



Pengaruh *Bacillus* sp. terhadap Malformasi Hifa Patogen *Phytophthora palmivora*

The Effect of *Bacillus* sp. against Hifa Malformation of *Phytophthora palmivora* Pathogen

Devi Tria Anjarsari^{1*}, Endang Triwahyu Prasetyawati², Yenny Wuryandari³

1 UPN "Veteran" Jawa Timur, email: 17025010101@student.upnjatim.ac.id

2 UPN "Veteran" Jawa Timur, email: endang_tp@upnjatim.ac.id

3 UPN "Veteran" Jawa Timur, yennywuryandari@upnjatim.ac.id

* Penulis Korespondensi: E-mail: 17025010101@student.upnjatim.ac.id

ABSTRAK

Busuk Buah kakao adalah salah satu penyakit penting yang disebabkan oleh jamur patogen *Phytophthora palmivora*. Pengendalian penyakit busuk buah kakao dapat menggunakan agensia hayati *Bacillus* sp. yang salah satu kandungannya adalah enzim ekstraseluler. Berdasarkan kemampuan yang dimiliki *Bacillus* sp. maka penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh dari *Bacillus* sp. dalam mengakibatkan malformasi hifa patogen *Phytophthora palmivora*. Bakteri *Bacillus* sp. yang digunakan dalam penelitian ini merupakan bakteri *Bacillus* sp. koleksi Dra. Endang Triwahyu P., MSi yaitu isolat Ba-6, Ba-9, Ba-12, Ba-15, dan isolat Ba-17. Metode pelaksanaan dalam penelitian ini yaitu pengambilan sampel buah kakao, isolasi dan pengamatan mikroskopis *Phytophthora palmivora*, peremajaan bakteri *Bacillus* sp., uji antagonisme, uji aktivitas enzim ekstraseluler *Bacillus* sp, dan pengamatan hifa patogen *Phytophthora palmivora*. Enzim ekstraseluler yang diamati yaitu enzim amilase, protease dan selulase. Perlakuan isolat Ba-6 dan Ba-9 menghasilkan enzim amilase, protease dan selulase yang mengakibatkan hifa *P. palmivora* membengkok dan membengkak, isolat Ba-12 menghasilkan enzim protease yang mengakibatkan hifa *P. palmivora* memendek, membengak, dan terpotong, isolat Ba-15 menghasilkan enzim amilase, protease dan selulase yang mengakibatkan hifa *P. palmivora* memendek dan terpotong, isolat Ba-17 menghasilkan enzim amilase dan protease yang mengakibatkan hifa *P. palmivora* membengkak namun jumlah hifa yang membengkak sedikit.

Kata kunci: *Bacillus* sp, enzim ekstraseluler, kakao, *Phytophthora palmivora*

ABSTRACT

Cocoa pod rot is one of the important diseases caused by the pathogenic fungus *Phytophthora palmivora*. The control of cocoa pod rot disease can use the biological agent *Bacillus* sp. one of which contains extracellular enzymes. Based on the ability of *Bacillus* sp. this study aims to determine the effect of extracellular enzymes from *Bacillus* sp. in causing hyphae malformations of the pathogenic *Phytophthora palmivora*. The bacteria used in this study were *Bacillus* sp. collection of Dr. Endang Triwahyu P., MSi were Ba-6, Ba-9, Ba-12, Ba-15, and Ba-17 isolates. The implementation methods in this study were sampling of cocoa pods, isolation and microscopic observation of *Phytophthora palmivora*, rejuvenation of *Bacillus* sp., antagonism test, test of extracellular enzyme activity of *Bacillus* sp, and observation of pathogenic hyphae of *Phytophthora palmivora*. The extracellular enzymes observed were amylase, protease and cellulase enzymes. The treatment of Ba-6 and Ba-9 isolates produced amylase, protease and seulase enzymes which caused *P. palmivora* hyphae to bend and swell, Ba-12 isolates produced protease enzymes which caused *P. palmivora* hyphae to shorten, swell, and cut, Ba-15 isolates produced amylase, protease and seulase enzymes which caused *P. palmivora* hyphae to shorten and truncate, Ba-17 isolate produced amylase and protease enzymes which caused *P. palmivora* hyphae to swell but the number of hyphae to swell was small.

