

Aktivitas Bakteri Kitinolitik dari Cangkang *Perna viridis* sebagai Antifungi *Phytophthora palmivora* Penyebab Penyakit Busuk Buah Kakao (*Theobroma cacao* L.)

Debby Agustin

Ulfa Nurul Khikmah

Muhson Isoni

Anisa Maulidiya

Abstrak. Penekanan pada pertumbuhan *Phytophthora palmivora* penting untuk mengurangi Pod Rot Disease of cacao (*Theobroma cacao* L.) yang dapat merusak sektor pertanian. Beberapa bakteri memiliki aktivitas enzim chitinolytic yang berpotensi digunakan sebagai antijamur terhadap *Phytophthora palmivora*, karena dinding sel jamur terdiri dari kitin. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui bakteri kitinolitik dari cangkang perna viridis yang memiliki aktivitas enzim kitinase yang lebih tinggi, jumlah aktivitas enzim kitinase dari masing-masing isolat terpilih, dan untuk mengetahui pengaruh isolat bakteri kitinolitik dari cangkang perna viridis untuk mengurangi pertumbuhan dari *Phytophthora palmivora*. Bakteri diisolasi dari cangkang *Perna viridis* di Pantai Depok, Kretek, Bantul, Yogyakarta. Penelitian ini merupakan penelitian eksploratif yang mencakup karakterisasi bakteri dan penelitian eksperimental yang meliputi uji antagonis bakteri kitinolitik terhadap *Phytophthora palmivora*. Bakteri kitinolitik diisolasi menggunakan media agar kitin selektif dengan metode pour plate dan kemudian dilakukan penyaringan terhadap isolat yang memiliki aktivitas enzim kitinase dengan mengukur aktivitas enzim dari masing-masing isolat bakteri dengan metode spektrofotometri. Isolat bakteri yang dipilih dicirikan oleh karakter makroskopik, mikroskopis dan fisiologis. Bakteri yang telah dipilih diuji kemampuannya untuk mengurangi pertumbuhan *Phytophthora palmivora* dengan metode modifikasi Kirby Bauer. Hasil penelitian menunjukkan bahwa ada 10 isolat yang memiliki aktivitas enzim kitinase dimana dua isolat terpilih memiliki aktivitas enzim kitinase yang lebih tinggi. Ada 7D dan 6B isolat. Isolat 7D memiliki 1,258 u / ml aktivitas enzim kitinase dan mengisolasi 6B memiliki aktivitas enzim kitinase 1,212 u / ml. Hasil uji antagonis bakteri kitinolitik pada pertumbuhan *Phytophthora palmivora* menunjukkan bahwa kedua isolat bakteri berpotensi sebagai antijamur *Phytophthora palmivora* dan menunjukkan efek nyata dalam menghambat pertumbuhan *Phytophthora palmivora* dengan nilai signifikansi <0,05.

Kata kunci: Bakteri Chitinolytic, *Perna viridis*, *Phytophthora palmivora*

Pendahuluan

Kakao (*Theobroma cacao* L.) merupakan komoditas pertanian bernilai ekonomi tinggi di Indonesia. Komoditas biji kakao menduduki tempat sejajar dengan komoditas perkebunan lainnya, seperti kelapa sawit dan karet (Tumpal, dkk., 2012). Indonesia sebagai produsen kakao ketiga di dunia mempunyai kontribusi $\pm 12\%$ terhadap produksi dunia. Namun demikian, berdasarkan data ICCO (*International Cacao and Coffee Organization*), pada tahun 2014 Indonesia menghasilkan 425.000-ton kakao, data tersebut menunjukkan penurunan dibandingkan tahun 2009 yaitu 550.000 ton. Penurunan produktivitas kakao baik dari segi kuantitas maupun kualitasnya dipengaruhi oleh beberapa faktor salah satunya oleh hama. Menurut Maukar dan Ferdiles (2013), hama yang sering menyerang kakao adalah jamur. Salah satu penyakit yang disebabkan oleh

