

Isolasi Bakteri Filosfer Berpotensi sebagai Penambat Nitrogen dan Deteksi *in Vitro* Kemampuannya dalam Menghambat Pertumbuhan *Colletotrichum*

Isolation of Potential Nitrogen-Fixing Phylloplane Bacteria and *in Vitro* Detection of Their Ability to Inhibit the Growth of *Colletotrichum*

Fitri Widiyanti^{1*}, Fitika Syahnur², Yusup Hidayat¹, Endah Yulia¹

¹Departemen Hama dan Penyakit Tanaman, Fakultas Pertanian, Universitas Padjadjaran

²Program Studi Agroteknologi, Fakultas Pertanian, Universitas Padjadjaran

Jalan Ir. Sukarno KM 21, Jatinangor, Sumedang – Jawa Barat 45363

(diterima Oktober 2023, disetujui Januari 2024)

ABSTRAK

Antraknosa merupakan salah satu penyakit penting pada tanaman cabai yang disebabkan oleh *Colletotrichum* spp. dengan tingkat kehilangan hasil yang dapat mencapai 100%. Dampak negatif penggunaan fungisida menyebabkan diperlukannya pencarian agens biokontrol sebagai bagian dari pengendalian penyakit yang ramah lingkungan. Salah satu sumber ialah agens biokontrol dari bagian filosfer. Percobaan ini bertujuan mendapatkan bakteri antagonis asal filosfer daun tanaman cabai sehat yang memiliki potensi untuk dikembangkan sebagai agens biokontrol sekaligus berpotensi meningkatkan perolehan nutrisi bagi tanaman melalui fiksasi nitrogen. Tanaman cabai sehat diperoleh dari pertanaman cabai merah di Desa Cijambu dan Desa Nanggerang, Kabupaten Sumedang, Jawa Barat. Hasil isolasi menggunakan medium bebas nitrogen dan hasil skrining aktivitas antagonisme diperoleh delapan galur bakteri, yaitu CJB1, CJB2, CJB3, CJB4, CJB5, NGR1, NGR2, dan NGR3. Delapan galur bakteri tersebut diuji dengan beberapa galur *Colletotrichum* spp. asal beberapa sentra pertanaman cabai di Garut, Lembang, Sumedang dan Jatinangor. Pengujian dilakukan menggunakan metode biakan ganda yang dilanjutkan dengan pengujian aktivitas senyawa volatil dengan metode *double compartment*. Hasil percobaan menunjukkan diperolehnya bakteri filosfer NGR1, CJB1, dan CJB5 yang secara konsisten menunjukkan kemampuan yang baik dalam menghambat pertumbuhan empat galur *Colletotrichum* spp., baik secara langsung melalui uji antagonis maupun berdasarkan uji aktivitas anticendawan senyawa volatil yang dihasilkan galurnya. Malformasi pada miselium *Colletotrichum* spp. juga terdeteksi ketika patogen dihadapkan secara langsung dengan bakteri filosfer maupun oleh senyawa volatil yang dihasilkannya. Hasil percobaan ini menunjukkan bahwa bakteri filosfer yang berpotensi dapat memfiksasi N ini juga berpotensi untuk dikembangkan sebagai agens biokontrol *Colletotrichum* spp.

Kata kunci: antraknosa, biokontrol, cabai, senyawa volatil

*Alamat penulis korespondensi: Departemen Hama dan Penyakit Tanaman, Fakultas Pertanian, Universitas Padjadjaran. Jalan Ir. Sukarno KM 21, Jatinangor, Sumedang- Jawa Barat 45363.
Surel: fitri.widiyanti@unpad.ac.id

ABSTRACT

Anthrachnose is one of the significant diseases in chili plants caused by *Colletotrichum* spp., with potential yield losses of up to 100%. The negative impact of fungicide use forces the search for biocontrol agents as part of environmentally friendly disease management. One of the sources where these biocontrol agents can be found is in the phyllosphere. This experiment aimed to obtain antagonistic bacteria from the phyllosphere of healthy chili plants that have the potential to be developed as biocontrol agents and potentially increase the nutrition uptake through nitrogen-fixation. Healthy chili plants were obtained from red chili plantations in Cijambu Village and Nanggerang Village, Sumedang Regency, West Java. Isolation using Nitrogen-free media and screening for antagonistic activity resulted in the isolation of eight bacterial strains, namely strains CJB1, CJB2, CJB3, CJB4, CJB5, NGR1, NGR2, and NGR3. The antagonistic tests on these eight bacterial strains were then conducted against various *Colletotrichum* spp. strains from different chili cultivation centers in Garut, Lembang, Sumedang, and Jatinangor. The testing was carried out using a dual-culture method followed by the examination of volatile compound activity using the double compartment method. The results showed that phyllosphere bacteria NGR1, CJB1, and CJB5 consistently demonstrated abilities to inhibit the growth of four *Colletotrichum* spp. strains, both directly through antagonistic tests and based on the volatile anticendawan compound activity produced by these bacterial strains. Malformations in the mycelium of *Colletotrichum* spp. were also detected when the pathogen was directly exposed to phyllosphere bacteria or their volatile compounds. This experiment indicates that phyllosphere bacteria that potentially capable of fixing nitrogen also have the potential to be developed as biocontrol agents for *Colletotrichum* spp.

Keywords: anthracnose, biocontrol, chili, volatile compounds

PENDAHULUAN

Suatu agens biokontrol memiliki dua mekanisme dalam menghambat pertumbuhan patogen penyebab penyakit, yaitu mekanisme penghambatan langsung terhadap patogen, juga mekanisme tidak langsung, yaitu melalui peningkatan kesehatan tanaman. Mekanisme tidak langsung tersebut antara lain meliputi peningkatan pertumbuhan tanaman dengan meningkatkan penyerapan nutrisi bagi tanaman. Aktivitas antagonisme dapat terjadi secara alami pada berbagai habitat, misal pada area filosfer (Siregar *et al.* 2020). Mikrob yang terdapat pada area filosfer sebagian besar dihuni oleh golongan bakteri (Sobanbabu *et al.* 2021). Akter *et al.* (2014) melaporkan beberapa spesies bakteri *Pseudomonas* asal filosfer tanaman padi mampu menghambat pertumbuhan *Rhizoctonia solani*. Penghambatan terbesar ditunjukkan oleh *P. aeruginosa* secara *in vitro*, yakni sebesar 68.44%. Bakteri filosfer *Arthrobacter* sp. dan *Bacillus* asal tanaman padi dapat menghambat pertumbuhan *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Prabawati *et al.* 2019). Selain itu,

bakteri filosfer asal tanaman millet jari (*Eleusine coracana*) juga dilaporkan mampu menghambat penyakit blas, dengan tingkat hambatan tertinggi ditunjukkan oleh spesies *Bacillus cereus* sebesar 62.87% (Sobanbabu *et al.* 2021).