Keywords: *Bacillus* sp, cacao, extracellular enzyme, *Phytophthora palmivora*

PENDAHULUAN

Phytophthora palmivora adalah jamur patogen yang menyebabkan penyakit busuk buah pada tanaman kakao. Penyakit ini merupakan penyakit yang cukup penting pada tanaman kakao di Indonesia, di mana kerugian akibat penyakit ini yaitu berkisar antara 15-53% di Indonesia (Rokhmah, 2020). Pengendalian penyakit busuk buah kakao dapat menggunakan agensia hayati *Bacillus* sp. yang lebih ramah lingkungan.

Bakteri *Bacillus* sp. yang digunakan dalam penelitian ini merupakan bakteri *Bacillus* sp. koleksi Dra. Endang Triwahyu P., MSi yaitu isolat isolat Ba-6, Ba-9, Ba-12, Ba-15, dan isolat Ba-17 yang secara *in vitro* terbukti mampu menekan patogen *Ralstonia solanacearum* dengan terbentuknya zona hambat. (Prasetyawati dan Wiyatiningsih, 2020). *Bacillus* sp. memiliki kemampuan dalam mengendalikan patogen tanaman karena mekanisme antagonisme yang dimilikinya. Salah satu mekanisme antagonisme yang dimiliki bakteri *Bacillus* sp. adalah mekanisme antibiosis (Junaid *et al.*, 2013). Menurut (Haggag & Mohamed, 2007) antibiosis merupakan mekanisme antagonisme dengan menghasilkan senyawa metabolit sekunder atau senyawa yang mirip dengan itu yaitu enzim yang dapat mengakibatkan kerusakan pada jamur patogen. Berdasarkan kemampuan yang dimiliki *Bacillus* sp. maka penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh dari *Bacillus* sp. dalam mengakibatkan malformasi hifa patogen *Phytophthora palmivora*.

METODE PENELITIAN

Waktu dan Tempat

Penelitian dilaksanakan Laboratorium Kesehatan Tanaman I Fakultas Pertanian Universitas Pembangunan Nasional “Veteran” Jawa Timur pada bulan November 2021.

Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah cawan petri, tabung reaksi, lampu bunsen, *Laminar Air Flow* (LAF), gelas beaker, kapas, kertas, autoklaf, timbangan analitik, pinset, scalpel, *hot plate*, *magnetic stirer*, gelas ukur, jarum ose. Sedangkan bahan yang digunakan adalah media Potato Dextrose Agar (PDA), media Vegetable 8 (V8), media Nutrient Agar (NA), media NA+1% pati, media NA+1% SKIM, media NA+1% Carboxy Methyl Cellulose (CMC), larutan iodine, larutan indikator congo red, isolat murni agensia pengendali hayati *Bacillus* sp. diperoleh dari koleksi Dra. Endang Triwahyu P., jamur patogen *Phytophthora palmivora* hasil isolasi dari buah kakao yang menunjukkan gejala penyakit busuk buah kakao, alkohol 70%, spiritus, aquadest.

Pelaksanaan

Pengambilan Sampel Buah Kakao yang Menunjukkan Gejala Busuk Buah Kakao

Sampel diambil dari buah kakao yang terinfeksi jamur *Phytophthora palmivora* di kebun daerah Wonosalam Jombang. Buah yang dipilih adalah buah yang diduga menunjukkan gejala awal terserang jamur *Phytophthora palmivora* yaitu buah yang busuknya basah berwarna coklat. Setelah diambil dari pohon, buah busuk dibungkus dengan kertas dan plastik agar menekan pertumbuhan saprofit.