BIONATURE

ISSN 1411 – 4720

Abstract. The emphasis on the growth of *Phytophthora palmivora* was important in order to reduce Pod Rot Disease of cacao (*Theobroma cacao* L.) which could harm agriculture sector. Some bacteria had chitinolytic enzyme activity that is potentially used as an antifungal against *Phytophthora palmivora*, because the cell wall of the fungi composed of chitin. The purpose of this research was to know chitinolytic bacteria from *Perna viridis* shell which had higher activity of chitinase enzyme, the amount of chitinase enzyme activity of each selected isolate, and to know the effect of chitinolytic bacterial isolates from *Perna viridis* shell to reduce the growth of *Phytophthora palmivora*. The bacteria were isolated from *Perna viridis* shell at Depok Beach, Kretek, Bantul, Yogyakarta. This research was an explorative research which include bacterial characterization and experimental research which include antagonistic test of chitinolytic bacteria against *Phytophthora palmivora*. The chitinolytic bacteria was isolated using selective chitin agar medium by pour plate method and then screening the isolates that had chitinase enzyme activity by measuring the enzyme activity of each bacterial isolates by spectrophotometric method. Selected bacterial isolates were characterized by macroscopic, microscopic and physiological characters. The bacteria that had been selected tested for their ability to reduce the growth of *Phytophthora palmivora* by Kirby Bauer modification method. The result showed that there were 10 isolates that had chitinase enzyme activity which two selected isolates had the higher chitinase enzyme activity. There were 7D and 6B isolates. The isolate 7D had 1,258 u/ml chitinase enzyme activity and isolate 6B had 1,212 u/ml chitinase enzyme activity. The result of chitinolytic bacterial antagonist test on *Phytophthora palmivora* growth showed that both bacterial isolates were potential to antifungal *Phytophthora palmivora* and showed a real effect in inhibiting the growth of *Phytophthora palmivora* with significance value < 0,05.

Keywords: Chitinolytic Bacteria, *Perna viridis*, *Phytophthora palmivora*.

Debby Agustin

Universitas Negeri Yogyakarta

Ulfa Nurul Khikmah

Universitas Negeri Yogyakarta

Muhson Isoni

Universitas Negeri Yogyakarta

Anisa Maulidiya

Universitas Negeri Yogyakarta

jamur adalah penyakit busuk buah yang disebabkan oleh *Phytophthora palmivora* (Rejeki, 2012). Intensitas serangan *P. palmivora* dapat mencapai 85% pada daerah yang mempunyai curah hujan tinggi, dan menimbulkan kerugian lebih 20-40%, dan bahkan menyebabkan kematian pohon kakao tersebut 10% per tahun (Maukar & Ferdiles, 2013). Besar kerugian akibat penyakit ini mencapai 20-30% dan kematian tanaman 10% pertahun (ICCO, 2012). Salah satu alternatif untuk mengurangi kerugian akibat penyakit busuk buah kakao adalah dengan memanfaatkan agen pengendali hayati, salah satunya menggunakan bakteri kitinolitik. Bakteri kitinolitik dapat didapatkan dari eksoskeleton invertebrate. Bakteri kitinolitik merupakan bakteri yang menghasilkan enzim kitinase. Menurut Neuhaus (1999) dalam Rita dan Widi (2012), enzim ini menghidrolisis ikatan β -1,4 antar N-Asetilglukosamina pada kitin. Kitin merupakan bahan organik utama yang terdapat pada kelompok hewan crustaceae, insekta, fungi, mollusca, dan arthropoda. Cangkang kerang hijau (*Perna viridis*) sangat melimpah keberadaannya di Indonesia. Cangkang *Perna viridis* mengandung kitin, selain itu kitin merupakan komponen penyusun dinding sel fungi (Webster et al., 2007). Enzim kitinase yang berperan menghancurkan dinding sel jamur tersusun oleh senyawa kitin. Oleh karena itu, kitinase dikenal sebagai salah satu protein anti jamur (Wang et al., 2005).

