

4. HASIL DAN PEMBAHASAN

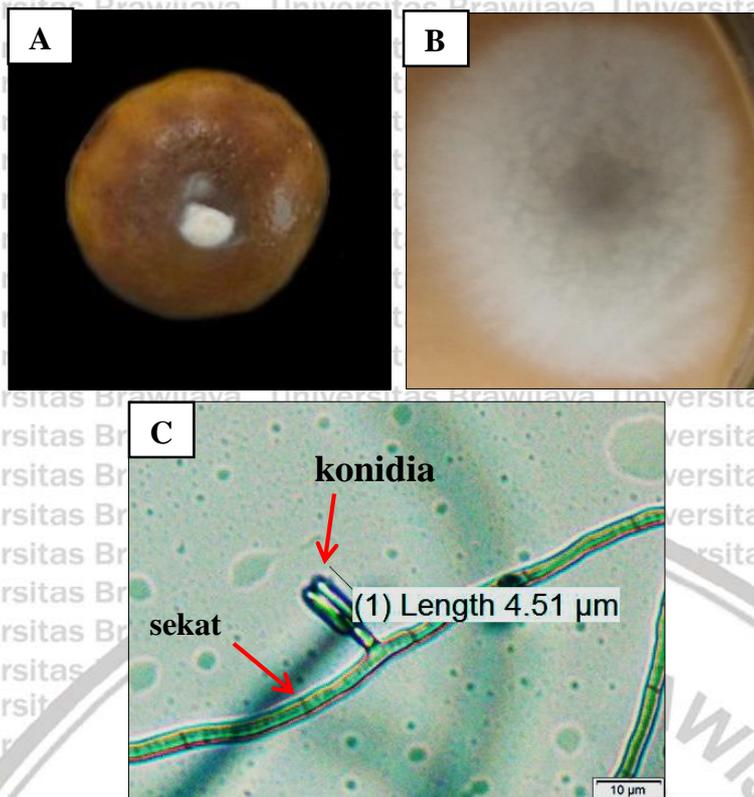
4.1 Isolasi dan Identifikasi Patogen *C. gloeosporioides*

Isolasi patogen *C. gloeosporioides* dilakukan pada buah jeruk keprok dengan gejala penyakit antraknosa (Gambar 5A). Dilakukan pembiakan pada media buatan PDA untuk mendapatkan isolat jamur. Selama kurang lebih 10 hari dilakukan pengamatan pada pertumbuhan jamur di media PDA.

Makroskopis. Hasil pengamatan secara makroskopis menunjukkan koloni jamur yang tumbuh pada media PDA tampak berwarna putih keabu-abuan, tekstur koloni tebal dan rapat (Gambar 5B). Koloni jamur tumbuh memenuhi cawan petri selama kurang lebih 7 hari. Guarro, dkk (1998) menyatakan bahwa *C. gloeosporioides* yang ditumbuhkan pada berbagai media buatan, mempunyai warna koloni mulai dari putih hingga keabu-abuan, tekstur koloni memiliki karakteristik yang sama dan memenuhi cawan petri selama 10 hari.

Mikroskopis. Identifikasi secara mikroskopis menunjukkan jamur memiliki hifa hialin yang bersekat dan bercabang. Terdapat konidia yang tumbuh pada ujung konidiofor. Konidia tampak hialin, tidak bersekat dan berbentuk silinder dengan kedua ujung yang tumpul (Gambar 5C). Hal ini sesuai dengan pernyataan Semangun (2000) bahwa *C. gloeosporioides* memiliki konidium hialin, berbentuk silinder dengan ujung tumpul, kadang berbentuk agak jorong dengan ujung yang membulat, tidak bersekat, berukuran 9 – 24 x 3 - 6 µm, terbentuk konidiofor seperti fialid, berbentuk silinder, berwarna hialin atau agak kecoklatan.

Isolat yang telah diidentifikasi, kemudian diuji postulat Koch. Hasil uji menunjukkan buah yang diinokulasi dengan isolat jamur yang telah didapat sebelumnya memiliki gejala penyakit antraknosa. Area gejala yang muncul diisolasi kembali dan dibiakan pada media buatan PDA. Biakan jamur tersebut menunjukkan ciri-ciri makroskopis (Gambar 5B) dan mikroskopis (Gambar 5C) yang sama dengan sebelumnya. Biakan jamur dipurifikasi sehingga didapatkan biakan murni dari patogen *C. gloeosporioides*.



