

Conference Paper

Uji Daya Hambat *Bacillus* sp. terhadap *Phytophthora palmivora* Penyebab Penyakit Busuk Buah Kakao

Inhibitory Test of Bacillus sp. against Phytophthora palmivora Causes Cocoa Fruit Rot Disease

Devi Tria Anjarsari, Endang Triwahyu Prasetyawati*, Yenny Wuryandari

Agrotechnology Study Program, Faculty of Agriculture, Universitas Pembangunan Nasional "Veteran" Jawa Timur, Surabaya 60294, Indonesia

*Corresponding author:
E-mail:
endang_tp@upnjatim.ac.id

ABSTRAK

Busuk buah merupakan salah satu penyakit penting pada buah Kakao, yang disebabkan oleh *Phytophthora palmivora*. Petani sering kali melakukan pengendalian patogen tersebut menggunakan pestisida kimia. Namun cara ini memiliki dampak yang merugikan bagi lingkungan maupun kesehatan. Pengendalian penyakit busuk buah yang lebih ramah lingkungan dapat menggunakan agensia biokontrol. *Bacillus* sp. merupakan salah satu agensia biokontrol yang mampu menghasilkan antibiotika yang dapat menghambat pertumbuhan patogen, terutama patogen tular tanah dan mempunyai kemampuan mengkoloni akar tanaman. Tujuan penelitian ini untuk mengetahui potensi *Bacillus* sp. dalam menghambat pertumbuhan jamur patogen *Phytophthora palmivora* secara *in vitro*. Penelitian ini menggunakan dua faktor percobaan yaitu bakteri *Bacillus* sp. isolat Ba-6, isolat Ba-9, isolat Ba-12, isolat Ba-15, dan isolat Ba-17 dan konsentrasi bakteri *Bacillus* sp. (10^6 cfu/ml dan 10^9 cfu/ml). Parameter yang diamati yaitu daya hambat dan mekanisme penghambatan bakteri *Bacillus* sp. terhadap jamur *Phytophthora palmivora*. Hasil uji daya hambat secara *in vitro* terbaik pada perlakuan Ba12K2 dengan penghambatan sebesar 61% dengan mekanisme penghambatan yaitu antibiosis dibuktikan dengan adanya zona penghambatan dan pembengkakan pada hifa.

Kata Kunci: Buah Kakao, *Phytophthora palmivora*, *Bacillus* sp., biokontrol

ABSTRACT

Fruit rot is one of the important diseases in cocoa fruit, which is caused by Phytophthora palmivora. Farmers often control these pathogen using chemical pesticides. However, this method has a detrimental impact on the environment and health. More environmentally friendly fruit rot disease control can use biocontrol agency. Bacillus sp. is one of the biocontrol agents that is able to produce antibiotics that can inhibit the growth of pathogens, especially soil-borne pathogens and have the ability to colonize plant roots. The purpose of this study is to determine the potential of Bacillus sp. in inhibiting the growth of the pathogenic fungus Phytophthora palmivora in vitro. This study used two experimental factors, type of isolates Bacillus sp. Ba-6 isolate, Ba-9 isolate, Ba-12 isolate, Ba-15 isolate, and Ba-17 isolate and the concentration of Bacillus sp. (10^6 cfu/ml and 10^9 cfu/ml). The parameters observed were the inhibitory power and the mechanism of inhibition of Bacillus sp. against Phytophthora palmivora. The results of the best in vitro inhibition test on Ba12K2 treatment with an inhibition of 61% with an inhibitory mechanism, namely antibiosis, as evidenced by the presence of zones of inhibition and swelling of the hyphae.

