

Eksplorasi Bakteri Potensial sebagai Agens Pengendali Hayati dan Uji Antagonistiknya terhadap *Colletotrichum acutatum* J.H. Simmonds Penyebab Penyakit Gugur Daun Karet

Hafiz Riswandi¹, Fitri Widiyanti^{2*}, Endah Yulia², Margaretta Christita^{3*},
dan Karmilla Parakkasi⁴

¹Program Studi Agronomi, Fakultas Pertanian, Universitas Padjadjaran

²Departemen Hama dan Penyakit Tumbuhan, Fakultas Pertanian, Universitas Padjadjaran
Jl. Raya Bandung-Sumedang Km. 21, Jatinangor, Jawa Barat 45363

³Pusat Riset Mikrobiologi Terapan, Badan Riset dan Inovasi Nasional (BRIN)
Kawasan Sains Teknologi Dr. (H.C) Ir. H. Soekarno,
Jl. Raya Bogor Km. 46 Cibinong, Jawa Barat 16911

⁴PT. Royal Lestari Utama
Pondok Indah Office Tower 5 Lt. 19,
Jl. Sultan Iskandar Muda Kav. V-TA, Jakarta 12310

*Alamat korespondensi: fitri.widiyanti@unpad.ac.id; marg005@brin.go.id

INFO ARTIKEL	ABSTRACT/ABSTRAK
Diterima: 02-01-2025 Direvisi: 05-05-2025 Dipublikasi: 31-05-2025	Exploration of potential bacteria as biocontrol agents and their antagonistic assay against <i>Colletotrichum acutatum</i> J.H. Simmonds, the causal agent of rubber leaf fall disease
Keywords: Chitinase, Gram-negative, Hemolysis, Hypersensitivity	Rubber (<i>Hevea brasiliensis</i> (Willd. ex A.Juss.) Müll.Arg.) is an industrial crop within the Euphorbiaceae family, originating from Brazil. It plays a crucial role in Indonesia's plantation sector. Despite its vast rubber plantation area, Indonesia's productivity remains lower than Thailand's. A major challenge in rubber cultivation in Indonesia is leaf fall disease, which results in significant yield losses. The pathogen that causes leaf fall disease also impacts private rubber plantations in East Kutai Regency. This study aims to investigate bacterial biological control agents and evaluate their antagonistic potential against the pathogenic fungi responsible for leaf fall disease. Sampling was conducted in East Kutai Regency, East Kalimantan Province, while laboratory experiments were performed at the Genomics Building and InaCC Building - BRIN in Cibinong, from September 2023 to June 2024. The antagonistic assays identified three bacterial isolates—F1.4, E1.3, and E5.2—that demonstrate potential as biological control agents. All three isolates are Gram-negative bacteria. Isolates F1.4 and E1.3 were found to produce the chitinase enzyme qualitatively. Furthermore, hemolysis and hypersensitivity assay for these isolates yielded negative results. This research is expected to provide an overview of the potential of biological control agents in supporting sustainable agriculture for rubber plants.
Kata Kunci: Gram negatif, Hemolisis, Hipersensitivitas, Kitinase	Karet (<i>Hevea brasiliensis</i> (Willd. ex A.Juss.) Müll.Arg.) adalah tanaman perkebunan yang masuk dalam famili Euphorbiaceae dan berasal dari Brazil. Karet merupakan salah satu komoditas penting bagi sektor perkebunan di Indonesia. Sebagai negara yang memiliki luas lahan karet terluas di dunia, produktivitas perkebunan karet di Indonesia masih rendah apabila dibandingkan dengan Thailand. Penyakit gugur daun merupakan salah satu masalah dalam budidaya tanaman karet di Indonesia karena mengakibatkan

kerugian hasil yang tinggi. Patogen penyebab penyakit gugur daun juga mengganggu produksi perkebunan karet swasta di Kabupaten Kutai Timur. Penelitian ini bertujuan untuk melakukan eksplorasi bakteri agens pengendali hayati dan menguji daya antagonisnya terhadap jamur patogen penyebab penyakit gugur daun. Pengambilan sampel dilakukan di Kabupaten Kutai Timur, Provinsi Kalimantan Timur sementara percobaan laboratorium dilaksanakan di Gedung Genomik dan Gedung InaCC – BRIN, Cibinong pada bulan September 2023 hingga Juni 2024. Hasil uji daya antagonis memperoleh tiga isolat bakteri— F1.4, E1.3, dan E5.2—yang berpotensi sebagai agens pengendali hayati. Tiga isolat bakteri tersebut merupakan bakteri Gram negatif. Isolat bakteri F1.4 dan E1.3 mampu menghasilkan enzim kitinase secara kualitatif. Hasil uji hemolisis dan hipersensitivitas menunjukkan gejala negatif untuk ketiga isolat bakteri tersebut. Penelitian ini diharapkan mampu memberikan gambaran mengenai potensi agens pengendali hayati dalam mendukung pertanian berkelanjutan untuk tanaman karet.

PENDAHULUAN

Karet merupakan salah satu komoditas penting untuk sektor perkebunan di Indonesia yang dikenal sebagai negara terbesar kedua di dunia sebagai produsen dan pengeksport karet alam. Pada tahun 2022 Indonesia mampu memproduksi 2,75 juta ton dan mengeksport 2,08 juta ton karet alam. Tercatat pada pertengahan tahun 2023, Indonesia berhasil memproduksi 1,11 juta ton dan mengeksport 0,95 juta ton karet alam (MRC, 2023). Perkebunan karet di Indonesia pada tahun 2021 memiliki luas 3.776.485 Ha yang terdiri dari 3.433.274 Ha (90,91%) perkebunan rakyat dan ditetapkan sebagai negara dengan luas lahan perkebunan karet terbesar di dunia. Pengelolaan perkebunan karet tersebar di 16 provinsi dengan Pulau Sumatera dan Pulau Kalimantan merupakan produsen karet alam terbesar di Indonesia (Ditjenbun, 2022).

Indonesia adalah negara yang memiliki luas lahan karet terbesar di dunia, akan tetapi produktivitas perkebunan karet di Indonesia masih rendah apabila dibandingkan Thailand. Salah satu penyebab rendahnya produktivitas perkebunan karet di Indonesia adalah serangan patogen penyebab penyakit pada daun tanaman karet yang biasa dikenal dengan penyakit gugur daun (Azizan *et al.*, 2023). Identifikasi penyakit gugur daun di Indonesia sejak tahun 2012 hingga 2019 disebabkan oleh jamur patogen, seperti *Colletotrichum* sp., *Corynespora* sp., *Oidium* sp., dan *Pestalotiopsis* sp. Gejala yang ditimbulkan oleh penyakit ini berbeda-beda tergantung jamur patogen yang menginfeksi, tetapi secara keseluruhan penyakit ini menyebabkan defoliasi terus menerus hingga 75-90%, tajuk

menjadi lebih tipis dan produksi lateks turun hingga 25-45%. Penyakit ini menyebabkan daun-daun berguguran sebelum waktunya sehingga tanaman karet tampak layu (Damiri *et al.*, 2022).

Kerugian akibat wabah penyakit gugur daun di Indonesia pada tahun 2016-2019 yang diakibatkan dari penurunan produksi lateks pada lahan seluas 382.000 Ha diperkirakan mencapai milyaran rupiah karena berkaitan erat dengan ekspor karet yang berkontribusi besar terhadap devisa negara (Alchemi & Jamin, 2022). Faktor pembatas produksi karet berupa serangan jamur patogen penyebab penyakit gugur daun karet tersebut harus segera ditangani, agar kasus wabah dapat dicegah dan tidak terulang lagi. Okubo-Kurihara *et al.* (2024) menyatakan bahwa penanggulangan serangan jamur patogen *Neopestalotiopsis* sp. dan *Colletotrichum* sp. pada tanaman karet secara kimiawi di Indonesia masih perlu diuji keefektifan bahan kimia yang digunakan dengan mempertimbangkan perlakuan pada klon karet yang berbeda, interval penyemprotan, dan jumlah aplikasi. Ota *et al.* (2025) menyebutkan pencegahan wabah penyakit gugur daun di Provinsi Sumatera Selatan kurang efektif karena pemupukan yang kurang maksimal pada lahan perkebunan karet yang memiliki tingkat kesuburan rendah.

Salah satu cara lain yang juga dapat digunakan untuk pengendalian serangan jamur patogen dan aman bagi kesuburan lahan perkebunan karet adalah penggunaan bakteri sebagai Agens Pengendali Hayati (APH) lokal. Metode nonkimia sintetik seperti penggunaan bakteri sebagai agens pengendali hayati mampu meningkatkan pertumbuhan tanaman dan pengelolaan penyakit, karena lebih aman dan ramah lingkungan. Bakteri

sebagai agens pengendali hayati juga mudah terurai di alam, ekonomis, dan memiliki spektrum aktivitas antimikroba yang luas dalam menekan populasi fitopatogen, sehingga memainkan peran besar dalam mempromosikan pertanian berkelanjutan (Kumar *et al.*, 2017). Bakteri yang ditemukan di daun dan bersifat antagonis dapat digunakan sebagai agens pengendali hayati. *Pantoea*, *Bacillus*, dan *Pseudomonas* adalah beberapa bakteri yang paling banyak digunakan sebagai APH (Trias *et al.*, 2008).

Penyakit gugur daun menyerang sejak tahun 2022 perkebunan karet di Kabupaten Kutai Timur, termasuk perkebunan swasta milik PT. Multi Karya Cemerlang (PT. MKC). Berdasarkan hal tersebut tujuan penelitian ini adalah melakukan eksplorasi bakteri agens pengendali hayati sebagai salah satu solusi untuk mengatasi permasalahan penyakit gugur daun di PT. MKC. Selain itu, pewarnaan Gram, uji daya antagonistik, kitinase, hemolisis, dan hipersensitivitas dilakukan untuk mengetahui karakteristik dan potensi bakteri yang ditemukan sebagai agens pengendali hayati.

