

Eksplorasi dan identifikasi bakteri endofit pereduksi nanosilver asal tanaman padi dan uji antibiosis terhadap

Xanthomonas oryzae pv. oryzae

Exploration and identification of nanosilver-reducing endophytic bacteria isolated from rice plants and antibiosis testing against

Xanthomonas oryzae pv. oryzae

Syaiful Khoiri*, Safirna Siti Solikha, Akhmad Djunaedy, Gita Pawana, Diana Nurus Sholehah

¹Program Studi Agroekoteknologi, Jurusan Ilmu dan Teknologi Pertanian, Fakultas Pertanian, Universitas Trunojoyo Madura

*Corresponding author : syaiful.khoiri@trunojoyo.ac.id

ABSTRAK

Salah satu penyakit yang menyerang tanaman padi adalah hawar daun bakteri yang disebabkan *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (*Xoo*). Umumnya pengendalian hawar daun bakteri menggunakan bakterisida sintetik. Diperlukan alternatif pegendalian salah satunya dengan pemanfaatan nanoteknologi. Ketersediaan bakteri pereduksi nanopartikel perak masih terbatas. Oleh karena itu, penelitian ini bertujuan untuk mengeksplorasi dan identifikasi bakteri endofit pada tanaman padi, mengkarakterisasi kemampuan bakteri endofit sebagai bioreduktor nanopartikel perak (AgNPs), dan menguji kemampuan antibiosis terhadap *Xoo*. Proses ini dimulai dengan eksplorasi dan identifikasi bakteri endofit tanaman padi, melakukan proses sintesis perak nitrat menggunakan isolat bakteri sebagai bioreduktor, mengkaraterisasi AgNPs dengan mengamati perubahan warna larutan serta spektrofotometer UV-Vis, uji antibiosis menggunakan metode difusi cakram, dan mengidentifikasi bakteri. Hasil ekplorasi diperoleh 15 isolat yang dominan (populasi lebih dari 10^7 cfu mL⁻¹). Isolat bakteri endofit yang positif mampu mereduksi partikel perak nitrat (AgNO₃) menjadi nanopartikel perak (AgNPs) hanya dua isolat yaitu isolat BI4 dan BI5. AgNP yang disintesis dengan reduktor bakteri endofit pada BI4 memiliki panjang gelombang maksimum 468 nm dengan nilai serapan 0,173 dan BI5 memiliki panjang gelombang maksimum 368 nm dengan nilai serapan 0,108. Hasil identifikasi berdasarkan 16S rRNA menunjukkan bahwa isolat BI4 adalah *Pseudomonas aeruginosa* dengan kemiripan 98% dan isolat BI5 adalah *Hafnia psychrotolerant* dengan kemiripan 87%. Pengujian AgNPs terhadap *Xoo* menunjukkan kemampuan antibiosis namun masih dalam kategori lemah.

Kata Kunci: AgNPs, antibiosis, hawar daun bakteri, *Oryza sativa*, 16S rRNA.

ABSTRACT

Bacterial leaf blight, caused by Xanthomonas oryzae pv. oryzae (Xoo), is a major disease affecting rice plants. Conventional control relies on synthetic bactericides; however, alternative approaches, such as nanotechnology, are needed to mitigate environmental concerns. The availability of bacteria capable of reducing silver nanoparticles (AgNPs) remains limited. This study aimed to explore and identify endophytic bacteria from rice plants, characterise their ability to act as bioreducers for silver nanoparticles, and evaluate their antibiosis potential against Xoo. The research involved isolating and identifying endophytic bacteria, synthesising silver nanoparticles using bacterial isolates as bioreducers, characterising AgNPs through solution colour changes and UV-Vis spectrophotometry, conducting antibiosis assays using the disc diffusion method, and performing molecular identification. A total of 15 dominant bacterial isolates (population exceeding 10⁷ CFU/mL) were obtained. Of these, only two isolates, BI4 and BI5, successfully reduced silver nitrate (AgNO₃) to AgNPs. AgNPs synthesised using BI4 exhibited a maximum wavelength of 468 nm with an absorbance of 0.173, while those synthesised with BI5 had a maximum wavelength of 368 nm and an absorbance of 0.108. Molecular identification using 16S rRNA revealed that BI4 is Pseudomonas aeruginosa (98% similarity) and BI5 is Hafnia psychrotolerant (87% similarity). Antibiosis testing of AgNPs against Xoo demonstrated inhibitory activity, though it was classified as weak.

Keywords: AgNPs, antibiosis, bacterial leaf blight, *Oryza sativa*, 16S rRNA.

PENDAHULUAN

Padi (*Oryza sativa*) merupakan salah satu komoditas pangan utama dunia yang berperan penting dalam ketahanan pangan global. Namun, produktivitas padi sering kali terganggu oleh berbagai penyakit, salah satunya adalah hawar daun bakteri (*bacterial leaf blight*), yang disebabkan oleh *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Xoo) (Hafiah et al., 2015). Penyakit ini dapat menyebabkan penurunan hasil panen hingga 36% pada musim hujan dan 28% pada musim kemarau, sehingga menjadi ancaman serius bagi keberlanjutan produksi padi (Hakim et al., 2022). Penyakit ini umumnya dapat menyebar dengan cepat dalam populasi tanaman yang padat. Hawar daun bakteri dapat menginfeksi bibit dan tanaman tua (Purwadi & Nasyuha, 2022). Bakteri Xoo merupakan mikroorganisme gram negatif yang bersifat patogenik terhadap tanaman padi. Bakteri Xoo dapat menyebar melalui air hujan, embun, angin, atau melalui alat-alat pertanian yang terkontaminasi. Bakteri ini memasuki tanaman melalui luka-luka pada daun atau melalui stomata. Gejala awal hawar daun bakteri biasanya berupa bercak kecil berwarna kuning pada daun padi yang kemudian berkembang menjadi lesi berwarna cokelat atau keabu-abuan. Lesi tersebut dapat membesar dan menggabung membentuk daerah nekrosis yang mengering. Infeksi yang parah dapat menyebabkan daun menguning, mengering, dan akhirnya mati sehingga dapat menurunkan hasil panen secara drastis. Suhu tinggi, kelembapan tinggi, cuaca hujan, dan pemakaian pupuk nitrogen berlebihan mendorong perkembangan dan penyebaran hawar daun bakteri (Purwadi & Nasyuha, 2022).

Pengendalian penyakit ini umumnya dilakukan dengan menggunakan bakterisida sintetik (Kamri et al., 2023). Namun, penggunaan bahan kimia tersebut dapat meninggalkan residu yang berbahaya bagi lingkungan, menyebabkan resistensi patogen, dan mengganggu ekosistem (Shahid & Khan, 2022; Xu et al., 2010, 2013). Oleh karena itu, diperlukan alternatif pengendalian yang lebih ramah lingkungan dan berkelanjutan seperti penggunaan nanoteknologi ramah lingkungan.