Isolasi *Phytophthora palmivora*

Isolasi dilakukan pada buah kakao yang mengalami gejala busuk buah akibat jamur *P. palmivora*. Jaringan buah diambil pada setengah bagian yang sehat dan setengah bagian yang sakit, di mana pada ujung gejala merupakan tempat patogen masih aktif tumbuh, kemudian jaringan buah yang sudah dipotong disterilkan dengan alkohol 70% dan dibilas menggunakan aquadest steril kemudian dikeringkan di atas tisu setelah itu ditanam pada cawan petri yang berisi media V8 selanjutnya dapat diinkubasi (Motulo *et al.*, 2007)

Pengamatan mikroskopis *Phytophthora palmivora*

Pengamatan jamur menggunakan mikroskop perlu dilakukan untuk mengetahui apakah jamur yang didapatkan merupakan jamur *Phytophthora palmivora*. Menurut Semangun (2000) *P. palmivora* memiliki hifa hialin dan tidak adanya sekat. Sporangia memiliki bentuk seperti uah pir dan adanya papilla. 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 di tabung reaksi.

Uji Antagonisme secara *In Vitro*

Uji antagonisme *Bacillus* sp. terhadap *P. palmivora* mengacu pada metode Flori *et al.*, (2020) yang dilakukan pada cawan petri yang berisi media PDA. Dua kertas saring dengan diameter 5mm direndam dalam suspensi *Bacillus* sp. selama 30 menit. Masing-masing kertas saring 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.

Uji Aktivitas Enzim Ekstraseluler Bakteri *Bacillus* sp.

Enzim yang diuji dalam penelitian ini yaitu enzim amilase, protease, dan selulase di mana metode pengujian ini mengacu pada penelitian Fasiku *et al.*, (2020) yaitu untuk mengetahui kandungan enzim amilase, bakteri usia 24 jam diisolasikan pada media Nutrient Agar (NA) yang mengandung 1% pati kemudian diinkubasi selama 24 jam. Zona bening yang terlihat setelah penambahan larutan iodine menandakan bahwa bakteri mampu memproduksi enzim amilase. Uji kandungan enzim protease dilakukan dengan mengisolasikan bakteri usia 24 jam pada media Nutrient Agar (NA) yang mengandung 1% SKIM milk kemudian diinkubasi selama 24 jam dan zona bening yang terlihat menandakan bahwa bakteri mampu memproduksi enzim protease. Sedangkan untuk uji kandungan enzim selulase dilakukan dengan cara mengisolasikan bakteri usia 24 jam pada media Nutrient Agar (NA) yang mengandung 1% CMC (Carboxy Methyl Cellulose) kemudian diinkubasi selama 24 jam. Zona bening yang terlihat setelah penambahan larutan indikator congo red menandakan bahwa bakteri mampu memproduksi enzim selulase (Fasiku *et al.*, 2020).

Pengamatan Hifa Patogen *Phytophthora palmivora*

Pengamatan hifa patogen *P. palmivora* dilakukan secara mikroskopis dengan bantuan mikroskop yang dilakukan dengan cara mengamati hifa jamur pada daerah kontak antara jamur *P. palmivora* dan *Bacillus* sp. pada cawan petri uji antagonisme.

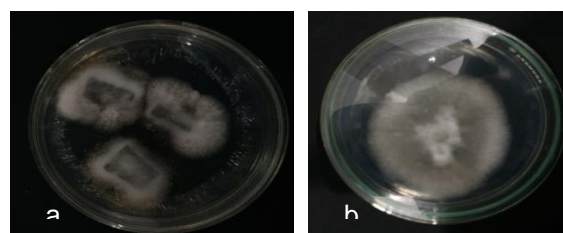
HASIL DAN PEMBAHASAN

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.