BAHAN DAN METODE

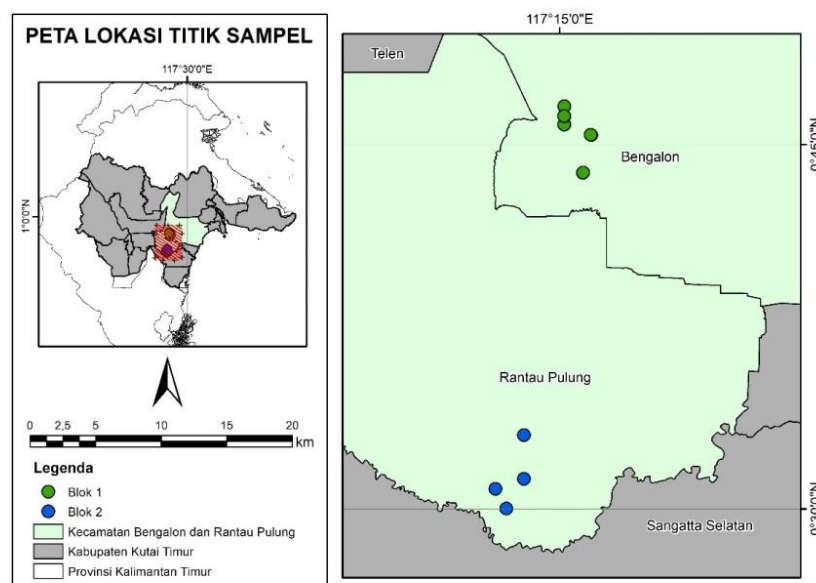
Tempat dan Waktu

Penelitian dilakukan dari bulan September 2023 hingga Juni 2024. Pengambilan sampel

dilakukan di dua blok lahan perkebunan karet PT. MKC, Kabupaten Kutai Timur, Provinsi Kalimantan Timur. Penelitian laboratorium dilaksanakan di Laboratorium Mikologi, Laboratorium Preparasi Sampel dan Laboratorium Genetika (Gedung Genomik dan Gedung Indonesian Culture Collection (InaCC)), Kompleks Cibinong Science Center-Botanical Garden, Badan Riset dan Inovasi Nasional (BRIN).

Pengambilan Sampel Daun Karet

Pengambilan sampel daun karet dilakukan di PT. Multi Kusuma Cemerlang (MKC) yang berlokasi di Kabupaten Kutai Timur, Provinsi Kalimantan Timur. Sampel daun karet dikoleksi dari dua blok tanam secara *purposive sampling* yakni mengambil daun karet sehat yang tidak memiliki gejala penyakit gugur daun. Blok 1 didominasi oleh tanaman karet yang sudah disadap dan berasal dari klon PB 260, sedangkan blok 2 terdiri dari tanaman karet yang belum disadap dan berasal dari klon IRR 112 (Tabel 1; Gambar 1). Kusdiana dkk. (2021) mengemukakan bahwa klon karet PB 260 merupakan klon karet yang moderat-tahan penyakit, sedangkan IRR 112 termasuk klon karet yang moderat-terhadap serangan penyakit gugur daun (Darojat & Oktavia, 2022).



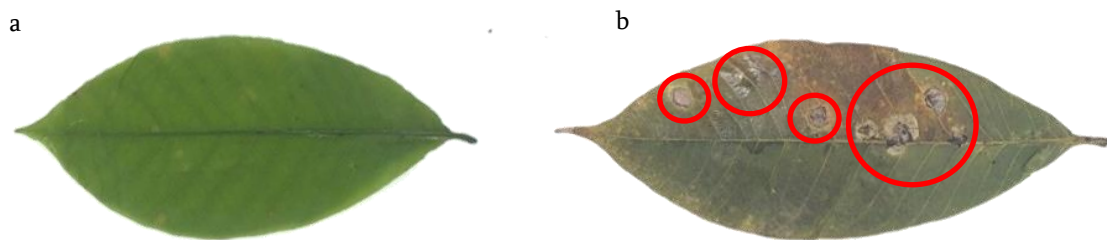
Gambar 1. Peta lokasi pengambilan sampel daun karet

Pengambilan sampel daun dilakukan secara aseptik menggunakan gunting pangkas dan sarung tangan nitril. Daun karet yang berada di ketinggian diambil menggunakan galah yang memiliki mata

pisau dan dijaring agar tidak bersentuhan langsung dengan tanah. Mata pisau diganti setiap pengambilan satu sampel daun untuk menjaga sampel tetap steril. Sampel daun yang didapat

kemudian dimasukkan ke dalam amplop dan diberi identitas sampel. Amplop yang berisi sampel daun dimasukkan ke dalam plastik klip dan disimpan dalam *cool box*. Selanjutnya sampel dibawa ke

laboratorium. Pengambilan sampel daun karet difokuskan untuk daun karet sehat yang tidak memiliki gejala serangan penyakit gugur daun ataupun hama (Gambar 2a).



Gambar 2. a) Daun karet sehat atau tidak bergejala, dan b) Daun karet sakit atau bergejala

Tabel 1. Lokasi pengambilan sampel daun karet

No.	Blok	Plot	Klon	Koordinat	Keterangan
1.	Blok 1	Q113	PB 260	0°46'10,7"N 117°15'10,9"E 0°46'10,2"N 117°15'11,3"E	Pohon belum disadap Pohon belum disadap
2.	Blok 1	Q074	PB 260	0°37'16,0"N 117°30'22,0"E 0°45'49,5"N 117°15'11,4"E 0°46'10,5"N 117°15'10,6"E	Pohon sudah disadap Pohon sudah disadap Pohon sudah disadap
3.	Blok 2	S056	IRR 112	0°30'00,8"N 117°12'48,1"E 0°41'29,0"N 117°38'57,0"E	Pohon belum disadap Pohon belum disadap
4.	Blok 2	S150	IRR 112	0°33'02,1"N 117°13'31,7"E 0°31'14,1"N 117°13'31,8"E	Pohon belum disadap Pohon belum disadap

Isolasi dan Pemurnian Isolat Bakteri Filosfer dan Bakteri Endofit Daun Karet

Isolasi bakteri daun karet dilakukan untuk mendapatkan bakteri filofit maupun bakteri endofit. Semua kegiatan dilakukan di dalam *Laminar Air Flow* (LAF). Masing-masing sebanyak lima daun sehat digunakan untuk mengisolasi bakteri filofit dan bakteri endofit. Isolasi bakteri filofit dilakukan menggunakan metode cetakan daun (*leaf imprint method*) yang mengikuti metode Shalini *et al.* (2020). Daun karet sehat dibersihkan dengan menuangkan akuades steril secukupnya untuk menghilangkan kotoran atau debu yang ada di permukaan daun. Daun kemudian dikeringkan dengan tisu steril. Selanjutnya dibuat cetakan daun pada media *Nutrient Agar* (NA) dengan cara menekannya secara halus pada permukaan agar dengan menggunakan batang kaca steril. Cetakan yang dibuat hanya menggunakan bagian permukaan adaksial daun. Cawan diinkubasi pada suhu 28 °C selama 24-48 jam. Isolasi bakteri endofit menggunakan metode sterilisasi permukaan mengikuti Linda *et al.*, (2018) dan Kabir *et al.*, (2023). Daun karet sehat dibersihkan dengan menuangkan akuades steril secukupnya untuk

menghilangkan kotoran atau debu yang ada di permukaan daun. Masing-masing sampel daun selanjutnya direndam menggunakan akuades steril dengan gelas beker yang berbeda. Sampel daun yang telah dibersihkan, kemudian direndam dengan alkohol 75% selama 30 detik. Sampel daun lalu direndam dengan NaOCl 2,5% selama 1 menit. Sampel daun selanjutnya dibilas sebanyak empat kali dengan akuades steril. Akuades steril yang digunakan untuk pembilasan keempat ditumbuhkan pada media NA sebagai validasi bahwa sterilisasi permukaan berhasil dan bakteri yang diisolasi merupakan bakteri endofit. Sampel daun kemudian dikeringkan dengan tisu steril. Sampel daun dipotong menggunakan gunting steril membentuk persegi berukuran 1-2 cm². Potongan bagian adaksial daun karet kemudian diletakan pada media NA. Cawan diinkubasi pada suhu 28 °C selama 24-48 jam. Bakteri filofit (kode isolat F) dan bakteri endofit (kode isolat E) yang tumbuh dimurnikan pada media NA baru hingga diperoleh koloni yang seragam, kemudian diamati karakteristik morfologi bakteri, seperti warna atau pigmentasi, bentuk, dan pinggiran koloni.

Uji Daya Antagonistik Bakteri Daun Karet terhadap *Colletotrichum acutatum*

Uji antagonis dilakukan dengan metode *dual culture* (Rushabh *et al.*, 2023) yang dimodifikasi antara isolat bakteri yang sudah melalui karakterisasi morfologi dan isolat jamur patogen. Metode *dual culture* merupakan metode yang paling umum digunakan untuk deteksi dini bakteri antagonis karena merupakan metode yang mudah, murah, dan cepat dalam mendapatkan hasil apabila dibandingkan dengan metode lain seperti *detached leaf assay*, *in planta assay*, dan beberapa metode kuantitatif (Nysanth *et al.*, 2022; Kjeldgaard *et al.*, 2022). *C. acutatum* digunakan sebagai jamur patogen untuk uji daya antagonistik karena merupakan isolat jamur terbanyak yang ditemukan pada sampel daun sakit atau bergejala penyakit gugur daun di PT. MKC (data belum dipublikasi). Aliya *et al.* (2022) menyebutkan bahwa *C. acutatum* kompleks dan *C. gloeosporioides* kompleks merupakan penyebab utama penyakit gugur daun di sebagian besar negara penghasil karet. Daya hambat bakteri diuji dengan menumbuhkan satu ose bakteri dan satu agar *plug* isolat jamur patogen dalam satu cawan petri dengan media PDA, tanpa isolat bakteri yang berfungsi sebagai kontrol. Cawan kontrol yang disiapkan hanya untuk isolat jamur patogen, sebagai pembanding pertumbuhan isolat jamur patogen di media PDA tanpa bakteri antagonis. Posisi isolat jamur diletakan di tengah cawan dan isolat bakteri digores di empat sisi jamur dengan jarak 3 cm. Penghitungan daya hambat dilakukan hingga hari kedelapan setelah inokulasi. Apabila dalam waktu 8 hari ditemukan jamur patogen yang belum mencapai atau melewati goresan bakteri, maka pengamatan dilanjutkan hingga hari ke-20 setelah inokulasi untuk melihat berapa lama daya hambat bakteri terhadap jamur patogen dapat berlangsung. Uji *dual culture* yang menunjukkan penghambatan pertumbuhan jamur patogen hingga hari ke-20 setelah inokulasi diamati secara mikroskopis menggunakan mikroskop *compound* Olympus BX53. Adapun penghitungan persentase penghambatan dapat diukur dengan rumus (Rushabh *et al.*, 2023) sebagai berikut:

$$R (\%) = \frac{D1-D2}{D1} \times 100\%$$

Keterangan:

R = Persentase penghambatan (%)

D1 = Diameter jamur patogen tanpa bakteri antagonis/kontrol (cm)

D2 = Diameter jamur jamur patogen dengan bakteri antagonis (cm)

Persentase penghambatan dalam uji antagonis dikelompokkan ke dalam tingkat kemampuan penghambatannya menurut Živković *et al.* (2010). Tingkat hambat rendah bila persentase penghambatannya 1%-25%, sedang bila 26%-50%, tinggi bila 51%-75% dan penghambatan tinggi bila persentase penghambatannya lebih dari 76%.

