



Pengaruh Mikroba Antagonis dari Buah Jeruk terhadap Pertumbuhan Jamur Patogen *Geotrichum* sp. Penyebab Penyakit Busuk Asam pada Buah Lemon (*Citrus limon* L. Burm)

Ni Komang Sri Bawantari*, Dewa Ngurah Suprpta, Gusti Ngurah Alit Susanta Wirya

Program Studi Magister Bioteknologi Pertanian Fakultas Pertanian Universitas Udayana,
Jl. PB. Sudirman Denpasar 80321, Bali, Indonesia

*Corresponding author: sribawantari72@gmail.com

ABSTRACT

Effect of Antagonistic Microbes from Citrus Fruit on the Growth of the Pathogenic Fungus *Geotrichum* sp. the Cause of Sour Rot Disease in Lemon Fruit (*Citrus limon* L. Burm). The pathogenic fungus *Geotrichum citri-aurantii* is a yeast from the Saccharomycetes class which can infect several types of agricultural plants. This fungus is very detrimental to the productivity of lemons (*Citrus limon* L. Burn). The use of biological agents is an alternative method recommended for controlling plant diseases. Disease control using biological agents is selective and good for the ecosystem. The aim of this research was to determine the effect of antagonistic microbes from citrus fruit on the growth of the pathogenic fungus *G. citri-aurantii* which causes sour rot disease on lemons. Research was carried out *in vitro* and *in vivo* in the laboratory as well as molecular identification at Sience Genetics. The results of the research show that the fungal pathogen that infects lemon fruit and causes sour rot disease is the fungus *G. citri-aurantii*. The results of molecular identification of antagonistic microbial isolates from Lumajang oranges (Lu1) showed that the microbes were *Bacillus velezensis*. Antagonistic microbial treatment significantly ($P < 0.05$) inhibited the growth of *G. citri-aurantii* fungal colonies on potato dextrose agar (PDA) media. Treatment with *B. velezensis* Lu1 was able to inhibit the growth of the fungus *G. citri-aurantii* with an inhibitory percentage of 71.20% when compared with the control when observed 7 days after inoculation. Treatment of *B. velezensis* Lu1 affected the biomass of the fungus *G. citri-aurantii*. In this study, treatment with filtrate of *B. velezensis* isolate Lu1 at a concentration of 40% was able to suppress the growth of *G. citri-aurantii* with an inhibitory percentage of 50.89% when observed 7 days after inoculation. Treatment with inoculation of *B. velezensis* Lu1 suspension before treatment of suspension of *G. citri-aurantii* *in vivo* on lemon fruit resuklted in an inhibitory activity of 45.27%. Further research is needed to determine the secondary metabolite compounds produced by *B. velezensis* Lu1 using the GC-MS method.

Keywords: *Geotrichum citri-aurantii*, *Bacillus velezensis*, Sour rot

PENDAHULUAN

Lemon (*Citrus limon* L. Burm) merupakan tanaman dengan bentuk pohon

yang memiliki buah berwarna kuning dari famili Rutaceae. Buah lemon memiliki kandungan nutrisi dan dapat digunakan sebagai bahan obat. Permintaan pasar

terhadap buah lemon terus mengalami peningkatan. Hal ini dikarenakan semakin banyaknya pemanfaatan buah lemon baik sebagai konsumsi maupun dalam dunia industri. Buah lemon dipercaya kaya akan manfaat dapat digunakan sebagai obat tradisional *Coronavirus Disease 2019* (Covid-19) (Kemenkes, 2020). Permintaan pasar yang meningkat terhadap buah lemon tidak dapat dipenuhi oleh produksi lemon lokal. Permintaan pasar yang meningkat terhadap buah lemon tidak dapat dipenuhi oleh produksi lemon lokal. Selain karena produksi buah lemon yang masih tergolong rendah, terdapat pengaruh organisme penggangu tanaman (OPT) yang dapat menurunkan kualitas buah lemon. Jamur patogen yang dapat menyebabkan penurunan kualitas buah lemon adalah *Geotrichum candidum* var *citri-aurantii*, *Penicilium* sp., dan *Coletotrichum* sp. *Geotrichum citri-aurantii* dapat menginfeksi jenis jeruk-jerukan. Menurut Montiel *et al.* (2010), bahwa *Geotrichum citri-aurantii* (Ferrari) (sinonim *G. candidum*) dapat menyebabkan kerugian pascapanen jeruk lemon, mandarin dan jeruk manis (*Citrus sinensis*) di seluruh dunia. Gejala yang diamati pada buah lemon akibat serangan patogen *G. citri-aurantii* adalah berupa busuk lunak pada bagian buah, yang kemudian menyebar ke sebagian besar buah yang mana mengeluarkan aroma yang khas seperti bau asam.

Pengendalian penyakit busuk asam biasanya dilakukan dengan pengaplikasian fungisida kimia sintetik. Patogen *G. citri-aurantii* tidak dapat dihambat pertumbuhannya dengan imazalin dan thiabendazole yang merupakan fungisida kimia sintetik yang efektif mengendalikan kapang hijau dan kapang biru (Droby *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2018). Penggunaan pestisida secara terus-menerus dikhawatirkan dapat menyebabkan terjadinya resistensi pada patogen. Pengendalian yang ramah lingkungan dan aman untuk kesehatan dapat

diterapkan dengan memanfaatkan agen hayati berupa mikroba antagonis. Mikroba yang telah dilaporkan mampu mengendalikan jamur patogen *G. citri-aurantii* yaitu dengan mekanisme antibiosis yang dihasilkan oleh *Bacillus subtilis* (Medzabal *et al.*, 2011). Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh mikroba antagonis dari buah jeruk terhadap pertumbuhan jamur patogen *Geotrichum* sp. penyebab penyakit busuk asam pada buah lemon (*Citrus limon* L. Burm).

BAHAN DAN METODE

Penelitian dilakukan dari bulan Juni 2023 sampai November 2023 di Laboratorium Biopestisida Fakultas Pertanian Universitas Udayana. Identifikasi molekuler dari isolat jamur patogen dan bakteri antagonis dilakukan di Perusahaan Genetika Science Indonesia.

Isolasi Jamur Patogen

Jamur patogen diisolasi dari buah lemon yang menunjukkan gejala busuk asam. Potongan buah lemon (ukuran sekitar 1 cm²) yang menunjukkan gejala (ada bagian yang sehat dan bagian dengan gejala) disterilisasi permukaan dengan alkohol 70%. Selanjutnya dibilas dengan air suling steril sebanyak 3 kali. Potongan buah ini selanjutnya ditumbuhkan pada media PDA dan diinkubasi selama 3 hari dalam tempat gelap pada suhu kamar. Jamur yang tumbuh selanjutnya diambil pada bagian pinggir koloni dengan *cork borer*, selanjutnya dipindahkan ke media PDA baru. Isolat jamur yang diperoleh kemudian diinokulasikan pada buah lemon untuk menguji virulensinya pada buah lemon sehat. Buah lemon sehat yang diperoleh dari supermarket, dicuci permukaan dengan air mengalir, selanjutnya disterilisasi permukaan dengan alkohol% dan dibilas 3 kali dengan air steril. Buah ini kemudian dilukai dengan

menusukkan jarum steril pada 3 bagian buah, dan selanjutnya diinokulasi dengan isolat jamur. Biakan ini diinkubasi dalam ruang gelap pada suhu kamar selama 3 hari. Gejala yang muncul dari buah ini dicocokkan dengan gejala awal, dan jika sesuai, maka dilakukan re-isolasi dari buah ini, dan dilakukan inokulasi kembali pada buah lemon, dan jika gejala yang ditimbulkan sama dengan gejala pertama, maka isolat tersebut merupakan patogen penyebab penyakit busuk asam, dan isolat tersebut digunakan untuk pengujian selanjutnya (Nasahi *et al.*, 2021).