Keywords: Cocoa pod rot disease, *Phytophthora palmivora*, *Bacillus* sp., biocontrol

How to cite:

Anjarsari, D. T., Prasetyawati, E. T., & Wuryandari, Y. (2022). Inhibitory test of *Bacillus* sp. against *Phytophthora palmivora* causes cocoa fruit rot disease. *Seminar Nasional Agroteknologi Fakultas Pertanian UPN "Veteran" Jawa Timur 2021*. NST Proceedings. pages 14-21. doi: 10.11594/nstp.2022.2003

Pendahuluan

Kakao (*Theobroma cacao* L.) merupakan komoditas penting bagi perekonomian nasional karena memberikan kontribusi tinggi bagi devisa negara (Lukito, 2004). Busuk buah kakao merupakan penyakit penting tanaman kakao yang disebabkan oleh jamur *Phytophthora palmivora*. Penyakit busuk buah kakao menyebabkan kerugian di Indonesia berkisar antara 25-50% (Darent & Guest, 2004). Pengendalian penyakit busuk buah kakao umumnya masih menggunakan pestisida kimia yang memiliki pengaruh buruk bagi lingkungan, hewan ataupun manusia sehingga perlu adanya pengendalian hayati yang lebih ramah lingkungan. Pengendalian hayati dapat menggunakan agensia biokontrol *Bacillus* sp. di mana bakteri ini mampu menghasilkan antibiotika yang mampu menghambat pertumbuhan patogen terutama patogen tular tanah dan mempunyai kemampuan mengkoloni akar tanaman.

Bakteri *Bacillus* sp. yang digunakan dalam penelitian ini merupakan bakteri *Bacillus* sp. koleksi Dra. Endang Triwahyu P., MSi yang secara *in vitro* terbukti mampu menekan patogen *Ralstonia solanacearum* dengan terbentuknya zona hambat. Besarnya zona hambat untuk isolat Ba-6, Ba-9, Ba-12, Ba-15, dan isolat Ba-17 bervariasi (Prasetyawati & Wiyatiningsih, 2020). Berdasarkan potensi yang dimiliki *Bacillus* sp. maka perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui pemanfaatan bakteri tersebut sebagai agen hayati untuk pengendalian jamur patogen *Phytophthora palmivora* penyebab penyakit busuk buah kakao dan diharapkan dapat mengurangi ketergantungan dan mengatasi dampak negatif dari pemakaian pestisida kimia yang selama ini masih dipakai untuk mengendalikan.

Bahan dan Metode

Sterilisasi alat

Peralatan yang akan disterilkan terlebih dahulu dicuci dan di kering anginkan. Peralatan yang berbentuk tabung seperti tabung reaksi, gelas ukur, dan erlenmeyer bagian atasnya ditutup dengan kapas, kemudian dibungkus dengan kertas, sedangkan untuk cawan petri atau gelas beaker langsung dibungkus dengan menggunakan kertas. Sterilisasi peralatan dilakukan dengan menggunakan autoklaf suhu 121°C, dengan tekanan 1,5 atm selama 25 menit (Sastrahidayat, 2012).

Isolasi Phytophthora palmivora

Patogen diisolasi dari buah kakao yang menunjukkan gejala busuk buah yang diakibatkan jamur *Phytophthora palmivora*. Jaringan buah diambil setengah bagian yang sehat dan setengah bagian yang sakit di mana pada bagian ini masih aktif untuk tumbuh patogen, selanjutnya disterilkan dengan alkohol 70% dan dibilas dengan aquades steril kemudian dikeringkan di atas tisu. Spesimen ditanam pada cawan petri yang berisi media V8 dan diinkubasi (Efendi *et al.*, 2014).

Pengamatan mikroskopis Phytophthora palmivora

Pengamatan jamur menggunakan mikroskop perlu dilakukan untuk mengetahui apakah jamur yang didapatkan merupakan jamur *Phytophthora palmivora*. Menurut Semangun (2000), hifa *P. palmivora* hialin dan tidak bersekat. Sporangia berbentuk seperti buah pir dan terdapat papilla, dengan ukuran 30-60x20-53µm. Pengamatan dilakukan dengan cara *object glass* ditetesi dengan aquades kemudian koloni jamur diletakkan di atasnya dan ditutup dengan *cover glass* selanjutnya diamati menggunakan mikroskop dimulai dengan perbesaran terendah.

Peremajaan bakteri Bacillus sp.

Isolat bakteri *Bacillus* sp. diremajakan dengan cara diambil menggunakan jarum ose kemudian digoreskan pada media NA yang telah di plating pada media miring.

