

**FORMULASI BIOFUNGSIDA KITOSAN ENZIMATIK UNTUK  
PENGENDALIAN CENDAWAN PASCA PANEN PADA BUAH TOMAT  
SECARA *IN VITRO***

**SKRIPSI**

**Disusun oleh:  
Nessa Amelia  
061118020**



**PROGAM STUDI BIOLOGI  
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
UNIVERSITAS PAKUAN  
BOGOR  
2022**

**FORMULASI BIOFUNGISIDA KITOSAN ENZIMATIK UNTUK  
PENGENDALIAN CENDAWAN PASCA PANEN PADA BUAH TOMAT  
SECARA *IN VITRO***

**SKRIPSI**

Diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Sains (S.Si) pada  
Program Studi Biologi Fakultas Matematika Dan Ilmu Pengetahuan Alam  
Universitas Pakuan

**Disusun oleh:  
Nessa Amelia  
061118020**



**PROGAM STUDI BIOLOGI  
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
UNIVERSITAS PAKUAN  
BOGOR  
2022**

## HALAMAN PENGESAHAN

Judul : Formulasi Biofungisida Kitosan Enzimatik Untuk  
Pengendalian Cendawan Pasca Panen Pada Buah Tomat  
Secara *In Vitro*.  
Nama : Nessa Amelia  
Npm : 061118020  
Program Studi : Biologi

Skripsi ini telah diperiksa dan disetujui pada  
Bogor, 21 November 2022

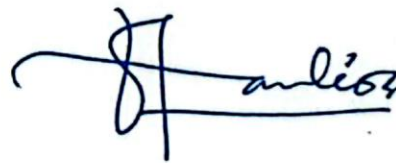
Menyetujui,

Pembimbing Pendamping,

Pembimbing Utama,



Ir. Yadi Suryadi, M.Sc  
NIP. 195809251985031002



Dra. Tri Saptari Haryani, M.Si.  
NIP. 196203181987032001

Mengetahui,

Ketua Program Studi Biologi  
FMIPA Universitas Pakuan



Dra. Triastinurmiatiningsih, M.Si.  
NIK. 108940294029207

Dekan FMIPA  
Universitas Pakuan



Asep Denih, S.Kom., M.Sc., Ph.D.  
NIK. 10997004090

**PERNYATAAN MENGENAI SKRIPSI DAN SUMBER INFORMASI  
SERTA PELIMPAHAN KEKAYAAN INTELEKTUAL DI UNIVERSITAS  
PAKUAN**

Saya yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama : Nessa Amelia

NPM : 061118020

Judul Skripsi : Formulasi Biofungisida Kitosan Enzimatik Untuk Pengendalian  
Cendawan Pasca Panen Pada Buah Tomat Secara *In Vitro*.

Dengan ini saya menyatakan bahwa Skripsi di atas benar karya saya dengan arahan dari komisi pembimbing dan belum diajukan dalam bentuk apapun kepada perguruan tinggi manapun.

Sumber informasi yang berasal atau dikutip dari karya yang diterbitkan maupun tidak diterbitkan dari penulis lain telah disebutkan dalam teks dan dicantumkan dalam Daftar Pustaka di bagian akhir skripsi ini.

Dengan ini saya melimpahkan hak cipta dari karya tulis saya kepada Universitas Pakuan.

Bogor, 21 November 2022



Nessa Amelia  
061118020

## LEMBAR PERSEMBAHAN

Segala puji bagi Allah SWT sang pemilik alam beserta isinya dengan kesempurnaannya. Puji syukur atas rahmat-Mu sehingga penulis diberikan kelancaran dalam menyelesaikan skripsi ini. Sholawat serta salam semoga selalu tercurah limpahkan kepada Nabi Muhammad SAW beserta keluarga dan para sahabat, beserta kita sebagai umatnya hingga akhir zaman.

Karya tulis ini saya persembahkan kepada:

Ibunda tercinta Siti Miswardah dan ayah tercinta Nurdin atas do'a yang tak pernah henti, dukungan dan bantuan baik moril maupun materil yang tak pernah pamrih.

Untuk adikku tersayang Pandu dan Talita sebagai pengingat untuk menyelesaikan penyusunan karya tulis yang penuh dengan lika liku ini.

Untuk seluruh staf akademik, laboran, dekanat dan staf tata usaha FMIPA Universitas Pakuan. dosen Biologi terkhusus Ibu Dra. Tri Saptari Haryani, M.Si. selaku pembimbing skripsi.