Isolasi mikroba antagonis

Untuk mendapatkan mikroba antagonis, isolasi dilakukan dari permukaan buah jeruk siem, jeruk spontan, jeruk lumajang, jeruk afourer, jeruk sunkis, jeruk nipis dan lemon. Buah jeruk yang diperoleh dari pasar dibawa ke laboratorium, selanjutnya diambil bagian kulitnya dan dimasukkan ke dalam Erlenmeyer yang sudah diisi dengan air steril. Erlenmeyer ini kemudian dimasukkan ke dalam shaker selama 24 jam agar mikroba yang ada pada permukaan kulit buah jeruk terlepas dan ada di dalam air (filtrat). Isolasi dilakukan dengan menumbuhkan sebanyak 0,2 ml filtrat pada media nutrisi agar (NA) dan PDA.

Seleksi Mikroba Antagonis untuk Menghambat Jamur Patogen

Isolat mikroba ditumbuhkan berdekatan dengan koloni jamur patogen pada cawan Petri dengan menggunakan media PDA. Jika dalam jarak 1 cm koloni jamur tumbuh abnormal dan terdapat zona hambatan, diduga mikroba tersebut memiliki aktivitas antijamur (Prahcahyo *et al.*, 2014). Mikroba yang memiliki aktivitas antijamur kemudian diisolasi untuk dilakukan uji selanjutnya.

Uji Daya Hambat Mikroba Antagonis terhadap Pertumbuhan Jamur Patogen Secara *in vitro*

Pengujian daya hambat mikroba antagonis terhadap pertumbuhan jamur *G. citri-aurantii* secara *in vitro* ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan 8 (delapan) perlakuan yaitu 7 (tujuh) isolat bakteri antagonis dan satu Kontrol. Masing-masing perlakuan diulang sebanyak 3 kali sehingga terdapat 32 unit percobaan yang terdiri atas 3 (tiga) biakan pada cawan Petri. Uji daya hambat mikroba antagonis dilakukan dengan cara menumbuhkan jamur *G. citri-aurantii* di salah satu sisi cawan Petri yang telah berisikan media PDA kemudian mikroba antagonis ditumbuhkan pada sisi satunya berhadapan dengan jamur patogen. Pertumbuhan jamur *G. citri-aurantii* ditentukan dengan mengukur luas koloni jamur patogen menggunakan kertas milimeter blok. Pengamatan dilakukan pada hari ke-6 untuk menentukan persentase daya hambat mikroba antagonis terhadap pertumbuhan jamur *G. Citri-aurantii* (Khalimi dan Wirya, 2009).

Setelah dilakukan pengamatan diperoleh nilai daya hambat mikroba antagonis terhadap pertumbuhan jamur *G. citri-aurantii*. Mikroba antagonis yang memiliki daya hambat tertinggi digunakan untuk pengujian selanjutnya.

Identifikasi jamur patogen secara morfologi dan molekuler

Identifikasi jamur patogen secara morfologi dilakukan secara makroskopis dan mikroskopis. Pengamatan makroskopis dilakukan dengan melihat bentuk dan warna koloni jamur pada cawan Petri. Sementara itu pengamatan secara mikroskopis dilakukan di bawah mikroskop untuk mengamati bentuk spora dan hifa jamur patogen. Hasil pengamatan morfologi kemudian dicocokkan dengan sumber yang tersedia.

Identifikasi molekuler pada jamur patogen dilaksanakan dengan metode sebagai berikut:

1. Isolasi DNA jamur patogen
2. Elektroforesis gel agarose
3. Amplifikasi dengan PCR

Amplifikasi PCR dilakukan dengan menggunakan *universal primer* untuk 18S. *Primer* tersebut adalah *primer forward* NS-1 (5'-GTA GTC ATA TGC TTG TCT C-3') dengan berat molekul 5785 dan *primer reverse* NS-8 (5'-TCC GCA CGT TCA CCT ACG GA-3') dengan berat molekul 6078. Sementara itu total volume reaksi yang digunakan adalah 40 µl dengan komponen yang berisis 10 x *buffer* PCR (4 µl), dNTP (4 µl), *primer forward* (2 µl), *primer reverse* (2 µl), DNA *template* (2 µl), *Taq polymerase* (1 µl), *distilled water* (25 µl) (Hidayah, 2012; Muthamainah, 2013).

4. Elektroforesis gel agarose
5. Sekuensing DNA

Produk PCR dari gen 18S rRNA kemudian dianalisis untuk mengetahui susunan nukleotida dari fragmen DNA yang didapatkan.

6. Analisis Data dengan Bioinformatika

Sikuen gen 18S rRNA yang telah didapatkan kemudian dibandingkan dengan sikuen DNA yang berasal dari GenBank (NCBI) menggunakan *software* BLASTn, setelah itu dilakukan proses *alignment* dengan menggunakan *software* Clustal X. Pohon filogenik kemudian dibentuk dengan menggunakan *software* MEGA.

Identifikasi Molekuler Mikroba Antagonis

Bakteri yang digunakan pada penelitian ini adalah bakteri yang memiliki daya hambat tertinggi. Langkah-langkah dari identifikasi molekuler adalah sebagai berikut:

1. Ekstraksi DNA total bakteri dengan pemurnian GeneJET Genomic DNAKit Thermo.
2. Amplifikasi DNA dengan PCR dan elektroforesis

Gen 16S rRNA diaplifikasi dengan PCR menggunakan primer forward 16S 63F (5'-CAG GCC TAA CAC ATG CAA GTC-3') dan 1387R (5'-GGG CGG WGT GTA CAA GGC-3'). Reaksi tersebut menggunakan SENSOQUEST Labcycler dan master mix (Kappa Biosystem) pada 94°C selama 5 menit, selanjutnya 30 siklus pada 94°C selama 30 detik, 55°C selama 45 detik dan 72°C selama 2 menit dan terakhir 72°C selama 10 menit. hasil PCR divisualisasikan pada gel agarose 1% dan dielektroporesis pada tris- asetic edta buffer (TAE), diwarnai dengan non-toxic fluorescent dye (PeqGREEN). DNA diamplifikasi pada ± 1300 bp.