Upaya mendapatkan agens biokontrol yang sekaligus memiliki kemampuan dalam membantu penyerapan unsur hara bagi tanaman memerlukan strategi tertentu. Penggunaan medium spesifik seperti medium bebas nitrogen (BN) dapat meningkatkan kemungkinan perolehan bakteri filosfer yang dapat memfiksasi nitrogen (N) di udara. Medium BN merupakan medium yang tidak mengandung nitrogen sehingga hanya golongan bakteri diazotrof saja yang dapat tumbuh pada medium tersebut (Kifle dan Laing 2016). Diazotrof adalah bakteri yang dapat memfiksasi nitrogen yang ada di sekitarnya. Keberadaan N_2 di udara sangat melimpah, namun tidak dalam bentuk yang dapat diserap langsung oleh tanaman. Bakteri pemfiksasi N dapat mengubah N_2 di udara menjadi NH_3 yang merupakan bentuk yang dapat diserap oleh tanaman (Bhattacharjee *et al.* 2008).

Nitrogen merupakan salah satu unsur hara penting dalam menunjang pertumbuhan tanaman. Oleh karena itu, agens biokontrol akan memiliki peran yang lebih baik lagi jika dapat dimanfaatkan untuk meningkatkan ketersediaan nutrisi bagi tanaman. Agbavor *et al.* (2022) menyatakan bahwa konsorsium bakteri filosfer yang disempatkan pada tanaman kedelai selain dapat menghambat efek negatif infeksi *Pseudomonas syringae* pv. *glycine* pada tanaman kedelai juga dapat meningkatkan biomassa tanaman termasuk meningkatkan kandungan klorofil dan nitrogen dalam tanaman. Hal tersebut disebabkan oleh kemampuan bakteri filosfer—seperti *Paenibacillus*—yang dapat menfiksasi N dari udara (Agbavor *et al.* 2022).

Agens biokontrol akan berhasil digunakan dalam upaya pengendalian jika memiliki aktivitas penghambatan yang kuat sehingga dapat digunakan sebagai alternatif pengendalian, selain fungisida. Dampak negatif dari penggunaan fungisida menyebabkan timbulnya populasi patogen yang resisten terhadap fungisida. Dilaporkan oleh Dewi (2022), bahwa *Colletotrichum* yang diisolasi dari beberapa daerah penanaman cabai merah di Jawa Barat menunjukkan penurunan sensitivitas terhadap fungisida yang umum digunakan oleh petani, seperti mankozeb, propineb, dan simoksanil. Oleh karena itu, bakteri filosfer yang memiliki aktivitas antagonisme terhadap *Colletotrichum* diharapkan dapat dipertimbangkan sebagai solusi pengembangan agens biokontrol terhadap penyakit antraknosa pada cabai merah.

BAHAN DAN METODE

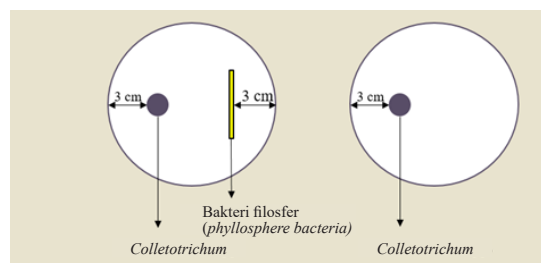
Isolasi Bakteri Pemfiksasi Nitrogen dari Filosfer Tanaman Cabai

Daun tanaman cabai dipilih dari tanaman cabai yang sehat, berwarna hijau, dan tidak menunjukkan adanya gejala terkena penyakit. Daun cabai diambil dari pertanaman cabai di Desa Cijambu, Kecamatan Tanjungsari dan Desa Nanggerang, Kecamatan Sukasari, Kabupaten Sumedang. Isolasi bakteri

filosfer dilakukan dengan metode *leaf print* pada medium bebas nitrogen (BN) (20 g mannitol, 0.2 g K_2HPO_4 , 0.2 g NaCl, 0.1 g $MgSO_4$, 5 g $CaCO_3$, 20 g agar-agar, dan 1 L akuades) (Holland *et al.* 2000). Koloni bakteri yang tumbuh pada medium BN kemudian dipindahkan pada medium agar-agar nutrisi (AN) untuk dimurnikan. Koloni bakteri yang tumbuh dikarakterisasi pada medium AN dan diamati morfologi koloninya yang meliputi warna, bentuk, elevasi, tepian, dan tekstur. Demikian juga pertumbuhannya diamati pada medium AN, medium *International Streptomyces Project 2* (ISP2) (4 g ekstrak khamir, 10 g ekstrak malt, 4 g glukosa, 20 g agar-agar, dan 1 L akuades), dan medium *tryptone soya agar* (TSA) (40 g TSA dan 1 L akuades). Bakteri filosfer kemudian diuji jenis Gram menggunakan KOH 3%.

Skrining dan Uji Antagonisme Bakteri Filosfer terhadap *Colletotrichum*

Skrining dilakukan untuk memperoleh galur bakteri filosfer yang memiliki aktivitas antagonisme saja. Uji antagonisme dilakukan menggunakan metode biakan ganda. Uji antagonisme biakan ganda dilakukan dengan menumbuhkan *Colletotrichum* dan bakteri filosfer dalam cawan medium agar-agar dekstroza kentang (ADK). Bakteri dan cendawan ditumbuhkan berjarak masing-masing 3 cm dari tepi cawan (Gambar 1). Uji antagonisme dilakukan terhadap empat galur *Colletotrichum* dari koleksi



Gambar 1 Ilustrasi uji antagonisme bakteri filosfer terhadap galur *Colletotrichum* dengan metode biakan ganda. a, perlakuan bakteri filosfer dan b, perlakuan kontrol.

(Figure 1 Illustration of the antagonism assay of phyllosphere bacteria against *Colletotrichum* strains using double culture method. a, phyllosphere bacteria treatment and b, control.)

Laboratorium Bioteknologi, Proteksi Tanaman, Fakultas Pertanian, Universitas Padjadjaran. Keempatnya berasal dari lokasi pertanaman cabai di Sumedang (*Colletotrichum* galur SMD), Garut (*Colletotrichum* galur GRT), Lembang (*Colletotrichum* galur LMG), dan Jatinangor (*Colletotrichum* galur JTN). Keempat galur *Colletotrichum* tersebut dilaporkan mengalami penurunan sensitivitas terhadap fungisida (Dewi 2022).

Percobaan dilakukan menggunakan rancangan acak lengkap dengan bakteri filofser hasil seleksi sebagai perlakuan, fungisida berbahan aktif mankozeb sebagai kontrol positif, dan tanpa perlakuan bakteri/fungisida sebagai kontrol negatif; serta masing-masing diulang sebanyak tiga kali.