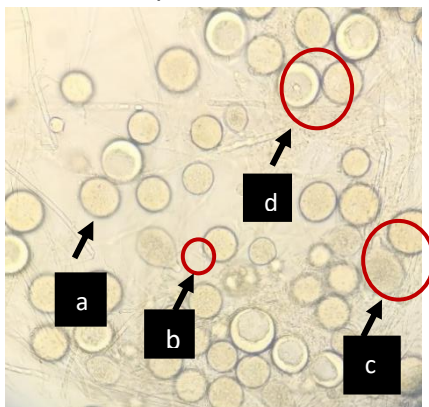
Gambar 1. Buah kakao yang diduga terinfeksi jamur *Phytophthora palmivora*



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

Pengamatan mikroskopis *Phytophthora palmivora*

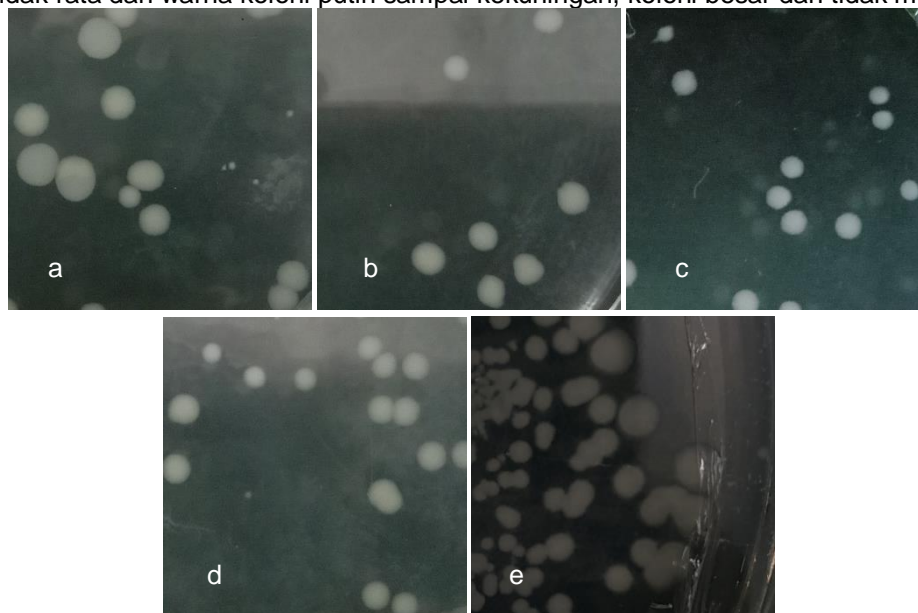
Hasil pengamatan mikroskopis *Phytophthora palmivora* terlihat adanya hifa yang tidak bersekat, klamidospora, sporangium berbentuk ovoid seperti buah pir dan papilla (Gambar 3). Hasil pengamatan ini sesuai dengan pengamatan Motulo *et al.*, (2007) yang mengungkapkan bahwa jamur *P. palmivora* memiliki hifa tidak bersekat, bentuk sporangium elipsoid sampai ovoid dan adanya tonjolan yang dinamakan papilla dan klamidospora berbentuk bulat.



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) mengemukakan bahwa permukaan koloni bakteri *Bacillus* sp. kasar dan tidak berlendir, bahkan ada yang memiliki permukaan cenderung kering berbubuk, tepi koloni memiliki bentuk bermacam-macam namun umumnya tidak rata dan warna koloni putih sampai kekuningan, koloni besar dan tidak mengkilat.