3. Sekuensing 16S rRNA dan analisis sekuen DNA.
- 4.

Uji daya hambat mikroba antagonis terhadap biomassa jamur *G. citri-aurantii*

Pertama-tama dibuat suspensi jamur *G. citri-aurantii* di dalam air steril. Sebanyak 1 ml suspensi jamur dimasukkan ke dalam PDB di dalam Erlenmeyer. Kegiatan ini dilakukan di dalam *laminar airflow cabinet*. Untuk perlakuan, sebanyak 1 ml suspensi bakteri antagonis ditambahkan ke dalam biakan yang sudah disiapkan tadi. Biakan ini diinkubasi pada suhu kamar ($28 \pm 2^\circ\text{C}$) selama 14 hari. Biomassa jamur selanjutnya disaring menggunakan kertas saring Whatman No.1 dan biomassa selanjutnya diambil dengan pinset dipindahkan pada aluminium foil (ditimbang beratnya terlebih dulu) untuk dikeringkan. Pengeringan dilakukan pada oven dengan suhu 70°C sampai berat konstan.

Uji Daya Hambat Filtrat Mikroba Antagonis terhadap Pertumbuhan Koloni Jamur *G. citri-aurantii* secara *in vitro*

Mikroba antagonis dibiakkan pada media *Potato dextrose broth* (PDB). Media PDB terdiri dari 200 g kentang, dan 20 g *dextrose*. Semua bahan tersebut di *fill up*

menjadi 1000 ml dan disterilisasi menggunakan *autoclave* pada suhu 121°C dengan tekanan 1,5 atm selama 20 menit. mikroba antagonis yang digunakan sebagai perlakuan dibiakkan pada media PDB. Setelah media mencapai suhu ruang, maka masing-masing media ditambahkan 1 ml suspensi bakteri. Kemudian kultur bakteri dikocok menggunakan *shaker* dengan kecepatan 100 rpm selama 30 hari. Selanjutnya, kultur disentrifugasi dengan kecepatan 4.500 rpm selama 15 menit. Supernatan disaring dengan membrane millipore 0,45 µm (Nihon Millipore Ltd. Yonezawa). Setelah itu, filtrat kultur diuji daya hambatnya terhadap koloni jamur *G. citri-aurantii* pada cawan Petri.

Pengujian daya hambat filtrat terhadap pertumbuhan jamur *G. citri-aurantii* dilakukan dengan rancangan acak lengkap (RAL) dengan 5 (lima) perlakuan yaitu konsentrasi filtrat 0%, 10%, 20%, 30% dan 40%. Masing masing perlakuan diulang sebanyak 5 kali sehingga terdapat 25 unit percobaan. Untuk mendapatkan konsentrasi 10% tersebut diperoleh dengan menuangkan 1 ml filtrat ke dalam cawan Petri dan menambahkan 9 ml media PDA. Setelah campuran PDA dan filtrat memadat, kemudian jamur *G. citri-aurantii* yang telah dibiakkan pada cawan Petri diambil dan dipisahkan dengan menggunakan *cork borer* diameter 3 mm, kemudian menggunakan jarum ose isolat jamur tersebut diletakkan tepat di bagian tengah cawan Petri. Selanjutnya kultur diinkubasi pada suhu ruang selama 6 hari. Luas koloni jamur *G. citri-aurantii* ditentukan dengan menggunakan kertas kalkir. Koloni jamur dari masing-masing perlakuan di gambar dalam kertas kalkir dan dihitung luasnya dengan kertas milimeter blok. Pengamatan dilakukan setiap hari untuk membandingkan luas koloni jamur *G. citri-aurantii* pada kontrol dengan luas koloni jamur pada masing- masing perlakuan.

Uji daya hambat suspensi mikroba antagonis terhadap koloni jamur *G. citri-aurantii* secara *in vivo* pada buah lemon

Inokulasi patogen pada buah lemon dilakukan dengan cara melukai kulit jeruk pada dua sisi dengan menggunakan jarum berukuran 2 mm dengan kedalaman 1 mm (Musto *et al.*, 2014). Uji ini dilakukan dengan 4 (empat) perlakuan yaitu, P0 (Kontrol, tidak diberikan perlakuan suspensi bakteri, tetapi diinokulasikan suspensi jamur patogen), P1 (inokulasi suspensi mikroba antagonis dilanjutkan perlakuan suspensi patogen); P2 (perlakuan suspensi patogen dilanjutkan inokulasi suspensi mikroba antagonis); P3 (perlakuan yang mengandung campuran suspensi jamur patogen dan suspensi mikroba antagonis). Setiap perlakuan diulang sebanyak 6 (enam) kali sehingga terdapat 24 unit percobaan yang terdiri atas 3 (tiga) buah lemon yang ditaruh pada nare plastik. Pada setiap lubang ditetaskan suspensi spora *G. citri-aurantii* dan bakteri masing-masing 100 µl. Buah lemon kemudian ditempatkan pada kotak yang telah sterilisasi dengan alkohol 70%, kemudian ditutup dengan plastik wrap. Untuk perlakuan kontrol buah lemon hanya diinokulasikan dengan suspensi jamur patogen. Setiap wadah berisi 3 buah lemon yang disusun masing-masing terpisah. Kemudian diletakkan di atas meja dan diinkubasi pada suhu ruang selama 4 (empat) hari.

Analisis Data

Data yang diperoleh kemudian dianalisis secara statistik dengan ANOVA (*Analysis of variance*). Apabila terdapat perbedaan nyata maka dilanjutkan dengan uji beda rata-rata *Duncan's Multiple Range Test* pada taraf 5%.

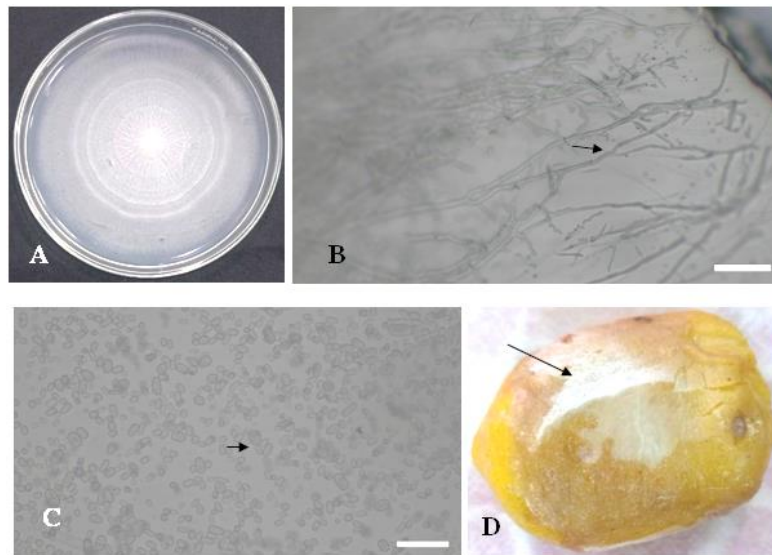
HASIL DAN PEMBAHASAN

Jamur Patogen Penyebab Penyakit Busuk Asam pada Buah Lemon

Buah lemon yang bergejala busuk asam diisolasi dan diamati perkembangannya secara makroskopis dan mikroskopis. Pada Gambar 1 A disajikan hasil identifikasi secara makroskopis morfologi jamur yang ditumbuhkan pada media PDA. Terlihat koloni berwarna putih kusam, lembut dan memiliki membran, dengan bau khas yang manis. Jamur ini memiliki percabangam miselium dikotomis di tepi koloni. Identifikasi menggunakan mikroskop, menunjukkan karakter morfologi, hifa bercabang dikotomis (bercabang dua) (Gambar 1 B). Hifa memiliki rantai arthospora berbentuk oval, dengan beberapa berbentuk silinder. Spora awalnya berbentuk silinder kemudian berbentuk tong, ellipsoidal atau subglobose sesuai dengan pernyataan