Gambar 1. *C. gloeosporioides*. A: Gejala penyakit pada buah jeruk. B: Kenampakan makroskopis koloni jamur. C: Mikroskopis hifa dan konidia.

4.2 Isolasi dan Identifikasi Khamir Termotoleran

Isolasi khamir termotoleran dilakukan pada buah jeruk keprok sehat. Diperoleh 3 isolat khamir setelah diberi perlakuan suhu dengan dioven pada suhu 40°C selama 90 menit. Berdasarkan hasil identifikasi, khamir yang diperoleh tergolong dalam genus *Candida* dan *Pichia*. Dua khamir tergolong dalam genus *Candida* dan satu khamir tergolong dalam genus *Pichia*. Perbandingan ciri mikroskopis dan makroskopis khamir yang ditemukan dengan literatur yang merujuk pada Kurtzman dan Fell (1998) disajikan pada Lampiran Tabel 9.

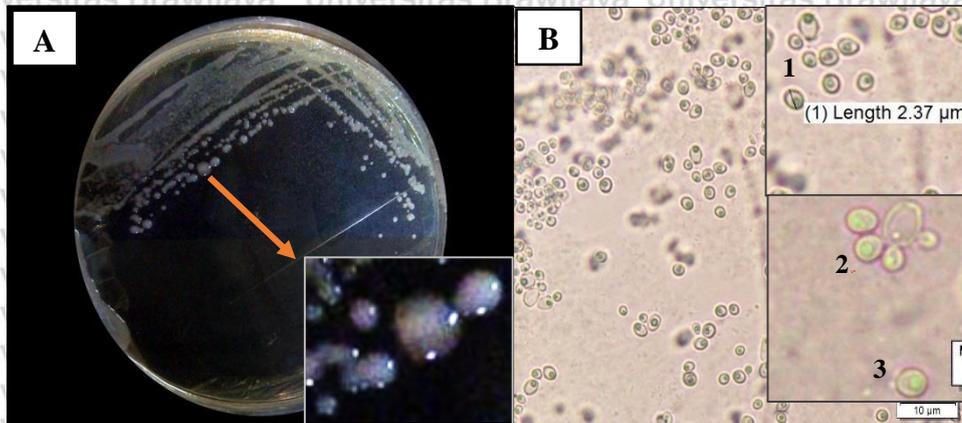
1. *Candida* sp. (isolat 1)

Makroskopis. Berdasarkan pengamatan makroskopis menunjukkan koloni berwarna putih kekuningan lebih pekat dipusat membias bening ke tepi, elevasi agak cembung, memiliki tekstur butiran, permukaan halus, serta tepi koloni yang rata bergerigi (Gambar 6A).

Mikroskopis. Pengamatan secara mikroskopis menunjukkan sel berbentuk bulat dengan ukuran berkisar 1,00 - 2,5 μm, sel tunggal, terdapat 1-2 inti sel dan membelah secara multilateral. Kurtzman dan Fell (1998) mendeskripsikan bahwa

khamir genus *Candida* sp., memiliki koloni seperti butiran, koloni berwarna putih kekuningan, memiliki bentuk permukaan yang timbul dan bertekstur halus.

Sedangkan ciri-ciri mikroskopis *Candida* sp., sel-selnya tunggal dan berbentuk bulat, lonjong, maupun bulat lonjong. Ukuran sel berkisar antara 1-5 μm dan membelah dengan cara berkelompok seperti rantai pendek (Gambar 6B).