Untuk Bapak Ir. Yadi Suryadi, M.Sc. selaku pembimbing pendamping yang telah banyak membantu dan memfasilitasi berlangsungnya penelitian di Pusat Riset Holtikultura dan Perkebunan (BRIN).

Untuk teman-teman tercinta Adhilla, Erika, Tridayu, Hokky, Dika, Ulan, Anisa, Zena, Silvia, Wanna dan keluarga FMIPA Universitas Pakuan angkatan 2018 yang telah menemani perjalanan saya suka duka selama 4 tahun menempuh perkuliahan. Untuk yang terkasih Hilmi Al-Arafi Mauladina yang selalu mendukung saya selama penyusunan karya tulis ini.

Serta semua yang terlibat secara langsung maupun secara tidak langsung selama perkuliahan maupun selama pengerjaan skripsi ini.

## RIWAYAT HIDUP



Penulis lahir di Cianjur pada tanggal 25 Juli 2000. Anak pertama dari Ayah yang bernama Nurdin dan Ibu yang bernama Siti Miswardah. Penulis adalah anak pertama dari tiga bersaudara dengan adik yang bernama Pandu Septian dan Talita Hasna Humaira.

Penulis memulai Pendidikan formal di SDN Simpang pada tahun 2006 hingga tahun 2012. Kemudian melanjutkan ke jenjang Sekolah Pertama di SMPN 1 Pacet pada tahun 2012 hingga tahun 2015. Selanjutnya melanjutkan pendidikan Sekolah Menengah Atas di SMAN 1 Sukaresmi pada tahun 2015 hingga tahun 2018. Pada tahun 2018 hingga tahun 2022 penulis melanjutkan ke Perguruan Tinggi di Program Studi Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Pakuan Bogor.

Selama menjadi mahasiswa, penulis aktif di organisasi yaitu Badan Eksekutif Mahasiswa FMIPA UNPAK 2019-2020 sebagai anggota luar biasa dan Himpunan Mahasiswa Biologi-*Helianthus* 2020-2021 sebagai anggota divisi media dan informasi.

Pada tahun 2021 penulis melaksanakan praktik kerja magang pada bidang Mikrobiologi di Balai Besar Peneliti Bioteknologi dan Sumber Daya Genetik Pertanian (BB-BIOGEN). Kemudian dilanjutkan dengan melaksanakan penelitian pada tahun 2022 mengenai pembuatan formula biofungisida untuk mencegah penyakit antraknosa dengan cara optimasi kitosan hidrolisis secara enzimatik oleh enzim kitinase yang dihasilkan berbagai kelompok bakteri kitinolitik.

## KATA PENGANTAR

Puji dan syukur dipanjatkan ke hadirat Allah SWT, atas segala limpahan rahmat, hidayah, dan petunjuk kepada hambaNya. Penulis sangat bersyukur atas terselesaikannya laporan proposal penelitian yang berjudul “Formulasi Biofungisida Kitosan Enzimatik Untuk Pengendalian Cendawan Pasca Panen Pada Buah Tomat Secara *In Vitro*.”. Pada kesempatan ini penulis mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada :

1. Ibu Dra. Tri Saptari Haryani, M.Si, selaku pembimbing utama dari Progam Studi Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Pakuan;
2. Bapak Ir Yadi Suryadi, M.Sc., selaku pembimbing pendamping dari di Laboratorium Pusat Riset Holtikultura dan Perkebunan (BRIN); serta
3. Ibu Dra. Triastinurmiatiningsih, M.Si, selaku Ketua Progam Studi Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Universitas Pakuan.
4. Bapak Asep Denih, S.Kom., M.Sc., Ph.D., selaku Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Pakuan.

Penulis menyadari bahwa dalam penulisan laporan ini masih jauh dari kesempurnaan. Karena itu, penulis memohon saran dan kritik yang sifatnya membangun demi kesempurnaannya dan semoga laporan ini dapat bermanfaat bagi kita semua.

Bogor, 21 November 2022  
Penyusunan,

Nessa Amelia

## RINGKASAN

Nessa Amelia. NPM:061118020. Formulasi Biofungisida Kitosan Enzimatik Untuk Pengendalian Cendawan Pasca Panen Pada Buah Tomat Secara *In Vitro*. Dibimbing oleh: Dra. Tri Saptari Haryani, M.Si. dan Ir. Yadi Suryadi, M.Sc.

