

STUDI AWAL EMPAT ISOLAT BAKTERI ANTAGONIS TERHADAP JAMUR

Colletotrichum gloeosporioides

Preliminary Study of Four Isolates of Antagonist Bacteria Against the *Colletotrichum gloeosporioides*

Elly Syafriani^{1)*}, Femy Riwany³⁾, Rahmi Hendayani³⁾, Rahmi Kamelia²⁾, Istino Ferita³⁾, Fatchiyah Fatchiyah³⁾, dan Jamsari Jamsari³⁾

¹⁾ Program Studi Agroteknologi Fakultas Pertanian, UPN "Veteran" Jawa Timur

²⁾ Program Pascasarjana, Jurusan Kimia, Universitas Andalas, Padang

³⁾ Fakultas Pertanian, Universitas Andalas, Padang

⁴⁾ Program Pascasarjana, Jurusan Kimia, Universitas Andalas, Padang

^{*)} Email: syafriani.elly@gmail.com

ABSTRAK

Serangan penyakit antraknosa yang disebabkan oleh jamur *Colletotrichum gloeosporioides* pada beberapa tanaman yang bernilai ekonomi tinggi sangat merugikan para petani. Cara konvensional yang banyak dimanfaatkan para petani untuk mengatasi permasalahan tersebut adalah dengan melakukan penyemprotan fungisida sintetik yang berdampak negatif terhadap konsumen dan lingkungan. Alternatif lain yang dibutuhkan untuk menggantikan peran fungisida sintetik tersebut adalah dengan menemukan mikroorganisme antagonis terhadap jamur *C. gloeosporioides* yang kemudian dapat digunakan sebagai bahan biofungisida yang aman bagi kesehatan dan lingkungan. Empat isolat bakteri antagonis jamur *C. gloeosporioides* yaitu UBCR_12, UBCR_36, UBCF_01, dan UBCF_13 tengah dikembangkan sebagai bahan untuk pembuatan biofungisida. Sebagai tahap awal penelitian pengembangan terhadap keempat bakteri tersebut, dilakukan sejumlah pengujian untuk mengidentifikasi dan mendapatkan sejumlah informasi terkait karakter keempat isolat tersebut. Pengujian morfologi menunjukkan bahwa isolat UBCR_12 adalah , UBCR_36 adalah, UBCF_01 adalah, dan UBCF_13 adalah. Pengujian biokimia menunjukkan bahwa UBCR_12 adalah , UBCR_36 adalah, UBCF_01 adalah, dan UBCF_13 adalah. Sedangkan pengujian dengan molekuler melalui kloning gen 16S rRNA menunjukkan bahwa isolat UBCR_12 adalah *Serratia plymuthica*.

Kata kunci : *Colletotrichum gloeosporioides*, fungisida sintetik, mikroorganisme antagonis, dan biofungisida

ABSTRACT

Anthrax disease on some important crops is caused by the *Colletotrichum gloeosporioides*. Because of this disease, many farmers were suffer a financial loss. The conventional way to solve this problem that taken by the farmers is synthetic fungicides application which has a negative impact on consumers and the environment. Another alternative to replace it is needed. Antagonistic microorganisms can be used to replace it then and to develop a biofungicide which is more safety for the consumers and the environment. Four isolates of antagonist bacteria to against *C. gloeosporioides* have been found, namely: UBCR_12, UBCR36, UBCF_01, and UBCF_13. They were being developed as the main material for the manufacture of biofungicide. As an initial step of it, some tests were conducted to identify and to obtain some information that related to the character of all the isolates. Gram staining and KOH test showed that UBCR_12, UBCR_36, and UBCF_01 were gram negative bacteria and UBCF_13 is gram positive bacteria. The four isolates were

also showed rod morphological form. Oxidative-fermentative (OF) test showed that the four isolates are facultative anaerobic bacteria. The protease enzyme activity test showed that only 3 of 4 isolates can produced a protease enzyme with the highest clear zone index to the lowest, respectively are UBCR_12, UBCF_13, and UBCF_01. This information leads to choosing UBCR_12 for the molecular identification by the cloning 16S rRNA gene of it. The result showed that UBCR_12 is *Serratia plymuthica*.

Keywords: *Colletotrichum gloesporioides*, synthetic fungicides, antagonist microorganism, and biofungicide

PENDAHULUAN

Jamur *Colletotrichum gloesporioides* diketahui sebagai patogen penyebab penyakit antraknosa yang lebih umum ditemukan daripada spesies *Colletotrichum* yang lainnya (Gautam, 2014). Jamur *ini* telah menyerang beberapa tanaman penting diantaranya jeruk (Soltani *et al.*, 2014; Marques *et al.*, 2012, Lima *et al.*, 2011; Jiang *et al.*, 2012), jambu biji (Moraes *et al.*, 2013), karet (Ogbebor *et al.*, 2007; Cai *et al.*, 2013; Evueh and Ogbebor, 2008), bawang merah (Alberto, 2014; Nischwitz *et al.*, 2008), strowberi (Pardo *et al.*, 2012; Nam *et al.*, 2012), cabai (Ratanacherdchai *et al.*, 2010; Than *et al.*, 2008; Silva *et al.*, 2014), kakao (Rojas *et al.*, 2010), pepaya (Ademe *et al.*, 2013), mangga dan alpukat (Giblin *et al.*, 2010; Haggag *et al.*, 2011; Shi *et al.*, 2012; Awa *et al.*, 2012; Moualem and Prusky; 2000; Coates *et al.*, 1993; Sanders & Korsten, 2003), dan juga tanaman lainnya. Gejala yang ditimbulkan pada tanaman yang diserang dapat berada di daun, batang, dan buah (Hong and Hwang, 1998). Gejala-gejala yang menandakan penyakit antraknosa adalah sunken, water-soaked lesions that expand rapidly on the infected plant surface, where the fully expanded lesions are soft, sunken and range in colour from dark red to tan to black (Gautam, 2014). Dengan gejala yang ditimbulkan tersebut maka persentase kehilangan hasil yang diakibatkan oleh serangan jamur ini sangat signifikan pada tanaman-tanaman yang diserangnya.