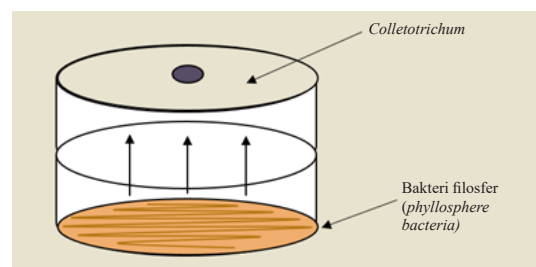
Pengamatan dilakukan dengan mengukur jari-jari koloni *Colletotrichum* yang menuju ke arah bakteri. Pengamatan pertumbuhan ini dilakukan setiap hari hingga koloni *Colletotrichum* pada perlakuan kontrol memenuhi cawan. Tingkat hambatan relatif (THR) dihitung berdasarkan rumus (Chaurasia *et al.* 2005).

$$\text{THR (\%)} = \frac{R1 - R2}{R1} \times 100\%, \text{ dengan}$$

THR, tingkat hambatan relatif (%); R1, jari-jari koloni *Colletotrichum* pada kontrol; dan R2, jari-jari koloni *Colletotrichum* pada perlakuan. Selain itu, morfologi hifa *Colletotrichum* diamati secara mikroskopi pada setiap perlakuan dan sebagai pembanding hifa normal *Colletotrichum* diamati pada kontrol.

Aktivitas Senyawa Volatil Bakteri Filosfer terhadap *Colletotrichum*

Percobaan disusun dalam rancangan acak lengkap terdiri atas 9 perlakuan (kontrol dan 8 galur bakteri) yang diulang sebanyak tiga kali. Deteksi aktivitas anticendawan dari senyawa volatil yang dihasilkan oleh bakteri filofser terhadap masing-masing galur *Colletotrichum* mengikuti metode *double compartment* (Widiantini dan Hartati 2020). Metode ini dilakukan dengan menggabungkan dua cawan yang masing-masing bakteri filofser yang ditumbuhkan pada medium ISP2 dan



Gambar 2 Ilustrasi uji penghambatan galur *Colletotrichum* dengan perlakuan volatil dari bakteri filofser.

(Figure 2 Illustration of inhibition assay of *Colletotrichum* strains treated with volatiles from phyllosphere bacteria.)

galur *Colletotrichum* yang ditumbuhkan pada medium ADK (Gambar 2). Perlakuan kontrol dilakukan tanpa menggunakan galur bakteri filofser. Pertemuan kedua cawan ditutup dengan plastik wrap untuk menghindari terjadinya kontaminasi. Kemudian, seluruh perlakuan diinkubasi pada suhu ruang 25–27 °C dan diameter koloni *Colletotrichum* diukur setiap hari hingga memenuhi cawan.

Setelah koloni *Colletotrichum* kontrol memenuhi cawan, dilakukan perhitungan persentase THR seperti pada uji antagonisme. Perhitungan tingkat penghambatan pertumbuhan koloni *Colletotrichum* dilakukan menggunakan rumus (Widiantini *et al.* 2016):

$$\text{THR (\%)} = \frac{DK - DP}{DK} \times 100\%, \text{ dengan}$$

THR, tingkat hambatan relatif (%); DK, diameter koloni cendawan pada kontrol; dan DP, diameter koloni cendawan pada perlakuan bakteri filofser. Selanjutnya, secara dilakukan pengamatan mikroskopik untuk mengetahui adanya kerusakan pada hifa cendawan akibat perlakuan.

Analisis

Data yang diperoleh diuji normalitas dan homogenitasnya. Data yang terdistribusi normal dan homogen kemudian dianalisis varians (ANOVA) menggunakan program Statistical Package for the Social Science (SPSS) versi 26, yang diikuti dengan uji lanjut Duncan pada taraf 5%.

HASIL

Bakteri Pemfiksasi Nitrogen dari Filosfer Tanaman Cabai

Bakteri dari daun tanaman cabai yang diisolasi pada medium BN tidak menghasilkan koloni bakteri. Hal ini menunjukkan bahwa koloni bakteri yang tumbuh pada medium isolasi daun *leaf print* merupakan koloni bakteri filosfer. Sebanyak 38 isolat bakteri filosfer yang diperoleh dan hanya 8 isolat yang menunjukkan aktivitas penghambatan, yaitu isolat CJB1, CJB2, CJB3, CJB4, dan CJB5 dari Desa Cijambu, dan isolat NGR1, NGR2, dan NGR3 dari Desa Nanggerang.

Bakteri filosfer yang dapat memfiksasi N memerlukan waktu relatif lama untuk tumbuh pada medium BN. Medium BN merupakan medium selektif sehingga tidak semua bakteri—terutama bakteri yang pertumbuhannya cepat (*fastidious*)—dapat tumbuh. Koloni bakteri filosfer baru muncul di medium BN pada 6 HSI. Galur bakteri filosfer terpilih memiliki morfologi koloni berbeda antarbakteri, tetapi seluruhnya merupakan bakteri Gram negatif (Tabel 1). Sebanyak delapan galur ini digunakan untuk uji lebih lanjut.

Aktivitas Antagonisme Bakteri Filosfer terhadap *Colletotrichum*

Jari-jari koloni *Colletotrichum* yang diperlakukan dengan bakteri filosfer dan fungisida berbahan aktif mankozeb terlihat secara nyata lebih pendek dibandingkan dengan perlakuan kontrol. Secara umum, rata-rata jari-jari koloni *Colletotrichum* galur JTN menunjukkan pertumbuhan yang lebih terhambat dibandingkan dengan galur *Colletotrichum* lainnya ketika diperlakukan dengan bakteri filosfer yang sama (Tabel 2).

Perlakuan bakteri filosfer terhadap *Colletotrichum* menghasilkan THR bervariasi, yakni berkisar antara 14.44% dan 57.22%, dengan penghambatan terbesar (57.22%) ditunjukkan oleh bakteri filosfer NGR1 terhadap *Colletotrichum* galur JTN. Bakteri ini umumnya memberikan efek penghambatan lebih tinggi ketika berhadapan dengan galur

Colletotrichum lainnya, yaitu sebesar 38.33% terhadap *Colletotrichum* galur SMD, 27.78% terhadap *Colletotrichum* galur GRT, dan 50% terhadap *Colletotrichum* galur LMG. Bakteri filosfer lain yang juga menunjukkan kemampuan penghambatan yang relatif konsisten ialah pada *Colletotrichum* galur CJB1 dan *Colletotrichum* galur CJB5.

Secara visual, bakteri filosfer dapat memengaruhi pertumbuhan koloni keempat galur *Colletotrichum* (Gambar 3). Pertumbuhan koloni *Colletotrichum* mengalami penipisan ketika mendekati koloni bakteri filosfer.