Nanoteknologi menawarkan solusi inovatif melalui aplikasi nanopartikel perak (AgNPs) yang memiliki sifat antibakteri luas. Namun, sintesis AgNPs secara fisik dan kimia memiliki kekurangan seperti melibatkan bahan kimia yang berlebihan yang dapat menyebabkan pencemaran lingkungan dan biaya yang tinggi sehingga membatasi peluang penggunaan nanoteknologi. Alternatif yang lebih aman adalah biosintesis AgNPs menggunakan mikroorganisme, seperti bakteri endofit. Biosintesis memberikan keuntungan karena menggunakan bahan yang tidak beracun dan ramah lingkungan, reaksi terjadi pada suhu kamar atau lebih rendah, dan prosesnya memerlukan sedikit atau tanpa masukan energi (Benelli, 2016). Beberapa bakteri diketahui memiliki kemampuan bioreduksi untuk menghasilkan AgNPs secara alami seperti *Lactobacillus* (Sintubin et al., 2009), *Bacillus marisflavi* (Antony et al., 2013), *Bacillus firmus* (Suryadi et al., 2022), *B. thuringiensis* (Khoiri et al., 2024), dan *Pseudomonas* (John et al., 2020). Bakteri-bakteri tersebut berpotensi menjadi agen biokontrol yang efektif dan ramah lingkungan. Sayangnya, ketersediaan isolat dan karakterisasi bakteri yang mampu mereduksi perak di Indonesia masih terbatas, terutama bakteri endofit pada tanaman padi. Oleh karena itu, penelitian ini bertujuan untuk mengeksplorasi dan mengidentifikasi bakteri endofit dari tanaman padi, mengkarakterisasi kemampuannya sebagai bioreduktor AgNPs, serta menguji potensi antibiosis AgNPs yang dihasilkan terhadap Xoo. Penelitian ini diharapkan dapat memberikan kontribusi dalam pengembangan biosintesis nanopartikel sebagai biopestisida.

BAHAN DAN METODE

Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Proteksi dan Lingkungan Tanaman, Program Studi Agroekoteknologi, Fakultas Pertanian, Universitas Trunojoyo Madura. Penelitian ini dilaksanakan pada bulan September 2023 – Maret 2024.

Alat dan Bahan

Penelitian ini menggunakan beberapa alat dan bahan meliputi Erlenmeyer 500 mL, beaker glass 1 L, timbangan analitik, tabung reaksi, sentrifuge, kamera, cawan petri, jarum ose, mikropipet, orbital shaker, oven, incubator, laminar air flow, autoklaf, vorteks, pH meter, bunsen, UV-VIS Spektrofotometer, mikroskop stereo, UV-transilluminator, Thermocycler PCR (Kyratec) dan alat-alat gelas laboratorium. Bahan yang digunakan yaitu meliputi isolat bakteri endofit, perak nitrat (AgNO₃), Nutrient Agar (NA), Luria Bertani (LB), Yeast Dextrose Carbonate Agar (YDCA), NaCl 0,5 M, aquades, Streptomycin sulfate 300 mg, *Genomic bacteria extraction kit* (Geneaid), agarose, primer 27F dan 1492R, PCR ready mix (Tiangen), dan DNA marker 1 Kb (Vivantis).

Eksplorasi dan Isolasi Bakteri Endofit

Metode yang digunakan untuk pengambilan sampel tanaman padi adalah purposive sampling yaitu pengambilan sampel secara acak yang diambil pada bagian tanaman padi. Cara pengambilan sampel dilakukan dengan memilih tanaman padi yang sehat kemudian dimasukkan ke kantong plastik dan segera dibawa ke

Laboratorium untuk dilakukan isolasi. Bakteri endofit diisolasi dengan metode spread plate. Bagian tanaman padi yang sehat seperti akar, batang, daun yang telah dipotong sebanyak 1 gram direndam pada larutan NaOCl 3%, alkohol 70%, dan aquades secara berturut – turut selama 1 menit. Kemudian, disuspensikan dalam larutan fisiologis NaCl 0,85% (8,5 g NaCl + 991,5 L aquades), kemudian di homogenkan menggunakan vortex. Selanjutnya, ekstrak bagian tanaman padi tersebut dibuat seri pengenceran dengan menggunakan aquades steril hingga pengenceran 10⁻⁶. Setelah diencerkan diambil sebanyak 100 µL kemudian dituang ke dalam cawan petri steril dengan metode spread plate. Selanjutnya diinkubasi menggunakan suhu ruang ke dalam selama 24-48 jam. Pemurnian bakteri dilakukan dengan cara mengambil koloni menggunakan jarum ose dan digores kuadran pada media nutrient agar (NA) baru yang telah disiapkan pada cawan petri. Jumlah bakteri yang dimurnikan sejumlah bakteri yang menunjukkan ciri koloni yang berbeda dan dominan (diantaranya ciri warna, tepian, dan permukaan). Selanjutnya diinkubasi selama 24-48 jam pada suhu ruang untuk pengujian selanjutnya.

Sintesis Nanopartikel Perak

Proses pembuatan larutan stok perak nitrat (AgNO₃) dilakukan dengan melarutkan perak nitrat sebanyak 16,9 mg pada 100 mL aquades sehingga diperoleh konsentrasi larutan stok 0,01 M (1,69 g L⁻¹). Berbagai konsentrasi volume yang diinginkan supernatan dan pelet dari kultur bakteri endofit ditambahkan ke 250 mL baffled Erlenmeyer shaker flask (masing-masing berisi 1 mL larutan AgNO₃ 0,01 M) untuk berikan volume total 10 mL dari seluruh campuran suspensi. Supernatan dan pelet bakteri yang telah dicampurkan larutan AgNO₃ dishaker pada suhu ruang dengan kecepatan putaran 150 rpm selama 3 hari (Banu & Balasubramanian, 2014). Campuran supernatan dan pelet bakteri dengan AgNO₃ yang mengalami perubahan warna merupakan indikator pertama bahwa nanopartikel telah berhasil terbentuk. Campuran larutan tersebut akan berubah warna menjadi coklat. Perbedaan warna tergantung pada ukuran dan bentuk nanopartikel yang terbentuk.

Karakterisasi Nanopartikel perak

Karakterisasi nanopartikel perak dilakukan secara kualitatif dengan mengamati perubahan warna pada larutan AgNO₃ dan campuran kultur bakteri. Perubahan warna pada campuran merupakan penanda pertama berhasil terbentuknya nanopartikel. Campuran larutan tersebut akan berubah warna menjadi coklat. Perbedaan warna tersebut tergantung pada ukuran dan bentuk nanopartikel yang terbentuk (Sayed et al., 2017). Perubahan warna larutan disebabkan oleh reduksi ion perak menjadi AgNP. Nanopartikel perak hasil sintesis kemudian dikarakterisasi menggunakan spektrofotometer UV-visibel untuk memastikan terbentuknya nanopartikel perak yang dihasilkan. Nanopartikel perak memiliki sifat khusus yang disebut resonansi plasmon permukaan (SPR). AgNPs dapat diukur pada kisaran Panjang gelombang 200 – 700 nm. SPR ini mampu menyerap cahaya tampak pada rentang panjang gelombang 400-500 nm, sehingga panjang gelombang tersebut dapat digunakan sebagai penanda dimulainya pembentukan nanopartikel perak (Fatimah & Mutiara, 2016). Standarisasi yang digunakan untuk pada instrumen spektrofotometer UV-Vis menggunakan blanko dari supernatan kultur bakteri. Larutan yang sudah mengandung nanopartikel perak kemudian dimasukkan pada kuvet kuarsa, yang selanjutnya akan dilakukan pengukuran pada panjang gelombang 200-800 nm.

