), *GoTaq Green Master Mix 2x* (*Promega*, USA), *nuclease free water*, primer yang dipergunakan untuk identifikasi bakteri berdasarkan gen parsial 16S rRNA yaitu 27F dan 1492R, primer yang

dipergunakan untuk identifikasi bakteri berdasarkan gen *gyrase* subunit B yaitu F-*gyrB* dan R-*gyrB*. Sedangkan bahan untuk visualisasi hasil PCR dengan elektroforesis yaitu agarosa, TBE 1x *buffer*, larutan *ethidium bromide* (EtBr), *loading buffer*, dan 100bp *DNA Ladder*.

Ekplorasi dan Pengujian Antagonisme secara In-Vitro

Isolasi dilakukan dari bagian akar tanaman karet. Studi ini dimulai dengan melakukan koleksi isolat serta penapisan secara *in vitro* terhadap kemampuan untuk menekan perkembangan penyakit.

Isolasi bakteri endofitik dilakukan dengan cara mengambil 0,5 g bagian tanaman, selanjutnya didisinfeksi permukaannya dengan 1% sodium hipoklorit selama satu menit, kemudian bagian tanaman tersebut dicuci dengan air steril 4-5 kali untuk menghilangkan sisa-sisa yang menempel. Bahan yang telah didisinfeksi digiling dengan mortar steril dalam 10 ml air steril. Larutan tersebut ditetaskan pada cawan petri sebanyak satu tetes dan ditambahkan media *Nutrient Agar* (NA) atau *Tryptic Soy Agar* (TSA) yang masih cair ($\pm 45^{\circ}\text{C}$). Untuk meratakan distribusi inokulum bakteri, petri digoyang-goyang perlahan dan searah, kemudian diinkubasikan pada suhu $30\pm 1^{\circ}\text{C}$ selama 24-48 jam (Joseph & Deka, 2007). Pemilihan media untuk pertumbuhan bakteri sangat penting karena memiliki pengaruh langsung terhadap jumlah dan jenis mikroorganisme yang dapat diisolasi dari jaringan akar. Untuk bakteri endofitik, pada umumnya menggunakan media TSA yang memiliki kisaran jenis bakteri cukup luas (Gardner *et al.*, 1982 dalam Hallmann *et al.*, 2006).

Kemampuan antagonisme isolat diketahui dengan uji oposisi langsung yang mengikuti metode Supriyanto, Priyatmojo, dan Arwiyanto (2011) yang dimodifikasi yaitu koloni jamur *R. microporus* yang telah dibor gabus dengan diameter $\pm 0,9$ cm kemudian diinokulasikan di tengah cawan petri yang telah berisi media TSA. Selanjutnya isolat bakteri yang diuji digoreskan pada empat sisi bagian tepi cawan petri dengan jarak 2,5 cm dari inokulum jamur. Inkubasi pada suhu kamar dilakukan sampai koloni jamur pada perlakuan kontrol memenuhi cawan petri.

Pengamatan dilakukan setiap hari dengan mengukur panjang pertumbuhan koloni jamur, yaitu dari tepi potongan inokulum awal *R. microporus* hingga ke ujung pertumbuhan koloni, serta zona penghambatan yang terbentuk.

Identifikasi Isolat Terpilih Berdasarkan Sekuens Gen 16S rRNA dan *gyrB*

Identifikasi secara molekuler dilakukan berdasarkan sekuens gen parsial 16S rRNA dan gen *gyrase* subunit B (*gyrB*). Aplikasi teknik molekuler untuk menganalisa keragaman mikroba, seperti analisis gen 16s-rRNA dengan *polymerase chain reaction* (PCR) mampu menampilkan keragaman genetika mikroba, baik yang dapat dikulturkan maupun tidak. Gen 16s rRNA merupakan pilihan karena gen ini terdapat pada semua prokariot dan memiliki bagian atau sekuen konservatif serta sekuen lainnya yang sangat bervariasi. Penggunaan gen parsial 16S rRNA masih cukup akurat dan cepat untuk mengetahui hubungan filogenetik bakteri dan keragaman komunitas mikrobia, sedangkan gen *gyrB* digunakan untuk membedakan hubungan antar spesies yang memiliki kekerabatan cukup dekat (Yin *et al.*, 2008).

1. Ekstraksi DNA

Salah satu isolat bakteri dipilih *single colony* dari bakteri tersebut dan ditumbuhkan pada media *Tryptic Soy Broth* (TSB) dengan inkubasi menggunakan *shaker* selama \pm 24-48 jam. Selanjutnya ekstraksi DNA dilakukan sesuai dengan Nishiguchi *et al.* (2002) tanpa menggunakan larutan proteinase K. Pelet DNA diresuspensi dengan TE *buffer* sebanyak 20-40 μ L dan disimpan pada -20°C.

2. Amplifikasi PCR 16S rRNA dan *gyrB*

Bakteri diidentifikasi berdasarkan gen parsial 16S rRNA dan *gyrB*. Proses identifikasi diawali dengan amplifikasi gen parsial 16S rRNA dengan PCR menggunakan urutan basa primer 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') dan primer 1492R (5'-TACGGYTACCTTGTACGACTT-3'). Primer 27F dan 1492R menghasilkan ampikon gen parsial 16S rRNA bakteri berukuran \pm 1.475

bp. Komposisi campuran PCR untuk mengamplifikasi gen parsial 16S rRNA adalah GoTaq Green Master Mix sebanyak 25 μ l, suspensi DNA sebanyak 5 μ l, primer 27F sebanyak 3 μ l, primer 1492R 3 μ l dan *nuclease free water* 14 μ l sehingga volume akhir suspensi adalah 50 μ l. PCR dilakukan menggunakan *Thermal cycler* dengan pengaturan denaturasi awal DNA cetakan 94°C selama 2 menit, diikuti dengan 34 siklus yang terdiri atas denaturasi (15 detik pada suhu 94°C), *annealing* (30 detik pada suhu 57°C), *extension* (30 detik pada suhu 68°C), dan pada akhir siklus, *final extension* pada suhu 72°C selama 5 menit.