Khanswa *et al.* (2020) (Gambar 1 C). Berdasarkan pencocokan ciri makroskopis dan mikroskopis jamur yang diisolasi dari buah lemon bergejala busuk asam dengan ciri-ciri yang dilaporkan pada beberapa referensi maka dapat diduga bahwa jamur yang berasosiasi adalah jamur *G. citri-aurantii*.

Uji postulat Koch *G. citri-aurantii* hasil isolasi dilakukan selama 7 hari atau sampai terlihat gejala busuk asam pada buah lemon yang diinokulasikan patogen. Pada hari ke-7 busuk pada buah lemon semakin meluas dan menyebabkan penurunan kualitas buah lemon akibat dilakukan inokulasi *G. citri-aurantii*. Gejala yang timbul akibat inokulasi *G. citri-aurantii* menunjukkan gejala yang sama dengan gejala infeksi di lapangan (Gambar 1 D). Sehingga bisa dipastikan hasil isolasi adalah patogen penyebab penyakit busuk asam pada buah lemon.



Gambar 1. Hasil isolasi jamur patogen penyebab busuk asam pada lemon. Keterangan: A) Koloni jamur pada media PDA; B) Morfologi jamur patogen secara mikroskopis, tanda panah menunjukkan miselium percabangan dikotomis; C) spora jamur; D) Gejala busuk asam yang pada buah lemon tanda panah menunjukkan miselia jamur berwarna putih.

Mikroba Antagonis Terhadap Jamur Patogen

Sebanyak 23 isolat bakteri berhasil diisolasi dari buah jeruk, dan di antaranya sebanyak 7 (tujuh) isolat menunjukkan aktivitas anti jamur terhadap *G. citri-aurantii*, seperti yang disajikan pada Tabel 1.

Daya Hambat Mikroba Antagonis Terhadap Pertumbuhan Jamur Patogen secara *in vitro*

Hasil pengujian menunjukkan bahwa isolat Lu1 memiliki persentase daya hambat tertinggi jika dibandingkan dengan isolat lainnya yaitu sebesar 71,20 % sebagaimana disajikan pada Tabel 2.

Perlakuan isolat Lu1 mampu menghambat pertumbuhan jamur patogen *G. citri-aurantii* secara *in vitro* (Gambar 2). Koloni jamur *G. citri-aurantii* pada kontrol tumbuh dengan normal. Sementara itu, koloni jamur *G. citri-aurantii* pada isolat Lu1 mengalami pengahambatan. Hasil uji daya hambat isolat Lu1 terhadap jamur patogen *G. citri-aurantii* menunjukkan bahwa perlakuan isolat Lu1 memberikan pengaruh yang berbeda nyata ($P < 0,05$) terhadap persentase daya hambat jamur *G. citri-aurantii*.

Tabel 1. Hasil uji aktivitas antijamur terhadap jamur patogen *G. citri-aurantii*

No	Isolat	Asal Buah	Aktivitas Anti Jamur	No	Isolat	Asal Buah	Aktivitas Anti Jamur
1	Jsi1	Jeruk Siam	+	13	Ja2	Jeruk Afourer	-
2	Jsi2	Jeruk Siam	+	14	Ja3	Jeruk Afourer	+
3	Jsi3	Jeruk Siam	-	15	Ja4	Jeruk Afourer	+
4	Jsi4	Jeruk Siam	-	16	Jl1	Jeruk Lemon	-
5	Lu1	Jeruk Lumajang	+	17	Jl2	Jeruk Lemon	-
6	Lu2	Jeruk Lumajang	-	18	Jn1	Jeruk Nipis	-
7	Jsp1	Jeruk Peras	-	19	Jn2	Jeruk Nipis	-
8	Jsp2	Jeruk Peras	+	20	Jn3	Jeruk Nipis	-
9	Jsp3	Jeruk Peras	-	21	Jn4	Jeruk Nipis	-
10	Jsp4	Jeruk Peras	+	22	Jsu1	Jeruk Sunkis	-
11	Jsp5	Jeruk Peras	-	23	Jsu2	Jeruk Sunkis	-
12	Ja1	Jeruk Afourer	-				

Keterangan: (+) positif memiliki anti jamur; (-) tidak memiliki anti jamur

Tabel 2. Uji daya hambat isolat dari buah jeruk terhadap jamur patogen *G. citri-aurantii* pada pengamatan hari ke-6

Nomor	Isolat	Ukuran Koloni (mm)	Daya Hambat (%)
1	Lu1	24,77 a	71,20
2	Ja3	26,43 a	69,26
3	Jsi2	37,73 b	56,12
4	Jsi1	38,53 b	55,19
5	Jsp2	39,07 bc	54,58
6	Jsp4	39,17 bc	54,46
7	Ja4	42,73 c	50,31
8	Kontrol	86 d	-

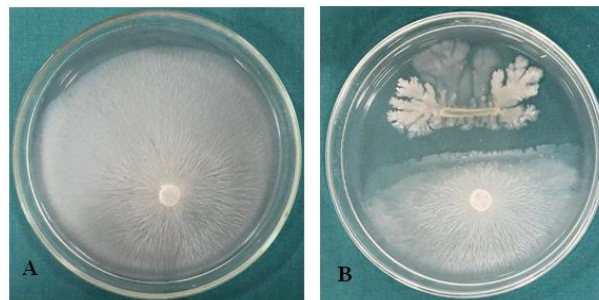
*) Nilai yang diikuti huruf yang sama menunjukkan berbeda tidak nyata berdasarkan uji DMRT pada taraf 5%.

Penekanan isolat Lu1 terhadap jamur patogen *G. citri-aurantii* ditandai dengan pertumbuhan jamur yang tidak normal dan adanya zona bening diantara isolat Lu1 dan jamur patogen. Zona bening diduga terjadi akibat produksi senyawa anti jamur yang dihasilkan oleh isolat Lu1. Cara lain agen hayati dalam menghambat patogen adalah dengan lisis. Mekanisme lisis hifa patogen ditandai dengan berubahnya warna hifa patogen menjadi jernih dan kosong karena isi sel dimanfaatkan oleh agen biokontrol sebagai nutrisi serta kemampuan agen biokontrol menghasilkan enzim yang dapat melisiskan dinding sel patogen dan akhirnya menyebabkan kematian sel (Sunarwatu dan Yoza, 2010).