Uji Antibiosis AgNPs terhadap *X. oryzae* pv. *oryzae*

Uji antibiosis dilakukan menggunakan metode difusi cakram yaitu menggunakan cakram kertas saring (paper disk) sebagai tempat menampung nanopartikel perak hasil sintesis bakteri untuk digunakan sebagai zat antibakteri. Kertas cakram tersebut diberi perlakuan AgNP masing-masing konsentrasi perlakuan. Cakram diletakkan pada media YDCA yang telah diinokulasi *Xoo* masing-masing kertas cakram ditetesi AgNPs masing-masing perlakuan sebanyak 5 µL kemudian diinkubasi selama 24 jam. Hasil yang diamati yaitu terbentuknya zona bening disekitar kertas cakram yang menunjukkan zona hambat pada pertumbuhan isolat (Fadillah, 2021; Khoiri et al., 2016). Adapun konsentrasi nanopartikel perak yang diujikan pada penelitian ini yaitu sebagai berikut:

- A = Supernatan
- B0 = Kontrol Aquades
- B1 = AgNPs konsentrasi 100%
- B2 = AgNPs konsentrasi 50%
- B3 = AgNPs konsentrasi 25%
- C = Antibiotik Steptomycin sulfat
- D = Larutan AgNO₃

Identifikasi Bakteri Pereduksi Nanopartikel Perak

Identifikasi dilakukan dengan beberapa tahapan, yaitu pewarnaan Gram (Wulandari & Purwaningsih, 2019), karakterisasi koloni (Wilson et al., 2017) dan identifikasi genetik berbasis 16S rRNA. Ekstraksi DNA menggunakan Bacterial genomic extraction kit (Geneaid). PCR dilakukan dengan menggunakan primer 27F dan 1492R. Hasil PCR dianalisis menggunakan Mupid-Xu elektroforesis dan dibaca menggunakan UV-transilluminator. Hasil PCR berukuran 1500 bp. Selanjutnya pembacaan urutan nukleotida (sequencing) hasil PCR dilakukan oleh 1st Base (<https://base-asia.com/>). Hasil sequencing dilakukan analisis BLAST-N (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) dan disusun pohon filogenetik menggunakan software MEGA 11 (Khoiri et al., 2017).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Isolasi Bakteri Endofit Tanaman Padi

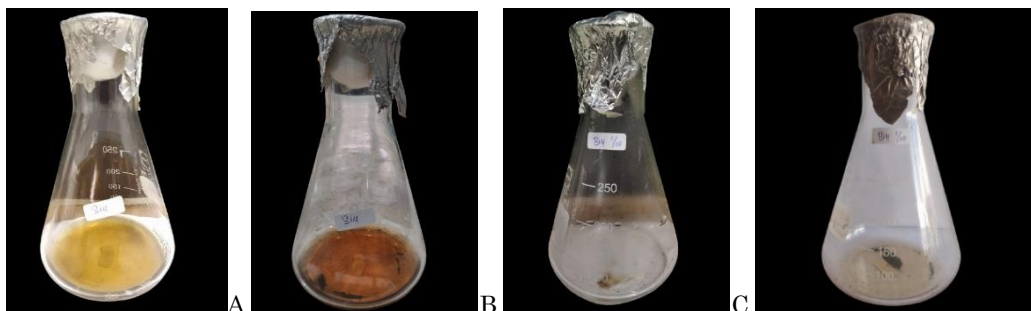
Hasil eksplorasi bakteri endofit diketahui kerapatan populasi pada bagian akar sebanyak $1,67 \times 10^{10}$ cfu g⁻¹, daun sebanyak $1,47 \times 10^{10}$ cfu g⁻¹, batang sebanyak $1,12 \times 10^{10}$ cfu g⁻¹. Hasil isolasi diperoleh 15 isolat dominan. Adapun ciri koloni menunjukkan warna koloni bakteri pada isolat akar, batang, daun tanaman padi memiliki permukaan tidak mengkilap. Koloni akan terlihat nampak mengkilap atau tidak mengkilap di bawah pantulan cahaya. Beberapa isolat mempunyai koloni berwarna kuning, yaitu isolat DI1, DI2, dan DI3. Isolat DI4 mempunyai koloni berwarna merah. Isolat AI1, AI5, BI4, BI5 mempunyai koloni yang berwarna putih kehijauan dan hijau. Sementara isolat lainnya mempunyai warna koloni putih (Tabel 1).

Tabel 1. Karakter morfologi 15 isolat bakteri endofit dominan pada tanaman padi

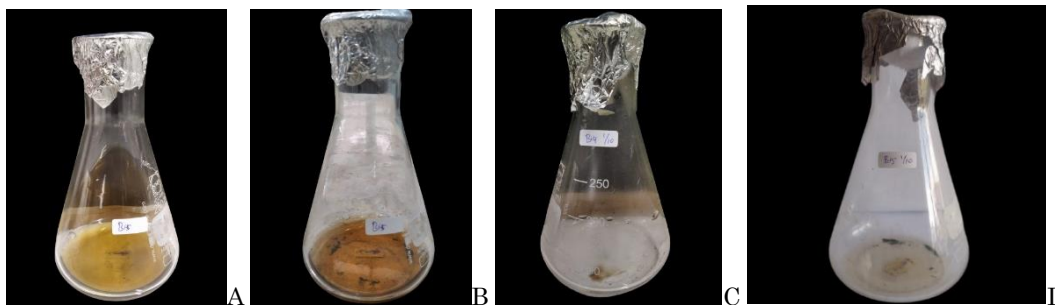
Bagian Tanaman	Isolat	Kode Isolat	Ukuran	Bentuk	Karakter Morfologi		
					Warna	Elevasi	Tepian
Akar	1	AI1	0,3 cm	Bulat	Putih Kehijauan mengkilap	Flat	Bergelombang
	2	AI2	0,5 cm	Irregular	Putih transparan	Flat	Bergelombang
	3	AI3	0,5 cm	Irregular	Putih	Flat	Bergerigi
	4	AI4	0,5 cm	Irregular	Putih	Convex	Bergelombang
	5	AI5	0,5 cm	Irregular	Hijau Mengkilap	Flat	Bergelombang
Batang	1	BI1	0,5 cm	Irregular	Putih	Flat	Bergelombang
	2	BI2	0,5 cm	Irregular	Putih	Flat	Bergelombang
	3	BI3	0,3 cm	Irregular	Putih	Flat	Bergerigi
	4	BI4	0,5 cm	Bulat	Putih hijau mengkilap	Flat	Halus dan beraturan
	5	BI5	0,5 cm	Bulat	Hijau Mengkilap	Flat	Halus dan beraturan
Daun	1	DI1	0,3 cm	Irregular	Kekuning-kuningan	Flat	Bergelombang
	2	DI2	0,5 cm	Irregular	Kekuning-kuningan	Flat	Bergelombang
	3	DI3	0,5 cm	Irregular	Kekuning-kuningan	Flat	Bergelombang
	4	DI4	0,5 cm	Bulat	Kekuning-kuningan	Flat	Beraturan
	5	DI5	0,5 cm	Irregular	Kekuning-kuningan	Flat	Bergerigi

