

## Uji Antagonistik *Paenibacillus polymyxa* Jav78 terhadap jamur *Colletotrichum* spp. secara in vitro

Trisna Agung Phabiola<sup>\*)</sup>, Khamdan Khalimi

Fakultas Pertanian Universitas Udayana  
Jl. PB. Sudirman Denpasar Bali, Indonesia

<sup>\*)</sup>Email: phabiola@unud.ac.id

### Abstract

Anthrachnose disease in chili plants can cause yield loss. The purpose of this study was to determine the ability of *Paenibacillus polymyxa* Jav78 to inhibit the growth of *Colletotrichum* spp. and identify the antifungal compound produced by *P. polymyxa* Jav78. Antagonistic test of *P. polymyxa* Jav78 against *Colletotrichum* fungus was carried out in vitro. Identification of antifungal compounds using Gas Chromatography Mass Spectrometry (GCMS). The results showed that *P. polymyxa* Jav78 was able to inhibit the growth of the fungus *Colletotrichum* spp. with the percentage of inhibition ranging from 77.33% to 85.07%. The *P. polymyxa* Jav78 filtrate contains antifungal compounds 76.01% hexadecanoic acid, methyl ester and 16.48% imidazole-3-oxide. The results of this study provide information that *P. polymyxa* Jav78 can be used as a biofungicide to control anthracnose disease in chili plants.

Keywords: *P. polymyxa* Jav78, antifungal activity, *Colletotrichum* spp.

### 1. Pendahuluan

Penyakit antraknosa pada tanaman cabai merupakan penyakit yang paling sering ditemukan dan hampir selalu terjadi disetiap areal tanaman cabai. Salah satu penyebab penyakit antraknosa pada cabai besar adalah *Colletotrichum* spp. Jamur *Colletotrichum* spp. dapat menginfeksi organ tanaman cabai terutama pada bagian buahnya. Penyakit antraknosa dapat menyebabkan kerugian hasil panen sebesar 50% (Than *et al.*, 2008). Penyakit antraknosa pada tanaman cabai di Bali disebabkan oleh jamur *C. truncatum*, *C. gloeosporioides*, *C. acutatum*, *C. fructicola*, *C. nymphaeae* dan *C. scovillei* (Khalimi *et al.*, 2019). Hasil penelitian Than *et al.* (2008) menunjukkan bahwa penyebab penyakit antraknosa pada cabai adalah *C. acutatum*, *C. atramentarium*, *C. dematium*, *C. coccodes*, *C. capsici*, *C. gloeosporioides* var. *minor*, dan *C. nigrum*. Sedangkan Liu *et al.* (2016) melaporkan bahwa penyebab penyakit antraknosa pada cabai adalah *C. siamense*, *C. dematium*, *C. boninense*, *C. brevisporum*, dan *C. cliviae*.

Saat ini, pengendalian penyakit antraknosa masih menggunakan fungisida sintetis. Penggunaan fungisida sintetis tersebut secara terus menerus dapat mengakibatkan timbulnya resistensi jamur patogen. Salah satu usaha dalam mengurangi penggunaan fungisida sintetis adalah dengan memanfaatkan mikroorganisme yang berperan sebagai agensia hayati. Bakteri yang berperan sebagai agensia hayati dan memiliki potensi untuk digunakan sebagai biofungisida adalah *Paenibacillus polymyxa* Jav78. Salah satu mekanisme bakteri *P. polymyxa* dalam mengendalikan populasi jamur patogen adalah dengan cara menghasilkan senyawa antijamur. Beatty dan Jensen (2002) melaporkan bahwa *P. polymyxa* PKB1 menghasilkan antibiotika fusaricidin yang dapat digunakan sebagai agensia hayati terhadap *Leptosharia maculans* penyebab penyakit pada tanaman *Brassica napus* L. dan *Brassica rapa* L. Sedangkan Li dan Chen (2019) melaporkan bahwa fusaricidin yang dihasilkan *P. polymyxa* WLY78 dapat menginduksi terbentuknya asam salisilat pada tanaman mentimun sehingga tanaman mentimun tahan terhadap infeksi *Fusarium oxysporum* f. sp. *Cucumerium*. Deng *et al.* (2011) melaporkan bahwa *P. polymyxa* strain JSa-9 menghasilkan senyawa antijamur di-n-butyl phthalate dan 15-guanidino-3-hydroxypentadecanoic acid yang memiliki aktivitas antijamur terhadap *Penicillium notatum* AS3.4356, *P. expansum* AS3.4042, *Aspergillus oryzae* AS3.951, *A. niger* AS3.350 dan *Rhizopus stolonifer* AS3.2336. Zhai *et al.* (2021) melaporkan bahwa *P. polymyxa* strain HX-140 mampu menghasilkan enzim protease, sellulase,  $\beta$ -1,3-glucanase dan senyawa organik volatile antijamur sehingga digunakan untuk mengendalikan populasi *F. oxysporum* f. sp. *Cucumerium*. Tujuan penelitian ini adalah untuk menguji kemampuan *P. polymyxa* Jav78 dalam menghambat pertumbuhan koloni jamur *C. truncatum*, *C. gloeosporioides*, *C. acutatum*, dan *C. fructicola* serta mengidentifikasi senyawa antijamur yang dihasilkan bakteri *P. polymyxa* Jav78.