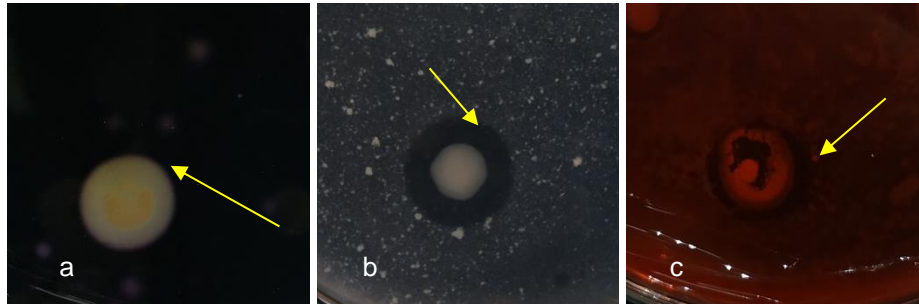


Gambar 4. Bakteri *Bacillus* sp. (a)Isolat Ba-6 (b)isolat Ba-9 (c)Isolat Ba-12 (d)Isolat Ba-15 (e)isolat Ba-17.

Uji Aktivitas Enzim Ekstraseluler Bakteri *Bacillus* sp.

Hasil uji enzim ekstraseluler pada bakteri *Bacillus* sp. untuk mengetahui adanya enzim amilase, protease, dan selulase. Hasil uji menunjukkan positif apabila terdapat zona bening disekitar koloni bakteri *Bacillus* sp. pada media media NA+1% pati untuk uji enzim amilase, media NA+1% SKIM untuk uji enzim protease, media NA+1% Carboxy Methyl Cellulose (CMC) untuk uji enzim selulase (Gambar 5). Perbedaan ukuran dari zona bening menunjukkan adanya perbedaan kemampuan menghasilkan enzim, dari ukuran diameter zona bening dibagi dengan diameter isolat

akan didapatkan nilai indeks rasaio (Tabel 1). Reaksi enzim ekstraseluler menunjukkan reaksi kuat jika rasio enzim ekstraseluler lebih dari sama dengan dua; jika rasio enzim ekstraseluler memiliki nilai antara satu dan dua maka reaksi sedang; dan apabila rasio enzim ekstraseluler kurang dari sama dengan satu maka reaksi lemah (Choi *et al.*, 2005). Hasil uji enzim ekstraseluler menunjukkan bahwa terdapat empat isolat yang positif menghasilkan enzim amilase yaitu isolat Ba-6, Ba-9, Ba-15 dan Ba-17. Lima isolat yang positif menghasilkan enzim protease yaitu Ba-6, Ba-9, Ba-12, Ba-15 dan Ba-17. Tiga isolat yang positif menghasilkan enzim selulase yaitu isolat Ba-6, Ba-9, dan Ba-15. Di mana kandungan enzim yang berada pada isolat bakteri akan mempengaruhi pertumbuhan dari jamur patogen *P. palmivora*.



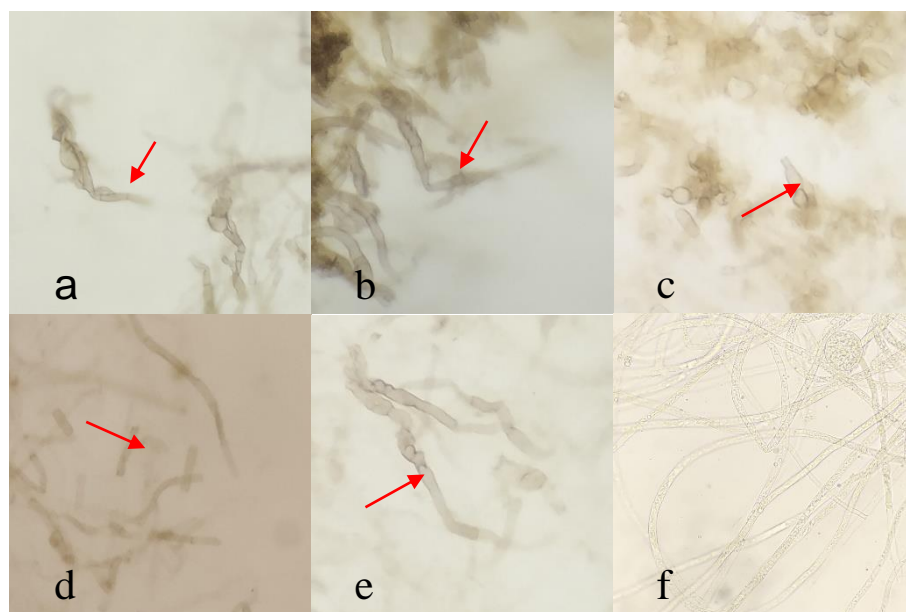
Gambar 5. Hifa uji aktivitas enzim ekstraseluler yang menunjukkan zona bening (a) amilase (b) protease (c) selulase