Berdasarkan hal tersebut, maka penelitian ini dilakukan untuk mengetahui aktivitas bakteri kitinolitik dari cangkang *Perna viridis* sebagai antifungi *Phytophthora palmivora* penyebab penyakit busuk buah kakao (*Theobroma cacao* L.) secara *in vitro*. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui genus bakteri kitinolitik dari cangkang *perna viridis* yang memiliki aktifitas enzim kitinase tertinggi, mengetahui besarnya aktifitas enzim kitinase dari setiap isolat bakteri terpilih, serta mengetahui pengaruh isolat bakteri kitinolitik dari cangkang *Perna viridis* dalam menekan pertumbuhan *Phytophthora palmivora*

Metode Penelitian

Waktu dan Tempat Penelitian

Tempat penelitian ini dilakukan di laboratorium Mikrobiologi FMIPA UNY. Waktu penelitian ini dilakukan pada bulan maret hingga juli 2017.

Persiapan Alat dan Media Isolasi Bakteri

Peralatan yang akan digunakan dalam penelitian disterilisasi menggunakan autoklaf selama 20 menit pada suhu 121°C.

*Persiapan Kapang *Phytophthora palmivora**

Isolat kapang *Phytophthora palmivora* diperoleh dari Lab. Mikologi Fakultas Pertanian UGM. Kemudian isolat tersebut diremajakan dengan menanam ulang pada media *Potato Dextrose Agar* (PDA).

Pembuatan Media Kitin Agar

Semua bahan untuk pembuatan media kitin agar dicampur lalu ditambahkan akuades sampai volumenya menjadi 500 mL, kemudian pH diatur sampai mencapai 6,8 dengan menambahkan NaOH, lalu media disterilisasi dengan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit.

Isolasi Bakteri dari ekstrak Cangkang *Perna viridis*

Sampel ekstrak cangkang *Perna viridis* diisolasi dengan membuat satu seri pengenceran yaitu dari 10^{-1} hingga 10^{-8} . Kemudian ekstrak tersebut diencerkan pada pengenceran 10^{-4} hingga 10^{-8} pada media *Kitin Agar* dengan menggunakan metode *pour plate*. Lalu diinkubasi dalam suhu 37°C selama 24-48 jam hingga bakteri tumbuh.

Pemurnian Isolat Bakteri Kitinolitik

Bakteri yang telah tumbuh pada media Kitin agar dipindahkan ke media kitin agar yang baru untuk mendapat kultur murni. Pemurnian bakteri dilakukan dengan menggunakan metode *streak plate*, bakteri ditanam pada Kitin agar di petridish. Lalu diinkubasi dalam suhu 37°C selama 24- 48 jam hingga bakteri tumbuh.

Screening Isolat Bakteri Kitinolitik

Dua lup isolat bakteri dimasukkan ke dalam 20 ml NB yang mengandung 0,5% koloidal kitin kemudian diinkubasi pada *shaker* dengan suhu 37°C dan kecepatan 100 rpm selama 24 jam. Isolat disentrifuge dengan kecepatan 4.000 rpm selama 30 menit untuk mendapatkan enzim kitinase ekstrak kasar di dalam supernatan. Produk N-asetil glukosamin (GlnAc) yang terbentuk diukur. Penentuannya yaitu dengan ditambahkan sebanyak 0,15 ml enzim kasar (supernatan bebas sel) ke dalam campuran 0,15 ml substrat kitin 1% dan 0,3 ml larutan buffer pH 7. Campuran dihomogenkan dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 60 menit kemudian dipanaskan pada suhu 100°C selama 3 menit. Selanjutnya, larutan control dibuat dengan menambahkan 0,15 ml enzim kasar setelah dipanaskan pada suhu 100°C selama 3 menit. Larutan disentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm selama 20 menit. Jumlah N-Asetilglukosamin dihitung dengan mencampurkan 0,5 ml supernatan dengan 0,5 ml akuades dan 1 ml pereaksi Schale. Selanjutnya, adsorbansi larutan diukur pada panjang gelombang 420 nm. Konsentrasi N-Asetilglukosamin dihitung berdasarkan kurva standar N-Asetilglukosamin. Isolat dengan aktifitas enzim tertinggi dipilih dan digunakan sebagai sampel pengujian serta aktifitas enzim dari isolat terpilih diukur berdasarkan fase kehidupan bakteri.