Selanjutnya amplifikasi gen *gyrase* B dengan PCR menggunakan primer F-*gyrB* (5'-CCCAAGCTTAAGTGCCTGGGAAATY-3') dan R-*gyrB* (5'-CGGAATTCGGATCCACRTCGGCRTCB-3'). Untuk amplifikasi gen *gyrB* mengikuti prosedur Yamamoto dan Harayama (1995). DNA hasil amplifikasi berukuran \pm 1.335 bp divisualisasi dengan elektroforesis pada 1% gel agarose (Sigma) (b/v) dalam 1x TBE *buffer* dengan 100 bp dan 1 kb DNA ladder.

3. Analisis data hasil sekuensing

Sekuensing dilakukan dengan mengirim hasil PCR ke perusahaan 1st BASE Malaysia. Hasil PCR dimasukkan ke dalam tabung ependorf kemudian diberi parafilm pada tutupnya. *Tube* yang berisi hasil PCR diletakkan di atas stereofom, kemudian dikemas dalam *ice box*, dan dikirimkan ke perusahaan 1st BASE Malaysia. Sekuensing bertujuan untuk mengetahui urutan basa DNA isolat bakteri yang akan digunakan untuk melihat dan menentukan kekerabatan spesies isolat bakteri dengan basis data (*database*) bakteri yang ada pada *GeneBank*. Hasil sekuensing kromosom DNA bakteri yang diperoleh, dianalisis dan dibandingkan dengan basis data yang ada pada NCBI menggunakan Program BLAST untuk mengetahui homologi sekuens isolat bakteri tersebut dengan spesies bakteri lainnya. Selanjutnya dilakukan analisis hubungan similaritas dan filogenetik bakteri hasil sekuensing menggunakan program Software Mega 5. Setelah itu digunakan Program TreeView pada Mega 5 untuk memperoleh gambaran pohon filogenetik bakteri teridentifikasi.

Pengujian Aktivitas Enzim Protease

1. Uji dalam medium *skim milk*

Pengujian ini dilakukan dengan menggunakan medium *skim milk* mengikuti Setyawan (2014) yang terdiri dari K_2HPO_4 (0,7 g/L), KH_2PO_4 (0,3 g/L), $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (0,5 g/L), $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ (0,01 g/L), $ZnSO_4$ (0,001 g/L), agar (15-20 g/L), dan *skim milk* (2,5 g/L). Isolat bakteri berumur 48 jam digoreskan pada medium uji kemudian diinkubasikan pada suhu kamar selama 24-48 jam. Aktivitas enzim protease yang terjadi ditunjukkan dengan munculnya zona bening atau halo disekitar koloni bakteri.

2. Uji pencairan gelatin

Pengujian ini dilakukan mengikuti metode Chakraborty, Mahapatra, dan Roy (2011), yaitu dengan menusukkan jarum ose yang telah dicelupkan ke dalam suspensi bakteri uji pada medium gelatin dalam tabung reaksi. Medium gelatin yang digunakan terdiri dari *beef extract* (3 g/L), *peptone* (5 g/L) dan gelatin (120 g/L). Media gelatin yang telah diinokulasi, diinkubasikan pada suhu 25°C dan dilakukan pengamatan setiap 2 hari sekali selama 14 hari. Pada saat pengamatan, tabung perlakuan dan tabung kontrol dimasukkan ke dalam lemari es yang bersuhu 4°C selama 30 menit hingga tabung kontrol yang ditusuk dengan air steril membeku. Aktivitas proteolitik isolat yang diuji ditunjukkan dengan mencairnya gelatin setelah dimasukkan ke dalam lemari es.

Pengujian Antagonisme Ekstraseluler dengan Metode Cakram Kertas Saring (*Filter Paper Disk*)

Filtrat isolat bakteri yang diuji dipersiapkan dengan ditumbuhkan terlebih dahulu pada medium *Tryptic Soy Broth* (TSB) selama 48 jam kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm selama 2 menit dan filtrat yang diperoleh disaring menggunakan kertas filter dengan kerapatan 0,22 μm . Selanjutnya filtrat dapat langsung digunakan atau disimpan pada suhu -20°C. Pengujian dilakukan dengan menggunakan medium TSA dalam cawan

petri. Setelah medium mengeras, potongan koloni jamur akar putih berdiameter 0,9 cm diletakkan di tengah petri. Selanjutnya 4 cakram kertas saring steril berdiameter 0,6 cm diletakkan di dalam petri dengan jarak 2 cm antara *paper disk* dan inokulum JAP. Pada setiap *paper disk* ditetesi dengan 20 μl filtrat bakteri dengan berbagai konsentrasi filtrat, yaitu 100%, 75%, 50% dan 25% filtrat bakteri dalam air steril. Setiap perlakuan diberikan ulangan 3 cawan petri. Sebagai kontrol, *paper disk* ditetesi dengan 20 μl air steril. Inkubasi dilakukan pada suhu kamar dan pengamatan zona penghambatan dilakukan setiap hari hingga koloni JAP dengan perlakuan kontrol memenuhi cawan petri.

Rancangan Percobaan dan Analisa Data

Rancangan percobaan dilakukan dengan Rancangan Acak Lengkap (RAL), masing-masing 3 ulangan setiap perlakuan. Data hasil pengujian dianalisis dengan *one way anova* dan diuji lanjut menggunakan *Duncan Multiple Range Test* pada taraf 5% dalam Program *Statistical Analysis System* (SAS).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Ekplorasi dan Pengujian Antagonisme secara *In-Vitro*

Ekplorasi yang dilakukan dari bagian akar tanaman karet sehat diperoleh 5 isolat bakteri endofitik, yaitu 3 isolat berasal dari areal endemik jamur akar putih (A10, A14 dan A16) dan 2 isolat berasal dari daerah non endemik (GN1 dan GN2). Isolat tersebut menunjukkan respon antagonis terhadap JAP yang sama pada hari keempat setelah inokulasi, kecuali isolat A10 yang memiliki zona penghambatan 0,3 cm (Tabel 1).

Pengamatan juga dilakukan terhadap pertumbuhan miselium *R. microporus* hingga 3 hari setelah inokulasi karena pada pengamatan hari ke-4 sebagian perlakuan dan kontrol telah memenuhi cawan petri. Pertumbuhan miselium *R. microporus* terlihat paling lambat pada perlakuan isolat A10 yang tidak berbeda nyata dengan isolat A14 dan A16 (Tabel 2).