## **2. Bahan dan Metode**

### **2.1 Bahan dan Alat Penelitian**

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Ilmu Penyakit Tumbuhan, Fakultas Pertanian, Universitas Udayana dari bulan Maret sampai Mei 2023. Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah jamur *C. truncatum*, *C. gloeosporioides*, *C. acutatum*, *C. fructicola*, agensia hayati *P. polymyxa* Jav78, media *Potato Dextrose Agar* (PDA), *Potato Dextrose Broth* (PDB). Alat yang digunakan adalah tabung reaksi, pipet mikro, timbangan digital, jarum Ose, mikroskop, *laminar flow cabinet*, dan Gas Chromatography Mass Spectrometry (GCMS).

### **2.2 Uji Antagonistik *P. polymyxa* Jav78 terhadap jamur *Colletotrichum* spp. secara in vitro**

Uji antagonistik *P. polymyxa* Jav78 terhadap jamur *C. truncatum*, *C. gloeosporioides*, *C. acutatum*, *C. fructicola* secara in vitro ini dilakukan berdasarkan metode Khalimi dan Wirya (2009). Uji aktivitas antijamur bakteri *P. polymyxa* Jav78 terhadap pertumbuhan jamur *C. truncatum*, *C. gloeosporioides*, *C. acutatum*, *C. fructicola* diawali dengan menyiapkan media tumbuh dengan cara menuangkan 10 ml

media PDA pada cawan petri. Selanjutnya jamur *C. truncatum*, *C. gloeosporioides*, *C. acutatum*, *C. fructicola* diinokulasikan ditengah cawan petri yang sudah berisi media PDA, selanjutnya *P. polomyxa* diinokulasikan pada 4 posisi mengapit jamur dengan jarak 2 cm dari jamur *C. truncatum*, *C. gloeosporioides*, *C. acutatum*, *C. fructicola*. Rancangan yang digunakan pada penelitian ini adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan 8 perlakuan dan 4 ulangan.

Penentuan persentase daya hambat bakteri agens hayati terhadap pertumbuhan jamur ditentukan dengan rumus sebagai berikut:

Daya hambat =  $\frac{\text{Luas koloni kontrol} - \text{Luas koloni perlakuan}}{\text{Luas koloni kontrol}} \times 100\%$

Laju pertumbuhan koloni jamur ditentukan menggunakan rumus sebagai berikut:

Laju pertumbuhan koloni =  $\frac{\text{Luas koloni pada pengamatan terakhir}}{\text{Selang waktu}}$