Aktivitas Senyawa Volatil Bakteri Filosfer terhadap *Colletotrichum*

Bakteri filosfer yang diuji aktivitas senyawa volatilnya mampu menghambat pertumbuhan koloni *Colletotrichum* (Tabel 3). Nilai tingkat penghambatan relatif umumnya lebih tinggi dibandingkan dengan hasil uji antagonisme. Sedikit berbeda dengan hasil uji biakan ganda, tidak hanya *Colletotrichum* galur JTN yang penghambatannya relatif tinggi, tetapi hal ini terjadi juga pada *Colletotrichum* galur GRT dengan nilai tingkat penghambatan di atas 30%. Seperti halnya pada uji antagonisme, bakteri filosfer NGR1 juga menunjukkan aktivitas penghambatan yang konsisten cukup tinggi ketika dihadapkan pada setiap galur *Colletotrichum* uji, yaitu sebesar 40.19% hingga 53.33%. Tingkat penghambatan paling tinggi (61.30%) ditunjukkan oleh bakteri filosfer CJB3 terhadap *Colletotrichum* galur GRT, tetapi tidak cukup stabil ketika diuji terhadap *Colletotrichum* lainnya. Pada pengujian terhadap *Colletotrichum* galur LMG, penghambatan yang diberikan hanya sebesar 28.15%.

Senyawa volatil yang dihasilkan juga memberikan pengaruh terhadap morfologi keempat koloni galur *Colletotrichum* yang diuji (Gambar 4). Secara visual, terlihat perbedaan warna koloni antara perlakuan kontrol dan perlakuan bakteri filosfer, terutama pada bagian bawah koloni. Pada perlakuan kontrol, koloni *Colletotrichum* cenderung lebih berwarna, warna keunguan pada *Colletotrichum* galur SMD,

Tabel 1 Karakteristik koloni bakteri filosfer asal tanaman cabai di Desa Cijambu dan Desa Nanggerang
 (Table 1 Colonies characteristics of phyllosphere bacteria from chili plants in Cijambu and Nanggerang villages)

Bakteri filosfer (<i>Phyllosphere bacteria</i>)	Warna (<i>Color</i>)	Bentuk (<i>Shape</i>)	Elevasi (<i>Elevation</i>)	Tepi (<i>Edge</i>)	Tekstur (<i>Texture</i>)	Lain-lain (<i>Other</i>)	Waktu tumbuh pada medium (jam setelah inokulasi) (<i>growth time on medium (... hours after inoculation)</i>)			Reaksi Gram (<i>Gram Reaction</i>)
							AN	ISP2	TSA	
CJB1	Bening kekuningan (<i>Yellowish transparent</i>)	Membulat (<i>Circular</i>)	Cembung (<i>Convex</i>)	Rapi (<i>Entire</i>)	Cair (<i>Liquid</i>)	Pusat berwarna kuning (<i>yellow center</i>)	24	24	24	Negatif (<i>Negative</i>)
CJB2	Bening keputihan (<i>Whitish transparent</i>)	Membulat (<i>Circular</i>)	Cembung (<i>Convex</i>)	Rapi (<i>Entire</i>)	Cair (<i>Liquid</i>)	Tidak memiliki pusat (<i>Has no center</i>)	24	24	24	Negatif (<i>Negative</i>)
CJB3	Bening (<i>transparent</i>)	Agak membulat (<i>Somewhat circular</i>)	Tidak cembung (<i>Not convex</i>)	Agak rapi (<i>Somewhat Entire</i>)	Cair (<i>Liquid</i>)	Mengering di medium NA (<i>Dries on NA medium</i>)	24	24	24	Negatif (<i>Negative</i>)
CJB4	Bening keputihan (<i>Whitish transparent</i>)	Membulat (<i>Circular</i>)	Tidak terlalu cembung (<i>Not too convex</i>)	Tidak rapi (<i>Undulate</i>)	Agak kental, lengket (<i>Slightly viscous, sticky</i>)	Tidak memiliki pusat (<i>Has no center</i>)	24	24	24	Negatif (<i>Negative</i>)
CJB5	Agak bening, Putih kekuningan (<i>Somewhat transparent, white yellowish.</i>)	Membulat (<i>Circular</i>)	Cembung (<i>Convex</i>)	Tidak rapi (<i>Undulate</i>)	Cair, agak lengket (<i>Liquid, slightly sticky</i>)	Sedikit mengkilap (<i>Slightly shiny</i>)	48	24	24	Negatif (<i>Negative</i>)
NGR1	Bening (<i>transparent</i>)	Menyebar (<i>Irregular</i>)	Cembung (<i>Convex</i>)	Rapi (<i>Entire</i>)	Cair (<i>Liquid</i>)	Tidak memiliki pusat (<i>Has no center</i>)	24	24	24	Negatif (<i>Negative</i>)
NGR2	Bening keputihan (<i>Whitish transparent</i>)	Membulat (<i>Circular</i>)	Cembung (<i>Convex</i>)	Rapi (<i>Entire</i>)	Cair (<i>Liquid</i>)	Pusat berwarna putih (<i>White center</i>)	24	24	24	Negatif (<i>Negative</i>)
NGR3	Bening (<i>Transparent</i>)	Membulat (<i>Circular</i>)	Cembung (<i>Convex</i>)	Agak rapi (<i>Somewhat Entire</i>)	Cair (<i>Liquid</i>)	Mengering di medium NA (<i>Dries on NA medium</i>)	48	24	24	Negatif (<i>Negative</i>)

Keterangan (Note): AN=Agar-agar Nutrient (*Nutrient agar*) ; ISP2= *International Streptomyces Project 2*; TSA= *Tryptone Soya Agar*

Tabel 2 Jari-jari koloni dan tingkat hambatan relatif (THR) koloni galur *Colletotrichum* oleh bakteri filosfer berdasarkan pada uji antagonisme menggunakan metode biakan ganda

(Table 2 Colonies radius and relative inhibition of *Colletotrichum* strain colonies by phyllosphere bacteria based on antagonism assay using double culture method)

Bakteri filosfer (<i>Phyllosphere bacteria</i>)	Galur <i>Colletotrichum</i> (<i>Colletotrichum</i> strain)							
	SMD		GRT		LMG		JTN	
	Jari-jari koloni (Radius) (cm)	THR (Inhibition) (%)	Jari-jari koloni (Radius) (cm)	THR (Inhibition) (%)	Jari-jari koloni (Radius) (cm)	THR (Inhibition) (%)	Jari-jari koloni (Radius) (cm)	THR (Inhibition) (%)
Kontrol (<i>Control</i>)	6.00 d	-	6.00 e	-	6.00 e	-	6.00 c	-
CJB1	3.63 a	39.44	4.50 c	25.00	3.93 b	34.44	3.90 ab	35.00
CJB2	4.70 bc	21.67	5.10 d	15.00	4.77 cd	20.56	4.10 b	31.67
CJB3	4.50 b	25.00	4.00 bc	33.33	5.03 d	16.11	3.70 ab	38.33
CJB4	4.80 bc	20.00	3.80 ab	36.67	5.10 d	15.00	2.87 ab	52.22
CJB5	3.63 a	39.44	4.27 bc	28.89	4.67 bcd	22.22	2.80 ab	53.33
NGR1	3.70 a	38.33	4.33 bc	27.78	3.00 a	50.00	2.57 a	57.22
NGR2	5.10 c	15.00	5.13 d	14.44	5.10 d	15.00	3.37 ab	43.89
NGR3	4.30 b	28.33	3.37 a	43.89	5.13 d	14.44	3.83 ab	36.11
Mankozeb	5.20 c	13.33	5.10 d	15.00	4.13 bcd	31.11	3.07 ab	48.89

Keterangan: Angka pada kolom yang sama dan diikuti huruf yang berbeda menunjukkan perbedaan nyata berdasarkan uji Jarak Berganda Duncan pada α 5%.