Tabel 1. Zona penghambatan beberapa isolat bakteri endofitik dengan uji oposisi langsung terhadap jamur akar putih *R. microporus* pada medium TSA
 Table 1. The direct inhibition zone of bacterial isolates against *R. microporus* on TSA medium

Isolat <i>Isolate</i>	Rerata zona penghambatan <i>Inhibition zone</i> (cm)		
	2 HSI 2 DAI	3 HSI 3 DAI	4 HSI 4 DAI
A10	0,8 a	0,4 a	0,3 a
A14	0,3 b	0,1 bc	0,0 b
A16	0,4 b	0,2 b	0,0 b
GN1	0,3 b	0,0 c	0,0 b
GN2	0,6 a	0,0 c	0,0 b
Kontrol	0,0 c	0,0 c	0,0 b

Keterangan (*Remarks*):

1. Angka yang diikuti huruf yang sama dalam satu kolom tidak berbeda nyata berdasarkan uji *Duncan Multiple Range Test* pada tingkat kepercayaan 95% (*Figures followed by the same letter in the same column indicates no significant difference based on DMRT at 95% level*)
2. HSI = Hari Setelah Inokulasi (*DAI = Days After Inoculation*)

Tabel 2. Pertumbuhan koloni jamur akar putih *R. microporus* dengan uji oposisi langsung beberapa isolat bakteri endofitik pada medium TSA
 Table 2. *R. microporus* culture growth on direct opposition test to several bacterial isolates on TSA medium.

Isolat <i>Isolate</i>	Pertumbuhan koloni jamur <i>Fungal colony growth</i> (cm)	
	2 HSI 2 DAI	3 HSI 3 DAI
A10	1,7 cd	2,2 d
A14	2,2 b	2,2 d
A16	1,9 bc	2,2 d
GN1	2,0 bc	2,4 c
GN2	1,7 d	2,8 b
Kontrol	2,7 a	4,2 a

Keterangan (*Remarks*):

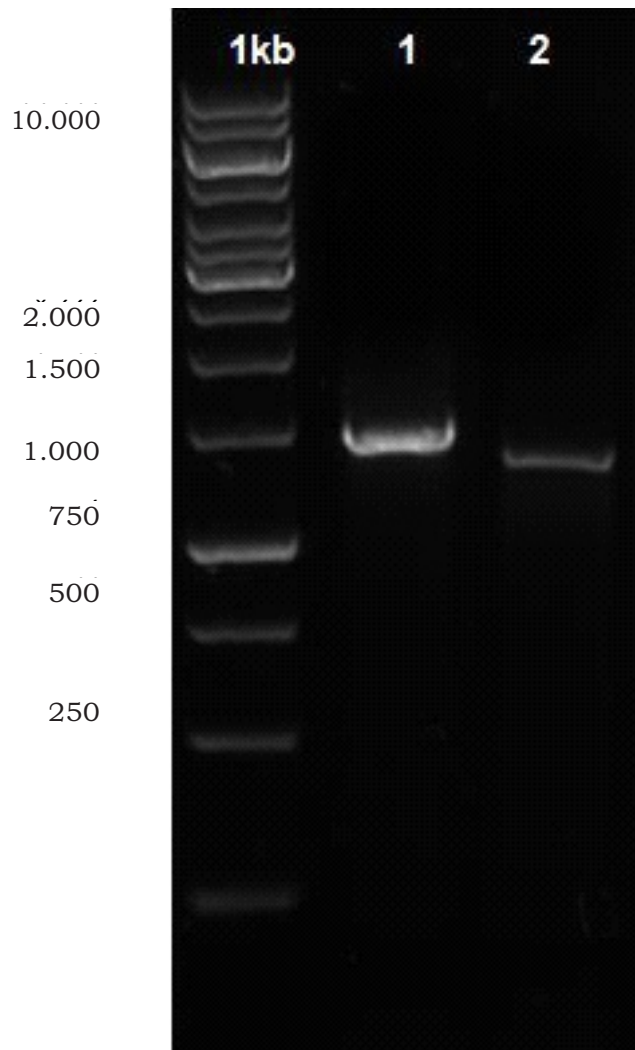
1. Angka yang diikuti huruf yang sama dalam satu kolom tidak berbeda nyata berdasarkan uji *Duncan Multiple Range Test* pada tingkat kepercayaan 95% (*Figures followed by the same letter in the same column indicates no significant difference based on DMRT at 95% level*)
2. HSI = Hari Setelah Inokulasi (*DAI = Days After Inoculation*)

Identifikasi Berdasarkan Sekuens Gen 16S rRNA dan *gyrB*

Identifikasi secara molekuler dilakukan terhadap isolat A10 yang mewakili isolat bakteri endofitik berasal dari tanaman sehat di areal endemik jamur akar putih. Identifikasi dilakukan berdasarkan sekuens gen 16S rRNA dan *gyrase* B. Hasil PCR menggunakan urutan basa primer 16S rRNA 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') dan 1492R (5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3'), dan primer *gyrase* B, yaitu F-*gyrB* (5'-

CCCAAGCTTAACTGCACTGGGAAATY-3') dan R-*gyrB* (5'-CGGAATTCGGATCCACRTCGGCRTCB-3') menunjukkan bahwa DNA isolat A10 mampu teramplifikasi menggunakan primer 16S rRNA dengan panjang basa ±1.475bp dan menggunakan primer *gyrB* pada ±1.335bp. Visualisasi hasil PCR gen 16S rRNA dan *GyrB* yang menggunakan gel agarosa 1% dibawah UV Transluminator dapat dilihat pada Gambar 1.

Produk PCR dengan kedua primer tersebut selanjutnya disekuensing untuk



Gambar 1. Visualisasi hasil PCR isolat A10 menggunakan primer 16S rRNA dan *gyrB*.
Figure 1. Agarose gel electrophoresis of PCR product based on 16S rRNA and *gyrB* gene of isolate A10.