### 2.3 Identifikasi Senyawa Antijamur dari Filtrat *P. polomyxa* Jav78

Filtrat bakteri diperoleh dari kultur bakteri *P. polomyxa* Jav78 yang sudah dishaker selama 14 hari dan disaring dengan membrane Millipore 0,45  $\mu\text{m}$  (Nihon Millipore Ltd. Yonezawa). Senyawa antijamur dari filtrat dianalisis menggunakan GCMS Agilent 6980N Network GC System dengan detektor Agilent 5973 inert MSD (70eV direct inlet) menurut metode Kannan *et al.* (2016). Larutan sampel filtrat bakteri sebanyak 2  $\mu\text{l}$  diinjeksikan ke GCMS yang memiliki kolom kapiler J&W Scientific, HP-5MS dengan panjang 30 mm, diameter 0,25 mm dan ketebalan 0,25  $\mu\text{m}$ . Gas pembawa helium pada laju alir 1 ml/ menit (konstan) dengan rasio split 1:10. Temperatur oven terprogram yaitu 50°C dan disimpan isothermal selama 5 menit, laju peningkatan menjadi 10°C/menit dan suhu ditingkatkan hingga 280°C selama 15 menit. suhu port injector adalah 290°C dan spektrometer massa yaitu 230°C. Identifikasi senyawa antijamur menggunakan database Willey versi 7.0 dengan membandingkan antara pola spektrum massa dan pola fragmentasi senyawa referensi yang tersimpan dalam perpustakaan Willey.

## 3. Hasil dan Pembahasan

### 3.1. Uji Antagonistik *P. polomyxa* Jav78 terhadap Jamur *Colletotrichum* spp. secara in vitro

Hasil uji kemampuan bakteri *P. polomyxa* Jav78 dalam menghambat pertumbuhan jamur *C. truncatum*, *C. gloeosporioides*, *C. acutatum*, *C. fructicola* secara in vitro menunjukkan bahwa bakteri *P. polomyxa* Jav78 mampu menghambat pertumbuhan koloni jamur *C. truncatum*, *C. gloeosporioides*, *C. acutatum*, *C. fructicola* dengan persentase daya hambat berkisar antara 77,33% sampai 89,79% (Tabel 1).

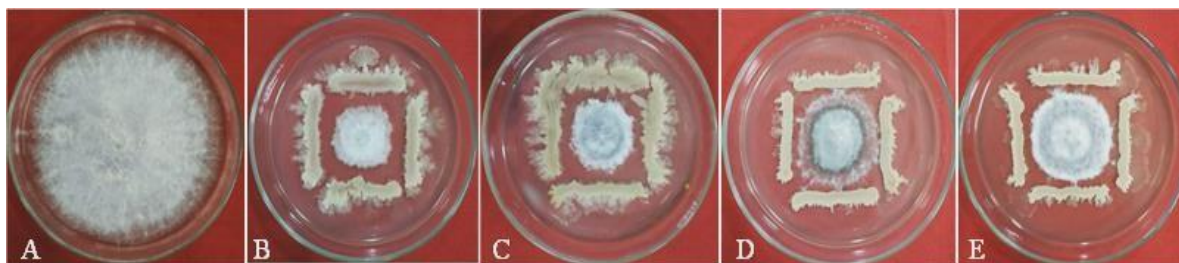
Koloni jamur *C. truncatum*, *C. gloeosporioides*, *C. acutatum*, *C. fructicola* pada perlakuan kontrol tumbuh secara normal dengan laju pertumbuhan koloni berkisar antara 179,92 mm<sup>2</sup>/hari sampai dengan 182,31 mm<sup>2</sup>/hari (Gambar 1 dan Tabel 1). Sedangkan koloni jamur pada perlakuan *P. polomyxa* Jav78 pertumbuhannya terhambat.

Hal ini terlihat pada rendahnya nilai luas koloni jamur yang merupakan manifestasi dari pertumbuhan jamur. Semakin rendah nilai luas koloni jamur maka semakin tinggi nilai daya hambat bakteri agens hayati terhadap jamur. Pertumbuhan jamur pada perlakuan *P. polymyxa* Jav78 terhambat karena adanya senyawa antijamur yang dihasilkan oleh *P. polymyxa* Jav78 melalui mekanisme antibiosis. Pertumbuhan jamur pada perlakuan *P. polymyxa* Jav78 terhambat dengan laju pertumbuhan koloni berkisar antara 40,82 mm<sup>2</sup>/hari sampai dengan 18,39 mm<sup>2</sup>/hari.