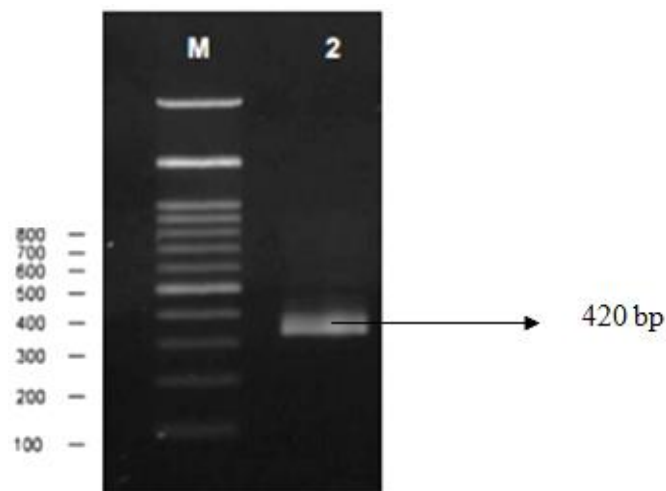
Hasil Identifikasi Jamur Patogen secara Melekuler

Aplifikasi produk PCR ITS1-4 diurutkan dari isolat jamur patogen dari buah lemon yang menunjukkan aktivitas serangan busuk asam pada buah lemon. Kemudian diidentifikasi menggunakan primer ITS 1-4 menghasilkan fragmen DNA dengan ukuran 420 bp (Gambar 3).

Berdasarkan penyelarasan urutan dengan database GenBank menggunakan Program Blast, isolat jamur patogen buah lemon mempunyai kekerabatan yang erat dengan *Geotrichum citrit-auranti* dari berbagai strain yang disajikan pada Tabel 3.



Gambar 2. Hasil uji daya hambat isolat Lu1 terhadap pertumbuhan *G. citri-aurantii* pada hari ke-6 masa inkubasi. Keterangan: (A) Kontrol ; (B) Perlakuan dengan isolat Lu1



Gambar 3. Hasil PCR isolat jamur Patogen penyebab penyakit busuk asam buah lemon. Keterangan: M) Marker; 2) Isolat patogen busuk asam lemon *G. citri-aurantii*

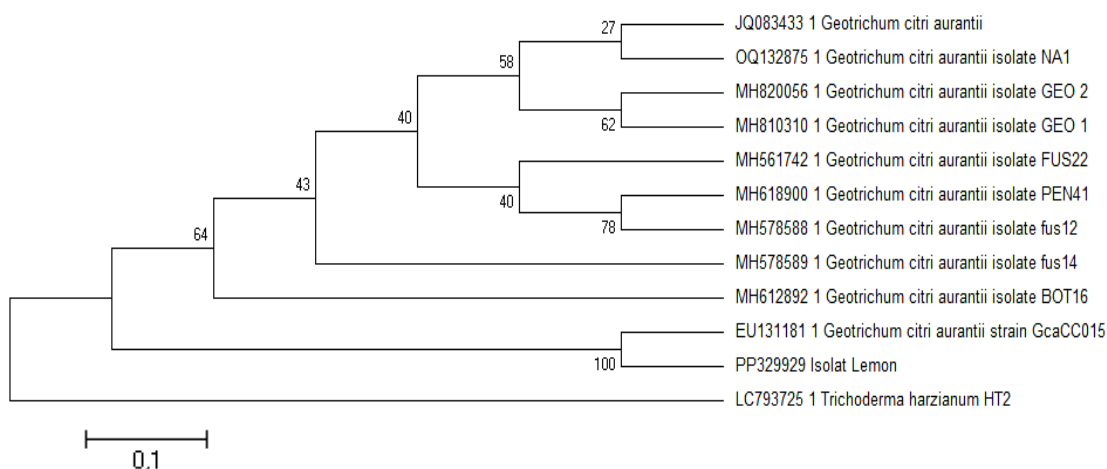
Hasil analisis pohon filogenik menggunakan Metode Maximum Parsimony (MP) dengan replikasi Bootstrap 1.000 kali menunjukkan isolat jamur patogen penyebab busuk asam lemon adalah *Geotrichum citri-aurantii* yang mencapai 99% serta didukung oleh Bootstrap Penopang (BS) (Gambar 4).

Busuk asam disebabkan oleh *G. citri-aurantii* (Ferraris) R.Cif. & F. Cif. (sinonim *G. candidum* Link) merupakan penyakit menyebabkan kerugian pascapanen pada buah lemon (*Citrus limon* Burn, f.), mandarin (*C. reticulata* Blanco), dan jeruk (*C. sinensis*

(L.) Osbeck) (2-4) di seluruh dunia (Montiel *et al.*, 2010). Penyakit ini telah dilaporkan disebagian wilayah di dunia dimana jeruk ditanam dan terdapat bukti infeksi pada jeruk keprok, jeruk, grapefruit, dan lemon. Hasil pohon filogeni menunjukkan bahwa jamur patogen *G. citri-aurantii* yang diisolasi dari buah lemon (PP329929 Isolat Lemon) memiliki kekerabatan dengan persentase kemiripan 100% dengan *G. citri-aurantii* strain GcaCC015 (EU131181). GcaCC015 merupakan strain dari jamur patogen *G. citri-aurantii* yang diisolasi dari buah jeruk di daerah Assiut, Mesir (Arias *et al.*, 2002).

Tabel 3. Kemiripan isolat jamur patogen penyebab penyakit busuk asam pada buah lemon dengan sekuen DNA lain pada GenBank melalui Program Blast

Isolat	Kemiripan (%)	Nomor akses
<i>Geotrichum citri-aurantii</i> strain GcaCC015	100	EU131181
<i>Geotrichum citri-aurantii</i>	99	JQ083433
<i>Geotrichum citri-aurantii</i> isolat GEO2	98	MH820056
<i>Geotrichum citri-aurantii</i> isolat GEO1	98	MH810310
<i>Geotrichum citri-aurantii</i> isolat PEN41	98	MH618900
<i>Geotrichum citri-aurantii</i> isolat fus12	98	MH578588
<i>Geotrichum citri-aurantii</i> isolat NA1	95	OQ132875
<i>Geotrichum citri-aurantii</i> isolat fus14	89	MH578589
<i>Geotrichum citri-aurantii</i> isolat FUS22	89	MH561742
<i>Geotrichum citri-aurantii</i> isolat BOT16	87	MH612892



Gambar 4. Pohon filogeny isolat jamur patogen penyebab busuk asam pada buah lemon

Hasil Identifikasi Molekuler Mikroorganisme Antagonis (Bakteri) dari Buah Jeruk

Amplifikasi produk 16S rRNA diurutkan dari mikroorganisme antagonis (bakteri) dari buah jeruk isolat Lu1 yang menunjukkan aktivitas penghambatan tertinggi terhadap jamur patogen *Geotrichum citri-aurantii*. Kemudian diidentifikasi menggunakan primer 16S dan menghasilkan fragmen DNA dengan ukuran $\pm$ 1411 bp (Gambar 5).

