
Efektivitas Supernatan Isolat Bakteri RNC19 dan RNC43 sebagai Antagonis terhadap Patogen Hawar Malai Padi *Burkholderia glumae in Vitro*

Ellia Septiarahma Rumambi, Fadjar Rianto, Supriyanto

Program Studi Agroteknologi Fakultas Pertanian Universitas Tanjungpura, Indonesia
Jalan Prof. Dr. Hadari Nawawi, Bansir Laut, Kec. Pontianak Bar., Kota Pontianak, Kalimantan Barat 78124, Indonesia

*Correspondence author: fajar.rianto@faperta.untan.ac.id

Abstrak

Supernatan dari kultur cair isolat bakteri antagonis diperkirakan mengandung senyawa metabolit yang berfungsi sebagai antimikroba. Kemampuan sebagai antibakteri ditunjukkan oleh sel isolat RNC19 dan RNC43 terhadap *Burkholderia glumae*, patogen penyebab penyakit hawar malai bakteri pada tanaman padi. Penelitian bertujuan menguji kemampuan antibakteri dari supernatan yang dihasilkan isolat RNC19 dan RNC43 terhadap *B. glumae*. Isolat bakteri yang digunakan merupakan hasil isolasi rhizosfer *Nepenthes clipeata* dari Bukit Kelam, Sintang. Produksi supernatan kedua isolat antagonis melalui co-culture, menumbuhkan isolat antagonis yang ditambahkan dengan *B. glumae* pada hari ke 2 masa inkubasi. Pengujian sebagai antibakteri meliputi kemampuan daya hambat menggunakan metode difusi cakram agar, menentukan minimum inhibition concentration (MIC) dan minimum bactericidal concentration (MBC). Hasil pengujian menunjukkan supernatan co-culture RNC19 lebih efektif menghambat pertumbuhan bakteri *B. glumae* dengan daya hambat 77.46%, sedangkan supernatan co-culture RNC43 menunjukkan daya hambat sebesar 46.94%. Kedua supernatan memiliki nilai MIC sebesar 50% dan tidak punya kemampuan membunuh sel *B. glumae*. Hasil penelitian diharapkan dapat menjadi alternatif bahan yang dapat dimanfaatkan sebagai antimikroba patogen tanaman dan pengembangan produksi metabolit sekunder antimikroba.

Kata kunci: Antibakteri, *minimum bactericidal concentration*, *minimum inhibition concentration*, supernatan co-culture.

The Effectiveness of the Supernatant of Bacterial Isolates RNC19 and RNC43 as Antagonists against the Rice Panicle Blight Pathogen *Burkholderia glumae in Vitro*

Abstract

The supernatant from liquid cultures of antagonistic bacterial isolates is thought to contain metabolite compounds that function as antimicrobials. The antibacterial ability was demonstrated by isolates RNC19 and RNC43 against *Burkholderia glumae*, the pathogen that causes bacterial panicle blight in rice. This study aimed to test the antibacterial ability of the supernatant from isolates RNC19 and RNC43 against the pathogen of panicle blight of rice. The bacterial isolate used was the result of rhizosphere isolation of *Nepenthes clipeata* from Bukit Kelam, Sintang. Production of supernatants from the two antagonist isolates through co-culture, cultivating the antagonist isolates which were added with *B. glumae* on the second days of the incubation period. Testing as an antibacterial includes an inhibition test using the agar disk diffusion method, minimum inhibition concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) tests. The test results showed that the RNC19 co-culture supernatant was more effective in inhibiting the growth of *B. glumae* bacteria with an inhibitory power of 77.46%, while the RNC43 co-culture supernatant showed an inhibitory power of 46.94%. Both supernatants have an MIC value of 50% and do not have the ability to kill *B. glumae* cells. The results of the research are expected to be an alternative material that can be used as an antimicrobial for plant pathogens and for the development of antimicrobial secondary metabolite production.

Keywords: Antibacterial, minimum bactericidal concentration, minimum inhibition concentration, co-culture supernatant.

Received: 16 September 2023; **Revised:** 29 November 2023; **Accepted:** 07 October 2024

PENDAHULUAN

Padi merupakan sumber pangan utama bagi penduduk dunia, demikian halnya dengan Indonesia. Ketersediaannya menjadi hal penting yang perlu diperhatikan, menjaga agar produksinya dapat memenuhi kebutuhan masyarakat. Gangguan produksi dapat diakibatkan oleh serangan hama dan penyakit, dan cukup banyak jenis penyakit yang terdapat pada tanaman padi yang terkadang dapat menggagalkan panen.

Burkholderia glumae merupakan patogen penyebab hawar malai bakteri (*bacterial panicle blight*). Bakteri yang sering dijumpai pada bulir padi ini juga dapat menimbulkan gejala busuk bulir pada malai (*bacterial grain rot*). Gejala yang disebabkan *B. glumae* dapat diamati pada pelepah padi berupa lesio panjang vertikal berwarna keabu-abuan dengan tepi coklat kemerahan. Pada bulir malai terjadi perubahan warna menjadi coklat tua di bagian pangkal dan malai tumbuh tegak karena bulir padi tidak terisi (Mulwa d et al., 2018).

B. glumae pertama kali dilaporkan di Jepang pada tahun 1950. Hingga saat ini, penyakit hawar malai bakteri telah banyak dilaporkan menyerang di berbagai negara seperti Amerika Selatan dan Tengah, Afrika, serta beberapa negara di Asia (Zhou-qi et al., 2016). Di Indonesia, patogen ini telah terdeteksi di beberapa lokasi di Jawa dan Sumatra Utara (Hasibuan dkk., 2018).