Deteksi Senyawa Pereduksi Nanopartikel Perak

Nanosilver hasil sintesis (AgNPs) dicirikan adanya perubahan warna larutan menjadi coklat. Perubahan warna coklat tersebut terjadi setelah mengalami proses sintesis selama 72 jam. Berdasarkan dari hasil eksplorasi diperoleh 15 isolat. Namun, isolat yang mengalami perubahan warna yaitu hanya isolat BI4 dan BI5 (Lampiran 1). Perbedaan warna larutan campuran AgNO₃ dengan penambahan supernatant bakteri (ekstraseluler) dan larutan campuran AgNO₃ dengan penambahan pellet bakteri (intraseluler) setelah masa inkubasi 72 jam ditunjukkan Gambar 1 dan Gambar 2.

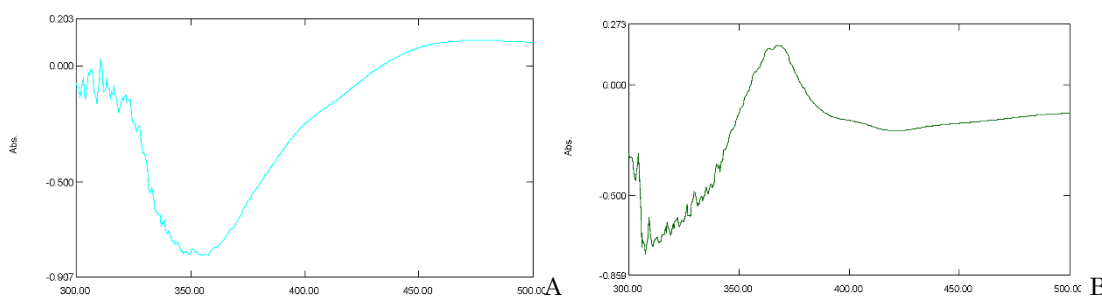


Gambar 1. Perbedaan warna hasil sintesis AgNP setelah masa inkubasi 72 jam (Supernatan isolat BI4 tanpa AgNO₃ (A), supernatant isolat BI4 + AgNO₃ (B), pelet BI4 tanpa AgNO₃ (C), dan pelet BI4 + AgNO₃ (D).



Gambar 2. Perbedaan warna hasil sintesis AgNP setelah masa inkubasi 72 jam (Supernatan isolat BI5 tanpa AgNO₃ (A), supernatant isolat BI5 + AgNO₃ (B), pelet BI5 tanpa AgNO₃ (C), dan pelet BI5 + AgNO₃ (D).

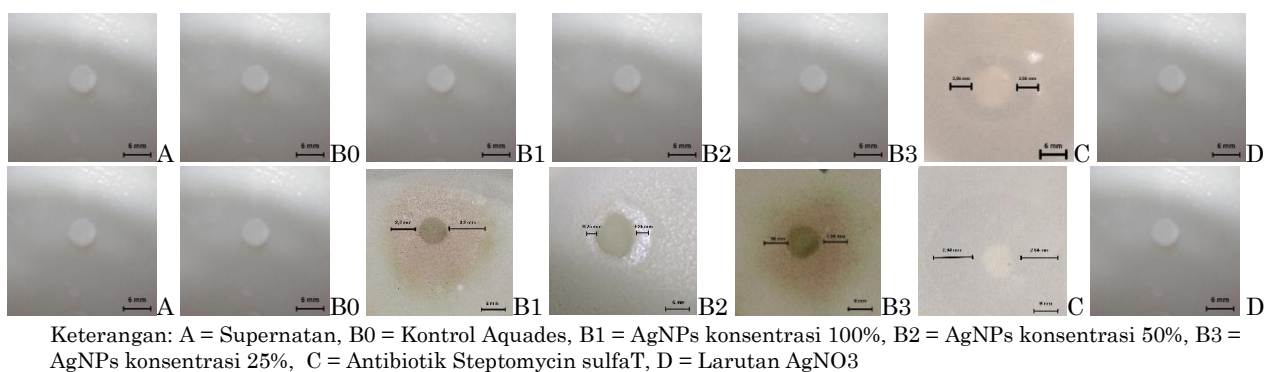
Penelitian ini menunjukkan adanya perubahan warna dari supernatant bakteri yang semula berwarna kuning menjadi coklat setelah penambahan larutan perak nitrat. Hal tersebut, menandakan bahwa koloid perak mulai terbentuk. Sedangkan AgNO₃ dengan penambahan pelet bakteri, larutan AgNO₃ tanpa penambahan pelet bakteri serta supernatant bakteri tanpa penambahan AgNO₃ tidak menunjukkan perubahan warna. AgNPs yang terbentuk memiliki warna yang awalnya kekuningan akan mengalami perubahan menjadi kecoklatan. Warna yang dihasilkan oleh nanokomposit perak merupakan hasil penyerapan absorbansi plasmon pada permukaan perak. Zat pereduksi organik yang telah digunakan memberikan pengaruh pada sampel, hal ini ditunjukkan oleh warna yang dihasilkan pada masing – masing sampel. Semakin lama waktu pencampuran maka warna larutan semakin pekat (Rahmayani et al., 2019). AgNPs yang terbentuk dari supernatant bakteri kemudian dikarakterisasi menggunakan spektrofotometer UV-visibel untuk memastikan terbentuknya nanopartikel perak yang dihasilkan. Berdasarkan hasil analisis spektrofotometer UV-visibel diperoleh data pada panjang gelombang 468 nm dan 368 nm dengan menggunakan AgNP yang dihasilkan selama proses biosintesis zat pereduksi isolate BI4 dan BI5 yang menunjukkan puncak serapan dengan nilai serapan absorbansi berturut – turut 0,108 dan 0, 0,173 (Gambar 3). Isolat BI5 memiliki puncak serapan pada 368 nm hal ini mungkin menunjukkan bahwa nanoaprtikel yang terbentuk sangat kecil, lebih kecil dari ukuran nanopartikel perak yang biasa. Dalam analisis serapan SPR, frekuensi dan lebar pita serapan SPR bergantung pada bentuk dan ukuran partikel logam dan juga konstanta dielektrik dan medium sekitar patikel logam (Irwan et al., 2016).