(Note: values in the same column followed by the same letter are significantly different based on Duncan's multiple range test at α 5%.)

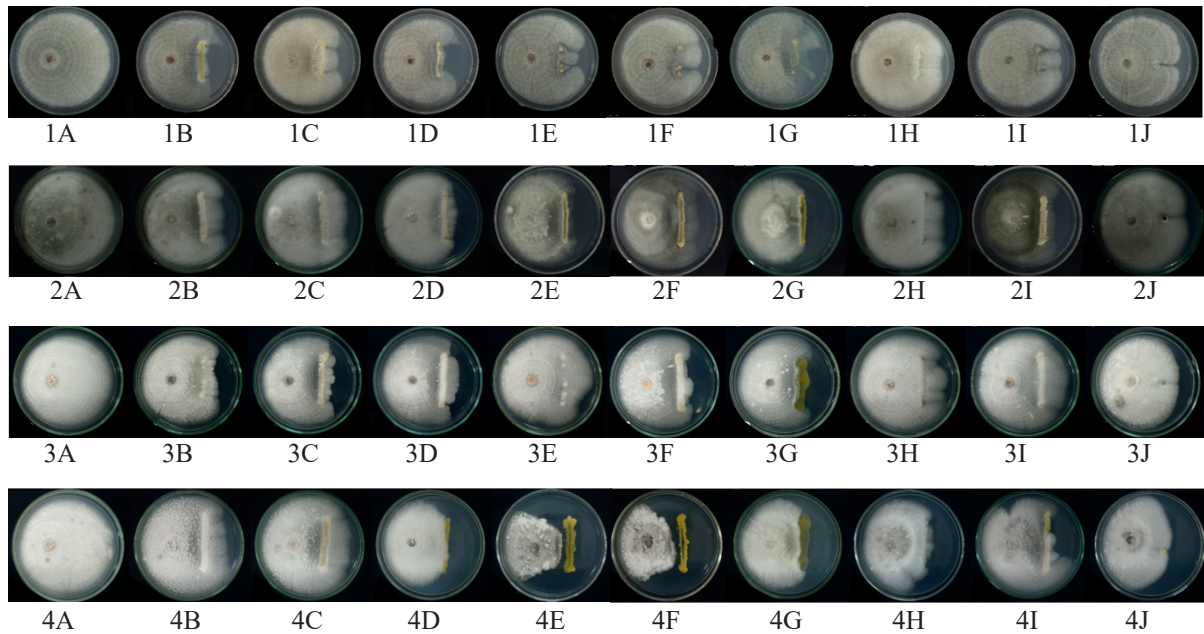
Tabel 3 Diameter koloni dan tingkat hambatan relatif (THR) koloni galur *Colletotrichum* pada uji aktivitas anticendawan senyawa volatil oleh bakteri filosfer menggunakan metode *double compartment*

(Table 3 Colonies diameter and relative inhibition of *Colletotrichum* strain colonies in the antifungal activity assay of volatile compounds by phyllosphere bacteria using double compartment method)

Bakteri filosfer (<i>Phyllosphere bacteria</i>)	Galur <i>Colletotrichum</i> (<i>Colletotrichum strain</i>)							
	SMD		GRT		LMG		JTN	
	Diameter (Diameter) (cm)	THR (Inhibition) (%)	Diameter (Diameter) (cm)	THR (Inhibition) (%)	Diameter (Diameter) (cm)	THR (Inhibition) (%)	Diameter (Diameter) (cm)	THR (Inhibition) (%)
Kontrol (<i>Control</i>)	9.00 c	-	9.00 e	-	9.00 e	-	9.00 b	-
CJB1	7.03 b	21.85	5.35 cd	40.56	4.48 a	50.19	4.82 a	46.48
CJB2	5.70 ab	36.67	4.37 ab	51.48	4.62 ab	48.70	5.17 a	42.59
CJB3	5.43 a	39.63	3.48 a	61.30	6.47 d	28.15	4.60 a	48.89
CJB4	5.50 a	38.89	4.75 bc	47.22	4.88 ab	45.74	4.18 a	53.52
CJB5	5.62 ab	37.59	4.67 bc	48.15	5.02 abc	44.26	4.52 a	49.81
NGR1	4.52 a	49.81	4.20 ab	53.33	5.13 abcd	42.96	5.38 a	40.19
NGR2	5.27 a	41.48	6.00 d	33.33	6.28 cd	30.19	5.52 a	38.70
NGR3	4.73 a	47.41	4.42 abc	50.93	5.90 bcd	34.44	4.42 a	55.19

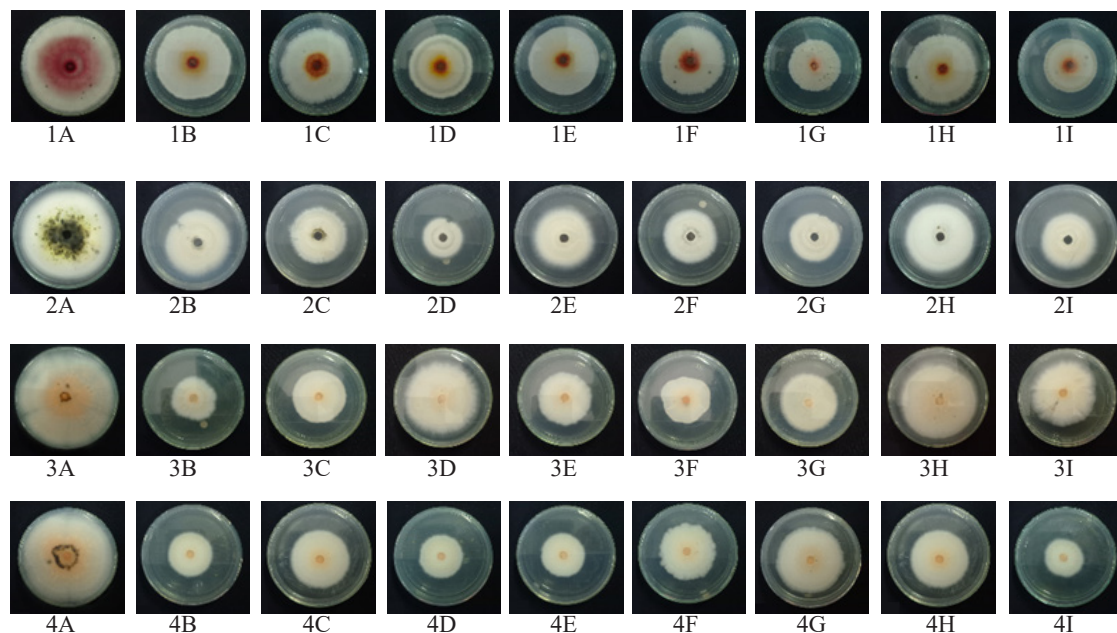
Keterangan: Angka pada kolom yang sama dan diikuti huruf yang berbeda menunjukkan perbedaan nyata berdasarkan uji Jarak Berganda Duncan pada α 5%.