Untuk meningkatkan kembali produktivitas tanaman-tanaman penting yang diserang penyakit antraknosa tersebut, cara yang banyak digunakan para petani adalah pengaplikasian fungisida sintetik. Namun besarnya dampak negatif yang diakibatkan oleh penggunaan fungisida sintetik terhadap kesehatan konsumen dan keamanan lingkungan, mengalihkan perhatian para peneliti untuk memanfaatkan pengendalian hayati sebagai pilihan aman utama saat ini dalam menggantikan peran fungisida sintetik. Salah satu upaya yang dapat digunakan dalam pengendalian hayati adalah pemanfaatan mikroorganisme-mikroorganisme antagonis terhadap patogen penyebab penyakit. Beberapa bakteri dalam jumlah terbatas telah ditemukan dan diketahui memiliki kemampuan antagonis terhadap jamur *C. gloesporioides* diantaranya adalah bakteri dari genus *Bacillus*, *Streptomyces*, *Pseudomonas*, dan *Burkholderia* (Zivkovic *et al.*, 2010; Ruangwong *et al.*, 2012; Kim *et al.*,

2010; Allu *et al.*, 2014; Rahman *et al.*, 2007; Ji *et al.*, 2013; Suryanto *et al.*, 2014; Passos *et al.*, 2014; Ashwini and Srividya, 2014; Narasimhan *et al.*, 2013).

Sejalan dengan hal di atas, telah ditemukan empat isolat bakteri antagonis jamur *C. gloeosporioides* dan saat ini telah menjadi stok di laboratorium Bioteknologi Fakultas Pertanian, Universitas Andalas, Padang. Dua isolat terbaik dari 101 isolat yang diisolasi dari daerah perakaran bawang merah (*Allium cepa* L.) yaitu isolat bakteri Unand Bacterial Collection Rhizosfir (UBCR) dengan nomor kode 12 dan 36 yang kemudian dilabel dengan UBCR_12 dan UBCR_36. Sedangkan dua isolate terbaik lainnya dari 120 isolat yang diisolasi dari daerah permukaan tanaman sawi (*Branssica juncea* L.) yaitu isolat bakteri Unand Bacterial Collection Filloplen (UBCF) dengan nomor kode 01 dan 13 yang kemudian dilabel dengan UBCF_01 dan UBCF_13.

Penelitian pendahuluan mengenai keempat isolat bakteri antagonis yang telah ditemukan tersebut menjadi sangat penting untuk dipelajari agar diperoleh sejumlah informasi karakter yang dimiliki keempatnya guna mengetahui jenis bakteri tersebut. Dengan mengetahui karakter dan identitas spesies bakteri-bakteri antagonis tersebut, diharapkan akan dapat memudahkan penelitian lanjutan berikutnya dalam mengembangkan biofungisida untuk mengatasi penyakit antraknosa oleh jamur *C. gloeosporioides*. Sehingga dengan demikian, penelitian ini bertujuan untuk mengetahui karakter dan jenis keempat isolat bakteri antagonis jamur *C. gloeosporioides* melalui pengujian morfologi, biokimia, dan molekuler.

BAHAN DAN METODE

Uji antagonis secara *in vitro*

Pengujian ini dilakukan dengan metode difusi agar menggunakan sel bakteri hidup dan senyawa ekstraseluler. Miselia jamur *C. gloeosporioides* diperbanyak pada media PDA di dalam petridish dan diinkubasi selama 7 hari. Miselia jamur yang telah tumbuh dipotong dengan ukuran 0.6 dan diletakkan ditengah media PDA dan diinkubasi selama 3 hari, kemudian satu koloni tunggal dari tiap isolate diambil dengan menggunakan tusuk gigi steril, lalu diletakkan pada empat arah yang mengapit jamur yaitu atas, bawah, kiri, dan kanan dengan jarak masing-masingnya yaitu 3 cm dari jamur. Biakan jamur dan bakteri diinkubasi pada suhu kamar selama 7 hari. Pengamatan pertumbuhan jamur *C. gloeosporioides* diukur pada hari ke-7 dengan cara mengukur jari-jari pertumbuhan miselia jamur dan dibandingkan dengan jari-jari jamur kontrol.

Selanjutnya, satu koloni tunggal bakteri ditumbuhkan pada media TZC sebanyak 20 mL, selama 48 jam dan dishaker dengan kecepatan 150 rpm. Kultur bakteri yang tumbuh kemudian ditransfer sebanyak 2 mL ke dalam tube eppendorf 2 mL. Selanjutnya, kultur bakteri tersebut disentrifugasi dengan kecepatan 14.000 rpm, selama 15 menit, pada suhu

4°C. Perlakuan ini diulang sebanyak 2 kali dan akan terbentuk dua lapisan yaitu pelet dan supernatan. Supernatan diambil dan digunakan untuk pengujian antagonis dengan menggunakan cork borer pada keempat sisi yang mengapit jamur dengan masing-masing jaraknya yaitu 3 cm dari jamur. Sebanyak 100 µL senyawa ekstraseluler ditempatkan di dalam cork borer dan diinkubasi selama 7 hari. Pengamatan pertumbuhan jamur diukur pada hari ke-7 dan dibandingkan dengan pertumbuhan jamur kontrol.

Karakterisasi isolat

Karakterisasi isolat dilakukan secara makroskopis, mikroskopis dan pengujian biokimia.

Pengujian makroskopis

Pengujian ini dilakukan dengan mengamati pertumbuhan keempat isolat bakteri, bentuk, elevasi, tepian, dan warna.

Pengujian mikroskopis

Pewarnaan gram

Pengujian ini dilakukan dengan metode manual pewarnaan gram bakteri yang dijelaskan oleh Wong *et al.* (2011).