Uji daya hambat secara *In Vitro* di cawan petri

Uji daya hambat *Bacillus* sp. terhadap *P. palmivora* mengacu pada metode Flori dkk (2020) dilakukan dalam cawan petri yang telah berisi Potato Dextrose Agar (PDA) steril. Dua kertas saring steril berbentuk bulatan dengan diameter 5 mm dan direndam kedalam suspensi *Bacillus* sp. Perendaman kertas saring pada isolat *Bacillus* sp. dilakukan selama 30 menit hal ini mengacu pada Flori dkk. (2020). Masing-masing kertas saring yang telah direndam dengan isolat *Bacillus* sp. diletakkan di bagian pinggir cawan petri dengan jarak 3 cm dari isolat *P. palmivora*, di mana isolat *P. palmivora* berada tepat di titik tengah cawan petri. Perlakuan kontrol hanya diinokulasi dengan isolat jamur *P. palmivora*.

Pertumbuhan jamur diukur dengan cara menghitung pertambahan diameter koloni jamur setiap harinya selama 7 hari. Pertumbuhan jamur *P. palmivora* digunakan untuk menghitung persentase penghambatan. Persentase penghambatan pertumbuhan koloni *P. palmivora* dihitung dengan rumus (Hanif, 2015):

$$\text{Daya Hambat} = \frac{Y - X}{Y} \times 100\%$$

Keterangan :

Y = Diameter koloni normal jamur *P. palmivora*

X = Diameter koloni jamur yang terhambat pertumbuhannya

Mekanisme antagonis

Pengamatan mekanisme antagonis *Bacillus* sp. terhadap jamur *Phytophthora palmivora* dilakukan secara makroskopis melalui pengamatan langsung pada hasil uji *in vitro* di cawan petri dan secara mikroskopis dengan cara mengamati hifa jamur pada daerah kontak antara jamur *P. palmivora* dan *Bacillus* sp. dengan bantuan mikroskop.

Rancangan percobaan dan analisis data

Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan dua faktor yaitu bakteri *Bacillus* sp. isolat Ba-6, isolat Ba-9, isolat Ba-12, isolat Ba-15, dan isolat Ba-17 dan konsentrasi bakteri *Bacillus* sp. (10^6 cfu/ml dan 10^9 cfu/ml). Pemilihan konsentrasi 10^6 cfu/ml dan 10^9 cfu/ml mengacu pada penelitian Sofiani dkk. (2016). Sehingga terdapat 10 perlakuan dan 3 ulangan dengan 3 kontrol. Analisis data pada penelitian ini dilakukan dengan menggunakan Anova dan apabila terdapat beda yang nyata akan dilakukan pengujian lanjutan untuk uji *in vitro* di cawan petri menggunakan uji *Duncan Multiple Range Test* (DMRT) 5%.

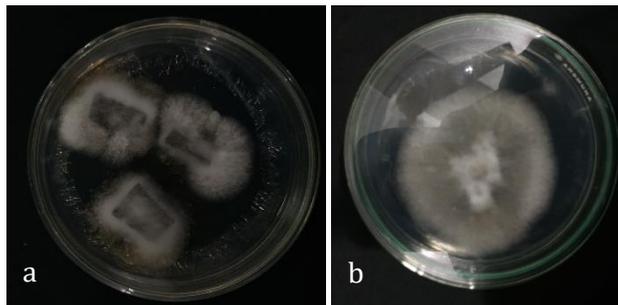
Hasil dan Pembahasan

Isolasi *Phytophthora palmivora*

Jamur patogen *Phytophthora palmivora* diperoleh dari hasil isolasi buah kakao yang menunjukkan gejala penyakit busuk buah di lahan perkebunan daerah Wonosalam Kabupaten Jombang. Buah yang dipilih merupakan buah yang diduga terinfeksi jamur *P. palmivora* yang menunjukkan gejala busuk berwarna coklat (Gambar 1). Jamur *P. palmivora* diisolasi pada media V8. Koloni jamur *P. palmivora* hasil isolasi menunjukkan ciri-ciri yaitu berwarna putih seperti kapas dan bentuk koloni yang tidak beraturan (Gambar 2). Bentuk koloni jamur *P. palmivora* sesuai dengan pendapat Lolong (2005) yang menyatakan bahwa bentuk koloni *P. palmivora* adalah stelat dan atau tidak beraturan pada media tumbuh agar PDA dan V8, bentuk permukaan miselium datar dan seperti kapas.