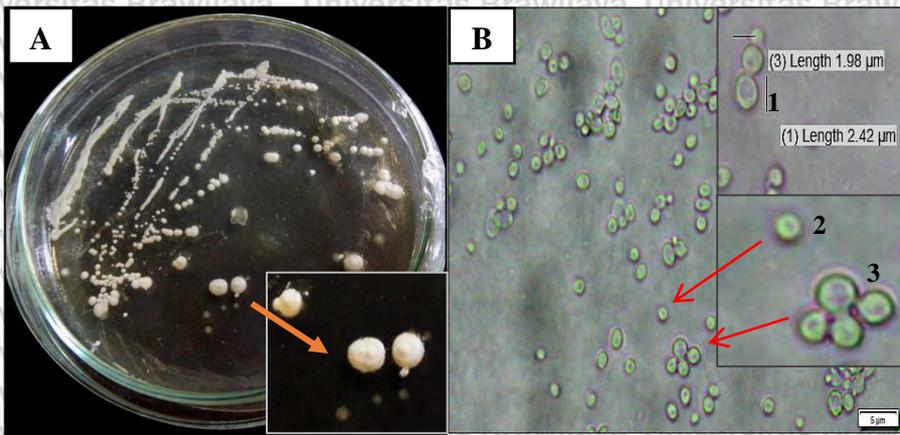


Gambar 2. Khamir *Candida* sp. (isolat 1), A. Makroskopis umur 5 hsi. B. Mikroskopis; (1) Ukuran sel (2) Pertunasan multilateral (3) Sel tunggal.

2. *Candida* sp. (isolat 2)

Makroskopis. Berdasarkan pengamatan makroskopis menunjukkan koloni berwarna putih pekat, elevasi cembung, memiliki tekstur butiran, permukaan kusam halus, serta tepi koloni yang rata (Gambar 7A).

Mikroskopis. Pengamatan secara mikroskopis menunjukkan sel berbentuk bulat dengan ukuran berkisar 1,00 - 2,49 μm , sel tunggal, terdapat 1 inti sel dan membelah secara multilateral. Kurtzman dan Fell (1998) mendeskripsikan bahwa khamir genus *Candida* sp., memiliki koloni seperti butiran, koloni berwarna putih kekuningan, memiliki bentuk permukaan yang timbul dan bertekstur halus. Sedangkan ciri-ciri mikroskopis *Candida* sp., sel-selnya tunggal dan berbentuk bulat, lonjong, maupun bulat lonjong. Ukuran sel berkisar antara 1-5 μm dan membelah dengan cara berkelompok seperti rantai pendek (Gambar 7B).

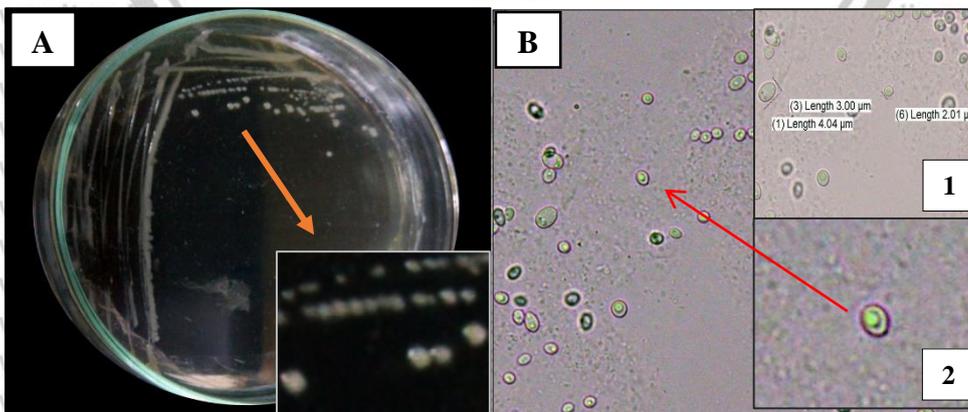


Gambar 3. Khamir *Candida* sp. A. Makroskopis umur 5 hsi. B. Mikroskopis; (1) Ukuran sel (2) Sel tunggal (3) Pertunasan multilateral.

3. *Pichia* sp.

Makroskopis. Berdasarkan pengamatan makroskopis menunjukkan koloni berwarna putih kekuningan membias bening ke tepi, elevasi cembung, memiliki tekstur butiran, permukaan halus, serta tepi koloni yang rata (Gambar 8A).