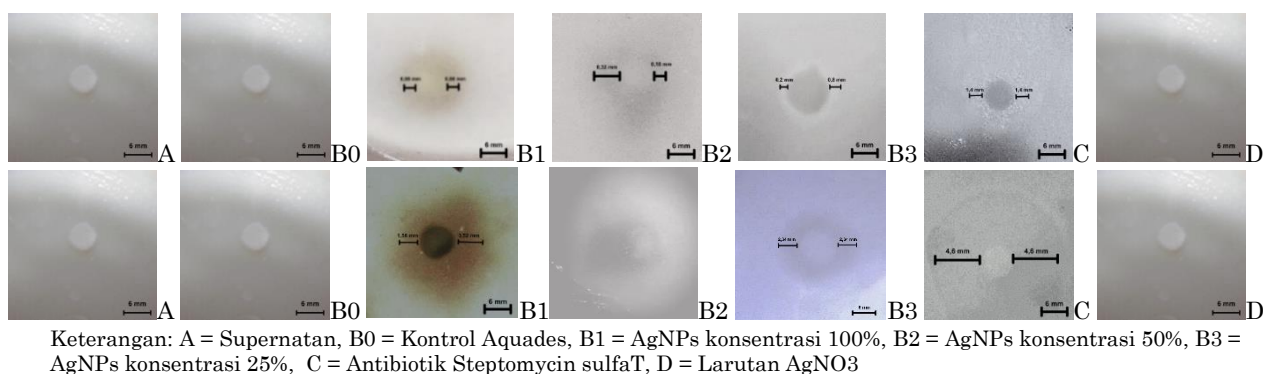
Gambar 3. Spektrum UV-Vis AgNP hasil sintesis supernatant bakteri (isolat BI4 (A) dan isolat BI5 (B).

Antibiosis AgNPs terhadap *X. oryzae pv. oryzae*

Metode difusi cakram digunakan untuk uji aktivitas bakterisida nanopartikel perak (AgNP) terhadap bakteri *Xanthomonas oryzae pv oryzae* (Xoo). Metode ini memberikan hasil positif yang dapat dilihat dari daerah penghambatan yang terbentuk berupa zona bening di sekitar cakram uji tersebut selama waktu inkubasi 24 jam dan 48 jam seperti yang ditunjukkan pada Gambar 4 untuk isolat BI4 dan Gambar 5 untuk isolat BI5.



Gambar 4. Aktivitas antibiosis perlakuan AgNPs hasil biosintesis isolat BI4 terhadap *Xoo* setelah inkubasi 24 jam (atas) dan 48 jam (bawah).



Gambar 5. Aktivitas antibiosis perlakuan AgNPs hasil biosintesis isolat BI5 terhadap *Xoo* setelah inkubasi 24 jam (atas) dan 48 jam (bawah).

Penelitian Bauer *et al.* (1966), menyatakan bahwa zona hambat bakteri diukur menggunakan jangka sorong untuk mengukur seluruh zona hambat termasuk ukuran kertas cakram. Jika mendapat ukuran 6 mm, maka tidak terbentuk zona penghambatan. Berdasarkan hasil penelitian, diperoleh data daerah penghambatan terbesar oleh isolat BI4 pada bakteri *Xoo* masa inkubasi 24 jam dengan perlakuan antibiotik sebesar 10,13 mm. Sedangkan pada perlakuan 50% dan 25% pada masa inkubasi 24 jam diperoleh penghambatan sebesar 6 mm sehingga tidak ada hambatan yang terjadi. Kemudian, pada masa inkubasi 48 jam dengan konsentrasi 100%, 50%, 25% diperoleh hasil berturut – turut yaitu 11,40 mm ; 6,5 mm dan 9,14 mm. Adapun, daerah penghambatan terbesar oleh isolat BI5 dengan konsentrasi 100% pada bakteri *Xoo* masa inkubasi 24 jam dan 48 jam secara berturut – turut yaitu sebesar 7,36 mm dan 11,10 mm. Sedangkan pada perlakuan 50% dan 25% diperoleh penghambatan pada masa inkubasi 24 jam secara berturut – turut yaitu 6,5 mm dan 6,11 mm. Kemudian, pada masa inkubasi 48 jam diperoleh hasil berturut – turut yaitu 9,68 mm dan 10,69 mm. Berdasarkan hasil uji ANOVA, Isolat BI4 setelah pengamatan 48 jam yang menunjukkan perlakuan terbaik yaitu pada B1 dan tidak berbeda nyata dengan perlakuan C. Data tersebut diperoleh konsentrasi optimum yakni pada perlakuan pemberian AgNP konsentrasi 100% dengan zona hambat sebesar 11,4 yang memiliki daya hambat 0,93. Adapun isolat BI5, setelah pengamatan 48 jam yang menunjukkan perlakuan terbaik yaitu B1 dan tidak berbeda nyata dengan perlakuan C. B1 memiliki daya hambat 0,85 yang tergolong pada kategori lemah (Tabel 2).

Tabel 2. Daya hambat nanopartikel perak terhadap pertumbuhan bakteri *X. oryzae pv. oryzae*

Isolat	Perlakuan	Diameter zona bening (mm)		Diameter Kontrol	Daya Hambat		Indeks antibiosis	
		24 jam	48 jam		24 jam	48 jam	24 Jam	48 Jam
BI4	A	6.00 a	6.00 a	6	0	0	Tidak ada hambatan	Tidak ada hambatan
	B0	6.00 a	6.00 a	6	0	0	Tidak ada hambatan	Tidak ada hambatan
	B1	6.00 a	11.40 c	6	0	0,93	Tidak ada hambatan	Lemah
	B2	6.00 a	6.50 ab	6	0	0,08	Tidak ada hambatan	Tidak ada hambatan

	B3	6.00 a	9.14 bc	6	0	0,5	Tidak ada hambatan	Lemah
	C	10.13 b	11.33 c	6	0,7	0,8	Lemah	Lemah
	D	6.00 a	6.00 a	6	0	0	Tidak ada hambatan	Tidak ada hambatan
	A	6.00 a	6.00 a	6	0	0	Tidak ada hambatan	Tidak ada hambatan
	B0	6.00 a	6.00 a	6	0	0	Tidak ada hambatan	Tidak ada hambatan
	B1	7.36 b	11.10 b	6	0,2	0,85	Lemah	Lemah
BI5	B2	6.50 ab	9.68 b	6	0,08	0,6	Tidak ada hambatan	Lemah
	B3	6.11 a	10.69 b	6	0,01	0,7	Tidak ada hambatan	Lemah
	C	9.00 c	15.27 c	6	0,5	1.5	Lemah	Kuat
	D	6.00 a	6,00 a	6	0	0	Tidak ada hambatan	Tidak ada hambatan

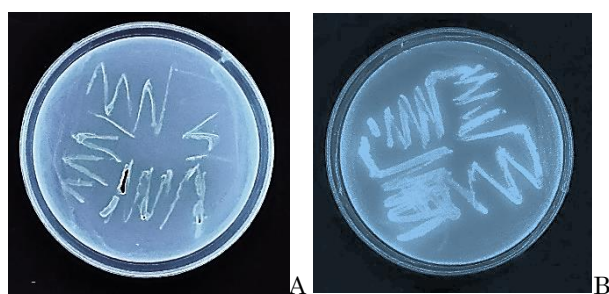
Keterangan: A = Supernatan, B0 = Kontrol Aquades, B1 = AgNPs konsentrasi 100%, B2 = AgNPs konsentrasi 50%, B3 = AgNPs konsentrasi 25%, C = Antibiotik Steptomycin sulfaT, D = Larutan AgNO3.