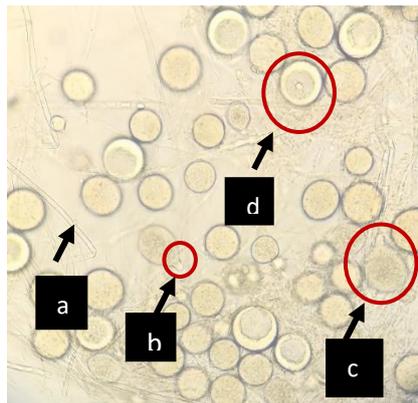


Gambar 1. Buah kakao yang diduga terinfeksi jamur *Phytophthora palmivora*



Gambar 2. Jamur *Phytophthora palmivora* (a) Hasil isolasi (b) Hasil pemurnian

Hasil pengamatan mikroskopis *Phytophthora palmivora* terlihat adanya hifa, klamidospora, sporangium berbentuk ovoid seperti buah pear dan adanya papilla (Gambar 3). Hasil pengamatan ini sesuai dengan pengamatan Matulo et al. (2007) yang mendeskripsikan bahwa jamur *P. palmivora* memiliki hifa tidak bersekat, sporangium berbentuk elipsoid sampai ke ovoid dan sporangiumnya memiliki tonjolan yang dinamakan papilla yang sangat mencolok dan klamidospora berbentuk bulat memiliki dinding yang tebal. Papila berfungsi sebagai tempat keluarnya zoospora dari sporangium, kalmidospora berfungsi sebagai spora resisten dan biasanya terbentuk di antara hifa atau di ujung hifa.

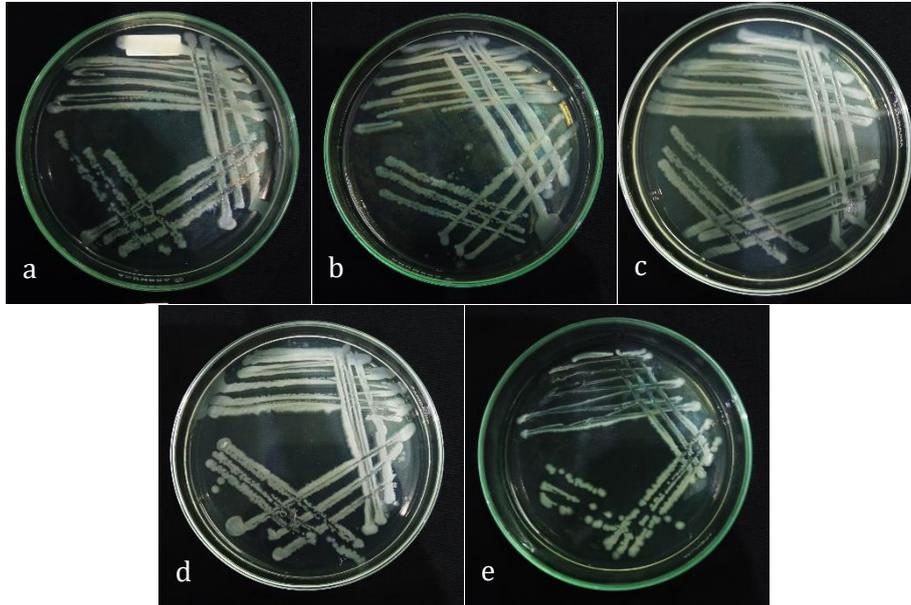


Gambar 3. Pengamatan mikroskopis *P. palmivora* (a) Hifa pada *P. palmivora* (b) Papilla pada *P. palmivora* (c) Sporangium pada *P. palmivora* (d) Klamidospora pada *P. Palmivora*

Peremajaan bakteri *Bacillus* sp.