Mikroskopis. Pengamatan secara mikroskopis menunjukkan sel berbentuk bulat ovoid dengan ukuran berkisar 2,00 - 4,04 μm , sel tunggal, dan terdapat 1 - 3 inti sel. Kurtzman dan Fell (1998) mendeskripsikan bahwa pertumbuhan biakan *Pichia* sp. pada suhu 25° C menunjukkan koloni berwarna putih, berbentuk butiran cembung rendah, dan memiliki tekstur yang halus. Sedangkan ciri-ciri mikroskopis *Pichia* sp., sel-selnya berbentuk bulat telur memanjang dengan ukuran 2,0-10 μm , sel tunggal dan dapat membentuk rantai pendek hingga dan membentuk *pseudomiselium* (Gambar 8B).



Gambar 4. Khamir *Pichia* sp. A. Makroskopis umur 5 hsi. B. Mikroskopis; (1) Ukuran sel (2) Sel tunggal.

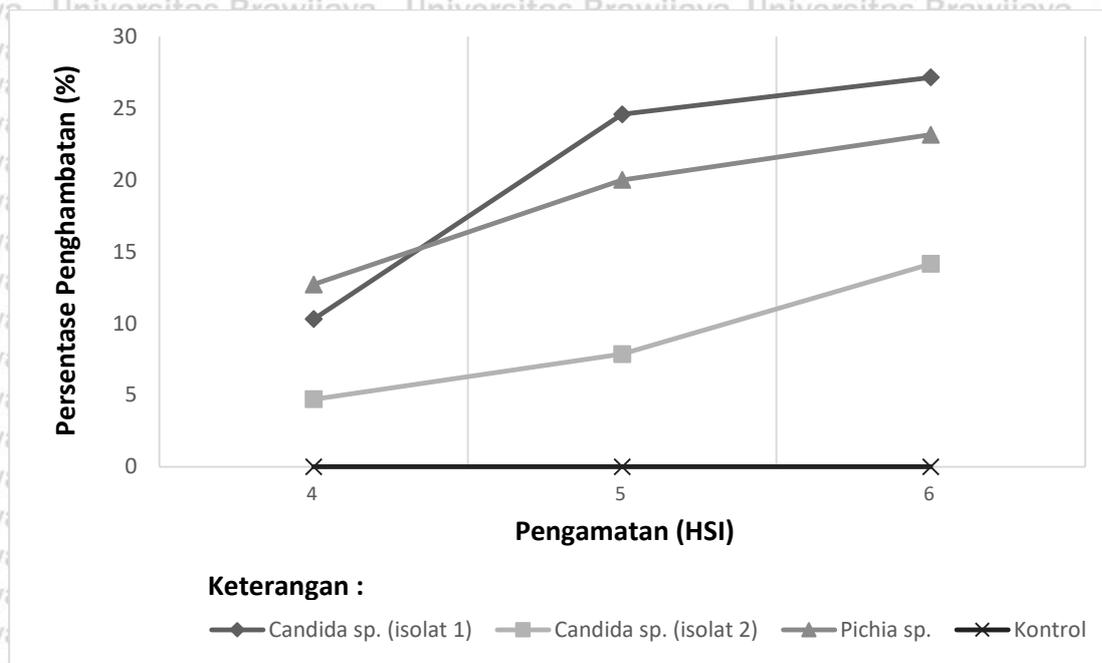
Tabel 1. Kenampakkan makroskopis dan mikroskopis khamir termotoleran yang ditemukan

Ciri Makroskopis					
Khamir	Warna Koloni	Tekstur Koloni	Permukaan Koloni	Elevasi Koloni	Tepi Koloni
<i>Candida</i> sp. (isolat 1)	Putih kekuningan	Butiran	Halus	Agak cembung	Rata bergerigi
<i>Candida</i> sp. (isolat 2)	Putih pekat	Butiran	Kusam halus	Cembung	Rata
<i>Pichia</i> sp.	Putih kekuningan	Butiran	Halus	Cembung	Rata
Ciri Mikroskopis					
Khamir	Bentuk Sel	Ukuran Sel (µm)	Reproduksi	Pola Tunas	Hifa/Pseudohifa
<i>Candida</i> sp. (isolat 1)	Bulat	1 – 2,5	Tunas	Multilateral	Tidak ada
<i>Candida</i> sp. (isolat 2)	Bulat	1 – 2,49	Tunas	Multilateral	Tidak ada
<i>Pichia</i> sp.	Bulat ovoid	2 – 4,04	Tunas	Multilateral	Tidak ada