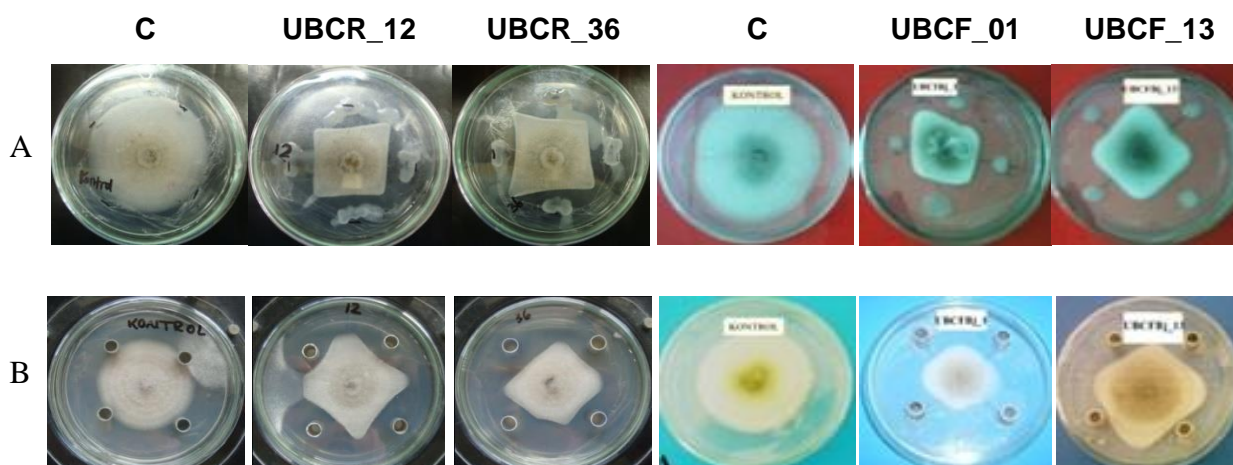
Pengujian biokimia

Beberapa pengujian biokimia yang dilakukan dalam penelitian ini yaitu uji motil, uji oksidatif-fermentatif (OF), uji aktivitas enzim protease, uji aktivitas enzim kitinase, dan uji aktivitas enzim selulase.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Antagonist test of the four bacteria against *C. gloeosporioides*

Kemampuan keempat isolat pada penelitian ini untuk melawan *C. gloeosporioides* menggunakan sel hidup dan senyawa ekstraselulernya dapat dilihat pada Gambar 1.

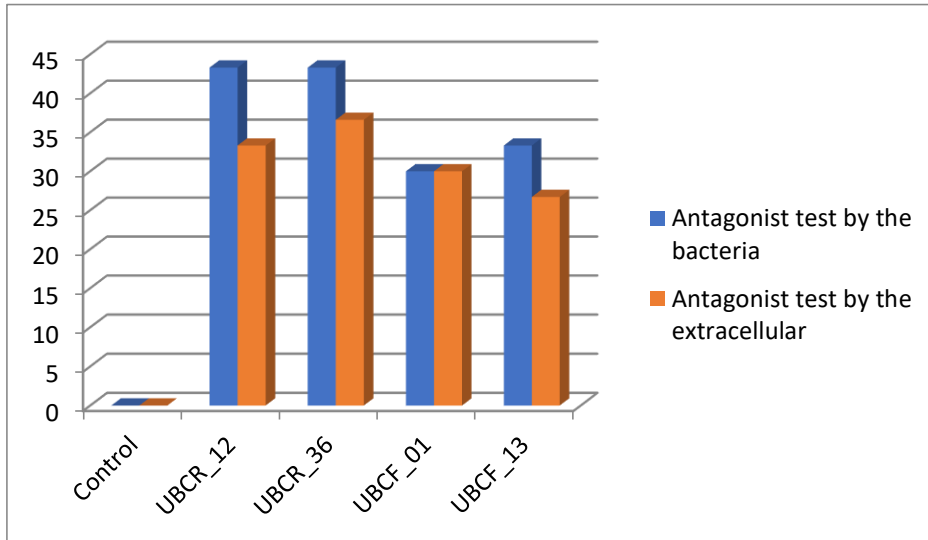


Gambar. 1. Visualisasi uji antagonis keempat isolat bakteri melawan *C. gloeosporioides* (A: pengujian koloni tunggal; B: pengujian senyawa ekstraseluler; C: kontrol).

Gambar 1. Menunjukkan bahwa keempat isolat memiliki potensi untuk dikembangkan sebagai agen hayati atau sebagai bahan biofungisida untuk menggantikan peran fungisida sintetik. Lebih lanjut, Tabel 1. dan Gambar 2. menunjukkan bahwa persentase daya hambat menggunakan sel hidup bakteri lebih tinggi daripada persentase daya hambat menggunakan senyawa ekstraseluler. Hal ini menjelaskan bahwa kemampuan antagonis bakteri lebih maksimal menggunakan sel hidup daripada hanya menggunakan senyawa ekstraselulernya. Hal ini dapat terjadi karena sebagai sel hidup, bakteri dapat terus tumbuh di dalam media hingga akhirnya mati dan pada sepanjang waktu tersebut bakteri memproduksi berbagai macam senyawa intra- dan ekstraseluler yang berperan dalam sebagai antijamur yang menghambat pertumbuhan *C. gloeosporioides*. Hal ini sangat berbeda dengan hasil dari perlakuan ekstraseluler yang hanya terdiri dari beberapa senyawa antijamur, dimana sebagian besar dari senyawa ekstraseluler tersebut terdiri dari protein antibiotik dan enzim.

Table 1. Persentase daya hambat berdasarkan uji antagonis

Isolat	Persentase daya hambat (%)	
	Uji antagonis dengan sel hidup bakteri	Uji antagonis dengan senyawa ekstraseluler
UBCR_12	43.3	33.3
UBCR_36	43.3	36.6
UBCF_01	30	30
UBCF_13	33.3	26.7
Control	0	0