Keterangan (Remarks):

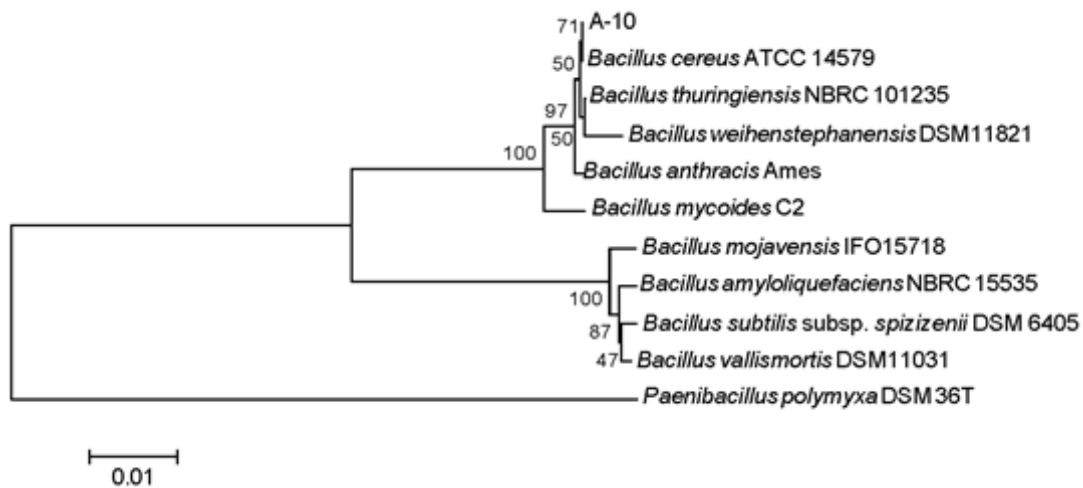
1. 1 kb = marker (1 kb = marker)
2. 1 = 16S rRNA ± 1.475bp (1 = 16S rRNA ± 1.475bp)
3. 2 = *gyrB* ± 1.335bp (2 = *gyrB* ± 1.335bp)

mengetahui urutan basa DNA isolat bakteri, dalam hal ini isolat A10, yang akan digunakan untuk menentukan hubungan kekerabatan spesies isolat bakteri dengan database DNA bakteri yang berada di *GeneBank*. Hasil sekuensing DNA bakteri dianalisis dan dibandingkan dengan database yang ada pada NCBI menggunakan program BLAST untuk mengetahui homologinya terhadap spesies bakteri lainnya. Homologi sekuens isolat A10 berdasarkan gen 16S rRNA dapat dilihat pada Tabel 3.

Berdasarkan sekuens gen 16S rRNA, isolat A10 termasuk atau mirip dengan isolat *Bacillus cereus* ATCC 14579 dengan homologi 99,93%. Selanjutnya dilakukan analisis hubungan similaritas dan filogenetik bakteri *Bacillus* spp. (isolat A10) hasil sekuensing dengan menggunakan Program Mega 5. Hasil analisis hubungan filogenetik bakteri *Bacillus* spp. berdasarkan gen 16S rRNA dapat dilihat pada Gambar 2.

Tabel 3. Homologi sekuens gen 16S rRNA isolat A10 dengan menggunakan Program BLAST
 Table 3. 16S rRNA gene sequence similarity of isolate A10 using BLAST Program

No.	Isolat Isolate	Homologi Homology (%)	Kode akses Accession code
1	<i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579*	99,93	NR_074540
2	<i>Bacillus thuringiensis</i> NBRC 101235*	99,85	AB426479
3	<i>Bacillus anthracis</i> Ames	99,78	NR_074453
4	<i>Bacillus weihenstephanensis</i> DSM11821*	99,49	NR_024697
5	<i>Bacillus mycooides</i> C2	99,49	AY373357
6	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>spizizenii</i> DSM 6405	94,34	DQ195067
7	<i>Bacillus mojavensis</i> IFO15718*	94,27	NR_024693
8	<i>Bacillus vallismortis</i> DSM11031*	94,27	NR_024696
9	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> NBRC 15535*	94,20	NR_041455
10	<i>Paenibacillus polymyxa</i> DSM 36T*	87,51	HG324077



Gambar 2. Hasil analisis hubungan filogenetik sekuens bakteri *Bacillus* spp. dan isolat A10 berdasarkan gen 16S rRNA. Isolat A10 menjadi satu kelompok dengan *Bacillus cereus* ATCC 14579.

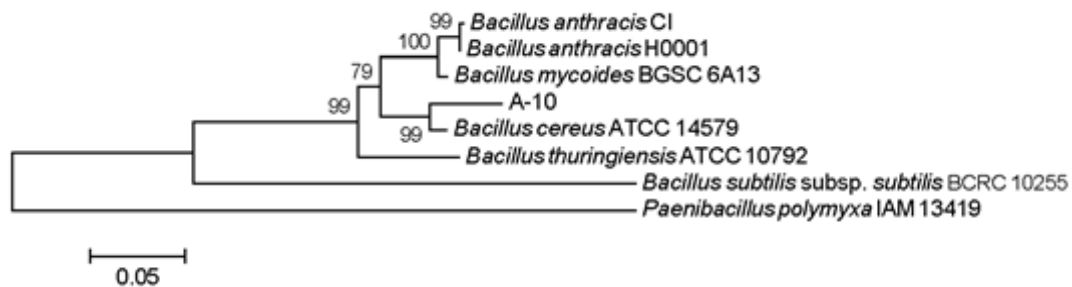
Figure 2. The phylogenetic tree based on 16S rRNA gene of *Bacillus* spp. included the isolates of A10. Isolate A10 was grouped and closely related to *Bacillus cereus* ATCC 14579.

Hasil analisis filogenetik sekuens gen 16S rRNA bakteri isolat A10 memiliki hubungan kekerabatan yang dekat dengan spesies bakteri *Bacillus cereus* ATCC 14579. Hal ini menunjukkan bahwa pada sekuens bakteri A10 berdasar gen 16S rRNA cukup konsisten sebagai *Bacillus cereus* baik berdasarkan homologi maupun dengan analisis filogenetik. Selanjutnya homologi sekuens bakteri *Bacillus* spp. atau isolat A10 juga dianalisis berdasarkan sekuens gen *gyrB*. Secara lengkap nilai homologinya dapat dilihat seperti pada Tabel 4.