---

Salah satu faktor biologis yang seringkali menjadi kendala pasca panen pada buah tomat yaitu serangan penyakit antraknosa yang disebabkan oleh jamur *Colletotrichum* sp. Alternatif yang dapat digunakan dan ramah lingkungan untuk pengendalian serangan antraknosa yaitu kitosan. Efektivitas kitosan dapat ditingkatkan dengan hidrolisis kitosan secara enzimatik oleh bakteri endofit menjadi kitosan bobot molekul rendah dan pembuatan Kitosan-Tripolifosfat menggunakan metode gelasi ionik. Tujuan penelitian adalah menguji potensi bakteri endofit yang berasal dari buah tomat matang dan mentah dalam menghambat pertumbuhan jamur penyebab penyakit antraknosa dan menentukan konsentrasi terbaik dalam formulasi Kitosan-Tripolifosfat.

Dalam proses pembuatan formula Kitosan-Tripolifosfat digunakan metode gelasi ionik untuk merubah ukuran partikel kitosan pada konsentrasi kitosan bobot molekul rendah (KBMR) 0.2 % dan larutan natrium tripolifosfat (NaTPP) 0.1% dengan rasio (3:1, 1:1 dan 5:2) dalam 50 mL, kontrol positif tidak diberi formula dan kontrol negatif diberi formula. Parameter yang diamati yaitu persen daya hambat antar konsentrasi secara *in vitro*. Analisis data menggunakan program SPSS dengan metode Rancang Acak Lengkap (RAL) dengan 4 perlakuan dan 9 pengulangan. Jika terdapat perbedaan dilanjut dengan uji Duncan.

Hasil penelitian menunjukkan isolat bakteri MH-1 yang berasal dari buah tomat mentah memiliki daya hambat paling tinggi yaitu 80,24% sehingga dipilih untuk formulasi Kitosan-Tripolifosfat. Konsentrasi formula Kitosan-Tripolifosfat dalam 50 mL rasio (3:1, 1:1 dan 5:2) tidak berbeda nyata terhadap antar perlakuan, namun berbeda nyata terhadap perlakuan kontrol. Hal ini disebabkan persamaan ukuran partikel kitosan yang dihasilkan pada konsentrasi formula Kitosan-Tripolifosfat.



## SUMMARY

Formulation Of Enzymatic Chitosan Biofungicide For In Vitro Control Of Post-Harvest Fungi on Tomatoes. Supervised by: Dra. Tri Saptari Haryani, M.Sc. and Ir. Yadi Suryadi, M.Sc.

---

One of the biological factors that often becomes a post-harvest obstacle in tomatoes is anthracnose disease caused by the fungus *Colletotrichum* sp. An alternative that can be used and is environmentally friendly for controlling anthracnose attacks is chitosan. The effectiveness of chitosan can be increased by enzymatic hydrolysis of chitosan by endophytic bacteria into low molecular weight chitosan and the manufacture of Chitosan-Tripolyphosphate using the ionic gelation method. The purpose of this study was to test the potential of endophytic bacteria derived from ripe and unripe tomatoes in inhibiting the growth of the fungus that causes anthracnose and to determine the best concentration in the Chitosan-Tripolyphosphate formulation.

In the process of making the Chitosan-Tripolyphosphate formula, the ionic gelation method was used to change the particle size of chitosan at a low molecular weight chitosan concentration of 0.2% and 0.1% sodium tripolyphosphate (NaTPP) solution with ratios (3:1, 1:1 and 5:2).) in 50 mL, the positive control was not given the formula and the negative control was given the formula. The parameters observed were the percentage of inhibition between concentrations in vitro. Data analysis using the SPSS program with a Completely Randomized Design (CRD) method with 4 treatments and 9 repetitions. If there is a difference, it is continued with Duncan's test.

The results showed that the MH-1 bacterial isolate from raw tomatoes had the highest inhibitory power of 80.24%, so it was chosen for the Chitosan-Tripolyphosphate formulation. The concentration of the Chitosan-Tripolyphosphate formula in a 50 mL ratio (3:1, 1:1, and 5:2) was not significantly different between treatments, but significantly different from the control treatment. This is due to the chitosan particle size equation produced at the concentration of the Chitosan-Tripolyphosphate formula.