Pewarnaan Gram dan Uji Kitinase

Protokol pewarnaan gram bakteri yang berpotensi sebagai APH mengikuti González *et al.* (2023). Kaca objek dibersihkan dengan alkohol 96%. Isolat bakteri dioleskan pada permukaan kaca objek menggunakan ose. Isolat bakteri ditetesi dengan 1 ml akuades steril dan dihomogenkan. Spesimen kemudian difiksasi dengan memanaskan kaca objek secara perlahan di atas api bunsen hingga kering. Pewarna kristal violet ditetaskan secara merata tepat di atas spesimen kemudian didiamkan selama 1 menit kemudian dibilas menggunakan akuades steril. Larutan lugol iodine ditetaskan ke permukaan spesimen, lalu didiamkan selama 2 menit dan dibilas kembali dengan akuades steril. Alkohol 96% ditetaskan dan didiamkan selama 5 detik kemudian dibilas menggunakan akuades steril. Safranin ditetaskan dan didiamkan selama 1 menit lalu dibilas perlahan dengan akuades steril serta di kering anginkan. Semua proses pembilasan dengan akuades steril diusahakan selama ± 5 detik saja. Spesimen diamati menggunakan mikroskop *compound* Olympus BX53. Apabila bakteri berwarna ungu, maka bakteri tersebut adalah gram positif sedangkan apabila berwarna merah/merah muda, maka bakteri tersebut adalah gram negatif.

Uji kualitatif kitinase mengikuti Linda *et al.* (2018). Koloidal kitin dibuat dari kitin cangkang udang (SigmaAldrich). Sebanyak 20 g kitin dilarutkan dalam 150 ml HCl 37% dan dihomogenkan dengan *magnetic stirrer* selama 1 jam. Larutan disaring menggunakan kain katun steril. Hasil saringan ditampung dalam 800 ml akuades steril dingin (4 °C) dan diinkubasi pada suhu 4 °C selama 24 jam. Endapan akan terbentuk sebagai koloid kitin. Kemudian bilas dengan air secara terus menerus sampai pH netral. Endapan kitin dikumpulkan melalui sentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm selama 10 menit. Setelah koloidal kitin didapatkan, selanjutnya disiapkan media *Colloidal Chitin Agar* (CCA) dengan komposisi terdiri dari

K₂HPO₄ 0,07% (w/v), KH₂PO₄ 0,03% (w/v), MgSO₄·5H₂O 0,05% (w/v), MnCl₂ 0,0001% (w/v), ZnSO₄ 0,0001% (w/v), bacto agar 2% (w/v), dan koloidal kitin 2% (w/v). Sebanyak satu ose bakteri dari media NA berumur 24 jam diinokulasikan pada permukaan media koloidal kitin. Cawan diinkubasi pada suhu 37 °C selama 7 hari untuk melihat kemunculan zona bening pada media koloidal kitin. Indeks kitinolitik diperoleh dengan cara membandingkan diameter zona bening yang terbentuk dengan diameter koloni yakni sebagai berikut:

$$IK = \frac{D_1}{D_2}$$

Keterangan:

IK = Indeks kitinolitik

D1 = Diameter zona bening

D2 = Diameter koloni bakteri

Semakin tinggi indeks kitinolitik, semakin tinggi pula sifat kitinolitik suatu isolat. Sifat kitinolitik bakteri dianggap kuat jika indeks kitinolitik di atas 2 (Hardoko *et al.*, 2020).

Uji Hemolisis dan Hipersensitivitas

Uji hemolisis dilakukan mengikuti Amaria *et al.* (2023). Sebanyak satu ose bakteri dari media NA berumur 24 jam diinokulasikan pada permukaan media agar darah/*blood agar*. Cawan petri kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37 °C. Hasil diinterpretasikan berdasarkan zona bening atau perubahan warna yang terbentuk di sekeliling koloni bakteri. Uji hemolisis dilakukan sebanyak dua kali ulangan dengan kontrol positif *Pseudomonas aeruginosa* dan kontrol negatif berupa akuades steril.

Uji hipersensitif dilakukan mengikuti Fitri dkk. (2023). Isolat bakteri yang berpotensi sebagai APH (sudah diremajakan dan berumur 24 jam) diinokulasikan ke dalam 100 ml media *Nutrient Broth* (NB), kemudian diinkubasi selama 24 jam dengan *Rotary Incubator Shaker* pada suhu 28 °C dan kecepatan 150 rpm. Sebanyak 1 ml isolat bakteri dengan kepadatan 10⁹ CFU/ml diinokulasikan menggunakan alat suntik/*syringe* ke dalam jaringan abaksial daun tembakau. Kontrol positif yang digunakan adalah isolat *Pseudomonas aeruginosa*, sedangkan kontrol negatif berupa akuades steril. Pengamatan gejala hipersensitif seperti nekrosis dan klorosis dilakukan 24-72 jam setelah inokulasi.

Identifikasi Bakteri Daun Karet Berdasarkan Sekuen Gen 16S rRNA

Identifikasi bakteri daun karet dilakukan dengan DNA ribosom 16S. Ekstraksi DNA isolat bakteri yang berpotensi sebagai APH dilakukan dengan menggunakan metode pemanasan PCR koloni dengan *microwave* (*microwave irradiation*) (Dashti *et al.*, 2009; Bergkessel & Guthrie, 2013; Liang *et al.* 2018). DNA bakteri daun karet diamplifikasi dengan menggunakan primer 27F (5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3') dan 1492R (5'-GGT TAC CTT GTT ACG AC TT-3'). Pengurutan DNA yang diamplifikasi dilakukan di laboratorium 1st BASE (PT. Genetika Science Indonesia). Data hasil sekuensing dicocokkan dengan data NCBI *Gen Bank* menggunakan BLAST yang dapat diakses di <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>. Beberapa sekuens dari pangkalan data (*Gen bank*) digunakan sebagai komponen untuk menyusun pohon filogenetik. Konstruksi pohon filogenetik dibuat menggunakan program MEGA 11. Sekuens disejajarkan dengan menggunakan fitur *Align by MUSCLE*. Analisis filogenetik dilakukan dengan metode *Neighbor Joining Tree* dalam *bootstrap* 1.000 ulangan.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Isolasi dan Pemurnian Isolat

Isolasi dan pemurnian isolat bakteri menggunakan media NA sebagai media tumbuh. Metode isolasi secara sterilisasi permukaan dan metode cetakan daun (*leaf imprint method*) mendapatkan masing-masing enam isolat bakteri endofit (E) dan enam isolat bakteri filosfer (F) dari empat lokasi (Tabel 2).

Secara keseluruhan isolat bakteri daun karet banyak ditemukan pada blok 2 dengan kondisi tanaman karet belum mengalami penyadapan. Lan *et al.* (2024) mengungkapkan bahwa bahwa komunitas bakteri endofit lebih dipengaruhi oleh penuaan daun daripada komunitas bakteri filosfer. Tingginya kelimpahan gen metabolisme di endosfer daun yang berwarna kuning berkontribusi pada proses degradasi dan relokasi hara dibandingkan daun berwarna hijau. Daun karet yang menua dan akhirnya gugur menyebabkan bakteri endofit tidak dapat bertahan hidup karena tidak ada pasokan nutrisi. Hubungan kondisi kekeringan dengan kandungan air di dalam tanaman karet sangat berkaitan karena pohon karet dapat merontokkan daun-daunnya saat disadap secara terus menerus

(Kunjet *et al.*, 2013). Peristiwa meranggasnya daun karet saat kekeringan tentu juga berkaitan erat dengan proses penuaan daun. Kondisi lingkungan blok 2 PT. MKC berdekatan dengan wilayah konservasi dan mengadopsi sistem agroforestri. Blok 2 tentu memiliki ekosistem yang lebih alami dibandingkan dengan blok 1. Integrasi pepohonan

ke dalam lahan pertanian monokultur dapat mengubah sifat-sifat tanah dan siklus hara. Praktik agroforestri telah terbukti mempengaruhi komunitas mikroba tanah yang ditunjukkan oleh perubahan aktivitas enzim, respirasi yang diinduksi oleh substrat, dan biomassa mikroba (Beule *et al.*, 2020).