Identifikasi Bakteri Pereduksi Nanopartikel Perak

Karakteristik isolat BI4 dan BI5 secara morfologi, fisiologi, dan mikroskopik tersaji pada Tabel 3. Secara makroskopis dapat dilihat bahwa koloni bakteri endofit dari isolat BI4 memiliki ukuran 0,5 cm, berbentuk bulat dengan tepian halus dan beraturan, elevasi flat serta mempunyai warna putih kehijauan mengkilap. Sedangkan koloni bakteri endofit dari isolat BI5 memiliki ukuran 0,5 cm, berbentuk bulat dengan tepian halus dan beraturan, elevasi flat, serta mempunyai warna hijau mengkilap. Hasil uji Gram menunjukkan hasil bahwa kedua isolat merupakan gram negatif. Selain itu, isolat BI4 dan BI5 memiliki ciri lain yaitu yaitu berpendar hijau dibawah sinar ultraviolet (Gambar 6).

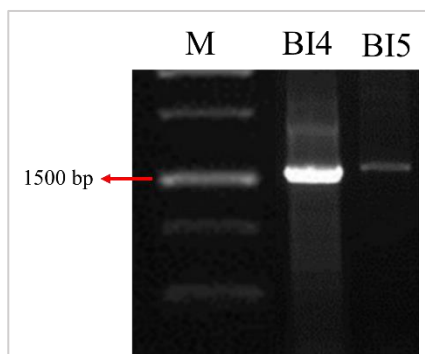
Tabel 3. Karakterisasi bakteri endofit tanaman padi penghasil senyawa pereduksi nanopartikel perak.

Isolat	Morfologi koloni					Gram	Karakter lain
	Ukuran	Bentuk	Tepian	Elevasi	Warna		
BI4	±0,5 cm	Bulat	Halus dan beraturan	Flat	Putih kehijauan mengkilap	Negatif	Berpendar
BI5	±0,5 cm	Bulat	Halus dan beraturan	Flat	Hijau mengkilap	Negatif	Berpendar



Gambar 6. Pendaran bakteri isolate BI4(A) dan isolat BI5 (B) dengan sinar nUV.

Hasil visualisasi PCR gen 16S rRNA menunjukkan bahwa panjang pita DNA diperoleh ukuran 1500 pasang basar (Gambar 7). Proses sequencing dilakukan dengan mengirimkan data pada 1st BASE. Hasil sequencing kemudian di BLAST-N pada web server NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/blast.cgi>). Menurut Destriana et al., (2016) menyatakan bahwa analisa sekuen gen 16S rRNA jika memiliki kesamaan urutan basa 97% maka spesies tersebut dinyatakan spesies yang sama. Namun, apabila kesamaannya kurang dari 97% maka bakteri yang diisolasi merupakan spesies baru. Hasil BLAST-N gen 16S rRNA isolat bakteri BI4 dan BI5 dapat dilihat pada Tabel 4 dan Tabel 5. Berdasarkan hasil BLAST isolat BI4 yang disajikan pada bahwa isolat BI4 mempunyai tingkat homologi 99% yang memiliki kemiripan dengan spesies bakteri *Pseudomonas aeruginosa*. Sedangkan isolat BI5 mempunyai tingkat homologi rendah 18% dengan similarity 87% dengan bakteri *Hafnia psychrotolerans* strain DJC1-1 dan tidak ada isolat lain yang mirip.



Gambar 7. Hasil visualisasi hasil PCR gen 16S rRNA (M=marker/ladder 1Kb, B14=isolat BI4, BI5= isolat BI5).

Tabel 4. Analisis hasil BLASTN Gen 16S rRNA Isolat BI4

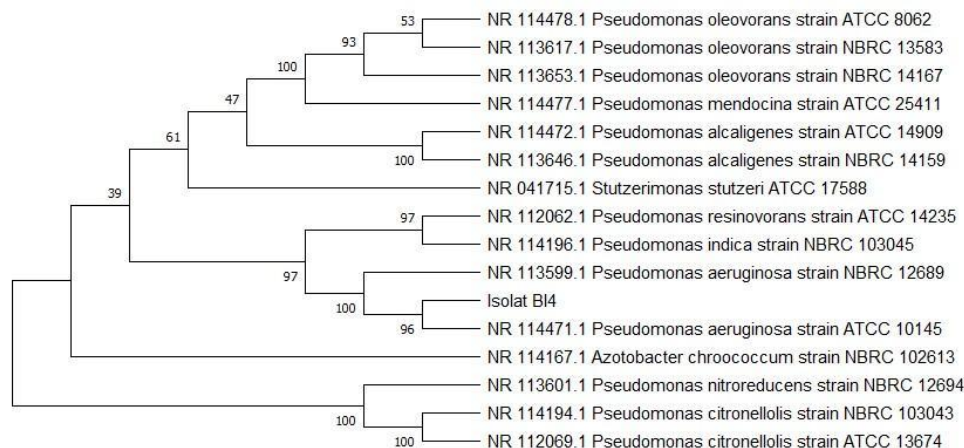
No.	Deskripsi	Nilai Maksimum	Query Cover	Per Ident	Nomor Akses
1.	<i>Pseudomonas aeruginosa strain NBRC 12689</i>	1339	99%	98,01%	NR 113599.1
2.	<i>Pseudomonas aeruginosa strain ATCC 10145</i>	1339	99%	98,01%	NR 11447.1
3.	<i>Pseudomonas resinovorans strain ATCC 14235</i>	1755	95%	96,24%	NR 112062.1
4.	<i>Pseudomonas alcaligenes strain ATCC 14909</i>	1738	99%	94,77%	NR 114472.1
5.	<i>Pseudomonas alcaligenes strain NBRC 14159</i>	1738	99%	94,77%	NR 113646.1
6.	<i>Azotobacter chroococcum strain NBRC 102613</i>	1735	99%	94,77%	NR 114167.1
7.	<i>Stutzerimonas stutzeri ATCC 17588</i>	1735	99%	94,77%	NR 041715.1
8.	<i>Pseudomonas mendocina strain ATCC 25411</i>	1722	99%	94,50%	NR 114477.1
9.	<i>Pseudomonas oleovorans strain ATCC 8062</i>	1718	99%	94,40%	NR 114478.1
10.	<i>Pseudomonas oleovorans strain NBRC 14167</i>	1718	99%	94,41%	NR 113653.1
11.	<i>Pseudomonas citronellolis strain NBRC 103043</i>	1711	99%	94,32%	NR 114194.1
12.	<i>Pseudomonas oleovorans strain NBRC 13583</i>	1709	99%	94,23%	NR 113617.1
13.	<i>Pseudomonas indica strain NBRC 103045</i>	1705	95%	94,39%	NR 114196.1
14.	<i>Pseudomonas nitroreducens strain NBRC 12694</i>	1703	99%	93,24%	NR 113601.1
15.	<i>Pseudomonas citronellolis strain ATCC 13674</i>	1703	99%	93,33%	NR 112069.1