## DAFTAR ISI

	<b>Halaman</b>
HALAMAN PENGESAHAN.....	i
KATA PENGANTAR .....	v
RINGKASAN .....	vi
SUMMARY .....	vii
DAFTAR ISI.....	viii
DAFTAR GAMBAR .....	x
DAFTAR TABEL.....	xi
DAFTAR LAMPIRAN.....	xii
BAB I PENDAHULUAN .....	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.3 Manfaat Penelitian.....	3
1.4 Hipotesis .....	3
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	4
2.1 Tanaman Tomat.....	4
2.2 Antraknosa pada Buah Tomat .....	6
2.3 Bakteri Kitinolitik dan Bakteri Endofitik .....	7
2.4 Kitosan.....	9
2.5 Kitosan Bobot Molekul Rendah (KBMR).....	10
BAB III BAHAN DAN METODE PENELITIAN.....	11
3.1 Waktu dan Tempat .....	11
3.2 Alat dan Bahan .....	11
3.2.1 Alat .....	11
3.2.2 Bahan .....	11
3.3 Prosedur Penelitian.....	11
3.3.1 Pembuatan Media PDA (Potato Dextrose Agar) .....	11
3.3.2 Pembuatan Media NA ( <i>Nutrient Agar</i> ).....	12
3.3.3 Pembuatan Media Kitin Cair .....	12
3.3.4 Peremajaan Isolat Cendawan <i>Colletotrichum</i> sp. ....	12
3.3.5 Isolasi Bakteri Endofit .....	13

3.3.6 Uji Daya Hambat Isolat Bakteri Terhadap Cendawan	
<i>Colletotrichum</i> sp. ....	14
3.3.7 Pengamatan Isolat Bakteri Secara Makroskopis.....	15
3.3.8 Pengamatan Isolat Bakteri Secara Mikroskopis .....	15
3.3.9 Ekstraksi Enzim Kitinase.....	16
3.3.10 Pembuatan Kitosan Bobot Molekul Rendah (KBMR) .....	16
3.3.11 Pembuatan Kitosan Tripolifosfat (KTTP) Metode Gelasi Ionik .....	17
3.3.12 Uji Daya Hambat Cendawan Metode Tuang Secara In Vitro .....	18
3.3.13 Analisa Data.....	18
BAB IV_HASIL DAN PEMBAHASAN .....	19
4.1 Peremajaan Isolat Cendawan <i>Colletotrichum</i> sp.....	19
4.2 Isolasi Bakteri Endofit.....	21
4.3 Uji Daya Hambat Isolat Bakteri Terhadap Cendawan	
<i>Colletotrichum</i> sp. ....	23
4.4 Pengamatan Isolat Bakteri secara Makroskopis dan Mikroskopis .....	25
4.5 Ekstraksi Enzim Kitinase .....	26
4.6 Pembuatan Kitosan Bobot Molekul Rendah (KBMR).....	28
4.7 Pembuatan Kitosan Tripolifosfat (KTTP) Metode Gelasi Ionik .....	29
4.8 Uji Daya Hambat Cendawan Metode Tuang Secara In Vitro .....	30
BAB V_KESIMPULAN DAN SARAN.....	34
5.1 Kesimpulan.....	34
5.2 Saran .....	34
DAFTAR PUSTAKA .....	35
LAMPIRAN.....	42

## DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Indikator Kematangan Buah Tomat Tiap Level .....	6
2. Gejala Awal Penyakit Antraknosa pada Buah Tomat .....	6
3. Proses Deasetilasi pada Kitin .....	9
4. Metode Sumuran Peremajaan Isolat Cendawan .....	13
5. <i>Streak Plate</i> Goresan T Kuadran 3 .....	14
6. Uji Daya Hambat Isolat Bakteri Endofit Terhadap Cendawan <i>Colletotrichum</i> sp. ....	15
7. Peremajaan Cendawan <i>Colletotrichum</i> sp. pada Media PDA Menggunakan Metode Sumuran.....	19
8. Makromorfologi Isolat Cendawan <i>Colletotrichum</i> sp. pada Media PDA.....	19
9. Mikromorfologi Isolat Cendawan <i>Colletotrichum</i> sp.....	20
10. Koloni Bakteri pada Tomat Mentah (MH) dan Tomat Matang (MT) dalam Pengenceran .....	21
11. Pemurnian Koloni Bakteri Metode <i>Streak Plate</i> Goresan T Kuadran 3 Tomat Mentah (MH) dan Tomat Matang (MT).....	22
12. Kultur Murni Bakteri Tomat Mentah (MH) dan Tomat Matang (MT) pada Media Agar Miring .....	22
13. Diagram Daya Hambat Isolat Bakteri Terhadap Cendawan <i>Colletotrichum</i> sp. ....	23
14. Uji Daya Hambat Isolat Bakteri Tomat Mentah (MH) dan Tomat Matang (MT) Terhadap Cendawan <i>Colletotrichum</i> sp. Metode <i>Dual Culture</i> pada Media PDA .....	24
15. Pengamatan Isolat bakteri.....	25
16. Media Kitin Cair .....	26
17. Hasil Sentrifugasi .....	27
18. Pelet Hasil Ekstraksi Enzim Kitinase .....	28
19. Hasil Sentrifugasi .....	28
20. Pembuatan Kitosan Tripolifosfat (KTTP) .....	29
21. Hasil Rata-rata Luas Cendawan dan Daya Hambat Cendawan .....	31
22. Hasil Uji Daya Hambat Pertumbuhan <i>Colletotrichum</i> sp. pada Media PDA Sebanyak 9 Ulangan Hari ke-7 .....	32