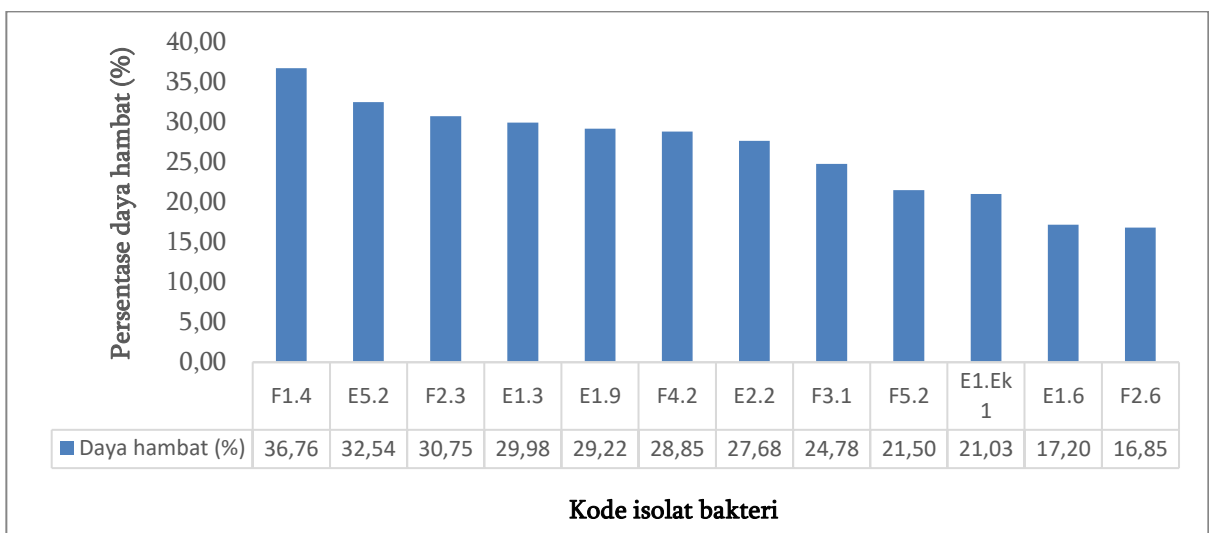
Tabel 2. Morfologi isolat bakteri yang ditemukan

No.	Asal sampel	Plot	Kode Isolat	Karakteristik koloni
1.	Blok 1	Q113	F3.1	Koloni berwarna putih pucat, bentuk bulat, dan pinggirannya bergelombang
2.	Blok 1	Q074	F4.2	Koloni berwarna putih pucat, bentuk bulat, dan pinggirannya halus
3.	Blok 1	Q074	F5.2	Koloni berwarna putih pucat, bentuk bulat, dan pinggirannya halus
4.	Blok 1	Q074	E5.2	Koloni berwarna putih kekuningan, bentuk bulat, dan pinggirannya halus
5.	Blok 2	S056	F1.4	Koloni berwarna putih kekuningan, bentuk bulat, dan pinggirannya halus
6.	Blok 2	S056	E1.Ek1	Koloni berwarna kuning, bentuk bulat, dan pinggirannya halus
7.	Blok 2	S056	E1.3	Koloni berwarna putih kekuningan, bentuk bulat, dan pinggirannya halus
8.	Blok 2	S056	E1.6	Koloni berwarna putih pucat, bentuk bulat, dan pinggirannya halus
9.	Blok 2	S056	E1.9	Koloni berwarna putih pucat, bentuk bulat, dan pinggirannya bergelombang
10.	Blok 2	S150	F2.3	Koloni berwarna kuning, bentuk bulat, dan pinggirannya halus
11.	Blok 2	S150	F2.6	Koloni berwarna kuning, bentuk bulat, dan pinggirannya halus
12.	Blok 2	S150	E2.2	Koloni berwarna putih pucat, bentuk bulat, dan pinggirannya bergelombang

Daya Hambat Antagonis Bakteri Daun Karet terhadap *C. acutatum* secara *In Vitro*

Dua belas isolat bakteri yang ditemukan pada daun karet selanjutnya diuji antagonisme terhadap *C. acutatum*. Menurut Lee *et al.* (2023) bakteri menekan pertumbuhan patogen melalui berbagai mekanisme, seperti antibiosis, kompetisi nutrisi dan ruang serta induksi ketahanan tanaman terhadap infeksi patogen. Perbedaan mekanisme ini

menyebabkan setiap bakteri memiliki daya hambat yang berbeda-beda. Tujuh isolat bakteri memiliki tingkat penghambatan yang termasuk dalam kategori sedang (26%-50%) dan lima isolat bakteri termasuk dalam kategori rendah (1%-25%) (Gambar 3). Diduga isolat bakteri yang diperoleh dapat menghasilkan mekanisme antibiosis dan kompetisi nutrisi dalam menghambat pertumbuhan *C. acutatum* (Gambar 4).

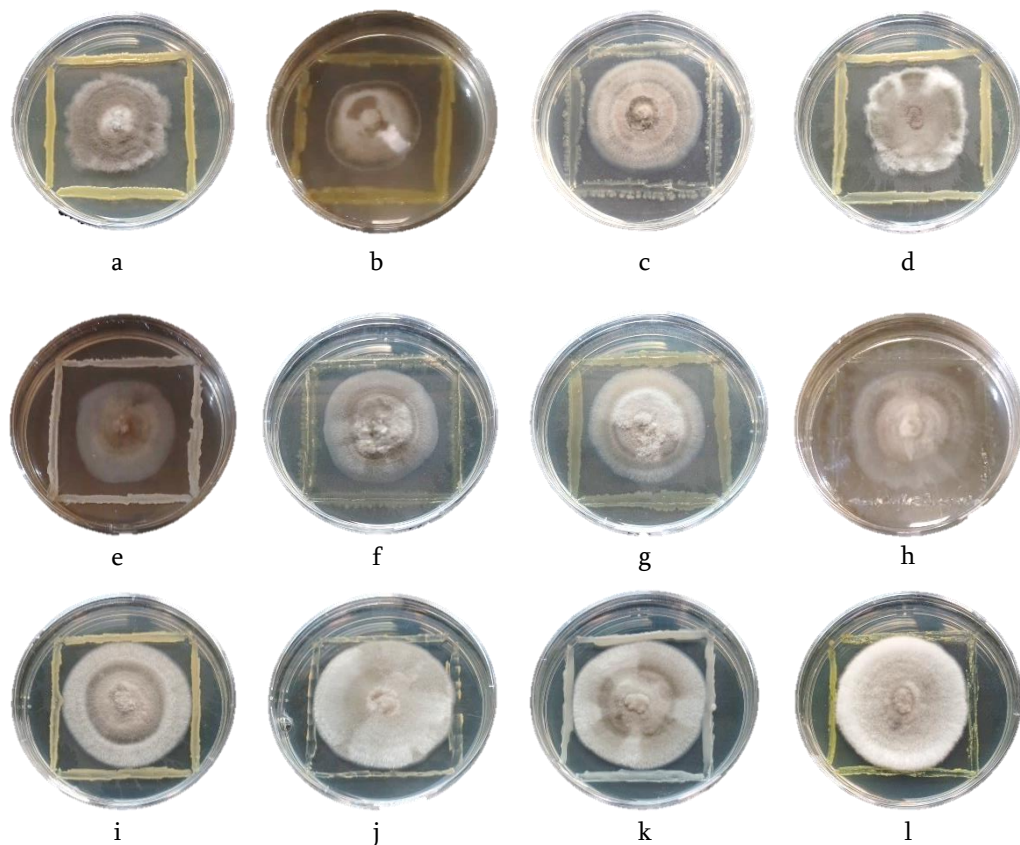


Gambar 3. Daya hambat antagonis isolat bakteri daun karet terhadap pertumbuhan *C. acutatum* pada hari kedelapan setelah inokulasi dengan metode *dual culture*

Bonatelli *et al.* (2019) menyatakan bahwa isolat bakteri yang ditemukan pada daun sehat tanaman guarana menarik untuk diamati. Kondisi ini sangat terkait dengan fase invasi awal patogen pada daun guarana yang tidak bergejala dan mekanisme pertahanan atau kompetisi yang dilakukan oleh bakteri yang memiliki potensi sebagai agens pengendali hayati (APH). Bonatelli *et al.* (2019) juga menemukan tingginya aktivitas enzim amilase dan pektat liase pada daun guarana sehat

dibandingkan dengan daun guarana yang bergejala atau terserang penyakit.

Keberadaan enzim amilase berhubungan dengan sumber energi mikroorganisme, antijamur, dan pencegahan infeksi patogen (Markovich & Kononova, 2003), sedangkan enzim pektat liase dikenal sebagai enzim pengurai struktur dinding sel tanaman (pektin) yang digunakan oleh patogen (Uluisk & Seymour, 2019).



Gambar 4. Penghambatan pertumbuhan *C. acutatum* oleh isolat bakteri daun karet pada medium PDA pada hari kedelapan setelah inokulasi dengan metode *dual culture*. a) Isolat F1.4, b) Isolat E5.2, c) Isolat F2.3, d) Isolat E1.3, e) Isolat E1.9, f) Isolat F4.2, g) Isolat E2.2, h) Isolat F3.1, i) Isolat F5.2, j) Isolat E1.Ek1, k) Isolat E1.6, dan l) Isolat F2.6

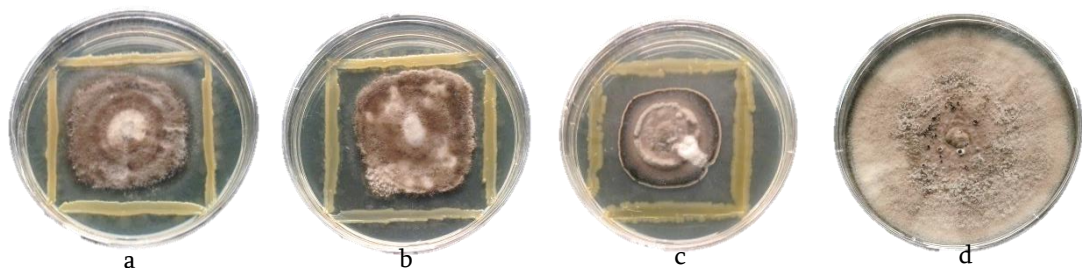
Pengamatan tetap dilakukan untuk tujuh isolat bakteri yang masuk dalam kategori sedang hingga hari ke-20 setelah inokulasi. Pengamatan ini bertujuan untuk melihat daya hambat isolat bakteri daun karet dalam rentang waktu yang lebih lama, saat koloni *C. acutatum* masih dapat tumbuh di media PDA. *C. acutatum* kompleks dan *C. gloeosporioides* kompleks dianggap sebagai penyebab utama penyakit gugur daun *Colletotrichum* di sebagian besar negara penghasil karet (Aliya *et al.*, 2022). Penelitian lebih lanjut

mengungkapkan bahwa *C. gloeosporioides* memiliki tingkat pertumbuhan koloni yang secara signifikan lebih tinggi dibandingkan dengan *C. acutatum* (Cao *et al.*, 2017). Liang *et al.* (2021) menyebutkan bahwa *C. gloeosporioides* memiliki diameter koloni yang dua kali lipat lebih besar dibandingkan *C. acutatum* pada hari keenam setelah inokulasi di media PDA. *C. gloeosporioides* juga menyebabkan diameter lesi yang 3 kali lipat lebih besar dibandingkan *C. acutatum* pada hari ketiga setelah inokulasi di daun karet saat pengujian patogenisitas.