Insidensi serangan *B. glumae* di Indonesia pada tanaman padi belum sebanyak penyakit hawar daun bakteri dan penyakit blast (Handiyanti et al., 2018). Jika merujuk pada iklim panas dan curah hujan tinggi yang sering terjadi di Indonesia, termasuk Kalimantan Barat sangat cocok untuk perkembangan *B. glumae*. Serangannya dikategorikan sebagai *emerging pathogen* dapat sewaktu-waktu meningkat dan berpotensi menimbulkan resiko sulit untuk dapat dikendalikan.

Bakterisida berbahan aktif *oxolonlic acid* (OA) diketahui mampu mengendalikan bakteri *B. glumae*. Namun penggunaan bahan kimia OA menimbulkan resistensi *B. glumae* terhadap OA dan turunannya (Hikichi et al., 1998). Pengendalian *B. glumae* dengan bahan kimia memberikan dampak buruk bagi lingkungan dan organisme lain. Sehingga, diperlukan alternatif yang dapat digunakan dalam mengendalikan *B. glumae* dengan memanfaatkan bakteri rhizosfer sebagai biokontrol.

Bakteri rhizosfer mengendalikan patogen dengan membentuk aktivitas antagonistik. Dua isolat bakteri rhizosfer yang diperoleh dari rhizosfer *Nepenthes clipeata* di Bukit Kelam menunjukkan aktivitas antagonis terhadap *B. glumae* yang ditandai dengan terbentuknya zona hambat di sekitar koloni bakteri rhizosfer pada uji sebelumnya. Kemampuan menghambat bakteri disebabkan oleh senyawa antibakteri yang dihasilkan bakteri rhizosfer sebagai bukti aktivitas antagonisnya. Senyawa yang dihasilkan akan dilepaskan ke sekeliling untuk mencegah perkembangan bakteri lainnya.

Bakteri yang ditumbuhkan pada media cair akan membentuk senyawa metabolik yang akan terlarut pada media, dan ini dapat diekstraksi dari supernatan. Supernatan bakteri yang bersifat sebagai antagonis dengan mekanisme antibiosis mengandung metabolit yang dapat menghambat pertumbuhan patogen. Supernatan ini dapat dimanfaatkan sebagai biokontrol yang ramah lingkungan untuk mengendalikan *B. glumae*. Penelitian ini bertujuan untuk menguji kemampuan antibakteri supernatan isolat RNC19 dan RNC43 terhadap *B. glumae* dalam rangka menentukan potensinya sebagai agens biokontrol dalam mengendalikan penyakit hawar malai bakteri.

METODE PENELITIAN

Tempat dan Waktu

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Penyakit Tanaman dan Laboratorium Biologi Terpadu, Universitas Tanjungpura. Penelitian dilaksanakan dari bulan Agustus 2022 sampai Januari 2023. Isolat bakteri RNC19 dan RNC43 yang digunakan dalam penelitian ini diperoleh dari rhizosfer *Nepenthes clipeata* di Bukit Kelam, Sintang. Isolat *B. glumae* yang digunakan berasal dari koleksi Laboratorium Penyakit Tanaman, Fakultas Pertanian, Universitas Tanjungpura.

Karakterisasi Morfologi Bakteri RNC19 dan RNC43

Isolat bakteri diremajakan dengan menginokulasi sebanyak 1 lup ose bakteri dalam media miring Luria-Bertani (LB). Inkubasi dilaksanakan selama 2 hari pada suhu 30°C dalam inkubator. Kultur bakteri hasil peremajaan digunakan sebagai stok kultur dalam uji-uji yang dilaksanakan.

Karakteristik bakteri antagonis meliputi bentuk, warna, tepian, elevasi, dan permukaan koloni tunggal pada media LB (Pointer dan Thomas, 1984), bentuk sel dan reaksi Gram. Koloni yang diamati hasil penumbuhan dengan metode gores pola kuadran. Bentuk sel dan reaksi Gram diamati dari hasil pewarnaan dalam uji Gram.

Produksi Supernatan Bakteri Antagonis dan Suspensi *B. glumae*

Pembuatan supernatan menggunakan metode *co-culture*, mengacu pada penelitian Wakefield (2017). Produksi supernatan bakteri dimulai dengan menyiapkan kultur cair bakteri RNC19 dan RNC43 sebagai kultur utama dan kultur cair *B. glumae* sebagai penginduksi.

Isolat bakteri RNC19 dan RNC43 sebanyak 3 sampai 4 lup ose diinokulasikan ke dalam 50 ml media LB *broth*, di kocok menggunakan shaker selama 48 jam pada kecepatan 120 rpm. Penambahan kultur cair *B. glumae* ke dalam kultur utama dilakukan satu hari setelah pembiakan kultur utama dengan perbandingan 1:10. *Co culture* di kocok kembali selama 7 hari pada kecepatan 120 rpm suhu ruangan. Biakan *co-culture* bakteri disentrifugasi pada kecepatan 12.000 rpm selama 5 menit dan dilanjutkan dengan penyaringan menggunakan kertas filter ukuran pori 0.2 µm untuk mendapatkan supernatan metabolit sekunder bebas sel bakteri. Supernatan disimpan dalam *freezer* sebelum digunakan untuk bahan pengujian senyawa antibakteri.