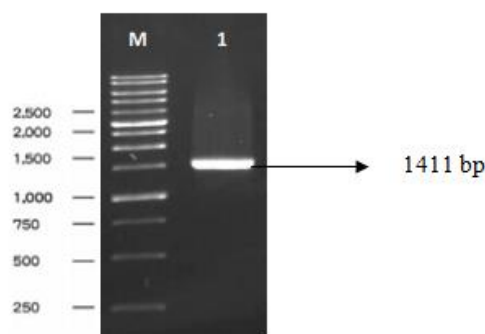
Berdasarkan penyelarasan urutan dengan database GenBank menggunakan Program Blast, isolat mikroba antagonis Lu1 mempunyai kekerabatan yang erat dengan bakteri *Bacillus velezensis* dari berbagai strain yang disajikan pada Tabel 4.

Hasil analisis pohon filogeni menggunakan Metode Maximum Parsimony (MP) dengan replika Bootstrap 1.000 kali menunjukkan isolat mikroba antahonis Lu1 adalah *Bacillus velezensis*, karena berada pada satu clade dengan sekuens bakteri *Bacillus velezensis* yang mencapai 100% serta didukung oleh Bootstrap pendukung (BS) (Gambar 6).

B. velezensis adalah bakteri aerobik, gram positif, pembentuk endospora yang mendorong pertumbuhan tanaman. Banyak strain spesies ini telah dilaporkan menekan pertumbuhan mikroba patogen, termasuk bakteri, jamur dan nematoda. Berdasarkan analisis filogeni terkini, beberapa spesies *Bacillus* telah diklasifikasikan ulang menjadi *B. velezensis*.

Tabel 4. Kemiripan isolat jamur patogen penyebab penyakit busuk asam pada buah lemon dengan sekuen DNA lain pada GenBank melalui Program Blast

Isolat	Kemiripan (%)	Nomor akses
<i>Bacillus velezensis</i> strain HZD-7	99	ON614207
<i>Bacillus velezensis</i> strain C1	99	MK788353
<i>Bacillus velezensis</i> strain NPPS4	99	MT383653
<i>Bacillus velezensis</i> strain AU2	99	OR794123
<i>Bacillus velezensis</i> PS-09	99	LC778307
<i>Bacillus velezensis</i> strain BA1	99	OM914944
<i>Bacillus velezensis</i> strain GSSN-2	99	ON797329
<i>Bacillus velezensis</i> strain GSSN-1	99	ON797328
<i>Bacillus velezensis</i> strain SH2	99	ON054040
<i>Bacillus velezensis</i> strain RH21	99	OM996115



Gambar 5 Hasil PCR isolat Lumajang 1 (Lu1). Keterangan: M) Marker; 1) Isolat bakteri antagonis dari buah jeruk lumajang Lu1 *B. Velezensis*

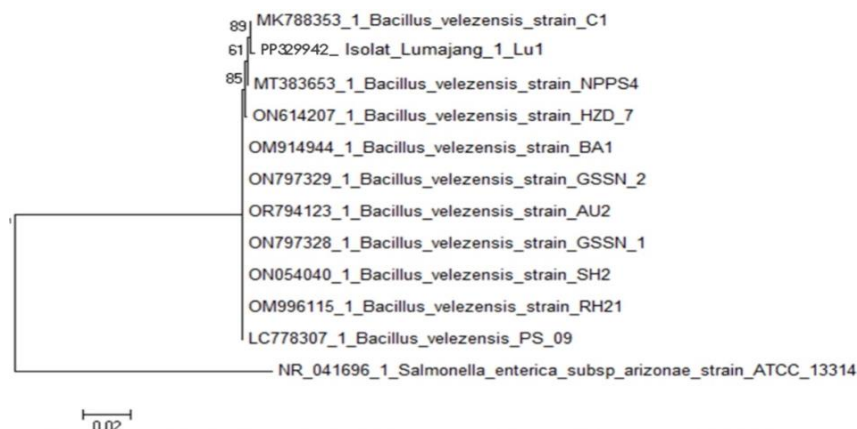
Dari hasil filogeny didapatkan bahwa bakteri antagonis yang diisolasi dari permukaan kulit jeruk lumajang, PP329942 isolat lumajang 1 (Lu1) memiliki kekerabatan dengan MK788353 *B. velezensis* strain C1 yang diisolasi dari rizosfer didataran China (Zhao *et al.*, 2009). Analisis genom mengungkapkan bahwa *B. velezensis* memiliki kelompok gen sensitif strain yang terkait dengan biosintesis metabolit sekunder, yang memainkan peran penting dalam penekanan patogen dan peningkatan pertumbuhan tanaman. Lebih khusus lagi, *B. velezensis* menunjukkan kapasitas genetik yang tinggi untuk mensintesis lipopeptida siklik (yaitu surfaktin, bacillomycin-D, fengycin dan bacillibactin) dan poliketida (yaitu makrolaktin, bacillaene dan difficidin).

Daya Hambat Mikroba Antagonis terhadap Biomassa Jamur *Geotrichum Citri-aurantii*

Hasil pengujian pengaruh *Bacillus velezensis* (Lu1) terhadap biomassa jamur

patogen *G. citri-aurantii* menunjukkan bahwa bakteri antagonis mampu menekan pertumbuhan biomassa jamur patogen. Kemampuan daya hambat bakteri *B. velezensis* Lu1 terhadap biomassa jamur *G. citri-aurantii* sebesar 9,45% jika dibandingkan dengan kontrol pada pengamatan 14 hari masa inkubasi.

Seiring dengan terhambatnya perkecambahan spora dan pertumbuhan miselium jamur *G. citri-aurantii* yang diinokulasikan dengan bakteri *B. velezensis* Lu1 tentunya berdampak pada rendahnya biomassa jamur yang terbentuk. Pada uji biomassa ini, bakteri mampu berkompetensi memperebutkan nutrisi dan ruang dengan cukup baik, hal ini ditunjukkan dengan lebih rendahnya biomassa jamur *G. citri-aurantii* pada perlakuan bakteri *B. velezensis* (Lu1). Diduga bakteri *B. velezensis* (Lu1) mampu menghasilkan antibiotik, siderofor maupun enzim sehingga mampu menekan pertumbuhan jamur patogen *G. citri-aurantii*.