Tabel 1. Nilai indeks rasio enzim ekstraseluler bakteri *Bacillus* sp.

Isolat	Indeks Rasio		
	Amilase	Protease	Selulase
Ba-6	1,27	1,86	1,30
Ba-9	1,25	2,41	1,60
Ba-12	-	1,80	-
Ba-15	2,12	1,36	1,10
Ba-17	1,20	1,92	-

Pengamatan Hifa Patogen *Phytophthora palmivora*

Pengamatan secara mikroskopis menunjukkan adanya pertumbuhan abnormal atau malformasi pada hifa jamur *P. palmivora*. Perubahan yang terjadi pada hifa *P. palmivora* diakibatkan oleh adanya aktifitas enzim yang terkandung oleh bakteri *Bacillus* sp. di mana menurut pendapat Singh & Chhatpar (2011) menyatakan bahwa enzim protease mampu memecah senyawa protein yang berada pada dinding sel jamur patogen dan Semêdo *et al.*, (2004) mengemukakan bahwa enzim selulase mampu untuk melisiskan senyawa selulosa, di mana senyawa selulosa adalah senyawa penyusun dinding sel jamur kelas Oomycetes dengan salah satu anggotanya adalah jamur *P. palmivora* (Semangun, 2000). Sedangkan untuk enzim amilase menurut Suriani & Muis (2016) enzim amilase dapat mengurai dinding sel patogen. Akibat adanya kandungan enzim pada kelima isolat *Bacillus* sp. mengakibatkan malformasi pada hifa patogen. Hal ini sesuai dengan pendapat Munif *et al.*, (2007) menyatakan bahwa pertumbuhan abnormal pada hifa (malformasi) berupa pembengkakan dan pemendekan hifa yang berakibat hifa tidak mampu berkembang dengan sempurna disebabkan oleh kandungan yang dimiliki oleh bakteri. Perlakuan isolat Ba-6 dan Ba-9 menghasilkan enzim amilase, protease dan selulase yang mengakibatkan hifa *P. palmivora* membengkok dan membengkak (Gambar 6a dan 6b), isolat Ba-12 menghasilkan enzim protease yang mengakibatkan hifa *P. palmivora* memendek, membengak, dan terpotong (Gambar 6c), isolat Ba-15 menghasilkan enzim amilase, protease dan selulase yang mengakibatkan hifa *P. palmivora* memendek dan terpotong (Gambar 6d), isolat Ba-17 menghasilkan enzim amilase dan protease yang mengakibatkan hifa *P. palmivora* membengkak namun jumlah hifa yang membengkak sedikit (Gambar 6e).



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

Perlakuan isolat Ba-6 dan Ba-9 menghasilkan enzim amilase, protease dan selulase yang mengakibatkan hifa *P. palmivora* membengkok dan membengkak, isolat Ba-12 menghasilkan enzim protease yang mengakibatkan hifa *P. palmivora* memendek, membengak, dan terpotong, isolat Ba-15 menghasilkan enzim amilase, protease dan selulase yang mengakibatkan hifa *P. palmivora* memendek dan terpotong, isolat Ba-17 menghasilkan enzim amilase dan protease yang mengakibatkan hifa *P. palmivora* membengkok namun jumlah hifa yang membengkok sedikit.