(Note: values in the same column followed by the same letter are significantly different based on Duncan's multiple range test at α 5%.)



Gambar 3 Reaksi antagonisme bakteri filiosfer terhadap beberapa galur *Colletotrichum*—galur SMD (13 HSI), GRT (15 HSI), LMG, dan JTN (16 HSI)—dengan metode biakan ganda. 1, *Colletotrichum* galur SMD; 2, *Colletotrichum* galur GRT; 3, *Colletotrichum* galur LMG; dan 4, *Colletotrichum* galur JTN dengan perlakuan A, kontrol; B, CJB1; C, CJB2; D, CJB3; E, CJB4; F, CJB5; G, NGR1; H, NGR2; I, NGR3; dan J, fungisida mankozeb.

(Figure 3 Antagonism reaction of phyllosphere bacteria against several *Colletotrichum* strains-SMD (13 DAI), GRT (15 DAI), LMG, and JTN (16 DAI)-by double culture method. 1, *Colletotrichum* strain SMD; 2, *Colletotrichum* strain GRT; 3, *Colletotrichum* strain LMG; and 4, *Colletotrichum* strain JTN with treatments A, control; B, CJB1; C, CJB2; D, CJB3; E, CJB4; F, CJB5; G, NGR1; H, NGR2; I, NGR3; and J, mancozeb fungicide.)



Gambar 4 Koloni cendawan *Colletotrichum* spp. setelah uji senyawa volatil *double compartment*: 1, *Colletotrichum* galur SMD; 2, *Colletotrichum* galur GRT; 3, *Colletotrichum* galur LMG; dan 4, *Colletotrichum* galur JTN dengan A, kontrol; B, Perlakuan CJB1; C, CJB2; D, CJB3; E, CJB4; F, CJB5; G, NGR1; H, NGR2; dan I, NGR3.

(Figure 4 Colonies of *Colletotrichum* spp. after double compartment volatile compound assay: 1, *Colletotrichum* strain SMD; 2, *Colletotrichum* strain GRT; 3, *Colletotrichum* strain LMG; and 4, *Colletotrichum* strain JTN with A, control; B, Treatment of CJB1; C, CJB2; D, CJB3; E, CJB4; F, CJB5; G, NGR1; H, NGR2; and I, NGR3.)

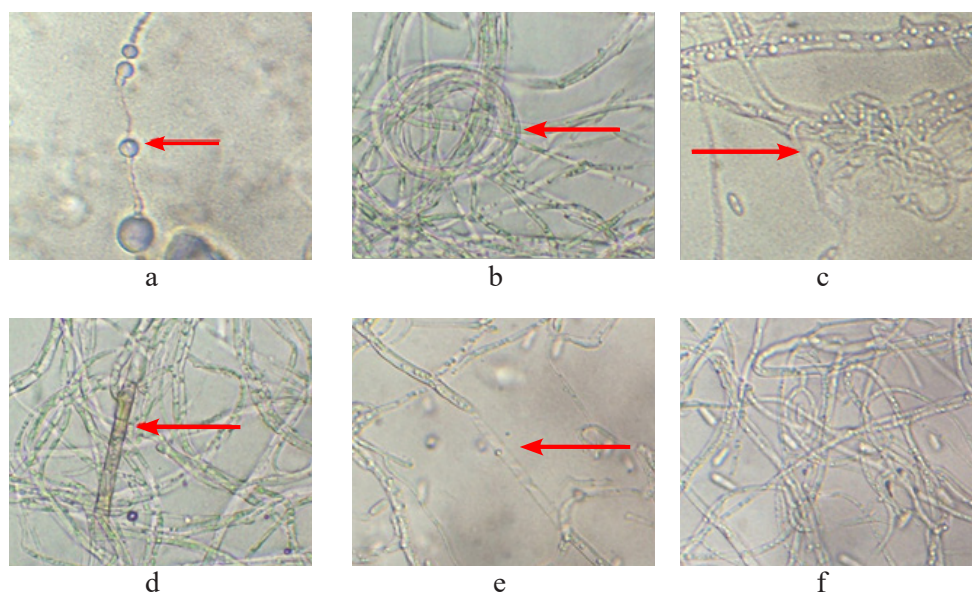
keabuan pada *Colletotrichum* galur GRT, dan warna salem pada *Colletotrichum* galur LMG dan JTN. Sementara pada perlakuan bakteri filosfer, warna tersebut memudar hingga terpusat pada zona tengah saja. Selain itu, pada pengamatan mikroskopi ditemukan hifa *Colletotrichum* membengkak, menggulung, mengeriting, mengalami melanisasi dan lisis banyak dijumpai pada koloni *Colletotrichum* yang dihadapkan pada bakteri filosfer, baik pada uji biakan ganda maupun pada uji *double compartment* (Gambar 5).

PEMBAHASAN

Medium BN tidak mengandung nitrogen (N) yang merupakan unsur penting yang diperlukan oleh bakteri bagi pertumbuhannya. Hanya bakteri yang dapat memfiksasi N dari udara dapat tumbuh pada medium BN. Hal ini diperkuat oleh penelitian yang dilakukan oleh Haerani *et al.* (2021) yang menyatakan bahwa kemampuan bakteri untuk memfiksasi N dapat dikonfirmasi dengan menumbuhkannya pada medium BN. Jika tidak tumbuh, berarti bakteri tersebut tidak dapat memfiksasi N. Bakteri filosfer yang mampu memfiksasi N memerlukan waktu relatif lebih lama untuk

muncul pada medium BN. Pada penelitian ini bakteri pemfiksasi N muncul pada 6 HSI. Hal ini disebabkan karena bakteri memerlukan energi yang cukup banyak untuk memfiksasi N dari udara. Soumare *et al.* (2020) melaporkan bahwa untuk dapat memfiksasi satu molekul N_2 diperlukan energi sebanyak 16 ATP. Pada penelitian ini potensi kemampuan bakteri filosfer dalam memfiksasi N perlu diteliti lanjut, terutama kaitannya dengan uji kuantitas kemampuannya dalam memfiksasi N.