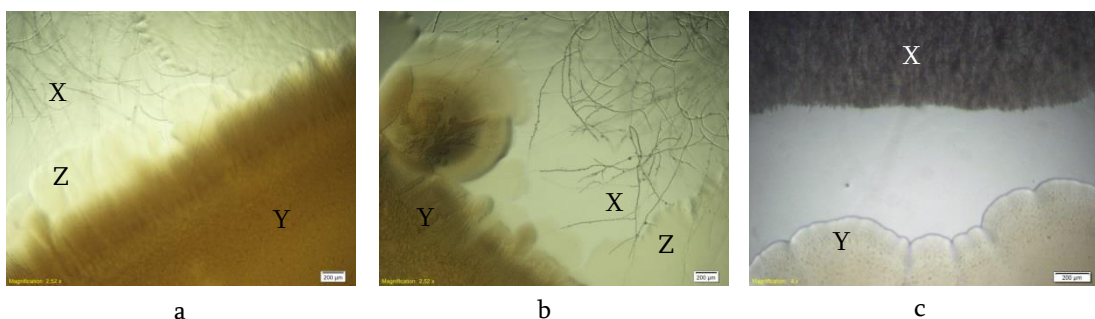
Pengamatan daya hambat isolat bakteri daun karet hingga hari ke-20 setelah inokulasi mendapatkan tiga isolat bakteri yang mampu menahan pertumbuhan *C. acutatum*, yaitu isolat F1.4, E1.3, dan E5.2. Hifa *C. acutatum* tidak dapat menembus isolat F1.4, E1.3, dan E5.2 baik secara makroskopis (Gambar 5) maupun mikroskopis (Gambar 6). Mekanisme isolat F1.4 (Gambar 6a) dan isolat E1.3 (Gambar 6b) dalam menahan pertumbuhan *C. acutatum* diduga sebagai antibiosis, karena terlihat adanya zona bening (Z) yang memisahkan antara isolat bakteri daun karet dengan *C. acutatum*. Hal ini sangat berbeda dengan isolat E5.2 yang tidak ditemukan adanya zona bening (Gambar 6c), sehingga diduga melakukan kompetisi sebagai cara dalam menahan pertumbuhan *C. acutatum*. Mekanisme antibiosis terhadap patogen dapat dicapai melalui produksi zat penghambat pertumbuhan patogen seperti antibiotik atau metabolit antimikroba di lingkungan dengan sumber

daya terbatas (Abraham *et al.*, 2013; Mourou *et al.*, 2022).

Soumyamol *et al.* (2023) menyebutkan bahwa bakteri endofit tanaman karet yang memiliki kemampuan menghambat pada uji antagonistik *dual culture*, diketahui menghasilkan antibiotik, enzim dan senyawa volatil yang memainkan peran penting dalam mengendalikan berbagai patogen tanaman karet. Arios dkk. (2014) melaporkan bahwa ukuran zona hambat yang dihasilkan dari interaksi antara bakteri endofit dan jamur patogen bergantung pada berbagai faktor, termasuk jenis, kelarutan, dan stabilitas metabolit yang dihasilkan oleh bakteri dalam medium uji, serta kepadatan dan komposisi medium itu sendiri. Produksi metabolit bakteri tidak hanya dipengaruhi oleh keberadaan jamur patogen, tetapi juga oleh stres lingkungan dan nutrisi. Senyawa metabolit bakteri cenderung diproduksi pada tingkat maksimum di lingkungan di mana ketersediaan nutrisi untuk pertumbuhan bakteri terbatas (Brader *et al.*, 2014).



Gambar 5. Penghambatan pertumbuhan *C. acutatum* oleh isolat bakteri daun karet pada medium PDA pada hari ke-20 setelah inokulasi dengan metode *dual culture*. a) Isolasi F1.4, b) Isolasi E1.3, c) Isolasi E5.2, dan d) kontrol.



Gambar 6. Kenampakan makroskopis (perbesaran 10x) proses penghambatan pertumbuhan *C. acutatum* oleh isolat bakteri daun karet pada medium PDA pada hari ke-20 setelah inokulasi dengan metode *dual culture*. X merupakan hifa *C. acutatum*, Y merupakan isolat bakteri, dan Z merupakan zona bening yang terbentuk di antara hifa *C. acutatum* dan isolat bakteri. a) Isolasi F1.4, b) Isolasi E1.3, dan c) Isolasi E5.2

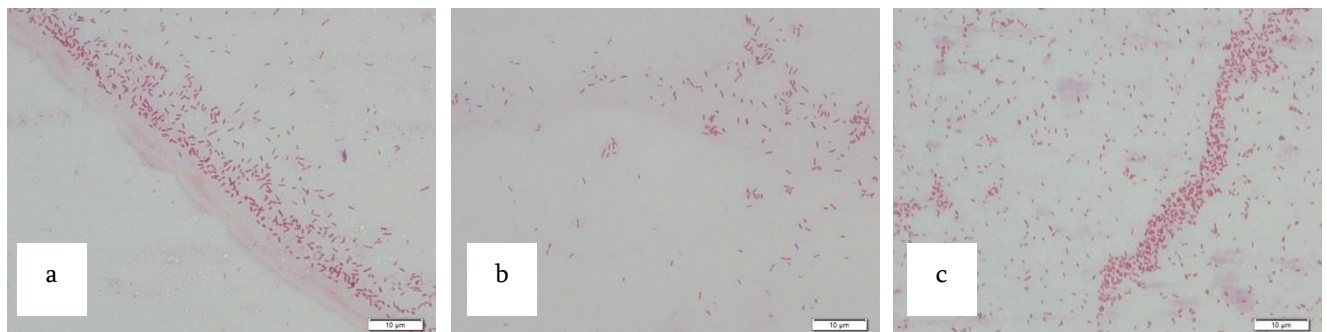
Pewarnaan Gram dan Uji Kitinase

Pewarnaan Gram dengan menggunakan kristal violet, iodine dan safranin dilakukan terhadap isolat F1.4, E1.3, dan E5.2. Hasil pewarnaan

menunjukkan bahwa ketiga isolat tersebut sebagai bakteri Gram negatif, karena berwarna merah muda (Gambar 7). Bakteri Gram negatif dikelilingi oleh dinding sel peptidoglikan tipis dan membran luar

yang mengandung lipopolisakarida, sehingga tidak mampu mempertahankan warna ungu dari kristal violet (Beveridge, 2001). Beberapa bakteri Gram negatif yang digunakan sebagai agens pengendali

hayati berasal dari keluarga Rhizobiaceae, Enterobacteriaceae, dan Xanthomonadaceae (Bonaterra *et al.*, 2022).



Gambar 7. Pewarnaan Gram isolat bakteri daun karet. a) Isolat F1.4, b) Isolat E1.3, dan c) Isolat E5.2

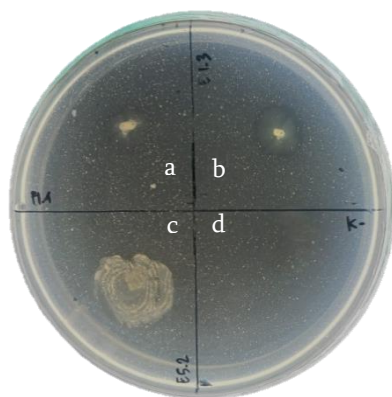
Isolat bakteri daun karet yang menghasilkan enzim kitinase secara kualitatif adalah isolat F1.4 dan E1.3 (Tabel 3). Isolat F1.4 dan E1.3 menghasilkan zona bening saat diinkubasi pada media kitin selama tujuh hari (Gambar 8). Zona bening yang mengelilingi koloni bakteri menunjukkan adanya aktivitas kitinase untuk memecah senyawa kitin yang terdapat dalam media tumbuh (Linda *et al.*, 2018). Kitin merupakan senyawa yang menyusun dinding sel jamur dan

berfungsi untuk menjaga stabilitas osmotik (Bowman & Free, 2006). Isolat F1.4 dan E1.3 yang mampu menghasilkan enzim kitinase memiliki potensi untuk memecah dinding sel jamur patogen penyebab penyakit gugur daun karet. Indeks kitinolitik isolat rata-rata F1.4 dan E1.3 masing-masing adalah 3,48 dan 4,49. Hal ini menunjukkan sifat kitinolitik isolat F1.4 dan E1.3 termasuk kuat untuk memecah senyawa kitin.