Sekuens bakteri isolat A10 berdasarkan gen DNA *gyrase* subunit B masih menunjukkan hasil yang sama dengan sekuens berdasarkan gen 16S rRNA. Isolat A10 termasuk atau mirip dengan isolat *Bacillus cereus* ATCC 14579 dengan homologi 92,34%. Selanjutnya dilakukan analisis hubungan similaritas dan hubungan filogenetik bakteri *Bacillus* spp. hasil sekuensing tersebut menggunakan Program *Mega 5*. Menurut analisis hubungan filogenetik ini, sekuens bakteri *Bacillus* spp. berdasarkan gen *gyrB* juga memiliki hubungan kekerabatan yang dekat dengan *Bacillus cereus* ATCC 14579 seperti tampak pada Gambar 3.

Tabel 4. Homologi sekuens gen *gyrB* isolat A10 menggunakan Program BLAST
 Table 4. *GyrB* gene sequence similarity of isolate A10 using BLAST Program

No	Isolat Isolate	Homologi Homology (%)	Kode akses Accession No.
1	<i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579*	92,34	AB014101
2	<i>Bacillus mycooides</i> BGSC 6A13	86,51	EF210250
3	<i>Bacillus anthracis</i> CI	86,43	DQ497181
4	<i>Bacillus anthracis</i> H0001	85,64	AB190227
5	<i>Bacillus thuringiensis</i> ATCC 10792*	83,17	FR850503
6	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i> BCRC 10255*	67,03	DQ309293
7	<i>Paenibacillus polymyxa</i> IAM 13419*	58,33	AB464839



Gambar 3. Hasil analisis hubungan filogenetik sekuens bakteri *Bacillus* spp. dan isolat A10 berdasarkan gen *GyrB*. Isolat A10 menjadi satu kelompok dengan *Bacillus cereus* ATCC 14579.

Figure 3. The phylogenetic tree based on *gyrB* gene of *Bacillus* spp. included the isolates of A10. Isolate A10 was grouped and closely related to *Bacillus cereus* ATCC 14579.

Berdasarkan analisis filogenetik gen 16S rRNA dan *gyrase* sub unit B, isolat A10 termasuk satu kelompok dengan bakteri *Bacillus cereus*. Berbeda dengan hasil pengujian reaksi gram dengan KOH 3% yang menunjukkan bahwa isolat A10 termasuk gram negatif, *Bacillus cereus* pada umumnya termasuk bakteri gram positif (Senesi & Ghelardi, 2010; Tallent *et al.*, 2012). *B. cereus* tersebar luas pada berbagai lingkungan, terutama di dalam tanah, dan dapat bertahan lama dalam berbagai kondisi lingkungan. Bakteri tersebut juga ditemukan di dalam jaringan tanaman sebagai bakteri endofit, seperti yang diisolasi oleh Zhao *et al.* (2011) dari tanaman *Sophora alopecuroides*.

Pada penelitian yang dilakukan oleh Li, Ma, Liu dan Zhang (2012), *Bacillus cereus* strain B-02 memiliki mekanisme antagonistik terhadap jamur *Botrytis cinerea* yang terdeteksi secara mikroskopik dengan adanya perubahan pada morfologi, ultrastruktur dan fisiologi hifa jamur *B. cinerea*. Beberapa isolat bakteri endofitik *B. cereus* diketahui menunjukkan aktivitas

antifungal terhadap beberapa jamur patogen tanaman seperti *Fusarium oxysporum* dan *Magnaphorthe grisea* (Zhao *et al.*, 2011).

B. cereus dapat memiliki siklus hidup sebagai saprofit seumur hidupnya, tetapi bakteri ini juga berpotensi sebagai patogen yang menyebabkan sakit pada manusia, terutama sebagai penyebab keracunan makanan yang ditandai dengan diare, gangguan perut, mual atau muntah, yang sebagian besar terjadi pada orang yang kurang sehat, memiliki penyakit kritis atau memiliki kekebalan tubuh yang lemah (McIntyre *et al.*, 2008; Senesi & Ghelardi, 2010; Tallent *et al.*, 2012;).

Pengujian Aktivitas Enzim Protease

1. Uji dalam medium *skim milk*

Medium *skim milk* merupakan medium yang terdiri atas *nutrient agar* yang ditambahkan susu yang mengandung kasein. Kasein adalah protein yang mendominasi susu dan merupakan makromolekul yang terdiri atas asam amino

yang dihubungkan oleh ikatan peptida. Enzim proteolitik yang disebut juga protease atau proteinase, merupakan enzim yang mampu memecah rantai panjang protein menjadi molekul yang lebih kecil (peptida) atau bahkan menjadi komponen terkecil penyusun protein (asam amino).

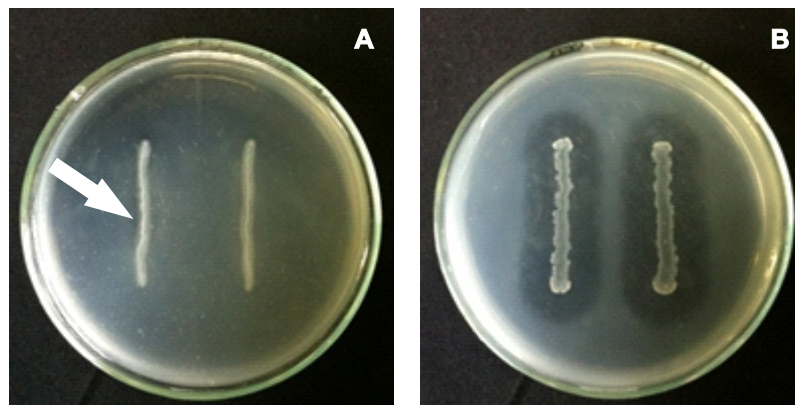
Hasil pengujian *Bacillus cereus* isolat A10 pada medium *skim milk* menunjukkan adanya aktivitas enzim protease yang sangat lemah ditandai dengan adanya zona bening yang tipis di sekitar koloni, dibandingkan dengan kontrol positif (Gambar 4). Nabrdalik, Grata, dan Latala (2010) juga menyebutkan bahwa salah satu isolat *Bacillus cereus* yang diujinya, yaitu isolat G10, tumbuh optimum dan dapat mengekspresikan aktivitas proteolitik pada medium *skim milk* hanya pada suhu 40°C dan 50°C. Sedangkan pada suhu 30°C, isolat tersebut menunjukkan aktivitas proteolitik yang sangat rendah pada medium *skim milk*.