Bakteri agensia hayati yang digunakan yaitu *Bacillus* sp. koleksi dari Dra. Endang Triwahyu P.,M.Si. dengan isolat Ba-6, Ba-9, Ba-12, Ba-15, dan Ba-17. Pemurnian dilakukan menggunakan media NA. Permukaan koloni *Bacillus* sp. untuk isolat Ba-15 memiliki permukaan cenderung lebih

kering dibandingkan dengan isolat lainnya. Sedangkan untuk koloni *Bacillus* sp. pada kelima isolat memiliki tepi yang tidak rata, berwarna putih (Gambar 4). Hatmanti (2000) menyatakan bahwa permukaan koloni bakteri *Bacillus* sp. kasar dan tidak berlendir, bahkan ada yang memiliki permukaan cenderung kering berbubuk, tepi koloni bermacam-macam namun umumnya tidak rata dan pada umumnya warna koloni putih sampai kekuningan, koloni besar dan tidak mengkilat.

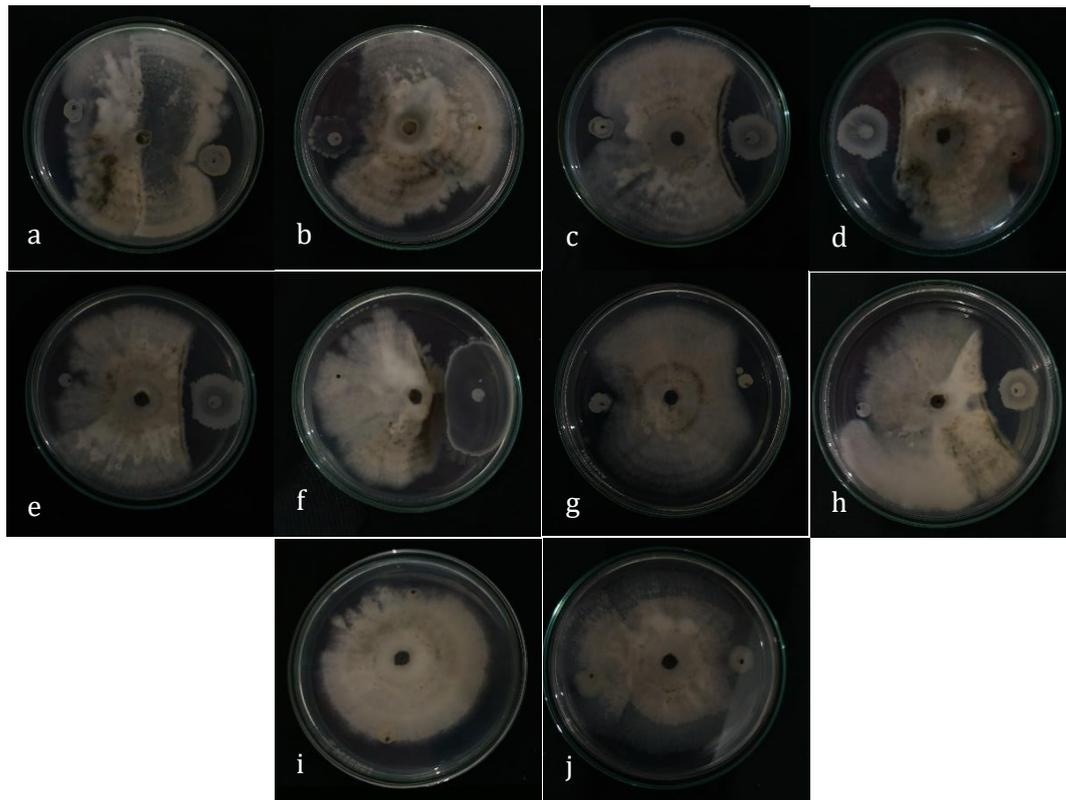


Gambar 4. Bakteri *Bacillus* sp. (a)Isolat Ba-6 (b)Isolat Ba-9 (c)Isolat Ba-12 (d)Isolat Ba-15 (e)Isolat Ba-17