4.3 Uji Efikasi Khamir Termotoleran dengan Patogen *C. gloeosporioides*

4.3.1 Uji Antagonis Khamir Termotoleran terhadap Patogen *C. gloeosporioides* secara *In vitro* pada Media PDA

Pengujian antagonis dilakukan terhadap 3 isolat khamir termotoleran dengan isolat patogen *C. gloeosporioides* pada media PDA, disertai pengujian kontrol sebagai acuan penghambatan. Pengamatan daya hambat khamir terhadap patogen dilakukan sejak 1 HSI hingga 6 HSI. Potensi penghambatan khamir terhadap *C. gloeosporioides* baru terlihat pada pengamatan hari keempat. Rerata persentase penghambatan khamir sejak 4 HSI hingga 6 HSI disajikan pada Gambar 9.



Gambar 5. Rerata persentase penghambatan khamir termotoleran terhadap pertumbuhan *C. gloeosporioides* sejak 4 HSI hingga 6 HSI

Gambar 9. menunjukkan bahwa ketiga khamir yang diujikan mampu memberikan penghambatan terhadap pertumbuhan patogen *C. gloeosporioides*. Ketiga khamir berpotensi dalam menghambat pertumbuhan patogen *C. gloeosporioides*. Terbukti dari nilai persentase hambatan ketiga khamir yang lebih besar dari pada kontrol. Perlakuan kontrol memiliki persentase hambatan paling rendah, sebesar 0%, menunjukkan bahwa tidak ada hambatan pada perlakuan ini. Berdasarkan grafik (Gambar 9), persentase hambatan paling tinggi pada 6 HSI ditunjukkan oleh perlakuan khamir *Candida* sp. (isolat 1). Sedangkan perlakuan khamir *Candida* sp. (isolat 2) menunjukkan persentase hambatan paling rendah dibandingkan dari kedua perlakuan khamir yang lainnya.

Hasil analisis ragam persentase penghambatan khamir terhadap pertumbuhan *C. gloeosporioides* pada 1 HSI (Lampiran Tabel 1) menunjukkan bahwa terdapat pengaruh penghambatan yang nyata terhadap pertumbuhan *C. gloeosporioides* oleh khamir. Nilai penghambatan yang terlihat pada 1 HSI disebabkan oleh pertumbuhan jamur patogen yang masih awal dan lambat, sehingga jarak (diameter) antara titik tumbuh patogen dengan titik tumbuh khamir masih lebar. Jadi pengaruh yang nyata pada analisis ragam persentase penghambatan khamir terhadap pertumbuhan *C. gloeosporioides* pada 1 HSI tidak disebabkan oleh daya hambat khamir terhadap pertumbuhan jamur patogen, melainkan karena pertumbuhan patogen yang masih lambat pada awal pertumbuhan.

Hasil analisis ragam persentase penghambatan khamir terhadap pertumbuhan *C. gloeosporioides* pada 2 HSI (Lampiran Tabel 2) menunjukkan bahwa tidak terdapat pengaruh penghambatan yang nyata terhadap pertumbuhan *C. gloeosporioides* oleh khamir. Ditunjukkan dengan nilai F hitung yang tidak lebih besar dari F tabel. Begitu pula dengan hasil analisis ragam persentase penghambatan khamir terhadap pertumbuhan *C. gloeosporioides* pada 3 HSI (Lampiran Tabel 3).

Hasil analisis ragam persentase penghambatan khamir terhadap pertumbuhan *C. gloeosporioides* pada 4 HSI (Lampiran Tabel 4) menunjukkan bahwa terdapat pengaruh penghambatan yang nyata terhadap pertumbuhan *C. gloeosporioides* oleh khamir. Ditunjukkan dengan nilai F hitung yang lebih besar dari F tabel. Begitu pula dengan hasil analisis ragam persentase penghambatan khamir terhadap pertumbuhan *C. gloeosporioides* pada 5 HSI (Lampiran Tabel 5) dan 6 HSI (Lampiran Tabel 6). Rerata persentase hambatan khamir terhadap *C. gloeosporioides* selama 6 HSI disajikan pada Tabel 2.