Gambar 2. Grafik persentase daya hambat

Persentase daya hambat diantara keempat isolat cukup berbeda secara signifikan. Persentase daya hambat dari isolat rizobakteri (UBCR) terlihat secara konsisten sedikit lebih tinggi daripada isolat filobakteri atau filoplen (UBCF). Hal ini diduga bahwa isolat rizobakteri lebih efektif sebagai agen hayati terhadap *C. gloeosporioides* daripada bakteri filoplen. Namun demikian, baik isolat rizobakteri maupun filoplen telah diketahui dengan baik sebagai bakteri antagonis. Mikroorganisme berasosiasi yang melekat pada daun atau akar (*leaf-attaching and/or root-associating microorganisms*) telah ditemukan dengan peluang yang cukup sering ditemukan dalam memanfaatkan metabolit sekunder yang berasal dari tanaman. Banyak tanaman mengandung beberapa jenis metabolit sekunder daun seperti pigmen, alkaloid, terpenoid, flavanoid, beberapa polifenol lain dan senyawa terkait lainnya. (Hashidoko, 2005). Beberapa senyawa seperti asam amino, vitamin, gula, tanin dan lain-lain dikeluarkan oleh akar. Senyawa-senyawa tersebut memiliki efek selektif pada mikroorganisme yang berada di daerah perakaran (Manoharachary and Mukerji, 2006). Kedua jenis metabolit sekunder pada permukaan daun dan eksudat akar menarik bagi banyak bakteri untuk digunakan sebagai nutrisi. Pada usaha mereka untuk mendapatkan nutrisi dari tanaman, bakteri mensintesis beberapa senyawa untuk melawan kompetitornya melalui mekanisme kompetisi dan antibiosis (Saharan and Nehra, 2011; Sivasakthi *et al.*, 2014). Mekanisme antibiosis adalah suatu penghambatan pertumbuhan patogen melalui senyawa metabolik yang diproduksi oleh agen hayati (Waksman, 1941). Mekanisme ini yang menjadikan bakteri-bakteri tersebut sebagai bakteri antagonis terhadap patogen.

Berdasarkan hasil yang diperoleh pada penelitian ini, beberapa penelitian sebelumnya melaporkan bahwa beberapa rizobakteri menunjukkan persentase penghambatan yang bervariasi terhadap *C. gloeosporioides*. Ann (2012) melaporkan enam

spesies berbeda dari rizobakteri dengan persentase penghambatan dari suspensi (kultur bakteri) masing-masingnya terhadap *C. gloeosporioides* melalui uji *dual culture* adalah sekitar 40.4 to 52.4%. Lee *et al.* (2003) melaporkan salah satu isolat rizobakteri terbaik mereka terhadap *C. gloeosporioides* yaitu bakteri strain TRL2-3, dengan persentase daya hambat sebesar 58.6%. Jamal *et al.* (2015) melaporkan isolat bakteri tanah mereka yaitu *B. amyloliquefaciens* memiliki persentase daya hambat yang bervariasi terhadap *C. gloeosporioides* tergantung pada konsentrasi kultur bakteri. Konsentrasi terendah yaitu 10% menunjukkan persentase daya hambat terendah, sekitar 23%. Berdasarkan data perbandingan ini, dapat diduga sementara bahwa keempat isolat dari penelitian ini tergolong ke dalam rizobakteri dengan level pengaruh antagonis yang cukup tinggi terhadap *C. gloeosporioides*.

Karakterisasi Keempat Isolat

Data karakterisasi keempat isolat ditunjukkan pada Tabel 2. Berdasarkan data tersebut, seluruh isolat memiliki bentuk, warna, dan elevasi yang serupa (mirip). Isolat UBCR_12 memiliki ukuran koloni yang sama dengan UBCF_01 (4 mm), dan lebih besar dari keduanya yaitu UBCF_36 (8 mm), yang diikuti selanjutnya yaitu UBCF_13 (9 mm). Berdasarkan uji pewarnaan gram, tiga dari empat isolat (UBCR_12, UBCR_36, dan UBCF_01) diketahui sebagai bakteri gram negatif. Sedangkan, UBCF_13 diketahui sebagai bakteri gram positif. Sebagai bakteri non motil, keempat isolat tidak aktif bergerak, karena tidak memiliki flagella (Berg, 2000; Terashima *et al.*, 2008). Uji oksidatif-fermentatif menunjukkan bahwa seluruh isolat adalah bakteri anaerob fakultatif, yang artinya keempat bakteri dapat tumbuh dengan ataupun tanpa oksigen (Yamamoto and Droffner, 1985; Gray *et al.*, 1966). Uji zona bening selulosa menunjukkan seluruh isolat tidak memproduksi enzim selulase, sehingga keempat bakteri tidak tergolong ke dalam bakteri selulolitik. Walau demikian, tiga dari empat isolat memproduksi protease, dimana zona bening dari uji enzim ini dari yang paling luas hingga yang paling sempit secara berturut-turut yaitu UBCR_12, UBCF_13, and UBCF_01. Uji zona bening hanya cara untuk memprediksi bakteri dapat menghasilkan protease atau tidak. Oleh karena itu, diperlukan suatu pengujian lainnya untuk mengetahui aktivitas protease dari ketiga isolat. Di sisi lain, data karakterisasi terakhir menunjukkan bahwa hanya UBCR_12 yang memiliki kemampuan untuk menghasilkan enzim katalase sehingga sintesis H₂O₂ menjadi H₂O and O₂ (M'leod and Gordon, 1923). Katalase diasumsikan sebagai enzim penting untuk pertumbuhan bakteri aerobik karena H₂O₂ adalah racun bagi bakteri.

Tabel 2. Data karakterisasi

Pengamatan	UBCR_12	UBCR_36	UBCF_01	UBCF_13
Bentuk	bulat	bulat	bulat	bulat
Ukuran koloni (mm)	4	8	4	9
Warna	putih	putih	putih	putih
Elevasi	Konveks	Konveks	Konveks	Konveks
Tepian	Entire	Rhizoid	Entire	Entire
Pewarnaan gram	- (rod)	- (rod)	- (rod)	+ (rod)
Uji <i>motility</i>	non motil	non motil	non motil	non motil
Uji OF	anaerob fakultatif	anaerob fakultatif	anaerob fakultatif	anaerob fakultatif
Zona bening enzim selulase	-	-	-	-
Zona bening enzim protease	+++		+	++
Uji enzim katalase	+	-	-	-