Penyiapan suspensi bakteri yang siap digunakan dalam pengujian mengikuti metode McFarland 0.5 sebagai acuan standarisasi (Sutton, 2011). Tingkat kekeruhan yang terbentuk setara dengan kepadatan bakteri 10⁸ CFU/ml. Kultur cair *B. glumae* sekitar 500 hingga 1000 µm ditambahkan ke dalam 10 ml air fisiologis 0.9% steril dan dihomogenkan. Kekeruhan suspensi bakteri disetarakan dengan larutan McFarland 0.5. Konfirmasi penyetaraan kekeruhan suspensi bakteri antagonis dan absorbansi standar McFarland 0.5 menggunakan spektrofotometer. Pengukuran dilakukan pada panjang gelombang 625 nm. Nilai absorbansi harus 0.08 - 0.13 sehingga kekeruhan yang terbentuk setara dengan konsentrasi bakteri 1.5 x 10⁸ CFU/ml (CLSI, 2012).

Uji Daya Hambat Bakteri secara *in Vitro*

Uji daya hambat dilakukan dengan metode difusi cakram agar (*disc diffusion*). Media LB agar diinokulasikan dengan suspensi *B. glumae* yang telah disesuaikan dengan standar McFarland 0.5. Kertas cakram ditetesi dengan supernatan bakteri uji 100% sebanyak 10 µl lalu diletakkan di atas media agar LB yang telah memadat. Kertas cakram yang ditetesi aquades steril digunakan sebagai kontrol negatif dan amoksilin (500 ppm) sebagai kontrol positif. Pengamatan dilakukan pada hari ke 3 masa inkubasi. Kemampuan antibakteri ditentukan dengan mengukur zona hambat atau zona bening yang dinyatakan dalam persamaan:

$$ZH = \frac{Dz - Dk}{Dk} \times 100\%$$

Keterangan:

ZH = Tingkat penghambatan

Dz = diameter zona bening

Dk = diameter kertas cakram

Uji Minimum Inhibition Concentration (MIC)

Pengujian MIC menggunakan metode *broth dilution*. Langkah-langkah yang dikerjakan mengacu pada penelitian Munfaati et al. (2014). Empat seri konsentrasi supernatan (100%, 50%, 25%, dan 12.5%) dari bakteri isolat RNC19 dan RNC43 dipersiapkan dengan melakukan pengenceran dua kali dari konsentrasi awal yang dianggap kandungan metabolitnya 100% (Soleha, 2015). Sebanyak 1 ml supernatan dari berbagai konsentrasi dan 200 µl suspensi *B. glumae* ditambahkan ke dalam 8.8 ml media LB *broth* dalam tabung reaksi. Pada kontrol negatif, media hanya ditambah dengan 1 ml aquades steril dan 200 µl kultur bakteri. Pada kontrol positif pada media kultur ditambah 1 ml amoksilin 500 ppm dan 200 µl kultur bakteri. Masing-masing campuran dikocok menggunakan vortex, dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 30°C dalam inkubator. Uji MIC dilakukan dengan dua ulangan. Nilai MIC ditentukan berdasarkan selisih nilai *Optical Density* (OD) sesudah dan sebelum inkubasi menggunakan spektrofotometer pada λ 533.8 nm. Konsentrasi terendah yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri ditetapkan sebagai MIC.

Uji Minimum Bactericidal Concentration (MBC)

Uji MBC mengacu pada penelitian Haryati et al. (2015). Konsentrasi yang menunjukkan kemampuan menghambat bakteri pada uji MIC dilanjutkan ke uji MBC. Kultur bakteri yang menunjukkan mempunyai nilai MIC ditumbuhkan pada media agar. Sebanyak 100 µl dari masing-masing perlakuan, termasuk kontrol diteteskan pada cawan petri menggunakan mikropipet, dan kemudian dituangkan media agar LB yang masih cair (suhu 45°C) sambil digoyang agar kultur bakteri yang dituangkan menyebar rata pada permukaan cawan. Inkubasi biakan selama 24 jam pada suhu 30°C. Hasil MBC dilihat dari ada tidaknya pertumbuhan koloni bakteri pada media.

HASIL DAN PEMBAHASAN

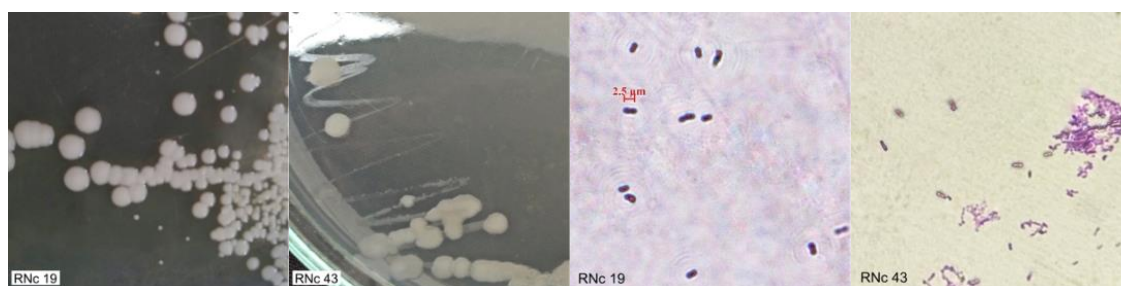
Karakteristik Morfologi Bakteri

Morfologi koloni bakteri RNc19 dan RNc43 yang diperoleh dari rhizosfer *Nepenthes clipeata* disajikan dalam Tabel 1.