**DAFTAR TABEL**

<b>Tabel</b>	<b>Halaman</b>
1. Perbandingan formula Kitosan Tripolifosfat (KTTP) dalam 50 mL. ....	17
2. Hasil Analisis Dengan Menggunakan Uji Duncan Sebagai Penentu Daya Hambat Cendawan Paling Paling Tinggi .....	33

**DAFTAR LAMPIRAN**

<b>Lampiran</b>	<b>Halaman</b>
1. Diagram Alur Penelitian .....	42
2. Proses Isolasi Bakteri.....	42
3. Hasil Daya Hambat Isolat Bakteri Terhadap Cendawan <i>Colletotrichum</i> sp.....	43
4. Hasil Uji Daya Hambat Pertumbuhan Cendawan Pada Berbagai Perlakuan .....	44
5. Hasil Analisis Data Uji Daya Hambat Pertumbuhan Cendawan Pada Berbagai Perlakuan .....	47

## **BAB I**

### **PENDAHULUAN**

#### **1.1 Latar Belakang**

Karena banyaknya kendala ekonomi, sosial dan biologis, perkembangan dan peningkatan produksi buah tomat tidak selalu mulus. Faktor biologis yang sering mengganggu adalah penyebaran penyakit antraknosa yang disebabkan oleh cendawan *Coletotrichum*. Beberapa spesies cendawan *Coletotrichum* penyebab penyakit antraknosa antara lain *Coletotrichum groeosporioides*, *Coletotrichum capsici*, *Coletotrichum acutatum*, dan *Coletotrichum cocodes* (Reviliya, 2020).

Petani telah mempraktikkan pencegahan dan pengendalian penyakit pasca panen, termasuk pemanenan yang hati-hati, menghindari cedera, pengangkutan yang baik, dan pemisahan buah yang sakit dan sehat. Namun, cara-cara tersebut tidak dapat menghilangkan patogen dari permukaan buah secara sempurna (Pamekas, 2002). Petani umumnya menggunakan sejumlah fungisida kimia seperti carbendazim, benomyl dan orthophanmethyyl untuk mengendalikan cendawan (Mulyaningtyas, 2016). Mengingat efek negatif fungisida kimia, yang dapat mencemari lingkungan, beracun bagi organisme, tahan patogen, dan dapat mengancam kesehatan manusia, alternatif untuk pengendalian antraknosa yang lebih aman adalah kitosan (Mulyaningtyas, dkk., 2016).

Efektivitas kitosan dalam pengendalian antraknosa dapat ditingkatkan dengan hidrolisis enzimatik kitosan menjadi Kitosan Bobot Molekul Rendah (KBMR). Salah satu enzim yang terlibat dalam proses hidrolisis kitosan komersial adalah enzim kitinase, yang dapat dihasilkan oleh bakteri endofit dari kelompok bakteri kitinolitik seperti *Bacillus farmus* E65 karena dapat menghasilkan enzim kitinase yang dapat mendegradasi dinding sel cendawan (Mulyaningtyas, dkk., 2016). Pada penelitian Pradana (2018) melaporkan bahwa bakteri endofit yang diisolasi dari akar tanaman yaitu *Coleus amboinicu*, *Mimosa pudica*, *Impatiens balsamina*, *Lycopersicum esculentum*, *Talinum triangulare*, *Strobilanthes crispus* dan *Oryza sativa* menghasilkan aktivitas kitinolitik. Selain itu, Aji Utami (2017) melaporkan bahwa terdapat 8 isolat bakteri endofit yang dihasilkan dari isolasi tomat ceri. Tiga isolat diisolasi dari tomat matang, tiga isolat dari tomat yang belum