Bakteri filosfer yang diperoleh merupakan bakteri Gram negatif. Bakteri pemfiksasi N digolongkan menjadi bakteri yang hidup bebas (*free-living nitrogen-fixing bacteria*) dan bersimbiosis dengan tanaman (*symbiotic nitrogen-fixing bacteria*). Bakteri pemfiksasi N yang hidup bebas kebanyakan termasuk ke dalam golongan bakteri Gram negatif, seperti *Azotobacter* dan *Azospirillum* (Vacher *et al.* 2016; Zhu *et al.* 2023). Bakteri pemfiksasi N yang ditemukan pada permukaan daun jagung termasuk ke dalam Firmicutes, Proteobacteria, Actinobacteria, dan Bacteroidetes dengan *Bacillus* sebagai genus bakteri yang mendominasi (Abadi *et al.* 2021). Sementara bakteri filosfer yang diisolasi dari daun tanaman hutan dilaporkan didominasi oleh



Gambar 5 Kerusakan hifa cendawan *Colletotrichum* spp. pada perlakuan bakteri filosfer; A, membengkak; B, menggulung; C, mengeriting; D, mengalami melanisasi; E, mengalami lisis; dan F, hifa normal.

(Figure 5 Damage to hyphae of the fungus *Colletotrichum* spp. due to the treatment of phyllosphere bacteria; A, swollen; B, coiled; C, curled; D, melanized; E, lysed; and F, normal hyphae.)

bakteri Gram negatif Proteobacteria dan Cyanobacteria (Furnkranz *et al.* 2008).

Permukaan daun merupakan habitat bagi banyak mikroorganisme dengan diversitas yang sangat beragam dan memiliki berbagai fungsi yang turut berkontribusi terhadap pertumbuhan serta kesehatan tanaman. Bakteri epifit pemfiksasi N memiliki ikatan yang erat dengan tanaman inangnya dengan berkontribusi terhadap penyediaan N yang diperlukan bagi pertumbuhan tanaman (Zhu *et al.* 2023), dan bakteri pemfiksasi N yang juga bersifat antagonis terhadap patogen dapat berkontribusi lebih banyak terhadap kesehatan tanaman inangnya. Pada penelitian ini diperoleh beberapa bakteri filosfer yang selain diduga dapat memfiksasi N juga memiliki aktivitas antagonisme terhadap *Colletotrichum* yang diisolasi dari berbagai lokasi pertanaman cabai. Setidaknya terdapat tiga galur bakteri filosfer, yaitu NGR1, CJB1, dan CJB5 yang berpotensi untuk dikembangkan sebagai agens biokontrol.

Agens biokontrol dapat mengendalikan penyakit tanaman melalui dua mekanisme, yaitu mekanisme secara langsung dengan menghambat pertumbuhan patogen dan mekanisme tidak langsung dengan meningkatkan kesehatan tanaman melalui penyediaan atau peningkatan keterserapan nutrisi bagi tanaman (Legein *et al.* 2020). Agens biokontrol yang memiliki berbagai mekanisme penghambatan pertumbuhan patogen akan lebih efektif dalam mengendalikan penyakit tanaman. Bakteri NGR1, CJB1, dan CJB5 secara konsisten menunjukkan kemampuan penghambatan pertumbuhan koloni *Colletotrichum* asal beberapa lokasi pertanaman. *Colletotrichum* yang dikumpulkan dari berbagai lokasi pertanaman dilaporkan memiliki tingkat virulensi dan kepekaan terhadap fungisida yang berbeda (Dewi 2022). Konsistensi suatu agens biokontrol dalam menghambat pertumbuhan patogen dan mengendalikan penyakit pada tanaman merupakan salah satu faktor penting untuk menilai keefektifannya mengendalikan penyakit tanaman (Bonaterra *et al.* 2022; Teixido *et al.* 2022).

Bakteri filosfer yang diuji pada penelitian ini dapat mengakibatkan terjadinya malformasi miselium *Colletotrichum* seperti membengkak, menggulung, dan mengeriting. Malformasi dapat pula berupa melanisasi dan lisis. Ketidaknormalan yang terjadi pada miselium *Colletotrichum* menunjukkan adanya gangguan pada dinding sel cendawan. Hifa cendawan yang mengalami malformasi dapat disebabkan oleh senyawa antibiosis yang dikeluarkan bakteri antagonis. Hifa cendawan patogen yang mengalami pembengkakan dapat disebabkan oleh enzim protease dan amilase yang dihasilkan oleh bakteri antagonis (Anjarsari *et al.* 2022). Senyawa antibiosis tersebut dapat menyebabkan membran sel pecah sehingga isi sel keluar (Soliman *et al.* 2022). Selain itu, pada penelitian ini senyawa volatil yang dikeluarkan bakteri filosfer juga menyebabkan warna koloni cendawan menjadi pudar. Gomez *et al.* (2021) melaporkan *C. gloeosporioides* mengalami pengurangan pigmentasi pada koloninya karena adanya indikasi stres akibat emisi senyawa volatil dari bakteri. Senyawa volatil dari bakteri filosfer dapat menyebabkan pengurangan bobot kering koloni cendawan *Alternaria alternata*, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum*, dan *F. verticillioides* (Azeem *et al.* 2022). Beberapa senyawa volatil juga ditemukan pada *Streptomyces* sp. yang dapat menghambat pertumbuhan dan menghambat produksi spora cendawan *C. gloeosporioides*. Hasil analisis bioasai menunjukkan keberadaan senyawa metil antranilat bertanggung jawab terhadap penghambatan pertumbuhan cendawan *C. gloeosporioides* (Gomez *et al.* 2021).

Meskipun aktivitas penghambatan yang ditimbulkan setiap galur bakteri filosfer bervariasi, setidaknya terdapat tiga galur bakteri filosfer (NGR1, CJB1, dan CJB5) yang memiliki potensi untuk dikembangkan lebih lanjut sebagai agens biokontrol karena memiliki aktivitas penghambatan yang relatif stabil terhadap semua galur *Colletotrichum* yang diuji. Bakteri yang diuji tidak hanya menghambat secara langsung pertumbuhan koloni galur *Colletotrichum*, tetapi juga dapat menghasilkan senyawa volatil yang

juga bersifat anticendawan. Kemampuan galur bakteri filosoffer tersebut perlu ditelaah lanjut untuk pengendalian penyakit tanaman, terutama keefektifannya di lapangan serta potensinya dalam memfiksasi nitrogen sehingga dapat menjadi pertimbangan pengendalian alternatif penyakit antraknosa pada cabai.