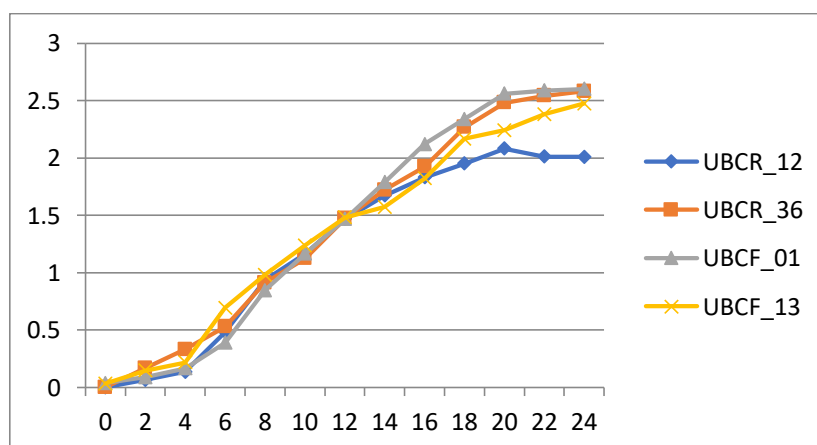
Kondisi Pertumbuhan dan aktivitas enzim keempat isolat

Untuk alasan keamanan, aplikasi sel hidup bakteri sebagai agen biokontrol tidak lebih baik daripada hanya menggunakan ekstraselulernya. Ekstraseluler sebagai zat antijamur dari bakteri diproduksi ketika pertumbuhan bakteri mencapai fase stasioner yang dikenal sebagai fase untuk memproduksi produk metabolit sekunder (Llorens *et al.*, 2010). Seperti yang dapat dilihat pada Gambar 3. menunjukkan bahwa keempat isolat memiliki kurva pertumbuhan yang hampir sama, dimana fase stasioner berlangsung pada 20 jam masa inkubasi. Hal ini memberikan informasi bahwa senyawa ekstraseluler dari keempat isolat pada penelitian ini mulai diproduksi pada 20 jam pertama masa inkubasi. Produk metabolit sekunder atau yang juga dikenal sebagai ekstraseluler secara umum diproduksi bakteri pada beberapa kondisi tertentu di samping induksi pada fase stasioner dalam keadaan normal. Kehadiran *C. gloeosporioides* pada media yang sama dengan bakteri tumbuh, dapat menginduksi sinyal bagi bakteri untuk memproduksi lebih ekstraseluler sebagai respon interaksi antara bakteri dan jamur *C. gloeosporioides*. Enzim-enzim pada senyawa ekstraseluler diketahui merupakan jenis enzim pendegradasi dinding sel, seperti protease, chitinase, selulase, dan glukonase (Sharma and Tiwari, 2005). Senyawa lainnya yang ikut termasuk ke dalam senyawa ekstraseluler yaitu siderophore, senyawa volatil, dan antibiotik seperti iturin, fengisin, surfaktin, dan lain-lain, tergantung pada spesies bakteri.

Dalam penelitian ini, aktivitas enzim protease dan kitinase membuktikan bahwa ekstraseluler dari keempat isolat mengandung kedua enzim tersebut (Gambar 3. dan Tabel 3.). Tetapi demikian, penelitian lanjutan dibutuhkan untuk mengetahui isolat mana yang merupakan isolat terbaik yang akan dipilih untuk menjadi biokontrol yang paling efektif. Hal ini dikarenakan senyawa ekstraseluler tidak hanya terdiri dari jenis enzim tetapi juga

beberapa senyawa jenis lainnya seperti yang telah dijelaskan sebelumnya. Sehingga, pengujian lainnya sangat diperlukan untuk membuktikan apakah keempat isolat bakteri juga menghasilkan jenis senyawa lainnya selain enzim pada senyawa ekstraselulernya. Walau demikian, enzim pendegradasi dinding sel dikenal secara umum sebagai enzim yang efektif menghambat pertumbuhan jamur patogen. Hal ini dikarenakan dinding sel jamur terdiri dari beberapa kitin dan selulosa yang sulit diuraikan (degradasi) tanpa bantuan enzim. Pada penelitian ini, enzim protease dari keempat isolat dapat mendegradasi protein pada dinding sel *C. gloeosporioides* menjadi asam amino yang dibutuhkan bakteri. Selain itu, enzim kitinase dari keempat isolat juga digunakan untuk mendegradasi kitin pada dinding sel *C. gloeosporioides* sebagai sumber nutrisi tambahan nitrogen. Huang *et al.* (2005) menyimpulkan bahwa protease ekstraseluler spesifik dapat menjadi penghidrolisis dinding sel jamur yang memiliki aktivitas antijamur terbaik.

Gambar 4. menunjukkan bahwa isolat bakteri dengan aktivitas protease terbaik pada penelitian ini, secara berturut-turut yaitu UBCR_12, UBCR_36, UBCF_01, and UBCF_13. Sedangkan aktivitas kitinase terbaik, secara berturut-turut yaitu UBCF_13, UBCF_01, UBCR_36, and UBCR_12. Informasi ini menjelaskan bahwa bakteri rizosfer memproduksi enzim protease lebih tinggi daripada bakteri filoplen. Sebaliknya, bakteri filoplen memproduksi enzim kitinase lebih tinggi daripada bakteri rizosfer. Hal ini menarik untuk dipelajari lanjut agar diperoleh informasi apa yang menjadi perbedaan spesifik keduanya berdasarkan habitat asal bakteri yang digunakan terkait aktivitas enzim protease dan kitinasenya. Walaupun demikian, diperoleh hasil yang cukup menarik pada UBCR_36 khususnya pada pengujian aktivitas protease. Hal ini menunjukkan aktivitas yang cukup tinggi yang berlawanan dengan hasil uji zona bening enzim protease sebelumnya. Perbedaan hasil ini memungkinkan terjadi karena pengujian zona bening hanya bersifat prediksi.