Uji daya hambat in vitro di Cawan Petri

Hasil pengamatan uji daya hambat secara in vitro antara jamur patogen *Phytophthora palmivora* dengan bakteri *Bacillus* sp. selama 7 hari pada media PDA menunjukkan isolat Ba-6, Ba-9, Ba-12, dan Ba-15 pada semua konsentrasi mampu menghambat perkembangan *P. palmivora* namun pada isolat Ba-17 untuk konsentrasi 10^6 tidak menunjukkan adanya penghambatan (Gambar 5). Kemampuan bakteri *Bacillus* sp. dalam menghambat perkembangan *P. palmivora* dapat terjadi karena kemampuannya dalam menghasilkan senyawa penghambat pertumbuhan. Purwanti dkk (2005) menyatakan bahwa bakteri antagonis menghasilkan senyawa penghambat pertumbuhan yang mampu mendegradasi dinding sel jamur, mempengaruhi permeabilitas membran sel, serta sebagai inhibitor enzim jamur. Bakteri *Bacillus* sp. memiliki beberapa jenis senyawa diantaranya zwittermicin, kanosamin, bacillaene, difficidin, macrolactin, dan rhizocticin. Senyawa tersebut sebagian besar merupakan antibiotik dari golongan peptida, dan beberapa lainnya merupakan antibiotik golongan butirosin dan protosin (Cawoy *et al.*, 2011).

Hasil pengukuran persentase daya hambat bakteri *Bacillus* sp. terhadap jamur patogen *Phytophthora palmivora* setelah dilakukan analisis sidik ragam dan dilakukan uji lanjut DMRT didapatkan hasil persentase tertinggi yaitu pada isolat Ba12K2 sebesar 61%, kemudian Ba12K1 sebesar 50%, Ba9K2 47 %, Ba6K2 sebesar 46.5 %, Ba9K1 sebesar 43%, Ba6K1 sebesar 33%, Ba15K1 sebesar 32%, Ba15K2 sebesar 31.5 %, Ba17K2 sebesar 1% dan yang terkecil adalah Ba17K1 sebesar 0% (Tabel 1). Hasil daya hambat pada masing-masing perlakuan memiliki persentase yang berbeda-beda, perbedaan daya hambat diduga karena kandungan masing-masing isolat bakteri *Bacillus* sp. yang berbeda antar isolat dan jumlah senyawa yang dihasilkan juga berbeda. Hal ini didukung oleh pendapat Pitasari dan Ali (2018) yang menyatakan bahwa perbedaan daya hambat ini bisa terjadi karena adanya perbedaan jenis dan jumlah senyawa yang dihasilkan masing-masing isolat yang berfungsi untuk menghambat. Hal lain dikemukakan oleh Saputra *et al.* (2015) mengemukakan bahwa perbedaan daya hambat dapat disebabkan oleh perbedaan fisiologis bakteri dalam memanfaatkan nutrisi pada media.



Gambar 5. Daya hambat *Bacillus* sp. terhadap *P. palmivora* (a) Ba6K1 (b) Ba6K2 (c) Ba9K1 (d) Ba9K2 (e) Ba12K1 (f) Ba12K2 (g) Ba15K1 (h) Ba15K2 (i) Ba17K1 (j) Ba17K2

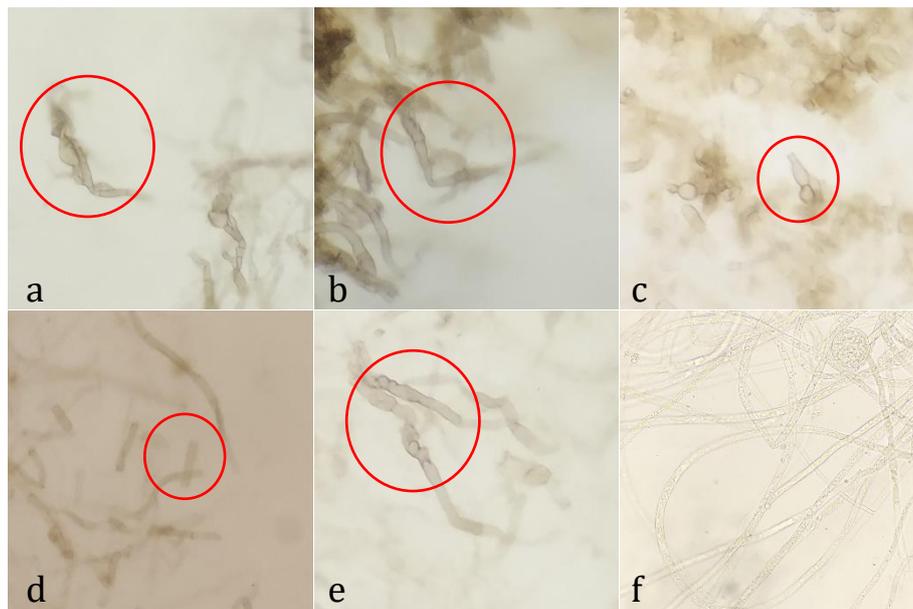
Tabel 1. Rata-rata persentase daya hambat *Bacillus* sp. terhadap *P. palmivora* secara *In Vitro* Umur 7 HSI