Tabel 1. Hasil uji Antagonistik *P. polymyxa* Jav78 terhadap jamur *C. truncatum*, *C. gloeosporioides*, *C. acutatum*, dan *C. fructicola* secara in vitro

Perlakuan	Luas koloni jamur (mm <sup>2</sup> )	Laju pertumbuhan koloni (mm <sup>2</sup> /hari)	Daya hambat (%)
<i>C. truncatum</i>	1261,01 a*	180,14 a	-
<i>P. polymyxa</i> + <i>C. truncatum</i>	285,77 b	40,82 b	77,33
<i>C. gloeosporioides</i>	1276,23 a	182,31 a	-
<i>P. polymyxa</i> + <i>C. gloeosporioides</i>	128,79 d	18,39 d	89,79
<i>C. acutatum</i>	1259,44 a	179,92 a	-
<i>P. polymyxa</i> + <i>C. acutatum</i>	267,82 b	38,26 b	78,76
<i>C. fructicola</i>	1267,65 a	181,09 a	-
<i>P. polymyxa</i> + <i>C. fructicola</i>	188,21 c	26,88 c	85,07

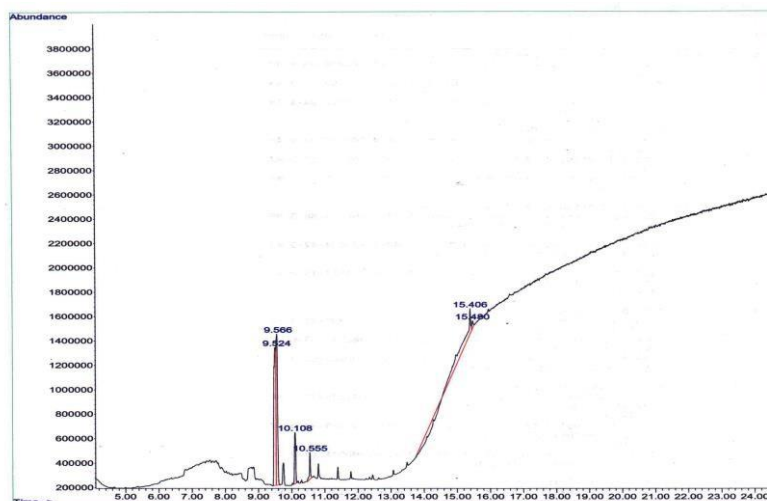
\*Nilai pada kolom yang sama diikuti dengan huruf yang sama tidak berbeda nyata ( $p > 0,05$ ) menurut Uji Jarak Berganda Duncan pada taraf 5%.



Gambar 1. Hasil uji antagonistik *P. polymyxa* terhadap jamur *Colletotrichum* spp. secara in vitro A: Perlakuan Kontrol *C. acutatum*; B: *P. polymyxa* + *C. truncatum*; C: *P. polymyxa* + *C. gloeosporioides*; D: *P. polymyxa* + *C. acutatum*; E: *P. polymyxa* + *C. fructicola*

### 3.2 Identifikasi Senyawa Antijamur dari Filtrat *P. polymyxa* Jav78

Berdasarkan hasil analisis GCMS menunjukkan bahwa filtrat bakteri *P. polymyxa* Jav78 mengandung 4 senyawa (Gambar 2). Empat senyawa tersebut adalah hexadecanoic acid, methyl ester; imidazole-3-oxide; 1-octadecanamine, N-methyl-; dan caproaldehyde.



Gambar 2. Data representatif kromatografi GC-MS dari filtrat *P. polomyxa* Jav78

Berdasarkan pustaka terhadap hasil analisis GCMS bahwa filtrat *P. polomyxa* Jav78 mengandung dua senyawa utama yang bersifat antijamur yaitu hexadecanoic acid, methyl ester (76,01%) dan imidazole-3-oxide (16,48%). Senyawa hexadecanoic acid, methyl ester terdeteksi pada puncak 1 dan 2 dengan waktu retensi 9,524 menit dan 9,566 menit dengan persentase area sebesar 40,71% dan 35,30% sedangkan senyawa imidazole-3-oxide terdeteksi pada puncak 3 dan 4 dengan waktu retensi 10,108 menit dan 10,555 menit dengan persentase area sebesar 12,48% dan 4,00% (Tabel 2).