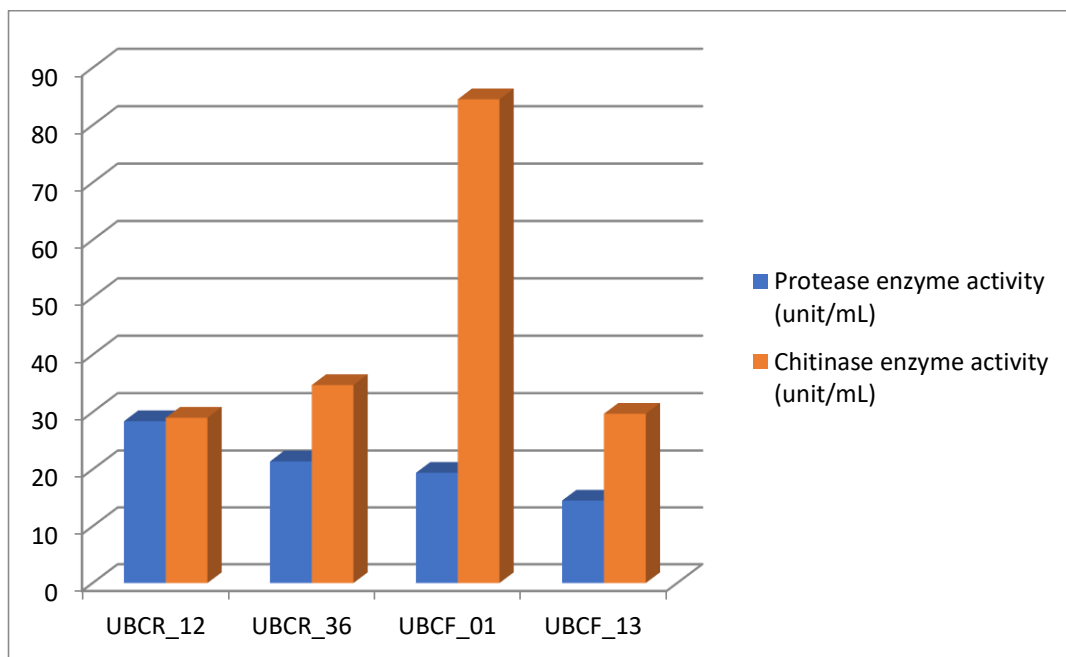


Gambar 3. Kurva pertumbuhan keempat isolat

Tabel 3. Aktivitas enzim keempat isolat

Isolat	Aktivitas enzim (unit/mL)	
	Protease ^{a)}	Kitinase ^{b)}
UBCR_12	28.4	29
UBCR_36	21.4	34.7
UBCF_01	19.4	84.5
UBCF_13	14.5	29.7

- Satu unit protease didefinisikan sebagai kemampuan enzim menghidrolisis casein and memproduksi 10 μmol tyrosine / menit pada pH 8 (37 °C).
- Satu unit kitinase didefinisikan sebagai sejumlah unit yang dibutuhkan untuk memproduksi 10 mg N-acetylglucosamine dari koloidal kitin selama 1 jam pada pH 7 (30 °C).

**Gambar 4. Bagan aktivitas enzim empat isolat**

Aktivitas protease dan kitinase dari keempat isolat dapat menjelaskan bahwa penghambatan pertumbuhan of *C. gloeosporioides* oleh supernatan ekstraselulernya dapat terjadi melalui mekanisme antibiosis. Mekanisme antibiosis adalah suatu penghambatan pertumbuhan patogen melalui senyawa metabolik yang diproduksi agen biokontrol (Waksman, 1941). Enzim hidrolitik seperti protease and kitinase adalah dua jenis senyawa metabolik oleh bakteri antagonis. Kedua jenis enzim ini, protease (Huang *et al.*, 2005) dan kitinase (Parani *et al.*, 2011) berfungsi baik sebagai enzim yang efektif melawan patogen

tanaman. Secara keseluruhan, selain kedua enzim tersebut, masih ada kemungkinan terdapat jenis enzim lainnya, antibiotik, dan juga senyawa antijamur lainnya yang termasuk ke dalam supernatan ekstraseluler bakteri. Penelitian lebih lanjut dibutuhkan untuk mengetahui hal tersebut. Informasi tersebut berguna untuk memahami secara komprehensif mekanisme antibiosis yang terjadi antara keempat isolat melawan *C. gloeosporioides*.

KESIMPULAN

Berdasarkan seluruh hasil yang telah diperoleh maka dapat disimpulkan bahwa isolat UBCR_12, UBCR_36, UBCF_01 adalah bakteri gram negatif dan UBCF_13 merupakan bakteri gram positif. Jenis metabolisme yang dimiliki keempat isolate bakteri yang ditunjukkan dari hasil pengujian oksidatif-fermentatif membuktikan bahwa keempat isolat bakteri tersebut merupakan bakteri anaerob fakultatif yang mampu mengubah glukosa menjadi asam baik dengan adanya oksigen maupun tanpa oksigen. Dari keempat isolat bakteri tersebut, hanya 3 isolat yang mampu memproduksi enzim protease dimana isolate UBCR_12 merupakan isolat yang menghasilkan enzim protease lebih tinggi daripada 2 isolat lainnya yaitu UBCF_13 dan UBCF_01.

UCAPAN TERIMA KASIH

Kami berterima kasih kepada Kemenristek DIKTI yang telah mendanai penuh penelitian ini melalui program PMDSU (Program Magister Menuju Doktor Sarjana Unggul).

DAFTAR PUSTAKA

- Ademe A, Ayalew A, and Woldetsadik K. 2013. Evaluation of antifungal activity of plant extracts against papaya anthracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*). *Plant Pathology and Microbiology*, 4(10):1-14.
- Alberto RT. 2014. Pathological response and biochemical changes in *Allium cepa* L. (bulb onions) infected with anthracnose-twister disease. *Plant Pathology & Quarantine* 4(1):23-31.
- Allu A, Kumar NP, and Audipudi AV. 2014. Isolation, biochemical and PGP characterization of endophytic *Pseudomonas aeruginosa* isolated from chilli red fruit antagonistic against chilli anthracnose disease. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 3(2):318-329.
- Ann YC. 2012. Rhizobacteria of pepper (*Piper nigrum*) and their antifungal activities. *African Journal of Microbiology Research* 6(19):4185-4193.
- Ashwini N and Srividya S. 2014. Potentiality of *Bacillus subtilis* as biocontrol agent for management of anthracnose disease of chilli caused by *Colletotrichum gloeosporioides* OGC1. *3 Biotech*, 4:127-136.
- Awa OC, Samuel O, Oworu OO, and Sosanya O. 2012. First Report of Fruit Anthracnose in Mango caused by *Colletotrichum gloeosporioides* in Southwestern Nigeria. *International Journal of Scientific & Technology Research*, Vol. 1, Issue 4, 30-34.
- Berg, HC. 2000. Motile behavior of bacteria. *Physics today* 53(1):24-30.
- Cai Z, Li G, Lin C, Shi T, Zhai L, Chen Y, and Huang G. 2013. Identifying pathogenicity genes in the rubber tree anthracnose fungus *Colletotrichum gloeosporioides* through