Tabel 3. Pewarnaan Gram, pengujian kitinase, hemolisis, dan reaksi hipersensitif pada daun tembakau

No.	Nama isolat	Jenis Gram	Uji kitinase	Uji hemolisis	Reaksi hipersensitif	Gejala hipersensitif
1.	F1.4	Negatif	+	-	-	-
2.	E1.3	Negatif	+	-	-	-
3.	E5.2	Negatif	-	-	-	-

Keterangan: - tidak menunjukkan/menghasilkan respon, + menunjukkan/menghasilkan respon



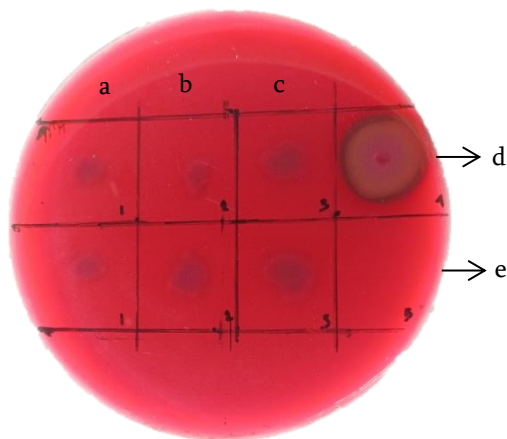
Gambar 8. Uji kitinase isolat bakteri daun karet. a) Isolat F1.4, b) Isolat E1.3, c) Isolat E5.2, dan d) Kontrol negatif (akuades steril)

Uji Hemolisis dan Hipersensitivitas

Pengujian dilanjutkan dengan uji hemolisis dan hipersensitivitas yang berhubungan dengan keamanan hayati. Uji hemolisis bertujuan untuk mengetahui apakah isolat bakteri yang ingin digunakan sebagai agens pengendali hayati aman untuk manusia dan hewan. Uji hemolisis dengan menggunakan media agar darah (*blood agar*) memperoleh hasil negatif (reaksi hemolisis gamma (γ)) untuk isolat F1.4, E1.3, dan E5.2 (Tabel 3). Setelah proses inkubasi selama 24 jam, tidak ditemukan adanya perubahan warna (reaksi hemolisis alfa (α)) dan munculnya zona bening (reaksi hemolisis beta (β)) di sekitar isolat F1.4, E1.3, dan E5.2 (Gambar 9). Zona bening muncul pada

isolat kontrol positif yang digunakan yaitu *Pseudomonas aeruginosa*.

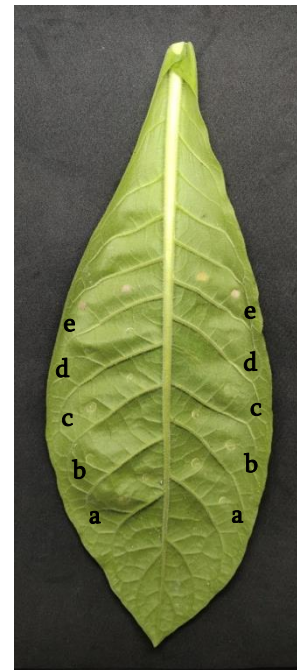
Hemolisis merupakan reaksi di mana sel darah merah dari media tumbuh dihancurkan karena adanya enzim yang diproduksi oleh bakteri yang disebut hemolisin (Amaria *et al.*, 2023). Reaksi hemolitik biasanya dibagi menjadi tiga kategori yaitu reaksi hemolisis α atau hemolisis parsial, reaksi hemolisis β atau hemolisis penuh, dan reaksi hemolisis γ atau tidak ada hemolisis. Gilligan (2013) memaparkan bahwa hemolisis α adalah karakteristik organisme seperti *Streptococcus pneumonia* dan *Lactobacillus* spp. serta menghasilkan agar yang mengalami perubahan warna hijau di area sekitar koloni. Hemolisis β sering terlihat pada organisme seperti *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, dan *Pseudomonas aeruginosa*. Hal ini ditandai dengan zona bening yang berbeda di sekitar koloni sehingga media di sekitarnya menjadi transparan.



Gambar 9. Uji hemolisis isolat bakteri daun karet. a) Isolat F1.4, b) Isolat E1.3, c) Isolat E5.2, d) Kontrol positif (*Pseudomonas aeruginosa*), dan e) Kontrol negatif (akuades steril)

Uji hipersensitivitas pada daun tembakau bertujuan untuk mengetahui apakah isolat bakteri yang ingin digunakan sebagai agens pengendali hayati bersifat patogenik atau tidak. Hasil pengujian hipersensitivitas menunjukkan tidak ada isolat bakteri jamur karet yang menyebabkan gejala klorosis dan nekrosis pada daun tembakau (Gambar 10). Gejala klorosis dan nekrosis ditunjukkan oleh kontrol positif yakni *Pseudomonas aeruginosa*. Tidak adanya gejala pada daun tembakau mengindikasikan bahwa isolat bakteri tersebut tidak bersifat patogenik. Suspensi bakteri yang diinfiltrasi pada

daun tembakau menginduksi aktivasi gen pertahanan dan produksi metabolit sekunder antimikroba yang berperan sebagai penghalang tanaman terhadap infeksi patogen (Wang *et al.*, 2016). Penelitian Wang *et al.* (2016) juga mengungkapkan bahwa tidak ada korelasi langsung antara asal isolat bakteri (filosfer atau endofit) dengan reaksi keamanan hayati (hemolisis dan hipersensitif).



Gambar 10. Uji hipersensitivitas isolat bakteri daun karet. a) Isolat F1.4, b) Isolat E1.3, c) Isolat E5.2, d) Kontrol negatif (akuades steril), dan e) Kontrol positif (*Pseudomonas aeruginosa*)

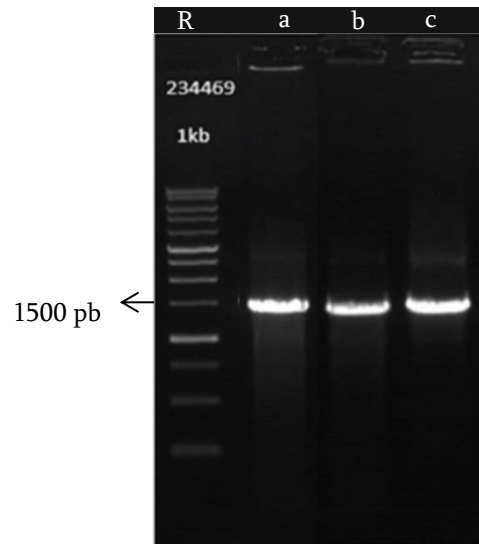
Identifikasi molekuler

Isolat bakteri daun karet F1.4, E1.3, dan E5.2 diidentifikasi lebih lanjut pada RNA ribosomal (16S rRNA). Teknik analisis sekuens gen 16S rRNA, gen yang mengkode subunit kecil RNA ribosomal, umumnya digunakan untuk klasifikasi filogenetik dan rekonstruksi filogeni prokariotik (Janda & Abbott, 2007). Amplifikasi gen 16S rRNA isolat F1.4, E1.3, dan E5.2 menghasilkan fragmen DNA berukuran masing-masing 1431 pb, 1429 pb, dan 1426 pb (Gambar 11). Hasil analisis menggunakan BLAST menunjukkan isolat F1.4 dan E1.3 tergabung dalam famili Xanthomonadaceae dan genus *Stenotrophomonas*, sedangkan isolat E5.2 termasuk dalam famili Enterobacteriaceae dan genus *Pantoea*.

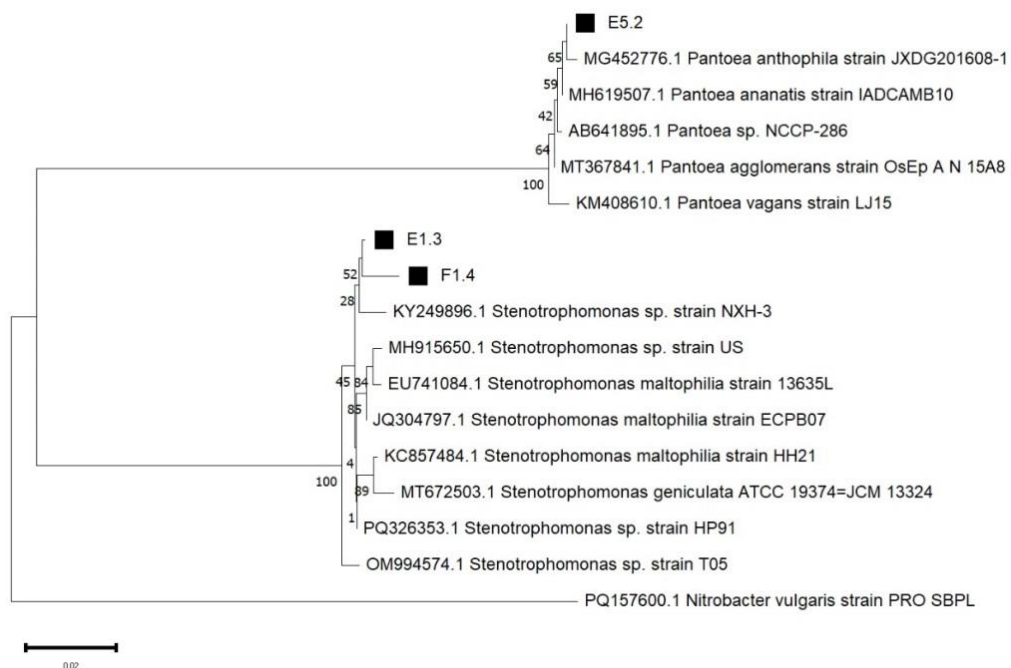
Analisis filogenetik dilakukan dengan menggunakan penyejajaran sekuens ganda MUSCLE dan metode *Neighbor Joining Tree* dalam *bootstrap* 1.000 ulangan. Isolat F1.4 dan E1.3 homolog dengan *Stenotrophomonas* sp. strain NXH-3, sedangkan isolat E5.2 homolog dengan *Pantoea anthophila* strain JXDG201608-1 (Gambar 12). *Stenotrophomonas maltophilia* strain 13635L merupakan strain bakteri di pangkalan data *Gen Bank* yang mendekati isolat F1.4 dan E1.3 untuk takson tingkat spesies. *Pantoea ananatis* strain IADCAMB10 mengikuti *Pantoea anthophila* strain JXDG201608-1 dalam kedekatan hubungan kekerabatan dengan isolat F1.4 dan E1.3.

Stenotrophomonas spp., khususnya *S. maltophilia* and *S. rhizophila* sering ditemukan berasosiasi dengan tanaman. Bakteri ini dapat diisolasi dari rhizosfer atau dari jaringan tanaman (endofit), terutama dari jaringan vaskular pada akar dan batang. Sebagian besar *Stenotrophomonas* spp. dapat beradaptasi di lingkungan dengan nutrisi yang terbatas, karena kemampuan *Stenotrophomonas* spp. untuk berkoloni dan bertahan hidup pada permukaan tanaman (Ryan *et al.* 2009; Kumar *et al.* 2023). Bakteri *Stenotrophomonas* banyak diteliti karena potensi penggunaannya sebagai bioinokulan yang efektif untuk mendorong pertumbuhan tanaman serta mengelola beberapa penyakit tanaman pangan dan perkebunan (Ulrich *et al.*, 2021). *Stenotrophomonas maltophilia* BCM mampu

mengkode beragam enzim hidrolitik (CAzymes, protease, kitinase, glukonase, dan lipase), produksi fitohormon (IAA), pelarut nutrisi (Fosfat) dan produksi fenazin (de Souza *et al.*, 2015; Sharma *et al.*, 2024).