Karakterisasi Isolat Bakteri Kitinolitik

Karakterisasi koloni bakteri dilakukan pada isolat terpilih dan kemudian dikarakterisasi berdasarkan pengamatan makroskopis dan mikroskopis. Pengamatan makroskopis meliputi warna koloni, tepi koloni, elevasi koloni, dan bentuk koloni. Pengamatan secara mikroskopis meliputi bentuk sel dan susunan sel. Dilakukan pula pengecatan gram, serta uji biokimiawi.

Identifikasi bakteri kitinolitik

Identifikasi bakteri kitinolitik dilakukan menggunakan metode *Profile Matching* melalui *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology 9th Edition*.

Uji Antagonis Bakteri Kitinolitik terhadap Kapang *Phytophthora palmivora*

Satu ose biakan kapang *Phytophthora palmivora* diinokulasikan pada media PDB (*Potato Dextrose Broth*), kemudian diinkubasi dalam suhu ruang selama 24 jam dengan perlakuan *shaker* berkecepatan 150 rpm. Kapang yang telah tumbuh kemudian diinokulasikan pada media PDA (*Potato Dextrose Agar*) dengan teknik *spread plate*. Isolat bakteri yang telah ditumbuhkan pada media NB (*Nutrient Broth*) dan memiliki kepadatan sel mencapai angka 1 disentrifuge untuk memperoleh enzim kasar berupa supernatan dengan cara disentrifuse dengan kecepatan 10.000

rpm selama 15 menit. Kertas cakram steril direndam pada supernatan bakteri sebanyak 3 ml selama 15 menit. Kertas cakram kemudian diletakkan pada media PDA yang telah diinokulasikan biakan *Phytophthora palmivora*. Sampel diinkubasikan pada suhu ruang selama 24 jam. Diameter zona bening diukur menggunakan jangka sorong untuk mengetahui besarnya daya hambat bakteri terhadap kapang.

Teknik Analisis Data

Identifikasi bakteri penghasil enzim kitinase dilakukan menggunakan metode *Profile Matching* yang ditelusuri melalui *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology 9th Edition*.

Hasil dan Pembahasan

Isolasi bakteri kitinolitik dari cangkang *Perna viridis* yang telah dilakukan menghasilkan 10 isolat bakteri kitinolitik. Kemudian dilakukan skrining bakteri penghasil enzim kitinase. Berdasarkan skrining yang dilakukan, seluruh isolat bakteri tergolong bakteri kitinolitik. Hal ini dibuktikan dengan tumbuhnya seluruh bakteri pada media selektif kitin agar. Hasil perhitungan dari aktifitas kitinase dapat dilihat pada table 1.

Tabel 1. Data perhitungan aktifitas kitinase.

Isolat	OD		[GlnNac] ($\mu\text{g/ml}$)		Aktifitas (u/ml)
	S	K	S	K	
5A	0.064	0.029	80172. 41	36328.13	0.33035
5B	0.044	0.011	211363 .6	52840.91	1.19442
6C	0.051	0.012	193750	45588.24	1.11635
7C	0.057	0.058	40086. 21	40789.47	-0.0053
8C	0.051	0.06	38750	45588.24	-0.0515
7A	0.057	0.053	43867. 92	40789.47	0.02319
7D	0.087	0.012	193750	26724.14	1.25848
8A	0.053	0.065	35769. 23	43867.92	-0.0610
6B	0.046	0.011	211363 .6	50543.48	1.21173
8B	0.054	0.069	33695. 65	43055.56	-0.0705

Dari 10 isolat didapatkan 5 isolat terpilih yang menghasilkan enzim kitinase dengan efektivitas tertinggi. Kelima isolat bakteri tersebut diantaranya adalah isolat dengan kode 5A, 5B, 6B, 6C, 7D.