Perlakuan	Persentase Penghambatan (%)
Kontrol	0 a
Ba6K1	33 b
Ba6K2	46.5 cd
Ba9K1	43 c
Ba9K2	47 cd
Ba12K1	50 d
Ba12K2	61 e
Ba15K1	32 b
Ba15K2	31.5 b
Ba17K1	0 a
Ba17K2	1 a

Keterangan: angka yang diikuti huruf yang sama pada kolom yang sama tidak berbeda nyata pada uji DMRT 5%

Aktivitas penghambatan bakteri *Bacillus* sp. terhadap jamur *P. palmivora* dapat terjadi karena adanya mekanisme penghambatan. Mekanisme penghambatan yang terlihat dalam penelitian ini yaitu mekanisme antibiosis. Hal ini terlihat dari adanya zona bening dan pada beberapa perlakuan dijumpai adanya pigmen dipermukaan bawah jamur. Pengamatan secara mikroskopis menunjukkan adanya pertumbuhan abnormal pada hifa jamur *P. palmivora*. Perlakuan isolat Ba-6 menunjukkan hifa *P. palmivora* membengkok dan membengkak (Gambar 6a), isolat Ba-9

menunjukkan hifa *P. palmivora* membengkok dan membengkak (Gambar 6b), isolat Ba-12 menunjukkan hifa *P. palmivora* memendek, membengkak, dan terpotong (Gambar 6c), isolat Ba-15 menunjukkan hifa *P. palmivora* memendek dan terpotong (Gambar 6d), isolat Ba-17 menunjukkan hifa *P. palmivora* membengkak namun jumlah hifa yang membengkak sedikit (Gambar 6e). Pengamatan pertumbuhan abnormal pada hifa *P. palmivora* terjadi karena adanya pengaruh dari senyawa yang dihasilkan oleh bakteri *Bacillus* sp. di mana bakteri tersebut memiliki kandungan senyawa antibiotik dan antifungi yang mengakibatkan malformasi pada hifa patogen *P. palmivora*, hal ini didukung oleh pendapat Eliza dkk (2007) menyatakan bahwa pertumbuhan yang abnormal pada hifa (malformasi) merupakan hasil dari senyawa antifungal bakteri, pertumbuhan abnormal pada hifa berupa pembengkakan dan pemendekan hifa yang berakibat hifa tidak mampu berkembang dengan sempurna.



Gambar 6. Hifa *Phytophthora palmivora* setelah diantagoniskan dengan (a) Isolat Ba-6 (b) Isolat Ba-9 (c) Isolat Ba-12 (d) Isolat Ba-15 (e) Isolat Ba-17. (f) hifa normal

Kesimpulan

Pengamatan uji daya hambat secara in vitro antara jamur patogen *Phytophthora palmivora* dengan bakteri *Bacillus* sp. selama 7 hari pada media PDA menunjukkan isolat Ba-6, Ba-9, Ba-12, dan Ba-15 pada semua konsentrasi mampu menghambat perkembangan *P. palmivora* namun pada isolat Ba-17 untuk konsentrasi 10^6 tidak menunjukkan adanya penghambatan tetapi pada semua isolat menunjukkan kemampuan mekanisme antibiosis.