Gambar 11. Hasil elektroforesis amplicon 16S rRNA. Amplicon 16S rRNA isolat bakteri daun karet : a) Isolat F1.4 (1431 pb), b) Isolat E1.3 (1429 pb), dan c) Isolat E5.2 (1426 pb). R = *Gen ruler* 1 kb DNA ladder



Gambar 12. Pohon filogenetik isolat bakteri daun karet

Pantoea spp. biasanya ditemukan berasosiasi dengan tanaman serta hidup di berbagai tanah dan lingkungan perairan di seluruh dunia (Walterson & Stavrinides, 2015). Duchateau *et al.* (2024) mengemukakan bahwa beberapa *Pantoea* spp. memiliki potensi dikembangkan sebagai agens pengendali hayati karena mampu menghasilkan senyawa antimikroba untuk perlindungan tanaman. Beberapa senyawa antimikroba tersebut yaitu: 1) senyawa organik volatil (2-nonanol, 3-metil butanol, dan p-xylene), 2) Antibiotik (fenazin, dapdiamida, dan residu peptida) dan 3) biosurfaktan seperti golongan glikolipid (ananatosida A dan B), derivat lipid (3-hidroksialkanoat) dan lipopeptida (herbicolin A dan B). Beberapa jenis bakteri *Pantoea* spp. yang sudah diujicoba secara *in vivo* seperti *P. agglomerans*, *P. ananatis*, *P. dispersa*, *P. jilinsensis*, dan *P. vagans* (Duchateau *et al.*, 2024). Walterson & Stavrinides (2015) juga mengindikasikan *P. anthophila* tidak termasuk dalam kategori patogen tanaman.

SIMPULAN

Hasil isolasi dari daun karet diperoleh 6 isolat bakteri endofit dan 6 isolat bakteri filosfer. Sebanyak 7 isolat bakteri termasuk dalam kategori bakteri dengan daya hambat sedang (26%-50%). Tujuh isolat bakteri tersebut yaitu isolat F1.4, E5.2, F2.3, E1.3, E1.9, F4.2, dan E2.2. Isolat bakteri yang masuk dalam kategori sedang dan mampu menahan pertumbuhan *C. acutatum* hingga hari ke-20 setelah inokulasi adalah isolat F1.4, E1.3, dan E5.2. Isolat F1.4, E1.3, dan E5.2 merupakan bakteri Gram negatif. Isolat bakteri F1.4 dan E1.3 mampu menghasilkan enzim kitinase secara kualitatif. Hasil uji hemolisis dan hipersensitivitas menunjukkan gejala negatif untuk isolat bakteri F1.4, E1.3, dan E5.2. Isolat F1.4 dan E1.3 homolog dengan *Stenotrophomonas* sp. strain NXH-3, sedangkan isolat E5.2 homolog dengan *Pantoea anthophila* strain JXDG201608-1. Penelitian ini masih dapat dilanjutkan dengan melakukan uji kompatibilitas bakteri sebagai dasar pembuatan formulasi agens pengendali hayati dan uji *in planta* di rumah kaca sebelum formulasi agens pengendali hayati diujicobakan ke lapangan.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Kepala Pusat Pengembangan Sumber Daya Manusia

Pertanian, Kementerian Pertanian atas bantuan dana penelitian. Penulis juga mengucapkan terima kasih kepada PT. Royal Lestari Utama, PT. Multi Kusuma Cemerlang, dan Pusat Riset Mikrobiologi Terapan – Badan Riset dan Inovasi Nasional (BRIN) atas pendanaan, penyediaan fasilitas serta alat dan bahan selama pengambilan sampel di lapangan dan penelitian di laboratorium, serta berbagai pihak yang turut membantu dalam pelaksanaan penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Abraham, A, S Philip, C Kuruvilla Jacob, and K Jayachandran. 2013. Novel bacterial endophytes from *Hevea brasiliensis* as biocontrol agent against *Phytophthora* leaf fall disease. *BioControl*. 58: 675–684. <https://doi.org/10.1007/s10526-013-9516-0>.
- Alchemi, PJK, and S Jamin. 2022. Impact of *Pestalotiopsis* leaf fall disease on leaf area index and rubber plant production. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*. 995. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/995/1/012030>.
- Aliya, SSS, SA Nusaibah, MM Mahyudin, WM Yun, and MR Yusop. 2022. *Colletotrichum siamense* and *Pestalotiopsis jesteri* as potential pathogens of new rubber leaf spot disease via detached leaf assay. *Journal of Rubber Research*. 25: 195–212. <https://doi.org/10.1007/s42464-022-00157-4>.
- Amaria, W, MS Sinaga, KH Mutaqin, Supriadi, and Widodo. 2023. Hemolysis and hypersensitive tests ease culture collection management of antagonistic bacteria. *Journal of Tropical Plant Pests and Diseases*. 23: 24–30. <https://doi.org/10.23960/jhptt.22324-30>.
- Arios, LN, D Suryanto, K Nurtjahja, dan E Munir. 2014. Asai kemampuan bakteri endofit dari kacang tanah dalam menghambat pertumbuhan *Sclerotum* sp. pada kecambah kacang tanah. *Jurnal Hama dan Penyakit Tropika*. 14: 178–186. <https://doi.org/10.23960/j.hptt.214178-186>.
- Azizan, FA, IS Astuti, A Young, and A Abdul Aziz. 2023. Rubber leaf fall phenomenon linked to increased temperature. *Agriculture, Ecosystems and Environment*. 352: 108531. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2023.108531>.
- Beveridge, TJ. 2001. Use of the Gram stain in microbiology. *Biotechnic and Histochemistry*.

- 76: 111–118.
<https://doi.org/10.1080/bih.76.3.111.118>.
- Beule, L, E Lehtsaar, MD Corre, M Schmidt, E Veldkamp, and P Karlovsky. 2020. Poplar rows in temperate agroforestry croplands promote bacteria, fungi, and denitrification genes in soils. *Frontiers in Microbiology*. 10: 1–11.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.03108>.
- Bonatelli, ML, S Tsui, BD Batista, MN Dourado, EW Kitajima, FD Andreote, VS Pylro, JO Pereira, JL de Azevedo, and MC Quecine. 2019. Bacterial communities associated with anthracnose symptomatic and asymptomatic leaves of guarana, an endogenous tropical crop, and their pathogen antagonistic effects. *Archives of Microbiology*. 201: 1061–1073.
<https://doi.org/10.1007/s00203-019-01677-1>.
- Bonaterra, A, E Badosa, N Daranas, J Francés, G Roselló, and E Montesinos. 2022. Bacteria as biological control agents of plant diseases. *Microorganisms*. 10: 10.
<https://doi.org/10.3390/microorganisms10091759>.
- Bowman, SM, and SJ Free. 2006. The structure and synthesis of the fungal cell wall. *BioEssays*. 28: 799–808.
<https://doi.org/10.1002/bies.20441>.
- Brader, G, S Compant, B Mitter, F Trognitz, and A Sessitsch. 2014. Metabolic potential of endophytic bacteria. *Current Opinion in Biotechnology*. 27: 30–37.
<https://doi.org/10.1016/j.copbio.2013.09.012>.
- Cao, X, X Xu, H Che, JS West, and D Luo. 2017. Distribution and fungicide sensitivity of *Colletotrichum* species complexes from rubber tree in Hainan, China. *Plant Disease*. 101: 1774–1780.
<https://doi.org/10.1094/PDIS-03-17-0352-RE>.
- Damiri, N, Y Pratama, TR Febbiyanti, SE Rahim, DT Astuti, and Y Purwanti. 2022. *Pestalotiopsis* sp. infection causes leaf fall disease of new arrivals in several clones of rubber plants. *Biodiversitas*. 23: 3943–3949.
<https://doi.org/10.13057/biodiv/d230811>.
- Darojat, MR dan F Oktavia. 2022. Ketahanan klon-klon karet terhadap serangan gugur daun baru *Pestalotiopsis* dalam Prosiding Seminar Nasional Peripi 2022: 271–281. (F Wendra, Asmawati, F Adriyansyah, W Lesmana, Eds.). Aksara Pena. Palembang.
<http://peripi.org/wp-content/uploads/2023/07/27.pdf>.
- Dashti, AA, MM Jadaon, AM Abdulsamad, and HM Dashti. 2009. Heat treatment of bacteria: A simple method of DNA extraction for molecular techniques. *Kuwait Medical Journal*. 41: 117–122.
- de Souza, R, A Ambrosini, and LMP Passaglia. 2015. Plant growth-promoting bacteria as inoculants in agricultural soils. *Genetics and Molecular Biology*. 38: 401–419.
<https://doi.org/10.1590/S1415-475738420150053>.
- Ditjenbun, 2021. Statistik Perkebunan Unggulan Nasional 2020-2022. (D Gartina, RLL Sukriya, E Pudjianto, A Udin, N Kurniawati, E Magdalena, dan SN Damarjati, Eds.). Sekretariat Direktorat Jenderal Perkebunan, Jakarta.
<https://ditjenbun.pertanian.go.id/?publikasi=buku-statistik-perkebunan-2020-2022>.
- Duchateau, S, J Crouzet, S Dorey, and A Aziz. 2024. The plant-associated *Pantoea* spp. as biocontrol agents: Mechanisms and diversity of bacteria-produced metabolites as a prospective tool for plant protection. *Biological Control*. 188: 105441.
<https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2024.105441>.
- Fitri, E, F Widiyanti, dan E Yulia. 2023. Kejadian dan uji hipersensitivitas bakteri yang berasosiasi dengan penyakit busuk batang jagung di Sumbawa Nusa Tenggara Barat. *Jurnal Agrikultura*. 34(2): 210-217.
<https://doi.org/10.24198/agrikultura.v34i2.48717>.
- Gilligan, PH. 2013. Identification of pathogens by classical clinical tests in *The Prokaryotes: Human Microbiology*. (Rosenberg, E, EF DeLong, F Thompson, S Lory, and E Stackebrandt, Eds.). Springer Nature Link. 57–89. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-30144-5>.
- González, CC, LI González García, LG Burciaga Jurado, and A Carrillo Castillo. 2023. Bactericidal activity of silver nanoparticles in drug-resistant bacteria. *Brazilian Journal of Microbiology*. 54: 691–701. Springer International Publishing.
<https://doi.org/10.1007/s42770-023-00991-7>.
- Hardoko, C Josephine, R Handayani, and Y Halim. 2020. Isolation, identification and chitinolytic index of bacteria from rotten tiger shrimp