Tabel 1. Karakteristik Morfologi Isolat Bakteri RNc19 dan RNc43 pada Media LB

Kode Isolat	Morfologi Koloni					Morfologi Sel	
	Bentuk	Warna	Tepi	Elevasi	Permukaan	Bentuk	Gram
RNc19	<i>Circular</i>	Putih susu	<i>Entire</i>	<i>Raised</i>	<i>Smooth</i>	<i>Rod</i>	Positif
RNc43	<i>Irregular</i>	Putih kekuningan	<i>Undulate</i>	<i>Flat</i>	<i>Rugose</i>	<i>Rod</i>	Positif

Karakteristik morfologi bakteri RNc19 ditentukan mengikuti Poiner dan Thomas (1984). Koloni yang tumbuh memiliki bentuk *circular* berwarna putih susu dengan tepi *entire*, elevasi *raised*, serta permukaan *smooth*. Isolat RNc43 memiliki bentuk koloni *irregular* berwarna putih kekuningan dengan tepi *undulate*, elevasi *flat*, dan permukaan *rugose*. Bentuk sel masing-masing isolat adalah *rod* dan tergolong bakteri Gram positif. Hasil pewarnaan Gram menunjukkan kedua isolat merupakan bakteri Gram positif dengan dinding sel berwarna ungu. Pada bakteri yang memperlihatkan reaksi sebagai Gram positif dinding selnya dilapisi peptidoglikan yang lebih tebal sehingga mampu mempertahankan zat warna Kristal violet walaupun telah dibasuh larutan alkohol 70% (Hamidah et al., 2019). Kondisi inilah yang menyebabkan zat warna yang diberikan tidak hilang. Berbeda dengan bakteri Gram negatif yang memiliki lapisan luar lipopolisakarida, terdiri atas membran dan lapisan peptidoglikan yang tipis. Saat dilakukan pencucian dengan alkohol maka lapisan peptidoglikan yang tipis tersebut akan tercuci sehingga zat warna kristal violet akan hilang, sehingga pemberian zat warna kedua, safranin yang melapisi dinding sel bakteri (Parlindo dan Septia. 2019).

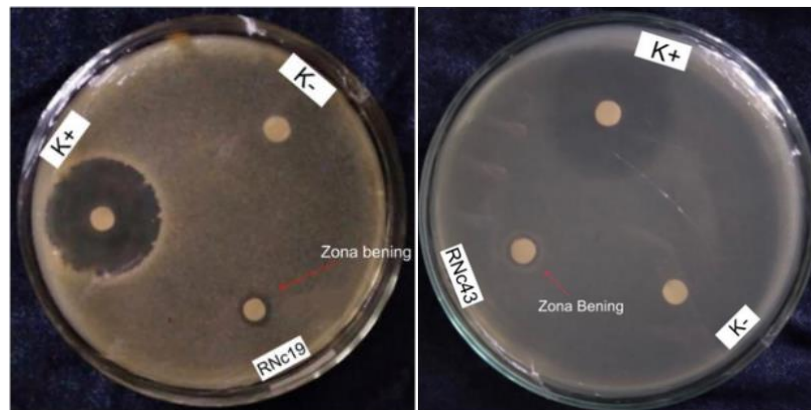


Gambar 1. Karakteristik Bakteri Antagonis. (a,b) Bentuk Koloni Bakteri; (c,d) Sel bakteri pada Perbesaran 400x.

Kemampuan Daya Hambat Supernatan *co-culture* terhadap Pertumbuhan Bakteri *Burkholderia glumae*

Supernatan *co-culture* yang mempunyai kemampuan antibakteri ditandai dengan terbentuknya zona bening, tidak ditumbuhi oleh koloni bakteri *B. glumae* disekitar kertas cakram uji. Pada uji pendahuluan, supernatan kultur monokultur RNc19 dan RNc43 tidak dapat menghambat pertumbuhan bakteri *B. glumae*. Hal ini ditunjukkan dengan tidak terbentuknya zona bening di sekitar kertas cakram

yang sebelumnya telah ditetesi supernatan pada saat pengujian. Induksi pembentukan metabolit sekunder oleh bakteri antagonis kedua isolat yang dilakukan pada supernatan *co-culture* membentuk senyawa antibakteri yang dapat menghambat *B. glumae*. Kemampuan menghambat ditunjukkan dengan terbentuknya zona bening di sekitar cakram pada media yang sebelumnya telah diinokulasi dengan *B. glumae* (Gambar 2).



Gambar 2. Uji Daya Hambat Supernatan *co-culture*. (a) RNC19; (b) RNC43. Kontrol + menggunakan amoksilin 500 ppm

Supernatan hasil *co-culture* bakteri isolat RNC19 menunjukkan kemampuan menghambat yang cukup tinggi terhadap *B. glumae*, dapat mencapai 77.46%. Berbeda dengan supernatan *co-culture* yang dihasilkan oleh isolat RNC43, hanya dapat menghasilkan hambatan sebesar 46.94% (Tabel 2). Kemampuan hambat dikategorikan memiliki efek minimal jika tingkat penghambatan hanya mencapai 30%, tetapi jika penghambatan lebih dari 60% maka dikategorikan memiliki efek maksimal yang cukup untuk menghentikan pertumbuhan patogen (Otten et al., 2004). Hasil pengujian yang telah dilakukan menunjukkan bahwa supernatan *co-culture* RNC19 dalam menghambat pertumbuhan *B. glumae* lebih efektif dibandingkan supernatan *co-culture* RNC43 dan tergolong memiliki efek maksimal menghambat pertumbuhan patogen.