Daftar Pustaka

- Cawoy, H., W. Bettioli, P. Fickers, & Ongena, M. (2011). *Bacillus*-based biological control of plant diseases. In: Stoycheva M. (ed.). *Pesticides in the modern world, pesticides use and management*. Croatia: Intech Europe.
- Darenth, A. & Guest, D.I.. (2004). *Diversity and management of Phytophthora in Southeast Asia*. Canberra: ACIAR.
- Eliza, M. A., Djatnika, I., & Widodo. (2007). Karakter fisiologis dan peranan antibiosis bakteri perakaran gramineae terhadap fusarium dan pemacu pertumbuhan tanaman pisang. *Jurnal Hort*, 17(2), 150-160.
- Flori, F., Mukarina., & Rachmawati. (2020). Potensi antagonis isolat bakteri *Bacillus* spp. asal rizosfer tanaman lada (*Piper nigrum* L.) Sebagai agen pengendali jamur *Fusarium* sp. *JDF. Bioma*, 5(1), 111-120
- Hanif A. (2015). Senyawa metabolit bakteri endofit sebagai alternatif pengendalian efektif cendawan patogen terbawa benih jagung. *Tesis*. Institut Pertanian Bogor. Bogor
- Hatmanti A. (2000). Pengenalan *Bacillus* spp. *Oseana*, 25(1), 31-41.
- Lolong, A. A. (2005). *Biology Phytophthora palmivora (Butler) butler penyebab penyakit busuk pucuk dan gugur buah kelapa*. Monograf Hama dan Penyakit Kelapa. Manado: Balitka.
- Lukito A.M. (2004). *Panduan lengkap budidaya kakao*. Jakarta: Agromedia Pustaka.
- Motulo, H. F. J. (2007). Karakter morfologi dan molekuler isolat *Phytophthora palmivora* asal kelapa dan kakao. *Jurnal LITTRI*, 13(3), 111-118.

- Pitasari, A., & Ali, M. (2018). Isolasi dan uji antagonis bakteri endofit dari tanaman bawang merah (*Allium ascalonicum* L.) terhadap jamur *Alternaria porri* Ellis Cif. *JOM Faperta*, 5(1), 1-12.
- Prasetyawati, E. T., & Wiyatiningsih, S. (2020). *Eksplorasi Bacillus spp di areal pertanaman cabai dan uji quorum sensing terhadap patogenesitas Ralstonia solanacearum pada inangnya*. Laporan Penelitian Dasar Lanjutan. Universitas Pembangunan Nasional "Veteran" Jawa Timur.
- Purwanti, S, Pujiyanto S., & Ferniah. (2005). *Uji efektivitas bakteri kitinolitik sebagai pengendali pertumbuhan kapang patogen penyebab penyakit utama tanaman sayuran dan potensinya sebagai bahan biofungisida ramah lingkungan*. Laporan penelitian. Universitas Diponegoro. Semarang.
- Saputra, R., Arwiyanto, T., & Wibowo, A. (2015). Uji aktivitas antagonistik beberapa isolat Bacillus spp. terhadap penyakit layu bakteri (*Ralstonia solanacearum*) pada beberapa varietas tomat dan identifikasinya, *Prosiding Sem Nas Masy Biodiv Indon*, 1(5), 1116-1122.
- Sastrahidayat, I. R., Djauhari, S. (2012). *Teknik Penelitian Fitopatologi*. Malang: UB Press.
- Semangun, H. (2000). *Penyakit-penyakit tanaman perkebunan di Indonesia*. Yogyakarta: Gajah Mada University Press.
- Sofiani, M., Djauhari, S., & Aini, L. Q. (2017). Pengaruh aplikasi Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) dalam menghambat penyakit rebah kecambah yang disebabkan oleh jamur *Sclerotium rolfsii* pada Kedelai. *Jurnal Hama dan Penyakit Tumbuhan*, 4(1), 32-38.
- Suryanto, D., Irawati, N., & Munir, E. (2011). Isolation and characterization of chitinolytic bacteria and their potential to inhibit plant pathogenic fungi. *Microbiol Indonesia*, 5(2), 144-148.