DAFTAR PUSTAKA

- Abadi VAJM, Sepehri M, Rahmani HA, Dolatabad HK, Shamsheeripour M, Khatibi B. 2021. Diversity and abundance of culturable nitrogen-fixing bacteria in the phyllosphere of maize. *Journal of Applied Microbiology*. 131(2):898–912. DOI: <https://doi.org/10.1111/jam.14975>.
- Agbavor C, Mirza BS, Wait A. 2022. The effects of phyllosphere bacteria on plant physiology and growth of soybean infected with *Pseudomonas syringae*. *Plants*. 11(9):2634. DOI: <https://doi.org/10.3390/plants11192634>.
- Akter S, Kadir J, Jurimi AS, Saud HM, Elmahdi S. 2014. Isolation and identification of antagonistic bacteria from phylloplane of rice as biocontrol agents for sheath blight. *Journal of Environmental Biology*. 35(6):1095–1100.
- Anjarsari DT, Prasetyawati ET, Wuryandari Y. 2022. Pengaruh *Bacillus* sp. terhadap malformasi hifa patogen *Phytophthora palmivora*. *Jurnal Agrohita*. 7(1):67–73.
- Azeem S, Agha SI, Jamil N, Tabassum B, Ahmed S, Raheem A, Jahan N, Ali N, Khan A. 2022. Characterization and survival of broad-spectrum biocontrol agents against phytopathogenic fungi. *Revista Argentina de Microbiología*. 54(3):233–242. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ram.2021.10.005>.
- Bhattacharjee RB, Singh A, Mukhopadhyay. 2008. Use of nitrogen-fixing bacteria as biofertilizer for non-legumes: Prospect and challenges. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 80:199–209. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00253-008-1567-2>.
- Bonaterrea A, Badosa E, Daranas N, Frances J, Rosello G, Montesinos E. 2022. Bacteria as biological control agents of plant diseases. *Microorganisms*. 10(9):1759. DOI: <https://doi.org/10.3390/microorganisms10091759>.
- Chaurasia B, Pandey A, Palni LMS, Trivedi P, Kumar B, Colvin N. 2005. Diffusible and volatile compounds produced by an antagonistic *Bacillus subtilis* strain cause structural deformations in pathogenic fungi *in vitro*. *Microbiological Research*. 160(1):75–81. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.micres.2004.09.013>.
- Dewi APK. 2022. Status Resistensi *Colletotrichum* spp. asal cabai dari Garut, Lembang, dan Sumedang terhadap Fungisida Berbahan Aktif Mankozeb, Propineb, dan Simoksamil [skripsi]. *Jatinangor (ID): Universitas Padjadjaran*.
- Furnkranz M, Wanek W, Richter A, Abell G, Rasche F, Sessitsch A. 2008. Nitrogen fixation by phyllosphere bacteria associated with higher plants and their colonizing epiphytes of tropical lowland rainforest of Costa Rica. *The ISME Journal*. 2:561–570. DOI: <https://doi.org/10.1038/ismej.2008.14>.
- Gomez AG, Ramos FA, Sinuco DC. 2021. Screening of volatile compounds from actinobacteria for the control of phytopathogen *Colletotrichum gloeosporioides*. *Biocontrol Science and Technology*. 31(10):1067–1079. DOI: <https://doi.org/10.1080/09583157.2021.1918635>.
- Haerani N, Syam'un E, Rasyid B, Haring F. 2021. Isolation and characterization of N-fixing and IAA producing rhizobacteria from two rice field agro-ecosystems in South Sulawesi, Indonesia. *Biodiversitas - Journal of Biological Diversity*. 22(5):2497–2503. DOI: <https://doi.org/10.13057/biodiv/d220506>.
- Holland MA, Davis R, Moffitt S, O'Laughlin K, Peach D, Sussan S, Wimbrow L, Tayman B. 2000. Using "Leaf Prints" to investigate a common bacterium. *The American Biology Teacher*. 62(2):128–131. DOI: <https://doi.org/10.2307/4450852>.

- Kifle MH, Laing MD. 2016. Isolation and screening of bacteria for their diazotrophic potential and their influence on growth promotion of maize seedlings in greenhouses. *Frontiers in Plant Science*. 6(1225):1–8. DOI: <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.01225>.
- Legein M, Smets W, Vandenheuvel D, Eilers T, Muysshondt B, Prinsen E, Samson R, Lebeer S. 2020. Modes of action of microbial biocontrol in the phyllosphere. *Frontiers in Microbiology*. 11:2020. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01619>.
- Prabawati A, Susilowati A, Sugiyarto. 2019. Bakteri filosfer padi sebagai kandidat agen biokontrol terhadap *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Xoo) penyebab penyakit hawar daun bakteri. *Prosiding Seminar Nasional Masyarakat Biodiversitas Indonesia*. 5(2):256–262.
- Siregar BA, Kasim NN, N Farida. 2020. Isolasi dan karakterisasi biologi bakteri endofit, filosfer dan rizosfer dari tanaman sagu (*Metroxylon sagu*). *Prosiding Seminar Nasional Biotik*. 10-11 Juli 2019. Aceh (ID): UIN Ar-Raniry Darussalam Banda Aceh. Hlm 335–340.
- Sobanbabu G, Theradiman M, Thiruvudainambi S, Vannirajan C, Rajavel S, Kalpana K, Sindhu S, Brindhadevi S. 2021. Evaluation of antagonistic activity of phylloplane bacteria against finger millet blast disease caused by *Magnaporthe grisea*. *Biological Forum—An International Journal*. 13(4):1058–1064.
- Soliman AS, Khaleil MM, Metwally RA. 2022. Evaluation of the anticendawan activity of *Bacillus amyloliquefaciens* and *B. velezensis* and characterization of the bioactive secondary metabolites produced against plant pathogenic bacteria. *Biology*. 11(10):1390. DOI: <https://doi.org/10.3390/biology11101390>.
- Soumare A, Diedhiou AG, Thuita M, Hafidi M, Ouhdouch Y, Gopalakrishnan S, Kouisni L. 2020. Exploiting biological nitrogen fixation: a route towards a sustainable agriculture. *Plants*. 9(8):1–22. DOI: <https://doi.org/10.3390/plants9081011>.
- Teixido N, Usall J, Torres R. 2022. Insight into a successful development of biocontrol agents: Production, formulation, packaging, and shelf life as key aspects. *Horticulturae*. 8(4):305. DOI: <https://doi.org/10.3390/horticulturae8040305>.
- Vacher C, Hampe A, Porte AJ, Suer U, Company S, Morris CE. 2016. The phyllosphere: microbial jungle at the plant-climate interface. *Annual Review Ecology Evolution Systematics*. 47:1–24. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev-ecolsys-121415-032238>.
- Widiantini F, Hartati F. 2020. Endophytic Bacteria origin of healthy rice plants produce anticendawan volatile compound inhibited the growth of *Pyricularia oryzae* Cav., the causal agent of rice blast disease. *Cropsaver Journal of Plant Protection*. 3(1):31–36. DOI: <https://doi.org/10.24198/cropsaver.v3i1.28121>.
- Widiantini F, Purnama A, Yulia E, Formanda D. 2016. Keefektifan oligochitosan dalam menekan pertumbuhan cendawan patogen *Rigidoporus lignosus* [(Klotzsch) Imazeki] penyebab penyakit cendawan akar putih pada tanaman cengkeh secara *in vitro*. *Jurnal Agrikultura*. 27(1):59–64. DOI: <https://doi.org/10.24198/agrikultura.v27i1.8477>.
- Zhu YG, Peng J, Chen C, Xiong C, Li S, Wang E, Liesack W. 2023. Harnessing biological nitrogen fixation in plant leaves. *Trends in Plant Science*. 28(12):1391–1405. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2023.05.009>.