Supernatan *co-culture* menghasilkan sejumlah besar metabolit. *Co-culture* sendiri merupakan teknik kultivasi sel dengan dua atau lebih populasi sel berbeda yang ditumbuhkan secara bersama (Goers et al., 2014). Penambahan kultur *B. glumae* pada masing-masing kultur bakteri isolat RNC19 dan RNC43 dimaksudkan agar kedua isolat antagonis tersebut terangsang menghasilkan senyawa metabolit yang dilepaskan ke dalam media tumbuh. Ini merupakan sebagai bentuk perlawanan yang diperlihatkan oleh isolat bakteri antagonis, baik isolat RNC19 ataupun RNC43 terhadap *B. glumae*. Kemampuan daya hambat supernatan *co-culture* RNC19 dan RNC43 terhadap *B. glumae* berkaitan dengan mekanisme antibiosis. Antibiosis merupakan mekanisme mikroorganisme antagonis dalam menghambat pertumbuhan patogen dengan melepaskan produk metabolit sekunder. Metabolit tersebut dapat berupa senyawa volatil, senyawa toksin, dan antibiotik yang dapat merusak pertumbuhan atau aktivitas metabolisme mikroorganisme lain (Saraf et al., 2014).

Terbentuknya zona hambat pada uji ini merupakan indikasi terjadinya mekanisme antibiosis, melibatkan metabolit yang dihasilkan pada proses fermentasi supernatan. Menurut Pellegrini et al. (2020), supernatan mengandung sejumlah metabolit yang dihasilkan dari aktivitas pertumbuhan bakteri dan nutrisi pada media yang digunakan. Kemampuan penghambatan supernatan dan metabolitnya berkorelasi dengan keberadaan lipopeptida, seperti siderofor, iturin, fengycins, dan surfaktin.

Tabel 2 Kemampuan Daya Hambat Supernatan *co-culture* terhadap *B. glumae*

Perlakuan	Tingkat penghambatan (%)
Supernatan RNC19	77.46
Supernatan RNC43	46.94
Kontrol positif (amoksilin 500 ppm)	405.83
Kontrol negatif	0.00

*Nilai penghambatan adalah rata-rata dari tiga ulangan.

Supernatan yang mengandung siderofor hasil produk metabolit dari *P. aeruginosa* dan *Alcaligenes* sp. efisien menghambat pertumbuhan *Pseudomonas solanacerum* secara *in vitro* (Pellegrini et al., 2020). Penelitian Ngalimat dkk. (2021) menyatakan, senyawa streptotricins D, E, dan F dari bakteri *Streptomyces* bersifat antibakteri terhadap *B. glumae*. Induksi bakteri antagonis pada penumbuhan *co-culture* dengan menambahkan bakteri patogen dapat memicu peningkatan produksi metabolit sekunder yang bersifat antibiotik. Produksi supernatan dengan sistem *co-culture* ini meningkatkan kemampuan biokontrol isolat RNC19 dan RNC43, serta menyediakan sumber yang efektif untuk mengembangkan senyawa yang dapat digunakan dalam mengendalikan patogen dari kelompok bakteri.

Penentuan Nilai MIC Supernatan *co-culture* RNC19 dan RNC43 terhadap Bakteri *B. glumae*

Penentuan nilai MIC bertujuan untuk menentukan konsentrasi terendah supernatan dari *co-culture* yang masih dapat menghambat pertumbuhan populasi bakteri *B. glumae*. Penentuan nilai MIC berdasarkan selisih nilai OD (*optical density*) yang didapatkan dari pengurangan nilai OD setelah inkubasi dengan nilai OD sebelum dilakukan inkubasi. Penetapan selisih nilai OD yang menunjukkan adanya hambatan pertumbuhan bakteri didapat dengan membandingkan selisih nilai OD supernatan *co-culture* dengan perlakuan kontrol negatif (aquades steril). Selisih nilai OD supernatan *co-culture* yang lebih besar dibanding selisih nilai OD kontrol negatif menunjukkan masih terjadi peningkatan jumlah sel bakteri, sedangkan selisih nilai OD yang lebih rendah dibandingkan kontrol negatif menunjukkan adanya hambatan pertumbuhan jumlah sel bakteri.

Hasil pengujian MIC supernatan *co-culture* terhadap bakteri *B. glumae* tersaji pada Tabel 3. Hasil pengamatan menunjukkan supernatan *co-culture* RNC19 dan RNC43 pada konsentrasi 12.5% dan 25% tidak terjadi penghambatan bakteri, terlihat dari nilai OD supernatan yang lebih tinggi dari kontrol negatif. Pada konsentrasi 50% dan 100% pada semua supernatan *co-culture* isolat bakteri antagonis memiliki kemampuan penghambatan. Kejadian ini ditunjukkan oleh nilai OD yang lebih rendah dibanding nilai OD kontrol negatif. Berdasarkan table tersebut, konsentrasi hambat minimum (MIC) supernatan *co-culture* RNC19 dan RNC43 yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri *B. glumae* adalah 50%. Konsentrasi tersebut merupakan konsentrasi terkecil yang mengalami penurunan nilai OD, dengan masing-masing nilai OD sebesar 0.106 dan 0.111. Nilai ini lebih rendah dibandingkan kontrol negatif, yakni sebesar 0.113.

Perlakuan konsentrasi supernatan pada pengujian MIC menunjukkan bahwa semakin besar konsentrasi supernatan yang digunakan, maka semakin kecil nilai OD yang dihasilkan. Ini berarti semakin tinggi konsentrasi supernatan maka semakin tinggi pula kemampuan penghambatan terhadap pertumbuhan populasi *B. glumae*. Semakin pekat supernatan maka konsentrasi senyawa metabolit yang bersifat antibakteri juga semakin banyak. Supernatan 100% atau dikenal sebagai konsentrasi kasar metabolit (*crude metabolite*) antagonis setelah melalui presipitasi mempunyai kandungan senyawa antimikroba yang tinggi, sehingga untuk menentukan nilai MIC dari metabolit yang dihasilkan perlu diencerkan. Hasil *co-culture* yang ditumbuhkan secara gabungan seperti *P. aeruginosa* dan *P. fuscoginae*, *P. aeruginosa* dan *B. subtilis*, dan *P. aeruginosa* dan *B. cereus* memiliki nilai MIC kisaran 180 mg/ml sampai 200 mg/ml terhadap bakteri *Salmonella typhi* dan *Klebsiella pneumoniae*. (Akpore et al., 2022). Hasil yang sama juga didapatkan oleh Rakhmawatie et al., (2023) metabolit yang dihasilkan dari kutur *B. subtilis* subsp *subtilis* dan diekstraksi menggunakan etil asetat mempunyai nilai MIC 3.125 µg/ml terhadap *Staphylococcus aureus*.