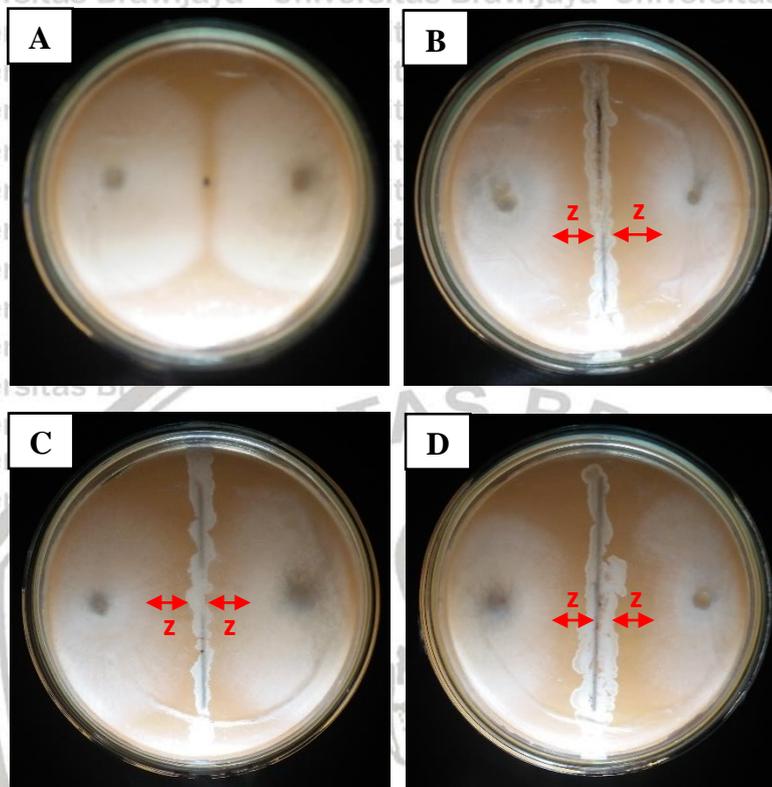
Tabel 2. Persentase Penghambatan Relatif Khamir Termotoleran terhadap Pertumbuhan Patogen *C. gloeosporioides* selama 6 HSI

Perlakuan Khamir	Persentase Penghambatan (%)								
	1 HSI	2 HSI	3 HSI	4 HSI	5 HSI	6 HSI			
<i>Candida</i> sp. (isolat 1)	18,86	20,14	14,86	10,28	b	24,57	b	27,14	b
<i>Candida</i> sp. (isolat 2)	7,86	14,43	10,43	4,71	a	7,86	a	14,14	a
<i>Pichia</i> sp.	25,14	21	12,57	12,71	b	20	b	23,14	b

Keterangan: Angka disertai huruf yang sama pada kolom yang sama menunjukkan tidak terdapat beda nyata antar perlakuan (BNT 5%)

Hasil analisis menggunakan uji Beda Nyata Terkecil pada taraf kesalahan 0,05 (BNT 5%) yang disajikan pada Tabel 2. menunjukkan pengaruh yang berbeda nyata antar perlakuan *Candida* sp. (isolat 1) dengan *Candida* sp. (isolat 2), serta perlakuan *Pichia* sp. dengan *Candida* sp. (isolat 2). Tetapi tidak terdapat beda nyata antar perlakuan *Candida* sp. (isolat 1) dengan *Pichia* sp. dalam menghambat pertumbuhan *C. gloeosporioides* selama 6 HSI. Perlakuan pertama menggunakan *Candida* sp. (isolat 1) mampu menghasilkan penghambatan sebesar 27,14%. Perlakuan kedua menggunakan *Candida* sp. (isolat 2), menghasilkan hambatan sebesar 14,14%. Pada perlakuan ketiga menggunakan *Pichia* sp., besarnya hambatan yang dihasilkan sebesar 23,14%. Berdasarkan hasil uji tersebut diketahui

bahwa yang paling berpotensi dalam menghambat pertumbuhan *C. gloeosporioides* adalah perlakuan menggunakan *Candida* sp. (isolat 1) dan *Pichia* sp. yang mampu menghasilkan daya penghambatan sebesar 27,14% dan 23,14%. Berikut hasil dokumentasi uji antagonis khamir termotoleran terhadap patogen *C. gloeosporioides* pada 6 HSI (Gambar 10).