Karakterisasi dilakukan dengan melakukan beberapa uji. Karakterisasi dilakukan untuk mengetahui sifat-sifat tertentu dari isolat bakteri yang didapatkan sehingga isolat tersebut dapat diidentifikasi genusnya. Diantaranya adalah uji fruktosa, galaktosa, laktisa, glukosa, maltosa, uji motilitas, uji produksi H_2S , serta uji katalase. Selain itu juga dilakukan pengecatan gram pada bakteri. Karakterisasi dilakukan pada lima isolat bakteri kitinolitik terpilih yang didapatkan dari cangkang kerang hijau (*Perna viridis*). Kelima isolat bakteri tersebut diantaranya adalah isolat

dengan kode 5A, 5B, 6B, 6C, 7D. Berikut adalah hasil dari karakterisasi biokemis isolat bakteri kitinolitik.

Tabel 2. Data karakterisasi biokemis isolat bakteri kitinolitik.

Uji	Kode Isolat				
	5A	5B	6B	6C	7D
Fruktosa	+	+	+	+	+
Galaktosa	+	+	+	+	+
Laktosa	+	+	+	+	+
Glukosa	+	+	+	+	+
Maltosa	+	+	+	+	+
SIM	-	-	-	-	-
NA	+	+	+	+	+
Katalase	-	-	+	-	+
Gram	-	-	-	-	-
Bentuk	Coccus	Strepto coccus	Coccus	Bacillus	Coccus

Pada uji fermentasi karbohidrat yaitu fruktosa, galaktosa, laktosa, glukosa, maltosa, kelima isolat bakteri menunjukkan hasil positif, dibuktikan dengan terjadinya perubahan warna media dari orange menjadi kuning serta terbentuknya gelembung dalam tabung durham. Hal ini berarti bahwa kelima isolat bakteri kitinolitik tersebut dapat memfermentasi karbohidrat jenis fruktosa, galaktosa, laktosa, glukosa, dan maltosa.

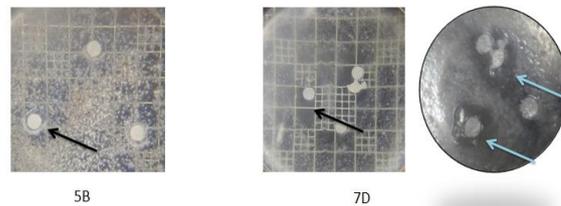
Kelima isolat bakteri kitinolitik terpilih diuji kemampuan menghasilkan H_2S dengan media SIM. Semua isolat bakteri kitinolitik terpilih negatif terhadap uji ini. Ditandai dengan tidak berubahnya warna media SIM menjadi hitam. Hal ini berarti bahwa kesemua isolat bakteri kitinolitik terpilih tidak mampu menghasilkan H_2S .

Uji motilitas terhadap kelima isolat bakteri kitinolitik menunjukkan hasil positif uji motilitas yang ditandai dengan tumbuhnya bakteri tidak hanya pada bekas tusukan, melainkan menyebar pada daerah media yang lainnya. Sehingga dapat dikatakan bahwa isolat bakteri yang ditusukkan tersebut dapat bergerak atau motil. Pengecatan gram dilakukan untuk mengetahui jenis gram sel bakteri dan bentuk sel bakteri. Berdasarkan pengamatan yang telah dilakukan didapatkan bahwa kelima isolat bakteri kitinolitik bersifat gram negatif, hal ini ditandai dengan tercatnya sel bakteri oleh zat warna safranin sehingga sel bakteri berwarna merah. Selain dapat mengetahui jenis gram pada sel bakteri, pengecatan gram juga dapat digunakan untuk mengetahui bentuk sel bakteri. Berdasarkan pengamatan yang dilakukan dengan menggunakan mikroskop perbesaran 40x10 kali terdapat perbedaan bentuk sel bakteri yang diisolasi dari cangkang kerang hijau (*Perna viridis*). Isolat dengan kode 5A, 6B, dan 7D memiliki bentuk sel coccus atau bulat. Isolat bakteri 5B memiliki bentuk isolat streptococcus, sedangkan isolat bakteri dengan kode 6C memiliki bentuk bacillus atau batang.

Uji katalase juga dilakukan pada kelima isolat bakteri kitinolitik terpilih. Isolat bakteri yang positif dapat menghasilkan enzim katalase untuk menghidrolisis H_2O_2 pada uji katalase diantaranya adalah 7D dan 6B. Sedangkan isolat lainnya yaitu 5A, 5B, dan 6C, memberikan hasil yang negatif terhadap uji katalase yang ditandai dengan tidak adanya gelembung udara yang dihasilkan oleh sampel saat ditetesi H_2O_2 .