Tabel 3. Hasil Uji MIC Supernatan *co-culture* terhadap Bakteri *B. glumae*

Supernatan	Konsentrasi%	Selisih Nilai OD*
RNC 19	100	0.084
	50	0.106
	25	0.119
	12.5	0.12
	100	0.103
RNC 43	50	0.111
	25	0.130
	12.5	0.159
Kontrol positif (amoksilin 500 ppm)		0.000
Kontrol negatif (aquades)		0.113

*Selisih nilai OD merupakan rata-rata dari selisih nilai OD setelah inkubasi dan nilai OD sebelum inkubasi.

Penentuan Nilai MBC Supernatan *co-culture* RNC19 dan RNC43 terhadap Bakteri *B. glumae*

Pengujian MBC dilakukan pada dua konsentrasi supernatan *co-culture* yang dapat menghambat bakteri pada uji MIC. Penentuan nilai MBC bertujuan untuk mengetahui konsentrasi terkecil supernatan *co-culture* yang dapat membunuh bakteri *B. glumae*. MBC ditentukan dari tidak adanya pertumbuhan bakteri *B. glumae* pada media uji.

Hasil MBC pada Tabel 4 menunjukkan bahwa perlakuan supernatan *co-culture* RNC19 dan RNC43 pada konsentrasi 50% dan 100% tidak dapat membunuh bakteri *B. glumae*. Hal ini terlihat dari adanya pertumbuhan bakteri *B. glumae* pada media uji. Kedua konsentrasi supernatan *co-culture* dan kontrol negatif menunjukkan pertumbuhan bakteri lebih besar dari 250 CFU sehingga dicatat sebagai *Too numerous too count* (TNTC). Normalnya jumlah koloni dalam permukaan agar di cawan petri berkisar antara 25-250 CFU. Hitungan di luar kisaran normal 25-250 CFU dapat memberikan indikasi yang salah tentang komposisi bakteri sampel yang sebenarnya (Maturi and Peeler, 2001). Pada kontrol positif (amoksilin 500 ppm), kandungan antibiotik pada perlakuan tersebut mampu membunuh *B. glumae* ditunjukkan tidak ada pertumbuhan bakteri pada media uji.

Adanya pertumbuhan bakteri pada uji MBC menandakan supernatan tidak dapat membunuh *B. glumae*. Hal ini dikarenakan senyawa metabolit yang terkandung di dalam supernatan *co-culture* tidak mampu membunuh bakteri *B. glumae*. Sehingga, nilai MBC tidak dapat ditentukan karena tiap konsentrasi masih menunjukkan pertumbuhan bakteri.

Tabel 4. Hasil Uji Minimum Bactericidal Concentration Bakteri Isolat RNC19 dan RNC43

Perlakuan	Pertumbuhan Bakteri	
Kontrol positif (amoksilin 500 ppm)	0	
Kontrol negatif (aquades)	TNTC	
Supernatan <i>co-culture</i> RNC 19	100%	TNTC
	50%	TNTC
Supernatan <i>co-culture</i> RNC 43	100%	TNTC
	50%	TNTC

Keterangan: TNTC = Too numerous to count.

Supernatan *co-culture* RNC19 dan RNC43 yang dapat menghambat *B. glumae* menunjukkan bahwa supernatan tersebut menghasilkan senyawa antibakteri. Namun, senyawa antibakteri yang dihasilkan tidak dapat membunuh bakteri patogen. Oleh karena itu supernatan *co-culture* RNC19 dan RNC43 tidak bersifat bakterisidal, sedangkan penggunaan Amoksilin sebagai kontrol positif pada uji bersifat bakterisidal pada konsentrasi 500 ppm karena mampu membunuh bakteri. Mekanisme hambat dapat bersifat bakterisidal apabila agen dapat membunuh bakteri (Bancalari, 2020).

Penggunaan supernatan dalam penelitian ini menunjukkan kemampuannya dalam menghambat pertumbuhan bakteri *B. glumae* secara *in vitro*. Supernatan *co-culture* RNC19 lebih efektif menghambat pertumbuhan *B. glumae* dibandingkan supernatan *co-culture* RNC43 dengan tingkat penghambatan maksimal. Penggunaan supernatan *co-culture* RNC19 menghasilkan zona hambat yang besar dengan nilai MIC 50% dikategorikan sebagai *susceptible* terhadap bakteri *B. glumae* rentan terhadap supernatan tersebut. Supernatan yang dihasilkan dari *co-culture* RNC43 menghasilkan zona hambat sedang dengan nilai MIC 50%, dikategorikan sebagai *intermediate* atau menengah. Menurut Tankeshwar (2022), MIC dan diameter zona inhibisi berkorelasi terbalik. Semakin rentan mikroorganisme terhadap senyawa antimikroba, semakin rendah MIC dan semakin besar zona inhibisi. Sebaliknya, semakin resisten mikroorganisme maka MIC semakin tinggi dan zona hambat semakin kecil. Senyawa metabolit yang dihasilkan oleh isolat RNC 19 lebih tinggi bersifat antibakteri pada *B. glumae*.