- random insertional mutagenesis. *Microbiological Research*, Vol. 168, Issue 6, 340-350.
- Chandra TJ and Mani PS. 2011. A study of 2 rapid tests to differentiate gram positive and gram negative aerobic bacteria. *J. Med. Allied Sci.*, 1(2):84-85.
- Coates LM, Muirhead IF, Irwin JAG, and Gowanlock DH. 1993. Initial Infection Processes by *Colletotrichum gloeosporioides* on avocado fruit. *Mycological Research*, Vol. 97, Issue 11, 1363-1370.
- Evueh GA and Ogbebor NO. 2008. Use of phylloplane fungi as biocontrol agent against *Colletotrichum* leaf disease of rubber (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.). *African Journal of Biotechnology*, Vol. 7 (15), 2569-2572.
- Gautam AK. 2014. The genera *Colletotrichum*: an incitant of numerous new plant disease in India. *Journal on New Biological Reports* 3(1):09-21.
- Giblin FR, Coates LM, and Irwin JAG. 2010. Pathogenic diversity of avocado and mango isolates of *Colletotrichum gloeosporioides* causing anthracnose and pepper spot in Australia. *Australasian Plant Pathology*, 39, 50-62.
- Gray CT, Wimpenny JWT, Hughes DE, and Mossman MR. 1966. Regulation of metabolism in facultative bacteria: 1. Structural and functional changes in *Escherichia coli* associated with shifts between the aerobic and anaerobic states. *Biochemica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 117(1):22-32.
- Haggag WM, Mohamed EM, and El Azzazy AM. 2011. Optimization and production of antifungal hydrolysis enzymes by *Streptomyces aureofaciens* against *Colletotrichum gloeosporioides* of mango. *Agriculture Sciences*, Vol. 2, No.2, 146-157.
- Hashidoko Y. 2005. Ecochemical studies of interrelationships between epiphytic bacteria and host plants via secondary metabolites. *Biosci Biotechnol Biochem*, 69(8):1427-1441.
- Hong JK and Hwang BK. 1998. Influence of inoculums density, wetness duration, plant age, inoculation, method, and cultivar resistance on infection on infection of pepper plants by *Colletotrichum coccodes*. *Plant Disease*, Vol. 82, No. 10, 1079-1083.
- Huang XW, Tian B, Niu Q, Yang QN, Zhang L, and Zhang K. 2005. An extracellular protease from *Brevibacillus laterosporus* G4 without parasporal crystals can serve as a pathogenic factor in infection of nematodes. *Res. Microbiol*, 156:719-727.
- Jamal Q, Lee YS, Jeon HD, Park YS. 2015. Isolation and biocontrol potential of *Bacillus amyloliquefaciens* YI against fungal plant pathogens. *Korean J Soil Sci Fert* 48(5):485-491.
- Ji SH, Paul NC, Deng JX, Kim YS, Yun BS, and Yu SH. 2013. Biocontrol activity of *Bacillus amyloliquefaciens* CNU114001 against fungal plant disease. *Mycobiology*, 41(4):234-242.
- Jiang YL, Tan P, Zhou XY, Hou XL, and Wang Y. 2012. *Colletotrichum gloeosporioides*, the casual agent of citrus anthracnose in Guizhou Province. *Plant Pathology & Quarantine*, Vol. 2, Issue 1, 25-29.
- Kim PI, Ryu J, Kim YH, and Tae Chi Y. 2010. Production of biosurfactant lipopeptides iturin A, fengycin, and surfactin a from *Bacillus subtilis* CMB32 for control of *Colletotrichum gloeosporioides*. *J. Microbiol. Biotechnol*, 20(1), 138-145.
- Lee C-S, Kim KKD, Hyun J-W, Jeun Y-C. 2003. Isolation of rhizobacteria in Jeju island showing anti-fungal effect against fungal plan pathogens. *Mycobiology* 31(4):251-254.
- Lima WG, Sposito MB, Amorim L, Goncalves FP, and Melo de Filho PA. 2011. *Colletotrichum gloeosporioides*, a new causal agent of citrus post-bloom fruit drop. *Europe Journal of Plant Pathology*, Vol. 131, Issue 1, 157-165.
- Llorens JMN, Tormo A, and Garcia EM. 2010. Stationary phase in gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol Rev*, 34:476-495. s
- Manoharachary C and Mukerji KG. 2006. Rhizosphere biology-an overview. *Soil Biology*, Vol. 7:1-6.