Setelah dilakukan karakterisasi, selanjutnya isolate tersebut diidentifikasi menggunakan metode *Profile Matching* melalui *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology 9th Edition*. Berdasarkan identifikasi yang dilakukan maka bakteri kitinolitik tersebut diduga merupakan genus *Acinetobacter*.

Kemudian selanjutnya dilakukan uji antagonis untuk mengetahui kemampuan enzim kitinase dalam menghambat pertumbuhan kapang *Phytophthora palmivora* secara in vitro dengan metode modifikasi Kirby-Bauer, yaitu dengan menanamkan kertas cakram yang telah direndam dalam enzim kitinase kasar selama 15 menit ke dalam media PDA yang telah diinokulasikan *Phytophthora palmivora* secara spread plate.



Gambar 1. Zona hambat yang terbentuk pada isolat 5B dan 7D.

Berdasarkan hasil pengamatan didapatkan dua isolat yang menunjukkan zona hambat terbesar, yaitu isolat 5B dan 7D. Zona hambat tersebut berupa daerah jernih disekitar kertas cakram yang telah direndam pada enzim kitinase. Zona jernih tersebut menunjukkan bahwa enzim kitinase dari bakteri kitinolitik kode 5B dan 7D mampu menghambat pertumbuhan kapang *Phytophthora palmivora*. Sehingga bakteri kitinolitik dari cangkang *Perna viridis* berpotensi menjadi antifungi *Phytophthora palmivora* penyebab busuk buah kakao.

Kesimpulan

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan dapat disimpulkan bahwa Genus bakteri kitinolitik dari cangkang *Perna viridis* yang memiliki aktifitas enzim kitinase tertinggi diduga merupakan genus *Acinetobacter*. Isolat bakteri yang memiliki aktifitas enzim kitinase tertinggi merupakan isolat 5B dan 7D. Isolat bakteri kitinolitik dari cangkang *Perna viridis* yang telah diisolasi dapat menekan pertumbuhan *Phytophthora palmivora*.

Referensi

- Harni., Amaria, W. (2012). Penyakit Bakteri Kitinolitik untuk Pengendalian Penyakit Busuk Pangkal Batang Lada (*Phytophthora capsici*). *Buletin RISTR*. 3 (1).
- ICCO (International Cocoa Organization). (2012). Pest and Disease. <http://www.icco.org/about-cocoa/pest-a-diseases.html>. 31 Oktober 2016.
- Marganof. (2003). *Potensi Limbah Udang sebagai Penyerap Logam Berat*. Bogor: Institut Pertanian Bogor.
- Maukar & Ferdiles, G. (2013). *Faktor-Faktor yang Mempengaruhi Produktifitas Komuditi Kakao yang Siap Diekspor Disepanjang Rantai Nilai*. Salatiga: Universitas Kristen Satya Wacana.
- Wang S, Wu J, Rao P, Ng TB & Ye X. (2005). A Chitinase With Antifungal Activity From The Mung Bean. *Protein Expr. Purif.* 40, 230-236.
- Webster, J & Weber, R. (2007). *Introduction to Fungi*. Edisi 3. Cambridge: Cambridge University Press.

Debby Agustin	Universitas Negeri Yogyakarta, Jl. Colombo No. 1, Yogyakarta, Indonesia E-mail: debbyaguztin3raksa@gmail.com
Ulfa Nurul Khikmah	Universitas Negeri Yogyakarta, Jl. Colombo No. 1, Yogyakarta, Indonesia E-mail: debbyaguztin3raksa@gmail.com
Muhson Isoni	Universitas Negeri Yogyakarta, Jl. Colombo No. 1, Yogyakarta, Indonesia E-mail: debbyaguztin3raksa@gmail.com
Anisa Maulidiya	Universitas Negeri Yogyakarta, Jl. Colombo No. 1, Yogyakarta, Indonesia E-mail: debbyaguztin3raksa@gmail.com