Gambar 6. Pohon filogeny isolat mikroba antagonis dari jeruk lumajang (Lu1)

Tabel 5. Pengaruh perlakuan *B. velezensis* (Lu1) terhadap biomassa jamur patogen *G. citri-aurantii*

Perlakuan	Biomassa Jamur Patogen (g)	Persentase Daya Hambat (%)
Kontrol	6,03	-
<i>B. velezensis</i> Lu1	5,46	9,45

Uji Daya Hambat Filtrat Mikroba Antagonis terhadap Koloni Jamur *G. citri-aurantii* secara *in vitro*

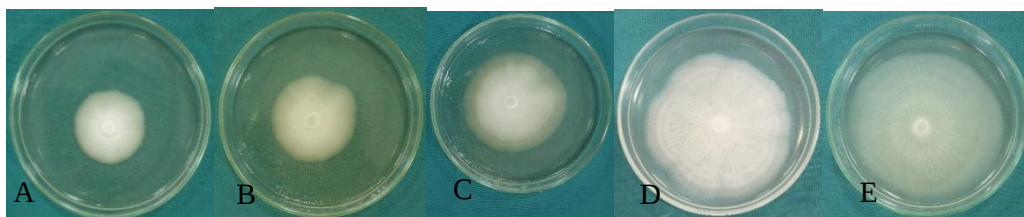
Hasil uji filtrat bakteri *B. velezensis* Lu1 terhadap jamur *G. citri-aurantii* secara *in vitro* menunjukkan bahwa, perlakuan filtrat bakteri *B. velezensis* Lu1 mampu menekan pertumbuhan jamur *G. citri-aurantii* secara efektif. Kemampuan daya hambat mengalami peningkatan pada setiap konsentrasi filtrat namun mengalami penurunan setiap harinya, hal ini diduga karena menurunnya daya racun dari senyawa metabolik sekunder yang dihasilkan oleh bakteri *B. velezensis* Lu1 sehingga filtrat bakteri mampu bersifat sebagai fungistatik, dimana mampu untuk menghambat pertumbuhan jamur namun tidak

mengakibatkan kematian pada sel jamur (Tabel 6). Perlakuan yang paling tinggi daya hambatnya adalah filtrat bakteri *B. velezensis* Lu1 pada konsentrasi 40% sedangkan yang paling kecil adalah pada konsentrasi 10%. Ukuran koloni jamur *G. citri-aurantii* pada perlakuan konsentrasi 40% sebesar 37,5 mm dengan nilai daya hambat sebesar 50,89%. Sementara ukuran koloni pada perlakuan konsentrasi 10% sebesar 63,1667 mm dengan nilai daya hambat 17,27% jika dibandingkan dengan ukuran koloni pada perlakuan kontrol yaitu sebesar 76,36 mm pada pengamatan 7 hari setelah inokulasi. Hal ini menunjukkan bahwa filtrat bakteri *B. velezensis* dapat menghambat koloni jamur patogen (Gambar 7).

Tabel 6. Pengaruh perlakuan Filtrat Bakteri *B. velezensis* (Lu1) pertumbuhan koloni Jamur *G. citri-aurantii*

Konsentrasi Filtrat	Diameter Koloni Jamur (mm)	Daya Hambat (%)
0% Kontrol	76,36 d*	-
10%	63,17 c	17,28
20%	45,67 b	40,19
30%	45,00 ba	41,07
40%	37,50 a	50,89

*) Nilai yang diikuti huruf yang sama menunjukkan berbeda tidak nyata berdasarkan uji DMRT pada taraf 5%.



Gambar 7. Hasil Daya Hambat Filtrat Masing-masing perlakuan Konsentrasi Filtrat Bakteri *B. velezensis* (Lu1) terhadap Koloni Jamur *G. citri-aurantii* pada Pengamatan 7 HSI. Keterangan: (A) Filtrat bakteri *B. velezensis* (Lu1) konsentrasi 40% dan *G. citri-aurantii*; (B) Filtrat bakteri *B. velezensis* (Lu1) konsentrasi 30% dan *G. citri-aurantii*; (C) Filtrat bakteri *B. velezensis* (Lu1) konsentrasi 20% dan *G. citri-aurantii*; (D) Filtrat bakteri *B. velezensis* (Lu1) konsentrasi 10% dan *G. citri-aurantii*; (E) Kontrol (tanpa filtrat).

Bakteri *B. velezensis* memiliki senyawa anti jamur yang dihasilkan dari metabolisme sekunder. Filtrat merupakan hasil dari proses pemisahan campuran heterogen yang mengandung cairan dan partikel-partikel padat dengan menggunakan media filter yang hanya meloloskan cairan dan menahan partikel-partikel padat. Dalam penelitian ini ditunjukkan bahwa filtrat bakteri *B. velezensis* Lu1 mampu menghambat pertumbuhan *G. citri-aurantii*, maka dapat diasumsikan bahwa bakteri menghasilkan metabolisme sekunder berupa senyawa antibiotik. Penggunaan filtrat mempermudah pengaplikasian agen hayati dalam bentuk biopestisida lapangan. Hal ini dikarenakan filtrat tidak mengandung mikroorganisme yang memerlukan mikroklimat tertentu dalam proses pertumbuhan.

Daya Hambat suspensi Mikroba Antagonis terhadap Koloni Jamur *G. citri-aurantii* Secara *in vivo* pada Buah Lemon

Penerapan suspensi bakteri *B. velezensis* Lu1 dengan perlakuan pemberian suspensi bakteri terlebih dahulu kemudian suspensi jamur patogen, suspensi jamur patogen terlebih dahulu kemudian suspensi bakteri dan perlakuan campuran suspensi jamur dan suspensi bakteri efektif menurunkan persentase penyakit busuk asam pada buah lemon (Gambar 3.8). Persentase pemberian suspensi bakteri

terlebih dahulu dibandingkan inokulasi jamur patogen lebih signifikan jika dibandingkan dengan inokulasi jamur terlebih dahulu dengan pemberian suspensi bakteri serta campuran suspensi jamur dan bakteri seperti pada Tabel 7.

Persentase daya hambat dengan perlakuan suspensi bakteri terlebih dahulu kemudian inokulasi jamur patogen adalah sebesar 45,27% sedangkan pada perlakuan campuran antara suspensi bakteri dengan suspensi jamur adalah sebesar 26,17 %. Hal ini menunjukkan bahwa pengaplikasian bakteri *B. velezensis* Lu1 sebaiknya dilakukan sebelum munculnya gejala serangan pada buah lemon. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa perlakuan suspensi *B. velezensis* Lu1 efektif mengendalikan pra-munculnya gejala penyakit busuk asam yang disebabkan oleh *G. citri-aurantii* pada buah lemon.

B. velezensis telah muncul sebagai anggota mikrobia tanaman yang penting untuk pertanian. Sejumlah penelitian telah menunjukkan bahwa *B. velezensis* dan spesies *Bacillus* lainnya yang berkerabat dekat memiliki kelompok gen yang terlibat dalam biosintesis metabolit sekunder, yang memainkan peran penting dalam menekan mikroba patogen. Metabolit bioaktif ini termasuk surfaktan, iturin A, bacillomycin D, fengycin, bacillibactin, makrolaktin, bacillaene dan difficidin (Xuan Vu *et al.*, 2023).