Gambar 6. Hasil uji antagonis khamir termotoleran terhadap *C. gloeosporioides* pada 6 HSI secara *in vitro*. A: perlakuan kontrol, B: perlakuan *Candida* sp. (isolat 1), C: perlakuan *Candida* sp. (isolat 2), D: perlakuan *Pichia* sp., z: Zona bening.

Hasil uji antagonis antara ketiga khamir termotoleran dengan patogen *C. gloeosporioides* juga menunjukkan adanya interaksi antagonis. Mekanisme antagonis yang dihasilkan adalah mekanisme antibiosis. Mekanisme antibiosis terlihat dari adanya zona bening di antara khamir dan patogen *C. gloeosporioides* yang menunjukkan adanya hambatan bagi pertumbuhan patogen.

Mekanisme antibiosis terjadi karena khamir mengeluarkan senyawa metabolit sekunder atau senyawa toksik lainnya yang dapat menghambat pertumbuhan patogen. Salah satunya ialah melalui mekanisme enzimatik. Enzim yang dihasilkan khamir ialah enzim kitinase, enzim ini dapat mendegradasi kitin yang menyusun dinding sel jamur. Haggag dan Mohamed (2007) melaporkan bahwa mekanisme antibiosis khamir melibatkan penggunaan senyawa metabolit sekunder seperti enzim pelisis, senyawa volatile, siderophores atau

senyawa toksik lainnya sehingga dapat menyebabkan fungistatik, lisis dinding sel, atau nekrotik, sehingga pertumbuhan jamur terhambat.

4.3.2 Uji Antagonis Khamir Termotoleran terhadap Patogen *C. gloeosporioides* secara *In vivo* pada Buah Jeruk Keprok

Uji antagonis secara *in vivo* dilakukan untuk mengetahui nilai kejadian penyakit dan masa inkubasi patogen *C. gloeosporioides* pada buah jeruk keprok dengan perlakuan khamir termotoleran. Pengaruh khamir terhadap persentase tingkat kejadian penyakit dan masa inkubasi dapat dilihat pada Tabel 3 dan 4.

Tabel 3. Pengaruh khamir terhadap tingkat kejadian penyakit

Perlakuan Khamir	Tingkat Kejadian Penyakit (%)
Tanpa Khamir	100
<i>Candida</i> sp. (isolat 1)	81,14
<i>Candida</i> sp. (isolat 2)	90,57
<i>Pichia</i> sp.	85,86

Hasil analisis tingkat kejadian penyakit secara kuantitatif menggunakan perhitungan statistik menunjukkan bahwa tidak ada beda nyata antar perlakuan khamir dalam mengendalikan pertumbuhan *C. gloeosporioides*. Namun apabila dianalisis secara kualitatif berdasarkan hasil pengamatan, ketiga perlakuan khamir memiliki potensi untuk menekan tingkat kejadian penyakit pada buah. Perlakuan menggunakan *Candida* sp. (isolat 1) menghasilkan tingkat kejadian penyakit sebesar 81,14%, perlakuan menggunakan khamir ini mampu menekan tingkat kejadian penyakit sebesar 18,86%. Perlakuan menggunakan *Candida* sp. (isolat 2) menghasilkan tingkat kejadian penyakit sebesar 90,57%, menunjukkan adanya penekanan tingkat kejadian penyakit sebesar 9,43%. Perlakuan menggunakan *Pichia* sp. menghasilkan tingkat kejadian penyakit sebesar 85,86%, menunjukkan adanya penekanan tingkat kejadian penyakit sebesar 14,14%. Terlihat adanya penekanan tingkat kejadian penyakit oleh ketiga perlakuan khamir, namun nilai penekanan yang diberikan sangat kecil (tidak signifikan) sehingga tidak terlihat secara kuantitatif.