- (*Penaeus monodon*) shells. AACL Bioflux. 13: 360–371.
<http://www.bioflux.com.ro/docs/2020.360-371.pdf>
- Janda, JM and SL Abbott. 2007. 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: Pluses, perils, and pitfalls. Journal of Clinical Microbiology. 45: 2761–2764.
<https://doi.org/10.1128/JCM.01228-07>.
- Kabir, MH, K Unban, P Kodchasee, RK Govindarajan, S Lumyong, N Suwannarach, P Wongputtisin, K Shetty, and C Khanongnuch. 2023. Endophytic bacteria isolated from tea leaves (*Camellia sinensis* var. *assamica*) enhanced plant-growth-promoting activity. Agriculture (Switzerland). 13(3): 533.
<https://doi.org/10.3390/agriculture13030533>.
- Kjeldgaard, B, AR Neves, C Fonseca, ÁT Kovács, and P Domínguez-Cuevas. 2022. Quantitative high-throughput screening methods designed for identification of bacterial biocontrol strains with antifungal properties. Microbiology Spectrum. 10(2): e0143321.
<https://doi.org/10.1128/spectrum.01433-21>.
- Kumar, A, H Verma, VK Singh, PP Singh, SK Singh, WA Ansari, A Yadav, PK Singh, and KD Pandey. 2017. Role of *Pseudomonas* sp. in sustainable agriculture and disease management in applications in crop production and protection, agriculturally important microbes for sustainable agriculture vol. 2. (VS Meena, PK Mishra, JK Bisht, and A Pattanayak, Eds.). Springer Nature. 195–216. https://doi.org/10.1007/978-981-10-5343-6_7.
- Kumar, A, L Rithesh, V Kumar, N Raghuvanshi, K Chaudhary, Abhineet, and AK Pandey. 2023. *Stenotrophomonas* in diversified cropping systems: friend or foe? Frontiers in Microbiology. 14: 1214680.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1214680>.
- Kunjet, S, P Thaler, F Gay, P Chuntuma, K Sangkhasila, and P Kasemsap. 2013. Effects of drought and tapping for latex production on water relations of *Hevea brasiliensis* trees. Kasetsart Journal - Natural Science. 47: 506–515.
<https://www.thaiscience.info/Journals/Article/TKJN/10898100.pdf>.
- Kusdiana, APJ. 2021. Diagnosis penyakit gugur daun karet (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.). Jurnal Penelitian Karet. 38: 165–178.
<https://doi.org/10.22302/ppk.jpk.v2i38.728>.
- Lan, G, Y Wei, X Zhang, Z Wu, K Ji, H Xu, B Chen, and F He. 2024. Assembly and maintenance of phyllosphere microbial diversity during rubber tree leaf senescence. Communications biology. 7: 1192.
<https://doi.org/10.1038/s42003-024-06907-x>.
- Lee, J, S Kim, H Jung, BK Koo, JA Han, and HS Lee. 2023. Exploiting bacterial genera as biocontrol agents: mechanisms, interactions and applications in sustainable agriculture. Journal of Plant Biology. 66: 485–498.
<https://doi.org/10.1007/s12374-023-09404-6>.
- Liang, C, Z Liu, C Liu, Y Li, H Yuan, and T Wang. 2018. Cook your samples: The application of microwave irradiation in speeding up biological processes. Molecular Biotechnology. 60: 236–244.
<https://doi.org/10.1007/s12033-018-0061-z>.
- Liang, C, B Zhang, Y Zhou, H Yin, B An, D Lin, C He, and H Luo. 2021. CgNPG1 as a novel pathogenic gene of *Colletotrichum gloeosporioides* from *Hevea brasiliensis* in mycelial growth, conidiation, and the invasive structures development. Frontiers in Microbiology. 12: 629387.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.629387>.
- Linda, TM, S Siregar, WD Fitri, A Martina, W Lestari, DI Roslim, and Hapsoh. 2018. Isolation and screening of culturable endophytic bacteria from leaf of rubber plant that produces of chitinase. Journal of Physics: Conference Series. 1116.
<https://doi.org/10.1088/1742-6596/1116/5/052038>.
- Malaysian Rubber Council (MRC). 2023. World Rubber Production, Consumption and Trade. Tersedia online pada: https://www.myrubbercouncil.com/industry/world_production.php (Diakses 30 Desember 2023).
- Markovich, NA and GL Kononova. 2003. Lytic enzymes of *Trichoderma* and their role in plant defense from fungal diseases: A review. Applied Biochemistry and Microbiology. 39: 341–351.
<https://doi.org/10.1023/A:1024502431592>.
- Mourou, M, A Hanani, AM D'onghia, SW Davino, GM Balestra, and F Valentini. 2022. Antagonism and antimicrobial capacity of epiphytic and endophytic bacteria against the

- phytopathogen *Xylella fastidiosa*. *Agronomy*. 12(6): 1266.
<https://doi.org/10.3390/agronomy12061266>.
- Nysanth, NS, SL Sivapriya, C Natarajan, and KN Anith. 2022. Novel in vitro methods for simultaneous screening of two antagonistic bacteria against multiple fungal phytopathogens in a single agar plate. *3 Biotech*. 12(6): 140.
<https://doi.org/10.1007/s13205-022-03205-3>.
- Okubo-Kurihara, E, TR Febbiyanti, F Ashari, Y Yanagawa, E Osada, T Kuriyama, M Shimizu, F Diyasti, and M Matsu. 2024. Screening of effective pesticides to control rubber tree leaf fall disease (LFD) caused by *Neopestalotiopsis* and *Colletotrichum* fungi in Indonesia. *Journal of Pesticide Science*. 49: 277–284.
<https://doi.org/10.1584/jpestics.D24-020>.
- Ota, M, LF Syarifa, A Alamsyah, IS Nugraha, H Asywadi, R Lestari, S Khaerunnisa, AE Satria, and TR Febbiyanti. 2025. Socioeconomic effects of *Pestalotiopsis* rubber leaf fall disease on smallholders in South Sumatra, Indonesia. *Multidisciplinary Science Journal*. 7(8): 2025371.
<https://10.31893/multiscience.2025371>.
- Ryan, RP, S Monchy, M Cardinale, S Taghavi, L Crossman, MB Avison, G Berg, D van der Lelie, and JM Dow. 2009. The versatility and adaptation of bacteria from the genus *Stenotrophomonas*. *Nature Reviews Microbiology*. 7: 514–525.
<https://doi.org/10.1038/nrmicro2163>.
- Rushabh, S, S Chandwani, and N Amaresan. 2023. Screening of endophytes for biocontrol properties in endophytic microbes: isolation, identification, and bioactive potentials. (A Sankaranarayanan, N Amaresan, and MK Dwivedi, Eds.). *Springer Protocols Handbooks*. 189–192.
https://doi.org/10.1007/978-1-0716-2827-0_20
- Shalini, M Jayasekhar, KG Sabarinathan, R Akila, and R Kannan. 2020. Antifungal activity of new bacterial biocontrol agents against *Diplocarpon rosae* causing black spot disease of rose. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*. 9: 3124–3133.
<https://doi.org/10.20546/ijcmas.2020.905.370>.
- Sharma, P, R Pandey, and NS Chauhan. 2024. Biofertilizer and biocontrol properties of *Stenotrophomonas maltophilia* BCM emphasize its potential application for sustainable agriculture. *Frontiers in Plant Science*. 15: 1–14.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2024.1364807>.
- Soumyamol, VB, PN Nejumunnisa, and C Bindu Roy. 2023. Biocontrol adeptness of bacterial endophytes antagonistic to *Colletotrichum* spp. causing *Colletotrichum* leaf disease in rubber (*Hevea brasiliensis*) and harnessing its plant growth-promoting traits. *South African Journal of Botany*. 161: 151–160.
<https://doi.org/10.1016/j.sajb.2023.08.009>.
- Trias, R, L Bañeras, E Montesinos, and E Badosa. 2008. Lactic acid bacteria from fresh fruit and vegetables as biocontrol agents of phytopathogenic bacteria and fungi. *International Microbiology*. 11: 231–236.
<https://doi.org/10.2436/20.1501.01.66>.
- Ulrich, K, M Kube, R Becker, V Schneck, and A Ulrich. 2021. Genomic analysis of the endophytic *Stenotrophomonas* strain 169 reveals features related to plant-growth promotion and stress tolerance. *Frontiers in Microbiology*. 12: 687463.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.687463>.
- Uluksik, S and GB Seymour. 2020. Pectate lyases: Their role in plants and importance in fruit ripening. *Food Chemistry*. 309: 125559.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125559>.
- Walterson, AM and J Stavriniades. 2015. *Pantoea*: Insights into a highly versatile and diverse genus within the Enterobacteriaceae. *FEMS Microbiology Reviews*. 39: 968–984.
<https://doi.org/10.1093/femsre/fuv027>.
- Wang, N, M Liu, L Guo, X Yang, and D Qiu. 2016. A novel protein elicitor (PeBA1) from *Bacillus amyloliquefaciens* NC6 induces systemic resistance in tobacco. *International Journal of Biological Sciences*. 12: 757–767.
<https://doi.org/10.7150/ijbs.14333>.
- Živković, S, S Stojanović, Ž Ivanović, V Gavrilović, T Popović, and J Balaž. 2010. Serbian source screening of antagonistic activity of microorganisms against *Colletotrichum acutatum* and *Colletotrichum gloeosporioides*. *Archives of Biological Sciences*. 62: 611–623.
<https://doi.org/10.2298/ABS1003611Z>.