2. Uji pencairan gelatin

Gelatin merupakan salah satu substrat yang mengandung protein sehingga dapat digunakan untuk menguji ada tidaknya aktivitas proteolitik bakteri. Medium gelatin *semi-solid* akan meleleh atau mencair pada suhu di atas 28°C (Anonim, 2014), namun akan segera membeku kembali apabila dimasukkan ke dalam lemari pendingin.

Hasil pengujian menunjukkan bahwa bakteri isolat *Bacillus cereus* A10 mampu menghasilkan enzim gelatinase atau menunjukkan aktivitas proteolitik setelah masa inkubasi 6 hari (Tabel 5). Aktivitas tersebut ditandai dengan mencairnya medium gelatin yang diinokulasi tusuk dengan *Bacillus cereus* isolat A10 setelah dimasukkan ke dalam lemari pendingin selama ±30 menit, pada hari ke-6 setelah inokulasi (Gambar 5B). Pada pengamatan hari kedua dan keempat setelah inokulasi, medium gelatin masih belum terhidrolisis dan padat (Gambar 5A). Sementara itu medium gelatin yang ditusuk dengan air steril tetap padat setelah dimasukkan ke dalam lemari pendingin, baik pada hari kedua hingga hari keempat belas setelah inokulasi

Berdasarkan hasil pengujian tersebut tampak bahwa *Bacillus cereus* isolat A10 dapat menghasilkan enzim gelatinase dengan kecepatan yang lambat. *Bacillus* spp. pada umumnya dapat menghasilkan enzim gelatinase pada periode inkubasi 8-96 jam (optimum 48 jam), pH medium 4-9 (optimum 7,5), suhu optimum pada 35°C, dengan sumber karbon yang berasal dari 0,8% laktosa (Balan, Nethaji, Sankar, & Jayalakshmi, 2012). Menurut Kebabci dan Cihangir (2011), aktivitas protease yang tertinggi dari isolat *Bacillus cereus* yang diujinya adalah pada suhu 30°C dan pH 6,4.



Gambar 4. Aktivitas enzim protease isolat *B. cereus* A10 pada medium *skim milk* (A) yang ditandai dengan adanya zona bening yang tipis di sekitar koloni (tanda panah), dibandingkan dengan kontrol positif dengan zona bening yang lebar (B).

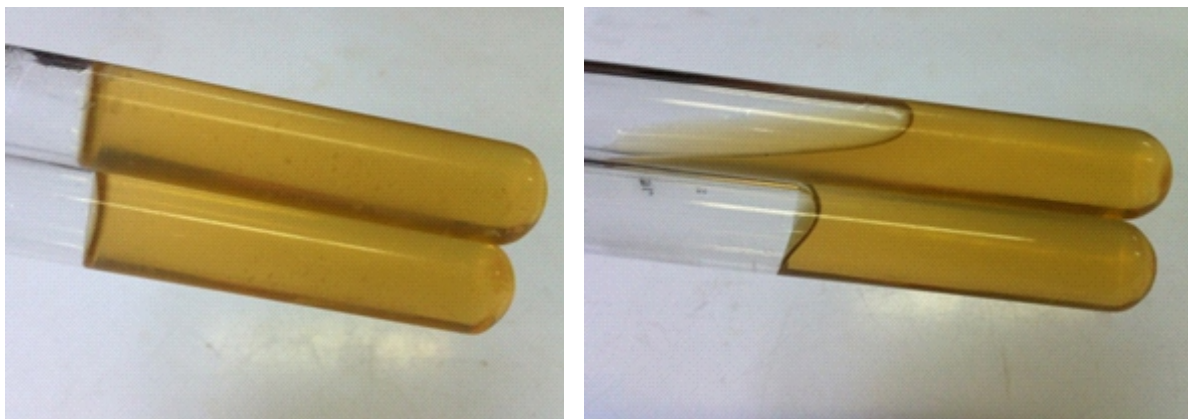
Figure 4. Protease activity of *B. cereus* A10 was marked by a thin clear zone on *skim milk* medium (A) compared to the wide distinctive protease activity (B).

Tabel 5. Hasil uji pencairan gelatin *B. cereus* isolat A10
 Table 5. Gelatine liquefaction test result by *B. cereus* A10

Masa Inkubasi (hari) <i>Incubation period (day)</i>	Kontrol <i>Control</i>	A10
2	-	-
4	-	-
6	-	+
8	-	+
10	-	+
12	-	+
14	-	+

Keterangan (*Remarks*):

1. + = gelatin mencair (+ = *gelatine melted*)
2. - = gelatin membeku (- = *gelatine solidified*)



Gambar 5. Hasil uji pencairan gelatin dengan masa inkubasi 2 dan 4 hari (A) dan adanya aktivitas proteolitik *B. cereus* isolat A10 yang ditunjukkan dengan mencairnya gelatin mulai hari ke-6 (B).

Figure 5. Gelatine liquefaction by *B. cereus* A10 with an incubation period of 2 and 4 days (A) and the melting of gelatine starting on day 6 (B).

Genus *Bacillus* memiliki mekanisme penghambatan terhadap jamur yang sangat bervariasi, misalnya dengan menghasilkan berbagai jenis antibiotik, maupun enzim pendegradasi dinding sel seperti protease, lipase, kitinase dan glukonase (Li & Jiang, 2006; Li *et al.*, 2012).

Pengujian Antagonisme Ekstraseluler dengan Metode *Filter Paper Disk*

Pengujian dilakukan untuk mengetahui kemampuan penghambatan secara ekstraseluler atau aktivitas beberapa antibiotik maupun enzim pendegradasi dinding sel yang dihasilkan oleh *Bacillus cereus* A10 terhadap pertumbuhan miselium *R. microporus*. Parameter pengamatan uji penghambatan dengan metode *filter paper disk* ini yaitu pertumbuhan miselium dan zona penghambatan yang terbentuk. Hasil pengujian menunjukkan bahwa pada zona

penghambatan hanya terbentuk hingga hari ke-2 setelah inokulasi pada konsentrasi 75% suspensi ekstraseluler dalam aquades steril. Hasil ini belum konsisten karena pada konsentrasi tertinggi (100%) tidak terbentuk zona penghambatan. Dan pada hari ketiga tidak terdapat adanya zona penghambatan pada semua konsentrasi (Tabel 6). Pertumbuhan miselium *R. microporus* juga tampak belum memberikan hasil yang konsisten sesuai perlakuan konsentrasi dan tidak terjadi penghambatan yang berarti (Tabel 7).