Tabel 2. Hasil analisis GC-MS komponen kimia filtrat *P. polomyxa* Jav78

Peak	Waktu Retensi	Area (%)	Komponen Kimia	Rumus Kimia
1	9,524	40,71	hexadecanoic acid, methyl ester	C17H34O2
2	9,566	35,30	hexadecanoic acid, methyl ester	C17H34O2
3	10,108	12,48	imidazole-3-oxide	C3H4N2O
4	10,555	4,00	imidazole-3-oxide	C3H4N2O
5	15,406	6,08	1-octadecanamine, N-methyl-	C19H41N
6	15,480	1,43	caproaldehyde	C6H12O

Menurut Human Metabolome Database (2014) bahwa senyawa hexadecanoic acid, methyl ester juga dikenal sebagai metil palmitat atau heksadekanoat metil ester yang termasuk senyawa organik dari golongan metil ester asam lemak. Metil ester asam lemak adalah senyawa yang mengandung asam lemak yang diesterifikasi dengan gugus metil. Beberapa peneliti melaporkan bahwa senyawa hexadecanoic acid, methyl ester memiliki aktivitas antijamur. Pinto *et al.* (2017) melaporkan bahwa senyawa metil palmitat dapat menghambat jamur *Candida neoformans* ATCC 24067, *C. gatti* ATCC 24065, *C. albicans* ATCC 18804, dan *Paracoccidioides brasiliensis* P18 dengan nilai *Minimal inhibitory concentration* (MIC) sebesar  $\geq 2000 \mu\text{g/mL}$ . Abubacker dan

Deepalakshmi (2013) melaporkan bahwa senyawa hexadecanoic acid, methyl ester dapat menghambat jamur *Alternaria solani* NCBT 118, *Aspergillus albicans* NCBT-120, *A. erithrocephalus* NCBT-124, dan *A. fumigatus* NCBT-126. Agoramoorthy *et al.* (2007) melaporkan bahwa senyawa hexadecanoic acid, methyl ester dapat menghambat jamur *Candida tropicalis* dan *Candida parapsilosis* dengan diameter zona hambat sebesar 11 mm dan 11,6 mm. Mekanisme senyawa hexadecanoic acid, methyl ester dalam menghambat pertumbuhan jamur adalah dengan cara menghambat pembentukan biofilm, menginduksi terjadinya apoptosis, menyebabkan kerusakan DNA, menyebabkan kerusakan mitokondria, dan menghambat biosintesis ergosterol (Prasath *et al.*, 2020).

Senyawa imidazole-3-oxide adalah senyawa yang memiliki gugus heterosiklik yang terdiri dari tiga atom karbon, empat atom hidrogen, dua atom nitrogen, dan satu atom oksigen (Siwach dan Verma, 2021). Beberapa peneliti melaporkan bahwa senyawa imidazole-3-oxide memiliki aktivitas antijamur. Banfi *et al.* (2006) melaporkan bahwa senyawa imidazole-3-oxide dapat menghambat jamur *C. albicans* dan *C. glabrata* dengan nilai MIC sebesar 8 mg/l dan 16 mg/l. Helmick *et al.* (2005) melaporkan bahwa senyawa imidazole-3-oxide dapat menghambat jamur *Saccharomyces cerevisiae* dan *C. albicans*. Siwach dan Verma (2021) melaporkan bahwa senyawa imidazole-3-oxide dapat menghambat jamur *Aspergillus niger* dan *C. albicans*. Menurut Hori *et al.* (2000) bahwa mekanisme senyawa imidazole-3-oxide dalam menghambat pertumbuhan jamur adalah dengan cara menghambat biosintesis ergosterol pada konsentrasi  $10^6$  M bersifat fungistatik sedangkan pada konsentrasi  $10^4$  M bersifat fungisida dengan cara merusak membrane sel jamur. Menurut Helmick *et al.* (2005) bahwa mekanisme senyawa imidazole-3-oxide dalam menghambat pertumbuhan jamur dengan cara menghambat fungsi enzim nitric oxide dioxygenase dari jamur.

#### 4. Kesimpulan

Hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa Bakteri *P. polymyxa* Jav78 mampu menghambat pertumbuhan jamur *Colletotrichum* spp. dengan persentase daya hambat berkisar antara 77,33% sampai dengan 85,07%. Filtrat *P. polymyxa* Jav78 mengandung senyawa antijamur hexadecanoic acid, methyl ester (76,01%) dan imidazole-3-oxide (16,48%).