Hal ini diduga karena patogen dan khamir berasal dari habitat yang sama. Menurut Golubev (2006), kemampuan antagonisme khamir akan lebih meningkat terhadap mikroorganisme dari habitat yang berbeda. Mikroorganisme dari habitat yang berbeda

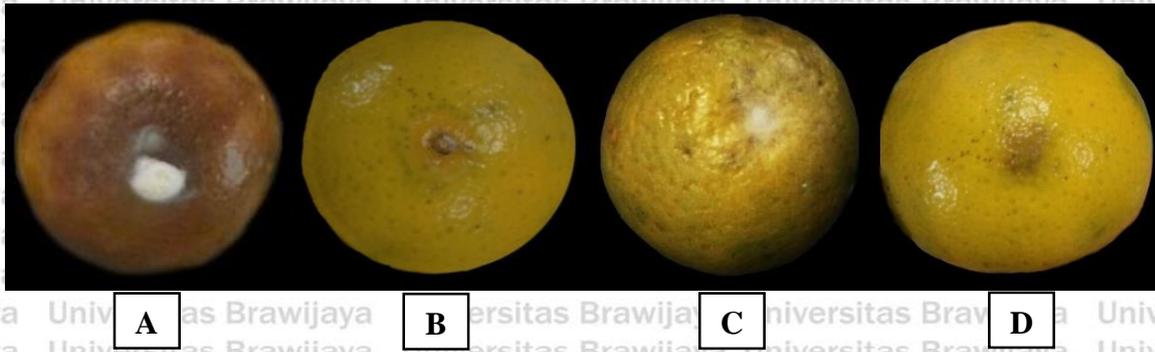
dianggap sebagai kompetitor baru yang harus dikalahkan untuk dapat mendominasi ruang dan nutrisi yang tersedia.

Pengamatan secara kualitatif menunjukkan bahwa metode penyemprotan suspensi khamir pada permukaan buah jeruk juga memberikan manfaat lain. Buah jeruk yang disemprot dengan suspensi khamir menjadi lebih tahan lama karena khamir mampu menghambat infeksi patogen. Metode penyemprotan pada permukaan buah jeruk dapat dijadikan salah satu metode pelapisan buah dengan menggunakan agens antagonis yang telah dikenal dengan istilah *bioedible coating*. Greener dan Fennema (1989) memaparkan bahwa pelapisan buah dapat dilakukan dengan beberapa cara, yaitu pencelupan (*dip application*), penyemprotan (*spray application*), pembuihan (*foam application*), dan penetesan (*drip application*).

Tabel 4. Pengaruh khamir terhadap masa inkubasi patogen

Perlakuan Khamir	Masa Inkubasi (Hari)
Tanpa Khamir	2 a
<i>Candida</i> sp. (isolat 1)	3,43 b
<i>Candida</i> sp. (isolat 2)	3 b
<i>Pichia</i> sp.	3,28 b

Berdasarkan hasil analisis menggunakan uji BNT pada taraf kesalahan 0,05 (Tabel 4) menunjukkan adanya beda nyata antara perlakuan khamir dengan perlakuan kontrol (tanpa khamir), tetapi tidak ada perbedaan yang nyata antar ketiga perlakuan khamir. Rerata masa inkubasi patogen *C. gloeosporioides* tanpa perlakuan khamir adalah 2 hari setelah inokulasi. Rerata masa inkubasi patogen *C. gloeosporioides* dengan perlakuan khamir berkisar pada 3 hari setelah inokulasi. Terlihat bahwa perlakuan ketiga khamir mampu memperlambat masa inkubasi patogen. Rerata masa inkubasi patogen dengan perlakuan *Candida* sp. (isolat 1) adalah pada 3,43 hari setelah inokulasi. Rerata masa inkubasi patogen dengan perlakuan *Candida* sp. (isolat 2) adalah pada 3 hari setelah inokulasi. Rerata masa inkubasi patogen dengan perlakuan *Pichia* sp. adalah pada 3,28 hari setelah inokulasi. Terlihat bahwa tidak ada perbedaan yang nyata antar ketiga perlakuan.



Gambar 7. Hasil uji antagonis khamir termotoleran terhadap *C. gloeosporioides* pada 6 HSI secara *in vivo*. A: perlakuan kontrol, B: perlakuan *Candida* sp. (isolat 1), C: perlakuan *Candida* sp. (isolat 2), D: perlakuan *Pichia* sp.