DAFTAR PUSTAKA

- Choi, Y. W., Hodgkiss, I. J., & Hyde, K. D. (2005). Enzyme production by endophytes of *Brucea javanica*. *Water*, 55–66.
- Fasiku, S. A., Ogunsola, O. F., Fakunle, A., & Olanbiwoninu, A. A. (2020). Isolation of Bacteria with Potential of Producing Extracellular Enzymes (Amylase, Cellulase and Protease) from Soil Samples. *Journal of Advances in Microbiology*, March, 21–26. <https://doi.org/10.9734/jamb/2020/v20i330224>
- Flori, F., Mukarlina, & Rahmawati. (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.
- Haggag, W. M., & Mohamed, H. A.-L. A. (2007). Biotechnological Aspects of Microorganisms Used in Plant Biological Control. *American-Eurasian Journal of Sustainable Agriculture*, 1(1), 7–12.
- Hatmanti, A. (2000). Pengenalan *Bacillus* spp. *Oseana*, XXV(1), 31–41.
- Junaid, J. M., Dar, N. A., Bhat, T. A., Bhat, A. H., & Bhat, M. A. (2013). Commercial Biocontrol Agents and Their Mechanism of Action in the Management of Plant Pathogens. *International Journal of Modern Plant & Animal Sciences International Journal of Modern Plant & Animal Sciences Journal Homepage: Wwww.ModernScientificPress.Com/Journals/IJPlant.aspx* Int. J. Modern Plant & Anim. Sci, 1(12), 39–57.
- Motulo, H. F., Sinaga, M., & Hartana, A. (2007). Karakter morfologi dan molekuler isolat. *Jurnal Littri*, 13(3), 111–118.

- Munif, A., Djatnika, I., & Widodo, W. (2007). Karakter Fisiologis Dan Peranan Antibiosis Bakteri Perakaran Graminae Terhadap Fusarium Dan Pemacu Pertumbuhan Tanaman Pisang. *Jurnal Hortikultura*, 17(2), 84824. <https://doi.org/10.21082/jhort.v17n2.2007.p>
- Rokhmah, D. N. (2020). Teknologi pengendalian terpadu penyakit busuk buah kakao (bbk). Balittri. <http://balittri.litbang.pertanian.go.id/index.php/berita/info-teknologi/1179-teknologi-pengendalian-terpadu-penyakit-busuk-buah-kakao-bbk>
- Semangun, H. (2000). Penyakit-Penyakit Tanaman Perkebunan di Indonesia. Gajah Mada University Press.
- Semêdo, L. T. A. S., Gomes, R. C., Linhares, A. A., Duarte, G. F., Nascimento, R. P., Rosado, A. S., Margis-Pinheiro, M., Margis, R., Silva, K. R. A., Alviano, C. S., Manfio, G. P., Soares, R. M. A., Linhares, L. F., & Coelho, R. R. R. (2004). *Streptomyces drozdowiczii* sp. nov., a novel cellulolytic streptomycete from soil in Brazil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54(4), 1323–1328. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.02844-0>
- Singh, A. K., & Chhatpar, H. S. (2011). Purification, characterization and thermodynamics of antifungal protease from *Streptomyces* sp. A6. *Journal of Basic Microbiology*, 51(4), 424–432. <https://doi.org/10.1002/jobm.201000310>
- Suriani, & Muis, A. (2016). Prospect of *Bacillus subtilis* as a biological control agent of soilborne pathogens on maize. / Prospek *Bacillus subtilis* sebagai agen pengendali hayati patogen tular tanah pada tanaman jagung. *Jurnal Penelitian Dan Pengembangan Pertanian*, 35(1), 37–45. email: surianipalla@gmail.com %5Cbalitsereal@litbang.pertanian.go.id NS -