Hasil pengujian di atas masih sesuai dengan pengujian oposisi langsung di awal penelitian, dimana *Bacillus cereus* isolat A10 memiliki tingkat antagonisme yang lemah terhadap jamur akar putih *R. microporus* dan aktivitas uji protease yang cukup lambat. Selain itu terdapat beberapa hal yang dapat mempengaruhi hasil di atas, antara lain

Tabel 6. Zona penghambatan berbagai konsentrasi filtrat *B. cereus* isolat A10 dengan metode filter paper disk terhadap jamur akar putih *R. microporus* pada medium TSA
 Table 6. Inhibition zone of *R. microporus* culture by extracellular filtrate of *B. cereus* A10 using filter paper disk method on TSA medium

Konsentrasi Concentration (%)	Rerata zona penghambatan Inhibition zone (cm)		
	1 HSI 1 DAI	2 HSI 2 DAI	3 HSI 3 DAI
100	1,4 b	0,0 b	0,0 a
75	1,7 a	0,1 a	0,0 a
50	1,4 b	0,0 b	0,0 a
25	1,4 b	0,0 b	0,0 a
0 (Kontrol)	1,4 b	0,0 b	0,0 a

Keterangan (Remarks):

1. Angka yang diikuti huruf yang sama dalam satu kolom tidak berbeda nyata berdasarkan uji Duncan Multiple Range Test pada tingkat kepercayaan 95% (Figures followed by the same letter in the same column indicates no significant difference based on DMRT at 95% level)
2. HSI = Hari Setelah Inokulasi (DAI = Days After Inoculation)

Tabel 7. Pertumbuhan miselium jamur akar putih *R. microporus* dengan uji oposisi langsung filtrat *Bacillus cereus* isolat A10 dengan metode filter paper disk pada medium TSA
 Table 7. *R. microporus* culture growth shown on direct opposition test against extracellular filtrate of *B. cereus* A10 using filter paper disk method on TSA medium

Konsentrasi Concentration (%)	Rerata pertumbuhan koloni Fungal culture growth (cm)		
	1 HSI 1 DAI	2 HSI 2 DAI	3 HSI 3 DAI
100	0,6 a	2,3 a	3,8 a
75	0,3 b	2,0 b	3,5 b
50	0,6 a	2,3 a	3,8 a
25	0,7 a	2,4 a	3,9 a
0 (Kontrol)	0,6 a	2,4 a	3,9 a

Keterangan (Remarks):

1. Angka yang diikuti huruf yang sama dalam satu kolom tidak berbeda nyata berdasarkan uji Duncan Multiple Range Test pada tingkat kepercayaan 95% (Figures followed by the same letter in the same column indicates no significant difference based on DMRT at 95% level)
2. HSI = Hari Setelah Inokulasi (DAI = Days After Inoculation)

diduga konsentrasi suspensi ekstraseluler yang digunakan masih terlalu rendah dan adanya kerusakan enzim atau senyawa lain yang berperan karena penyimpanan dalam suhu -20°C sebelum digunakan.

nyata terhadap koloni *R. microporus* pada pengujian filtrat ekstraseluler melalui metode cakram kertas saring. Berdasarkan identifikasi molekuler sekuens gen 16S rRNA dan gen *gyrase* subunit B, isolat A10 termasuk ke dalam kelompok bakteri *Bacillus cereus*.

KESIMPULAN

Bakteri endofitik isolat A10 mampu menghambat pertumbuhan koloni jamur *R. microporus* secara invitro, dengan penghambatan yang lemah. Isolat tersebut mampu menghasilkan enzim ekstraseluler seperti protease dan gelatinase, tetapi masih belum memberikan penghambatan yang

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih disampaikan kepada Balai Penelitian Getas, Pusat Penelitian Karet, atas bantuan dana *In House* sehingga dapat terlaksananya penelitian ini. Selain itu ucapan terima kasih

juga disampaikan kepada Laboratorium Bakteriologi Tumbuhan Jurusan Perlindungan Tanaman Fakultas Pertanian Universitas Gadjah Mada atas dukungan tempat dan fasilitas laboratorium yang diberikan.