Penggunaan supernatan sebagai antimikroba dalam penelitian ini kurang efektif dibanding penggunaan sel bakteri langsung dalam mengendalikan penyakit hawar malai bakteri secara *in vitro*. Sel bakteri RNC19 dan RNC43 yang diinokulasikan dalam media uji menciptakan kompetisi antara bakteri antagonis dengan bakteri patogen. Selain kompetisi ruang dan nutrisi, bakteri antagonis juga memproduksi senyawa metabolit yang dapat meningkatkan kemampuannya dalam menekan pertumbuhan bakteri *B. glumae*. Ada banyak peluang untuk mendapatkan senyawa antimikroba dari banyak kondisi lingkungan yang menjadi habitat mikroba seperti di air limbah, tanah, lingkungan akuatik. Produksi senyawa antimikroba memungkinkan untuk dikembangkan sebagai upaya mengatasi seringnya terjadi resistensi pada bakteri sehingga perlu selalu mencari jenis mikroba sebagai sumber penghasil antimikroba (Kumar and Kumar, 2016).

Penggunaan supernatan sebagai biokontrol hanya memproduksi senyawa metabolit sekunder tanpa melibatkan mekanisme antagonis lainnya. Sejalan dengan pernyataan Podile and Kishore (2002), yang menyatakan bahwa efektivitas biokontrol lebih besar yang ditunjukkan oleh sel bakteri dapat disebabkan oleh aksi sinergis dari mekanisme biokontrol yang berbeda oleh sel bakteri seperti produksi antibiotik dan induksi resistensi. Selain itu, menurut Manjula et al. (2004), mekanisme utama yang terlibat sebagai biokontrol adalah kompetisi ruang dan nutrisi, produksi antibiotik, dan enzim hidrolitik. Pada penggunaan supernatan maka mekanisme antibiosis, senyawa metabolit yang dihasilkan menjadi unsur utama dalam mengendalikan patogen, baik pada tanaman, manusia ataupun hewan.

Meskipun sel RNc19 dan RNc43 lebih efektif daripada supernatan, penggunaan supernatan bisa lebih efektif. Peningkatan kualitas dan kuantitas supernatan sebagai antimikroba dapat dilakukan dengan cara menambahkan suplementasi seperti kitin atau elisitor lain. Optimasi supernatan juga dapat dilakukan dengan melakukan modifikasi pada media pertumbuhan sehingga supernatan yang didapatkan memiliki kadar metabolit sekunder lebih tinggi dan memberikan efek bakterisidal seperti yang dilakukan oleh Jacob et al. (2017) menggunakan berbagai komposisi media pati terlarut dalam rangka meningkatkan produksi metabolit antibakteri oleh *Streptomyces nogelator* terhadap *E. coli* dan *S. aureus*.

KESIMPULAN

Isolat bakteri RNc19 dan RNc43 tergolong sebagai bakteri Gram positif. Supernatan *co-culture* RNc19 lebih efektif sebagai antimikroba terhadap *B. glumae* dibandingkan RNc43, dengan daya hambat sebesar 77.46%.

Kedua supernatan isolat bakteri *co-culture* memiliki nilai MIC sebesar 50% serta tidak bersifat bakterisidal karena masih menunjukkan pertumbuhan bakteri pada uji MBC.

DAFTAR PUSTAKA

- Akpor, O. B., Okonkwo, M. A., Ogunnusi, T. A., dan Oluba, O. M. 2022. Production, characterization and growth inhibitory potential of metabolites produced by *Pseudomonas* and *Bacillus* species. *Scientific African* 15 e01085
- Bancalari, E., Martelli, F. Bernini, V. Neviani, E., Gatti, M. 2020. Bacteriostatic or bactericidal? Impedometric measurements to test the antimicrobial activity of *Arthrospira platensis* extract. *Food Control*, vol. 118. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2020.107380>.
- CLSI. (Clinical & Laboratory Standards Institute) (2012). *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically; Approved Standard - Ninth Edition*. CLSI document M07-A9. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.
- Goers L, Freemont P, Polizzi KM. (2014). Co-culture systems and technologies: taking synthetic biology to the next level. *J R Soc Interface*, 11. DOI:10.1098/rsif.2014.0065
- Hamidah, M.N., Rianingsih, L. and Romadhon, R. 2019. Aktivitas antibakteri isolat bakteri asam laktat dari pedas dengan jenis ikan berbeda terhadap *E. coli* dan *S. aureus*. *Jurnal Ilmu dan Teknologi Perikanan*, 1(2), pp.11-21.
- Handiyanti, M., S. Subandiyah., dan T. Joko. 2018. Molecular Detection of *Burkholderia glumae*, A Causal Agent of Bacterial Panicle Blight Disease Deteksi Molekuler *Burkholderia glumae*, Penyebab Penyakit Hawar Malai Padi. *Jurnal Perlindungan Tanaman Indonesia*, 22(1), 98–107. doi: 10.22146/jpti.30259.
- Haryati, S., F. Hamzah., dan F. Restuhadi. 2015. Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Cangkang Kelapa Sawit (*Elaeis guineensis* Jacq.). *Jom Faperta*, 2(1), 1-10.
- Hasibuan, M., I. Safni, Lisawita, dan K. Lubis. 2018. Morphological Characterization of Several Strains of the Rice-Pathogenic Bacterium *Burkholderia glumae* in North Sumatra dalam IOP Conf. Ser.: Earth Environ. Sci 122 (hlm. 1–5). Medan. 7-8 November 2018.