- Marques JPR, Amorim L, Sposito MB, and Appezzato-da-Gloria B. 2012. Histopathology of postbloom fruit drop caused by *Colletotrichum acutatum* in citrus flowers. European Journal of Plant Pathology.
- Moraes SRG, Tanaka FAO, and Junior NSM. 2013. Histopathology of *Colletotrichum gloeosporioides* on guava fruits (*Psidium guajava* L.). Rev. Bras. Frutic., Jaboticabal-SP. Vol. 35, no. 2, 657-664.
- M'leod JW and Gordon J. 1923. Catalase production and sensitiveness to hydrogen peroxide amongst bacteria: with a scheme of classification based on these properties. The journal of Pathology and Bacteriology, 26(3):326-331.
- Moualem DB and Prusky D. 2000. Early events during quiescent infection development by *Colletotrichum gloeosporioides* in unripe avocado. Biochemistry and Cell Biology, Vol. 90, No. 5, 553-559.
- Nam MH, Park MS, Lee HD, and Yu SH. 2013. Taxonomic Re-evaluation of *Colletotrichum gloeosporioides* isolated from strawberry in Korea. The Plant Pathology Journal, 29 (3): 317-322.
- Narasimhan A, Suresh A, Bist D, and Shivakumar S. 2013. Enhancement of mycolytic activity of an antagonistic *Bacillus subtilis* through ethyl methane sulfonate (EMS) mutagenesis. Turkish Journal of Biology, 37: 323-328.
- Nischwitz C, Langston D, and Sanders HF. 2008. First Report of *Colletotrichum gloeosporioides* causing 'Twister Disease' of onion (*Allium cepa*) in Georgia. The American Phytopathological Society. Plant Disease, Vol. 92, no. 6, 974.
- Ogbebor NO, Adekunle AT, and Enobakhare DA. 2007. Inhibition of *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz) Sac. causal organism of rubber (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.) leaf spot using plant extracts. African Journal of Biotechnology, Vol. 6 (3), 213-218.
- Parani K, Shetty G, and Saha B. 2011. Isolation of *Serratia marcescens* SRI as a source of chitinase having potentially of using as a biocontrol agent. Indian journal of microbiology 51(3):247-250.
- Pardo EM, Grellet CF, Slazar SM, Castagnaro AP, Diaz Ricci JC, and Arias ME. 2012. Histopathology of the resistance to *Colletotrichum gloeosporioides* of wild strawberries and species related to commercial strawberry. Australian Journal of Crop Science, Vol. 6, Issue 7, 1147-1153.
- Passos JFM, Costa PB, Costa MD, Zaffari GR, Nava G, Boneti JI, Oliveira AMR, and Passaglia MP. 2014. Cultivable bacteria isolated from apple *Colletotrichum gloeosporioides* trees cultivated under different crop systems: Diversity and antagonistic activity against. Genetics and Molecular Biology, 37, 3, 560-572.
- Rahman MA, Kadir J, Mahmud TMM, Rahman AR, and Begum MM. 2007. Screening of antagonistic bacteria for biocontrol activities on *Colletotrichum gloeosporioides* in papaya. Asian Journal of Plant Sciences 6(1): 12-20.
- Ratanacherdchai K, Kai Wang H, Cheng Lin F, and Soyong K. 2010. ISSR for comparison of cross-inoculation potential of *Colletotrichum capsici* causing chilli anthracnose. African Journal of Microbiology Research, Vol. 4(1), 076-083.
- Rojas EI, Rehner SA, and Samuels GJ, Van Bael SA, Herre EA, Cannon P, Chen R, Pang J, Wang R, Zhang Y, Qiong Peng Y, and Sha T. 2010. *Colletotrichum gloeosporioides* s.l. associated with *Theobroma cacao* and other plants in Panama: multilocus phylogenies distinguish host-associated pathogens from asymptomatic endophytes. Mycologia, 102(6), 1318-1338.
- Ruangwong OU, Chang CI, Lamine SA, and Liang WJ. 2012. Identification of antifungal compound produced by *Bacillus subtilis* LB5 with ability to control anthracnose disease caused by *Colletotrichum gloeosporioides*. African Journal of Microbiology Research, Vol. 6 (16), 3732-3738.
- Saharan B and Nehra V. 2011. Plant growth promoting rhizobacteria: a critical review. Life Sci Med Res 21:1-30.

- Sanders GM and Korsten L. 2003. Comparison of cross inoculation potential of South African avocado and mango isolates of *Colletotrichum gloeosporioides*. Microbiological Research, Vol. 158, Issue 2, 143-150.
- Sharma A and Tiwari R . 2005. Extracellular enzyme production by environmental strains of *Serratia* spp. isolated from river Narmada. Indian Journal of Biochemistry and biophysics, 42(3):178.
- Shi X, Li B, Qin G, and Tian S. 2012. Mechanism of antifungal action of borate against *Colletotrichum gloeosporioides* related to mitochondrial degradation in spores. Postharvest Biology and Technology, 67, 138-143.
- Silva SAM, Rodrigues R, Goncalves LSA, Sudre CP, Bento CS, Carmo MGF, and Medeiros AM. 2014. Resistance in *Capsicum* spp. to anthracnose affected by different stages of fruit development during pre- and post-harvest. Tropical Plant Pathology, Vol. 39 (4): 335-341.
- Sivasakthi S, Usharani G, and Saranraj P. 2014. Biocontrol potentiality of plant growth promoting bacteria (PGPR)-*Pseudomonas fluorescens* and *Bacillus subtilis*: a review. Afr J Agric Res 9:1265-1277.
- Soltani J, Pour Haghighi MY, and Nazeri S. 2014. Light, temperature, and aging dependent vegetative growth and sporulation of *Colletotrichum gloeosporioides* on different culture media. Journal of Medicinal Plants Research, Vol. 8, Issue 4, 208-216.
- Suryanto D, Wahyuni S, Siregar EBM, and Munir E. 2014. Utilization of chitinolytic bacterial isolates to control anthracnose of cocoa leaf caused by *Colletotrichum gloeosporioides*. African Journal of Biotechnology, Vol. 13(15), 1631-1637.
- Terashima H, Kojima S, and Homma M. 2008. Flagellar motility in bacteria: structure and function of flagellar motor. International review of cell and molecular biology, 270:39-85.
- Than PP, Jeewon R, Hyde KD, Pongsupasamit S, Mongkolporn O, and Taylor PWJ. 2008. Characterization and pathogenicity of *Colletotrichum* species associated with anthracnose on chilli (*Capsicum* spp.) in Thailand. Plant Pathology, 57, 562-572.
- Waksman SA. 1941. Antagonistic relations of microorganisms. Bacteriological review 5(3):231.
- Wong RCW, Heung SSY, Ho YC, Yip KT, and Que TL. 2011. Evaluation of PREVI color gram automated staining system on positive blood culture samples. Labmedicine, Vol. 42, no. 7, 414-418.
- Yamamoto N and Droffner ML. 1985. Mechanisms determining aerobic or anaerobic growth in the facultative anaerobe *Salmonella typhimurium*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 82(7):2077-2081.
- Zirkovic S, Stojanovic S, Ivanovic Z, Gavrilovic V, Popovic T, and Balaz J. 2010. Screening of antagonistic activity of microorganism against *Colletotrichum acutatum* and *Colletotrichum gloeosporioides*. Arch. Biol. Sci. Belgrade, 62 (3), 611-623.