#### Daftar Pustaka

- Abubacker, M.N., Deepalakshmi, T. (2013). In vitro antifungal potentials of bioactive compound methyl ester of hexadecanoic acid isolated from *Annona muricata* Linn. (Annonaceae) Leaves. *Biosci., Biotech. Res. Asia* 10(2): 879-884.
- Agoramoorthy, G., Chandrasekaran, M., Venkatesalu, V., Hsu, M.J. (2007). Antibacterial and antifungal activities of fatty acid methyl esters of the lind-your-eye mangrove from India. *Brazilian Journal of Microbiology* 38:739-742.
- Banfi, E., Giuditta, S., Daniele, Z., Maria, G.M., Luciano, V., Marco, F., Maurizio, F., Maria, S.P., Sabrina, P. (2006). Antifungal and antimycobacterial activity of new

- imidazole and triazole derivatives, A combined experimental and computational approach. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 58: 76–84
- Beatty, P., Jensen, S.E. (2002). *Paenibacillus polymyxa* produces fusaricidin-type antifungal antibiotics active against *Leptosphaeria maculans*, the causative agent of blackleg disease of canola. *Can. J. Microbiol.* 48: 159–169.
- Deng, Y., Zhaoxin, L., Fengxia, L., Chong, Z., Yu, W., Haizhen, Z., Xiaomei, B. (2011). Identification of LI-F type antibiotics and di-n-butyl phthalate produced by *Paenibacillus polymyxa*. *Journal of Microbiological Methods* 85: 175–182.
- Helmick, R.A., Arin, E. F., Anne, M. G., Christopher, R. G., Angela, N.H., Michael, C.G., Paul, R.G. (2005). Imidazole antibiotics inhibit the nitric oxide dioxygenase function of microbial flavohemoglobin. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 49(5): 1837-1843.
- Hori, K., Akira, S., Michinari, K., Koichi, I., Yuri, A., Yuso, Y. (2000). Structure-activity relationships of a new antifungal imidazole, AFK-108, and related compounds. *Chem. Pharm. Bull.* 48(1): 60-64.
- Human Metabolome Database. (2014). Showing metabocard for Methyl hexadecanoic acid (HMDB0061859). <https://hmdb.ca/metabolites/HMDB0061859>.
- Khalimi, K., Darmadi, A.A.K., Suprpta, D.N. (2019). First Report on the Prevalence of *Colletotrichum scovillei* Associated with Anthracnose on Chili Pepper in Bali, Indonesia. *Intl. J. Agric. Biol.* 22: 363–368.
- Li, Y., Chen, S. (2019). Fusaricidin Produced by *Paenibacillus polymyxa* WLY78 Induces Systemic Resistance against Fusarium Wilt of Cucumber. *Int. J. Mol. Sci.* 20: 1-19.
- Liu, F., Guiting, T., Xiaojuan, Z., Ying, L., Xiaofang, S., Xiaobo, Q., You, Z., Jing, X., Huabao, C., Xiaoli, C., Sirong, Z., Guoshu, G. (2016). Molecular and phenotypic characterization of *Colletotrichum* species associated with anthracnose disease in peppers from Sichuan Province, China. *Scientific reports* 6:1-17.
- Pinto, M.E.A., Sthefane, G.A., Marcela, M., Nivea, P.S., Caroline, M.L., Carlos, A.R., Ezequeira, P., Susana, J., Luciana, A.R.S. (2017). Antifungal and antioxidant activity of fatty acid methyl esters from vegetable oils. *Anais da Academia Brasileira de Ciencias* 89(3): 1671-1681.
- Prasath, K.G., Tharani, H., Mourya, S.K., Shunmugiah, K.P. (2020). Palmitic acid inhibits the virulence factors of candida tropicalis: biofilms, cell surface hydrophobicity, ergosterol biosynthesis, and enzymatic activity. *Frontiers in Microbiology* 11(864):1-21.
- Siwach, A., Verma, P.K. (2021). Synthesis and therapeutic potential of imidazole containing compounds. *BMC Chemistry* 15(12): 1-69.
- Than, P.P., Haryudian, P., Sitthisack, P., Paul, W.J.T., Kevin, D.H. (2008). Chilli anthracnose disease caused by *Colletotrichum* species. *Journal of Zhejiang University Science B* 9(10):764-778.
- Zhai, Y., Jiu, X.Z., Tai, M.T., Jian, P.X., Ai-rong, S., Xie, B.Y., Ji, L.L., Liang, B.Z. (2021). Isolation and characterization of antagonistic *Paenibacillus polymyxa* HX-140 and its biocontrol potential against Fusarium wilt of cucumber seedlings. *BMC Microbiology* 21(75): 1-12.