Tabel 5. Analisis hasil BLASTN Gen 16S rRNA Isolat BI5

No	Deskripsi	Nilai Maksimum	Query cover	Per Ident	Nomor Akses
1.	<i>Hafnia psychrotolerans strain DJC1-1</i>	56.5	18%	87,04%	NR 134741.1

Hasil blastn sekuen kemudian disejajarkan untuk pembuatan pohon filogenetik. Metode yang digunakan dalam rekonstruksi pohon filogenetik yaitu *Neighbor Joining Method* (Tamura et al., 2011, 2021). Isolat bakteri BI4 yang diidentifikasi sebagai spesies *Pseudomonas* berdasarkan data hasil BLAST-N. Sepuluh data hasil BLAST-N kemudian dilakukan penyejajaran urutan gen 16S rRNA menggunakan Clustal-O MEGA. Hasil penjajaran gen 16S rRNA isolat BI4 kemudian dibuat pohon filogenetik menggunakan program MEGA11. Pohon filogenetik ini digunakan untuk melihat kekerabatan spesies isolat bakteri BI4 dengan 10 spesies hasil Clustal-O MEGA yang dapat dilihat pada Gambar 8. Hubungan kekerabatan isolat bakteri BI4 pada pohon filogenetik menunjukkan kedekatan dengan spesies *Pseudomonas aeruginosa*. Oleh karena itu, dapat disimpulkan bahwa isolat bakteri BI4 merupakan kelompok spesies *pseudomonas aeruginosa*. Sementara itu, untuk isolat BI5 hanya ditemukan satu spesies dikarenakan sekuen hafnia masih kurang tersedia di GenBank maka dapat disimpulkan bahwa isolat BI5 merupakan kelompok spesies *Hafnia psychrotolerans*.

Menurut Hidayat et al. (2018), bakteri *Hafnia sp* termasuk pada jenis gram negatif, yang memiliki bentuk sel basil dengan diameter 1 μm . Bakteri *Hafnia* mampu beradaptasi pada lingkungan yang memiliki suhu 30-37 °C. *Hafnia sp* dapat menghasilkan glukosa serta pembentukan gas. Genus *Hafnia* hanya mempunyai 1 spesies heterogen, yaitu *Hafnia alvei*. Berdasarkan penelitian Firmansyah et al. (2023), menemukan bahwa bakteri dari hasil penelitian memiliki ciri yang sama dengan genus *Hafnia* yang diamati berdasarkan pengamatan makroskopis dan mikroskopis serta uji fisiologis. Bakteri *Hafnia* pada media NA menunjukkan ciri - ciri warna putih, mempunyai bentuk koloni bulat, pinggir rata serta elevasi raised. Secara mikroskopis bakteri genus *Hafnia* merupakan bakteri yang tergolong gram negatif, sel bakteri berbentuk kokus, dan pada uji katalase memperoleh hasil positif. *Hafnia* memiliki aktivitas enzim selulase yang sangat baik, bakteri tersebut mampu memecahkan selulosa. Bakteri yang mampu tumbuh pada media selulosa akan dikategorikan bahwa bakteri tersebut termasuk bakteri selulolitik (Siruwahni & Rasyidah, 2023).



Gambar 8. Pohon Filogenetik Isolat BI4 memiliki kekerabatan dengan *P. aeruginosa* ATCC10145.

KESIMPULAN

Nanopartikel perak (AgNP) dapat disintesis dengan menggunakan bakteri endofit tanaman padi. Isolat bakteri endofit yang positif mampu mereduksi partikel perak nitrat (AgNO_3) menjadi nanopartikel perak (AgNPs) hanya dua isolat yaitu isolat BI4 dan BI5. AgNPs yang disintesis dengan reduktor bakteri endofit pada BI4 memiliki panjang gelombang maksimum 468 nm dengan nilai serapan 0,173 dan BI5 memiliki panjang gelombang maksimum 368 nm dengan nilai serapan 0,108. Hasil identifikasi berdasarkan 16S rRNA menunjukkan bahwa isolat BI4 adalah *Pseudomonas aeruginosa* dengan kemiripan 98% dan isolat BI5 adalah *Hafnia psychrotolerant* dengan kemiripan 87%. Pengujian AgNPs terhadap Xoo menunjukkan kemampuan antibiosis namun masih dalam kategori lemah.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih disampaikan kepada Lembaga Penelitian dan Pengabdian kepada Masyarakat, Universitas Trunojoyo Madura atas sebagian pendanaan penelitian ini melalui Program Penelitian Mandiri skema Penelitian Pemula Tahun 2023 dengan nomor kontrak 5612/UN46.4.1/PT.01.03/2023.