Tabel 7. Persentase daya hambat suspensi mikroba antagonis *B. velezensis* Lu1 terhadap penyakit busuk asam pada buah lemon secara *in vivo*

Perlakuan	Diameter gejala yang busuk pada setiap tempat inokulasi (mm)	Persentase Daya Hambat (%)
P0	35,85 d*	-
P1	19,62 a	45,27
P2	23,91 ab	33,30
P3	26,47 c	26,17

*) Nilai yang diikuti huruf yang sama menunjukkan berbeda tidak nyata berdasarkan uji DMRT pada taraf 5%. P0 = Kontrol (hanya diinokulasi dengan suspensi jamur patogen; P1= Perlakuan *B. velezensis* Lu1 diikuti oleh inokulasi *G. citri-aurantii*; P2 = Inokulasi *G. citri-aurantii* diikuti oleh perlakuan *B. velezensis* Lu1; P3 = perlakuan dengan campuran suspensi *B. velezensis* dan suspensi jamur *G. citri-aurantii*.



Gambar 8. Hasil Daya Hambat Suspensi Mikroba Antagonis *B. velezensis* (Lu1) terhadap Koloni Jamur *G. citri-aurantii* Secara *in vivo* pada Buah Lemon pada Pengamatan 4 HSI. Keterangan: (A) Inokulasi suspensi *B. velezensis* (Lu1) terlebih dahulu kemudian dilanjutkan inokulasi jamur patogen *G. citri-aurantii*; (B) Inokulasi suspensi Jamur patogen *G. citri-aurantii* terlebih dahulu kemudian dilanjutkan inokulasi suspensi *B. velezensis* (Lu1); (C) Inokulasi suspensi campuran antara *B. velezensis* (Lu1) dan jamur patogen *G. citri-aurantii*; (D) Kontrol *G. citri-aurantii*

Selain itu, penelitian ini juga mengungkapkan bahwa strain *B. velezensis* merupakan kandidat yang menjanjikan untuk mengembangkan biofungisida guna mencegah kerugian pascapanen pada tanaman jeruk akibat penyakit busuk ujung batang dan jamur hijau (Xuan Vu *et al.*, 2023). Dalam uji ini perlakuan dengan cara dilukai pada buah lemon menghasilkan daya hambat yang cukup tinggi pada perlakuan inokulasi mikroba terlebih dahulu sebelum jamur patogen. Hal ini menunjukkan bahwa mikroba antagonis *B. velezensis* memiliki potensi yang tinggi dalam menekan penyakit busuk asam yang disebabkan oleh jamur patogen *G. citri-aurantii* dengan cara pencegahan di lapangan.

SIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian dan pembahasan yang telah diuraikan maka dapat disimpulkan sebagai berikut berdasarkan hasil identifikasi molekuler spesies jamur patogen penyebab penyakit busuk asam buah lemon adalah *Geotrichum citri-*

aurantii. Berdasarkan hasil identifikasi molekuler mikroba antagonis yang diisolasi dari buah jeruk lumajang adalah *Bacillus velezensis* Lu1. Bakteri antagonis *B. velezensis* Lu1 mampu menghambat pertumbuhan jamur *G. citri-aurantii* secara *in vitro* dengan persentase daya hambat sebesar 76,05%, dan konsentrasi filtrat bakteri 40% dapat menghambat pertumbuhan *G. citri-aurantii* secara *in vitro* dengan persentase daya hambat sebesar 50,89%, serta pemberian suspensi bakteri *B. velezensis* Lu1 terlebih dahulu sebelum inokulasi jamur patogen *G. citri-aurantii* memiliki persentase daya hambat terbesar yaitu 45,27%. Mekanisme kerja mikroba antagonis dalam menghambat pertumbuhan *G. citri-aurantii* adalah melalui antibiosis.

DAFTAR PUSTAKA

Arias, C. R., Burns, J. K., Friedrich, L. M., Goodrich, R. M., Parish, M. E. 2002. Yeast species associated with orange juice. Evaluation of different identification methods. *Applied & Environmental Microbiology*. 68. 1955-

- 1961.
- Droby, S., Vinokur, V., Weiss, B., Cohen, L., Daus, A., Goldschmidt, E.E., Porat, R. 2002. Induction of Resistance to *Penicillium digitatum* in Grapefruit by the Yeast BIOCONTROL Agent *Candida oleophila*. *Phytopatology* 92 (4): 393-399.
- Kemnkes. 2020. Kemenkes Sarankan Masyarakat Manfaatkan Obat Tradisional. Sehat Negeriku Sehatlah Bangsa. sehatnegeriku.kemkes.go.id
- Khamsaw, P., Sangta, J., Chaiwan, P., Rachtanapun, P. Sirilun, S., Sringarm, K., Thanakkasarnanee, S., Sommano, S.R. 2022. Bio-Circular Perspective of Citrus Fruit Loss Caused by Pathogens: Occurrences, Active Ingredient Recovery and Application. *Horticulturae*. 8(8): 748.
- Montiel, L. G. H. Pena, R. J. H. Barragan, H. L. 2010. First Report of Sour Rot Caused by *Geotrichum citri-aurantii* on Key Lime (*Citrus aurantifolia*) in Colima State, Mexico. *Plant disease*. 94 (4): 488. doi:10.1094/PDIS-94-4-0488B. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/> diakses pada 10 April 2023.
- Nasahi, C., Clonelin, R. 2021. Effect of Betel Leaf (*Piper* sp.) Water Extracts to Control *Penicillium digitatum* Causes of Green Mold in Dekopon Citrus (*Citrus reticulata*). 37 (4): 10.24198/crosaver.v4i1.33913. Cropsaver-J
- Pracahyo, R., Khalimi, K., Wijaya, G. 2014. Kajian Potensi Bakteri Lumpur Lapindo Sebagai Agen Hayati Terhadap *Pyricularia oryzae* dan Agen Biostimulan pada Tanaman Padi. *E-Jurnal Agroekoteknologi Tropika* (Journal of Agroecotechnology). 3: (4).
- Sunarwati, D., dan Yoza, R. 2010. Kemampuan *Trichoderma* dan *Penicilium* dalam Menghambat Pertumbuhan Cendawan Penyebab Penyakit Busuk Akar Durian (*Phytophthora palmivora*) Secara *In Vitro*. Balai Penelitian Tanaman Buah Tropika. Seminar Nasional Program dan Strategi Pengembangan Buah Nusantara. Solok. 10 Nopember 2010. 176-189.
- Wang, T., Yang, Li, Q., Bi, K. shun. 2018. Bioactive Flavonoid in Medicinal plants: Structure, activity, and biological fate. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 13 (1): 12-23.
- USDA. 2023. Taxon *Geotrichum citri-aurantii*. Animal and Plant Health Inspection Services. U.S. Department of Agriculture. <https://acir.aphis.usda.gov/>
- Xuan Vu, T., Tran, T. B. Tran, M. B., Kim, D. T. T., Mai, D. L., Dinh, M. T., Thai, H.D., Pham, D.N., Tran, V. T. 2023. Efficient Control of the Fungal Pathogens *Colletotrichum gloeosporioides* and *Penicillium digitatum* Infecting Citrus Fruits by Native Soilborne *Bacillus velezensis* Strains. *ScienceDirect. Heliyon*. 9 (2): 13663.
- Zhao Z. 2019. Direct Submission. Bioscience and Engineering, Jiangxi Agricultural University, Zhinin Avenue, Nanchang 330045, China.