Efektivitas Supernatan Isolat Bakteri RNC19 dan RNC43 sebagai Antagonis terhadap Patogen Hawar Malai Padi *Burkholderia glumae* in Vitro

- Hikichi, Y., Z. Kazumi, K. Toyoda, M. Horikoshi, T. Hirooka, and T. Okuno. 1998. Successive observation of growth and movement of genetically lux-marked *Pseudomonas cichorii* and the response of host tissues in the same lettuce leaf. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn*, 64, 519–25.
- Jacob J., Rajendran R. U., Priya S. H., Purushothaman J, Saraswathy Amma D. K. B. N. 2017 Enhanced antibacterial metabolite production through the application of statistical methodologies by a *Streptomyces nogalater* NIIST A30 isolated from Western Ghats forest soil. *PLoS ONE* 12(4): e0175919. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0175919>
- Kumar, D. and Kumar, S. 2016. Antimicrobial metabolites and antibiotics obtained from different environmental sources. Review article. *International J. Pharmaceutical Research & Allied Sci.*, 5(3):85-90
- Manjula K, Kishore GK, Podile AR. 2004. Whole cells of *Bacillus subtilis* AF 1 proved more effective than cell-free and chitinase-based formulations in biological control of citrus fruit rot and groundnut rust. *Can J Microbiol.* 50(9):737-44. doi: 10.1139/w04-058. PMID: 15644928.
- Maturi, L. dan Peeler, J. BAM Chapter 3: Aerobic Plate Count. <https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-chapter-3-aerobic-plate-count> (diakses pada tanggal 25 Mei 2023).
- Mulaw, T., Y. Wamishe., dan Y. Jia. 2018. Characterization and in plant detection of bacteria that cause bacterial panicle blight of rice. *American Journal of Plant Sciences*, 9, 667–84. doi: 10.4236/ajps.2018.94053.
- Munfaati, P. N., E. Ratnasari, dan G. Trimulyono. 2014. Aktivitas senyawa antibakteri ekstrak herba meniran (*Phyllanthus niruri*) terhadap pertumbuhan bakteri *Shigella dysenteriae* secara in vitro. *Lentera Bio*.
- Ngalimat, M. S., E. Mohd Hata, D. Zulperi, S. I. Ismail, M. R. Ismail, N. A. I. Mohd Zainudin, N. B. Saidi, dan M. T. Yusof. 2021. Characterization of *Streptomyces* Spp. from Rice Fields as A Potential Biocontrol Agent against *Burkholderia glumae* and Rice Plant Growth Promoter. *Agronomy*, 11(9). doi: 10.3390/agronomy11091850.
- Otten W, Bailey DJ, Gilligan CA. 2004. Empirical evidence of spatial thresholds to control invasion of fungal parasites and saprotrophs. *New Phytol.* Vol. 163(1):125-132. doi: 10.1111/j.1469-8137.2004.01086.x. PMID: 33873783.
- Parlindo, F. dan Septia, E. D. 2019. Keanekaragaman dan sebaran mikroba endofit indigenous pada tanaman kedelai (*Glycine max* L. Merrill). *Agriprima* 1(3), 1-14.
- Pellegrini, M., G. Pagnani, M. Bernardi, Al Mattedi, D. M. Spera, dan M. D. Gallo. 2020. Cell-Free Supernatants of Plant Growth-Promoting Bacteria: A Review of Their Use as Biostimulant and Microbial Biocontrol Agents in Sustainable Agriculture. *Sustainability*, 12(23). doi: 10.3390/su12239917.
- Podile, A.R., and Kishore, G.K. 2002. Biological control of peanut diseases. In *Biological control of crop diseases*. Edited by S.S. Gnanamanickam. Marcel Dekker, Inc., New York. pp. 131–160.
- Poinar, G.O., Thomas, G.M. 1984. Bacteria. In: *Laboratory Guide to Insect Pathogens and Parasites*. Springer, Boston, MA. https://doi.org/10.1007/978-1-4684-8544-8_4
- Rakhmawatie, M. D., Marfu'ati, N., Barsaliputri, B., Fikriyah, A. Z., Ethica, S. N. 2023. Antibacterial activity and GC-MS profile of secondary metabolites of *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* HSF1-9 associated with *Holothuria scabra*. *Biodiversitas* 24(5):2843-2849.
- Saraf, M., Pandya, U., dan Thakkar, A. 2014. Role of allelochemicals in plant growth promoting rhizobacteria for biocontrol of phytopathogens. *Microbiological research* 169, 18-29
- Soleha, T. U. 2015. Uji Kepekaan terhadap Antibiotik. *Juke Unila*, 5(9), 119-123.
- Sutton, S. 2011. Measurement of Microbial Cells by Optical Density. *Journal of Validation Technology*.

- Tankeshwar, A. 2022. Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Bactericidal Concentration (MBC). https://microbeonline.com/minimum-inhibitory-concentration-and-minimum-bactericidal-concentration-mbc/#google_vignette. (diakses pada tanggal 20 Juli 2023).
- Wakefield, J., Hasan, H. M., Jaspar, M., Ebel, R. and Rateb, M. E. 2017. Dual induction of new microbial secondary metabolites by fungal bacterial co-cultivation. *Frontier* vol. 8 <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01284>
- Zhou-qj, C., Z. Bo., X. Guan-lin., L. Bin., dan H. Shi-wen. 2016. Research status and prospect of *Burkholderia glumae*, the pathogen causing bacterial panicle blight. *Rice Science*, 23(3), 111–18. doi: 10.1016/j.rsci.2016.01.007.