DAFTAR PUSTAKA

- Antony, J. J., Sithika, M. A. A., Joseph, T. A., Suriyakalaa, U., Sankarganesh, A., Siva, D., Kalaiselvi, S., & Achiraman, S. (2013). In vivo antitumor activity of biosynthesized silver nanoparticles using *Ficus religiosa* as a nanofactory in DAL induced mice model. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 108, 185–190.
- Banu, A. N., & Balasubramanian, C. (2014). Optimization and synthesis of silver nanoparticles using *Isaria fumosorosea* against human vector mosquitoes. *Parasitology Research*, 113, 3843–3851.
- Bauer, A. W., Kirby, W. M. M., Sherris, J. C., & Turck, M. (1966). Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *American Journal of Clinical Pathology*, 45(4 ts), 493–496.
- Benelli, G. (2016). Green synthesized nanoparticles in the fight against mosquito-borne diseases and cancer—a brief review. *Enzyme and Microbial Technology*, 95, 58–68.
- Destriana, D., Azhar, M., & Oktavia, B. (2016). Identifikasi Molekuler Gen 16S rRNA Isolat Bakteri Pendegradasi Inulin dari Rizosfer Umbi Dahlia. *Periodic*, 5(2), 16–21.
- Fadillah, I. (2021). Kajian Literatur Sintesis Nanopartikel Perak Menggunakan Reduktor Kimia dan Biologi serta Uji Aktivitas Antibakteri. *Jurnal Riset Farmasi*, 141–149.
- Fatimah, I., & Mutiara, N. A. L. (2016). Biosynthesis of silver nanoparticles using Putri Malu (*Mimosa pudica*) leaves extract and microwave irradiation method. *Molekul*, 11(2), 288–298.
- Firmansyah, R., Hidayat, Y., & Afza, A. (2023). Karakterisasi Bakteri Pencemar Daging Langkitang (*Fuanus ater*). *Jurnal Pendidikan Tambusai*, 7(3), 21185–21189.
- Hafiah, W., Abadi, A. L., & Aini, L. Q. (2015). Ketahanan lima galur padi (*Oryza sativa* L.) terhadap dua isolat *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* penyebab penyakit hawar daun bakteri pada tanaman padi. *Jurnal HPT (Hama Penyakit Tumbuhan)*, 3(2), 9–17.
- Hakim, L., Efendi, E., & Marlina, M. (2022). Evaluasi Potensi Hasil Galur Padi Lokal Aceh Hasil Mutasi Radiasi Yang Terinfeksi Bakteri *Xanthomonas oryzae* pv *oryzae* (Xoo) Penyebab Penyakit Hawar Daun Bakteri. *Jurnal Media Pertanian*, 7(1), 44–49.
- Hidayat, M. I., Manampiring, A., & Kepel, B. J. (2018). Isolasi dan Identifikasi Bakteri Resisten Arsen pada Sedimen Tanah di Pesisir Pantai Ratatotok. *EBiomedik*, 6(2).
- Irwan, R., Zakir, M., & Budi, P. (2016). Pengaruh Konsentrasi AgNO_3 dan Suhu Sintesis terhadap Surface Plasmon Resonance (SPR) Nanopartikel Perak. *Indonesian Journal of Chemical Research*, 4(1), 356–361.

- John, M. S., Nagoth, J. A., Ramasamy, K. P., Mancini, A., Giuli, G., Natalello, A., Ballarini, P., Miceli, C., & Pucciarelli, S. (2020). Synthesis of bioactive silver nanoparticles by a *Pseudomonas* strain associated with the antarctic psychrophilic protozoon *Euplotes focardii*. *Marine Drugs*, 18(1), 38.
- Kamri, A. M., Baits, M., Amin, A., Kosman, R., Dede, A., Rosmayanti, R., Septinia, A., Wahyuni, S., Zabrina, A., & Irmayani, I. (2023). Edukasi Penggunaan Antibiotik Rasional Pada Masyarakat. *Jurnal Pengabdian Masyarakat Bangsa*, 1(8), 1361–1374.
- Khoiri, S., Damayanti, T. A., & Giyanto, G. (2016). Identification of quorum quenching bacteria and its biocontrol potential against soft rot disease bacteria, *Dickeya dadantii*. *AGRIVITA Journal of Agricultural Science*, 39(1), 45–55.
- Khoiri, S., Damayanti, T. A., & Giyanto, G. (2017). Identification of quorum quenching bacteria and its biocontrol potential against soft rot disease bacteria, *Dickeya dadantii*. *Agrivita*, 39(1). <https://doi.org/10.17503/agrivita.v39i1.633>
- Khoiri, S., Rahmawati, I. N., Djunaedy, A., Pawana, G., & Megasari, D. (2024). Biosynthesis silver nanoparticle using *Bacillus thuringiensis* strain BT2 and its potential use against *Spodoptera frugiperda* JE Smith (Lepidoptera: Noctuidae). *BIO Web of Conferences*, 146, 01009.
- Purwadi, P., & Nasyuha, A. H. (2022). Implementasi Teorema Bayes Untuk Diagnosa Penyakit Hawar Daun Bakteri (Kresek) Dan Penyakit Blas Tanaman Padi. *JURIKOM (Jurnal Riset Komputer)*, 9(4), 777–783.
- Rahmayani, Y., Zuhadjri, Z., & Arief, S. (2019). Sintesis dan Karakterisasi Nanopartikel Perak-Tricalcium Phosphate (TCP) dengan Bantuan Ekstrak Daun Alpukat (*Persea americana*). *Jurnal Kimia Valensi*, 5(1), 72–78.
- Sayed, A. M. M., Kim, S., & Behle, R. W. (2017). Characterisation of silver nanoparticles synthesised by *Bacillus thuringiensis* as a nanobiopesticide for insect pest control. *Biocontrol Science and Technology*, 27(11), 1308–1326.
- Shahid, M., & Khan, M. S. (2022). Ecotoxicological implications of residual pesticides to beneficial soil bacteria: A review. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 188, 105272. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2022.105272>
- Sintubin, L., De Windt, W., Dick, J., Mast, J., Van Der Ha, D., Verstraete, W., & Boon, N. (2009). Lactic acid bacteria as reducing and capping agent for the fast and efficient production of silver nanoparticles. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 84, 741–749.
- Siruwahni, D., & Rasyidah, R. (2023). Isolasi dan Aktivitas Bakteri Selulolitik pada Limbah Diapers. *BIOEDUSAINS: Jurnal Pendidikan Biologi Dan Sains*, 6(2), 407–421.
- Suryadi, Y., Susilowati, D. N., & Made-Samudra, I. (2022). Biosintesis nanopartikel perak (AgNP) menggunakan *Bacillus firmus* E65 dan aktivitasnya terhadap mikroba patogen. *Agrointek: Jurnal Teknologi Industri Pertanian*, 16(2), 197–205.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., & Kumar, S. (2011). MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*, 28(10), 2731–2739.
- Tamura, K., Stecher, G., & Kumar, S. (2021). MEGA11: molecular evolutionary genetics analysis version 11. *Molecular Biology and Evolution*, 38(7), 3022–3027.
- Wilson, W., Pawestri, Y. A., & Sembiring, L. (2017). Isolasi, karakterisasi dan skrining antimikroba bakteri endofit tanaman Purwoceng (*Pimpinella pruatjan* Molk). *Jurnal Labora Medika*, 1(1), 1–6.
- Wulandari, D., & Purwaningsih, D. (2019). Identifikasi dan karakterisasi bakteri amilolitik pada umbi *Colocasia esculenta* L. secara morfologi, biokimia, dan molekuler. *Jurnal Bioteknologi Dan Biosains Indonesia*, 6(2), 247–258.
- Xu, Y., Luo, Q., & Zhou, M. (2013). Identification and Characterization of Integron-Mediated Antibiotic Resistance in the Phytopathogen *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *PLOS ONE*, 8(2), e55962. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0055962>
- Xu, Y., Zhu, X.-F., Zhou, M.-G., Kuang, J., Zhang, Y., Shang, Y., & Wang, J.-X. (2010). Status of Streptomycin Resistance Development in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* and *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* in China and their Resistance Characters. *Journal of Phytopathology*, 158(9), 601–608. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.2009.01657.x>