DAFTAR PUSTAKA

- Anonim. (2014). *Gelatinase Test*. <http://www.hccfl.edu>. Diakses tanggal 31 Januari 2014.
- Balan, S. S., Nethaji, R., Sankar, S., & Jayalakshmi, S. (2012). Production of gelatinase enzyme from *Bacillus* spp. isolated from the sediment sample of Porto Novo Coastal sites. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 2(3), 1811-1816. Doi: 10.1016/S2221-1691(12)60500-0
- Chakraborty, S. P., Mahapatra, S. K., & Roy, S. (2011). Biochemical characters and antibiotic susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolates. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 1(3), 212-216. Doi: 10.1016/S2221-1691(11)60029-4
- Direktorat Jenderal Perkebunan. (2015). *Data luas serangan OPT karet nasional dan taksasi kerugian hasil*. Jakarta, Indonesia: Ditjenbun.
- Hallmann, J., Berg, G., & Schulz, B. (2006). Isolation procedures for endophytic microorganism. In: Schulz, B., Boyle, C., & Sieber, T. N. (eds.). *Soil Biology, Volume 9, Microbial Root Endophytes*. Berlin, Germany: Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Joseph, K., & Deka, H. K. (2007). Biocontrol techniques. In: Jacob, C. K., Srinivas, P., & Roy, C. B. (eds.). *A Laboratory manual for international training on strategies for management of Corynespora Leaf Fall Disease of Hevea brasiliensis*. Kottayam, India: Rubber Research Institute of India.
- Kebabci, O., & Cihangir, N. (2011). Isolation of protease producing novel *Bacillus cereus* and detection of optimal conditions. *African Journal of Biotechnology*, 10(7), 1160-1164.
- Kuklinsky-Sobral, J., Araujo, W. L., Mendes, R., Pizzirani-Kleiner, A. A., & Azevedo, J. L. (2005). Isolation and characterization of endophytic bacteria from soybean (*Glycine max*) grown in soil treated with glyphosate herbicide. *Plant and Soil*, 273(1), 91-99. Doi: 10.1007/s11104-004-6894-1.
- Li, W. J., & Jiang, R. B. (2006). The isolation and characteristic analysis of antagonistic substance produced by *Brevibacillus laterosporus* X10. *Journal of Biology*, 23, 16-19.
- Li, J. H., Wang, E. T., Chen, W. F., & Chen, W. X. (2008). Genetic diversity and potential for promotion of plant growth detected in nodule endophytic bacteria of soybean grown in Heilongjiang province of China. *Soil Biology & Biochemistry*, 40(1), 238-246. Doi: 10.1016/j.soilbio.2007.08.014
- Li, F. X., Ma, H. Q., Liu, J., & Zhang, C. (2012). Antagonistic effects of *Bacillus cereus* strain B-02 on morphology, ultrastructure and cytophysiology of *Botrytis cinerea*. *Polish Journal of Microbiology*, 61(2), 119-128.
- McIntyre, L., Bernard, K., Beniac, D., Isaac-Renton, J. L., & Naseby, D. C. (2008). Identification of *Bacillus cereus* group species associated with food poisoning outbreaks in British Columbia, Canada. *Appl. Environ. Microbiol.*, 74(23), 7451-7453. Doi: 10.1128/AEM.01284-08.
- Nabrdalik, M., Grata, K., & Latala, A. (2010). Proteolytic activity of *Bacillus cereus* strains. *Proceedings of ECOpole 4(2)*, 273-277.
- Nishiguchi, M. K., Doukakis, P., Egan, M., Kizirian, D., Phillips, A., Prendini, L., Rosenbaum, H. C., Torres, E., Wyner, Y., DeSalle, R., & Giribet, G. (2002). DNA isolation Protocols. In: DeSalle, R., Wheeler, W., & Giribet, G (eds.). *Techniques in Molecular Systematics and Evolution*. Basel, Germany: Birkhäuser.

- Pereira, P., Nesci, A., & Etcheverry, M. G. (2007). *Efficacy of bacterial seed treatments for the control of Fusarium verticillioides in maize*. Rio Cuarto, Brazil: Springer.
- Rashid, S., Charles, T. C. & Glick, B. R. (2012). Isolation and characterization of new plant growth-promoting bacterial endophytes. *Applied Soil Ecology*, 61, 217-224. Doi: 10.1016/j.apsoil.2011.09.011.
- Senesi, S., & Ghelardi, E. (2010). Production, secretion and biological activity of *Bacillus cereus* enterotoxins. *Toxins*, 2(7), 1690-1703. Doi: 10.3390/toxins2071690.
- Setyawan, B., Pawirosoemardjo, S., & Hadi, H. (2013). Biofungisida *Triko Combi* sebagai salah satu pengendali jamur akar putih pada tanaman karet. *Warta Perkaratan*, 32(2), 83-94.
- Setyawan, B. (2014). Identifikasi dan uji antagonisme bakteri dari rizosfer *Mimosa* sp. Terhadap jamur akar putih *Rigidoporus microporus* strain karet (Tesis), Universitas Gadjah Mada, Indonesia.
- Situmorang, A., Suryaningtyas, H., & Pawirosoemardjo, S. (2007). Current status of white root disease (*R. microporus*) and the disease control management in rubber plantation of Indonesia. *Proc. of the Int. Work. White Root Dis. Hevea Rubb. 2006* (p. 27-33). Salatiga, Indonesia: IRR-IRRDB.
- Sujatno., & Pawirosoemardjo, S. (2001). Pengenalan dan teknik pengendalian penyakit jamur akar putih pada tanaman karet secara terpadu. *Warta Perkaratan*, 20(1-3), 64-75.
- Supriyanto., Priyatmojo, A., & Arwiyanto, T. (2011). Uji penggabungan PGPF dan *Pseudomonas putida* strain Pf-20 dalam pengendalian hayati penyakit busuk lunak lidah buaya di tanah gambut. *Jurnal Hama dan Penyakit Tumbuhan Tropika*, 11(1), 11-21.
- Tallent, S. M., Kotewicz, K. M., Strain, E. A., & Bennett, R. W. (2012). Efficient isolation and identification of *Bacillus cereus* group. *Journal of AOAC International*, 95(2), 446-451. Doi: 10.5740/jaoacint.11-251
- Tan, D., Fu, L., Han, B., Sun, X., Zheng, P., & Zhang, J. (2015). Identification of an endophytic antifungal bacterial strain isolated from the rubber tree and its application in the biological control of banana fusarium Wilt. *PLoS ONE*, 10(7), 1-14. Doi: 10.1371/journal.pone.0131974
- Ulrich, K., Ulrich, A., & Ewald, D. (2008). Diversity of endophytic bacterial communities in popular grown under field conditions. *FEMS Microbiology Ecology*, 63(2), 169-180. Doi: 10.1111/j.1574-6941.2007.00419.x
- Yamamoto, S., & Harayama, S. (1995). PCR amplification and direct sequencing of gyrB genes with universal primers and their application to the detection and taxonomic analysis of *Pseudomonas putida* Strains. *Appl. Environ. Microbiol.*, 61(3), 1104-1109.
- Yin, H., Cao, L., Xie, M., Chen, Q., Qiu, G., Zhou, J., Wu, L., Wang, D., & Liu, X. (2008). Bacterial diversity based on 16S rRNA and gyrB genes at Yinshan mine, China. *Systematic and Applied Microbiology*, 31(4), 302-311. Doi: 10.1016/j.syapm.2008.05.003.
- Zhao, L., Xu, Y., Sun, R., Deng, Z., Yang, W., & Wei, G. (2011). Identification and characterization of the endophytic plant growth promoter *Bacillus cereus* strain MQ23 isolated from *Sophora alopecuroides* root nodules. *Brazilian Journal of Microbiology*, 42, 567-575. Doi: 10.1590/S1517-83822011000200022.