matang, dan dua isolat bakteri dari batang tomat. Bakteri endofit merupakan bakteri yang hidup di dalam jaringan tanaman dan dapat mengkolonisasi jaringan tanaman tanpa merugikan inangnya (Aqlinia, dkk., 2020). Bakteri endofit biasanya terdapat pada jaringan tanaman yang sehat seperti biji, akar, batang, buah dan daun. Bakteri endofit menghuni jaringan tanaman dan memiliki habitat yang relatif terlindungi dan makanan yang memadai. Bagi tanaman, bakteri endofit berperan penting dalam menjaga kesehatan tanaman (Sianipar, dkk., 2020).

Upaya pengendalian penyakit pasca panen yang disebabkan oleh serangan antraknosa menggunakan kitosan antara lain telah dilakukan secara *in vitro* dan *in vivo*. Pada buah cabai, penggunaan hidrolisis kitosan secara enzimatik oleh bakteri kitinolitik, serta aplikasi rasio (5:2) konsentrasi Kitosan Bobot Molekul Rendah (KBMR) 0.2% : Natrium Tripolifosfat (NaTPP) 0.1% dilaporkan cenderung dapat menekan laju perkembangan penyakit dengan daya hambat 65-68% (Suryadi, 2019). Selain pada buah cabai, pengendalian antraknosa menggunakan hidrolisis kitosan secara enzimatik oleh bakteri *B. firmus* E65 telah dilakukan pada buah mangga. Persentase daya hambat cendawan paling baik dilaporkan pada perbandingan rasio (3:1) antara Kitosan Bobot Molekul Rendah (KBMR) 0.2 % : Natrium Tripolifosfat (NaTPP) 0.1% dengan tingkat daya hambat sebesar 91% pada suhu ruang (Mulyaningtyas, dkk., 2016). Selain itu Suryadi, dkk., (2020) juga melakukan penelitian dengan hidrolisis kitosan secara enzimatik oleh bakteri *B. cepacia* E76 dan aplikasinya pada buah mangga. Konsentrasi terbaik yang digunakan untuk pengendalian antraknosa yaitu Kitosan Bobot Molekul Rendah (KBMR) 0.3% : Natrium Tripolifosfat (NaTPP) 0.1% yaitu pada rasio (5:2), dengan daya hambat sebesar 61.28-93.75%,. Aplikasi kitosan enzimatik oleh bakteri endofit berpengaruh nyata pada umur penyimpanan buah mangga karena dapat menghambat pertumbuhan cendawan penyebab antraknosa. Biasanya selama penyimpanan, dalam keadaan segar buah mangga hanya dapat bertahan selama 7 hari pada kondisi suhu kamar 28–30°C. (Amiarsi, 2012).

Berdasarkan hal tersebut, masih perlu dilakukan optimasi kitosan hidrolisis secara enzimatik oleh enzim kitinase yang dihasilkan berbagai kelompok bakteri kitinolitik yang berbeda. Bakteri yang akan diuji pada penelitian ini



diperoleh dari bakteri endofit pada bagian asal buah tomat matang dan mentah kemudian diaplikasikan untuk pengendalian penyakit antraknosa secara *in vitro*. Dalam pembuatan kitosan enzimatis perlu dioptimasi berbagai konsentrasi Kitosan Bobot Molekul Rendah (KBMR) dan Natrium Tripolifosfat (NaTPP), agar didapatkan formula yang memiliki kemampuan daya hambat paling baik. Penelitian ini selanjutnya menjadi dasar untuk pengembangan penelitian *in vivo* pada pasca panen tanaman tomat untuk mengendalikan penyakit antraknosa.

### **1.2 Tujuan Penelitian**

1. Menguji potensi bakteri endofit yang berasal dari buah tomat matang dan mentah dalam menghambat pertumbuhan cendawan penyebab penyakit antraknosa.
2. Menentukan konsentrasi terbaik pada formula Kitosan-Tripolifosfat dengan konsentrasi Kitosan Bobot Molekul Rendah (KBMR) 0.2% : Natrium Tripolifosfat (NaTPP) 0.1% pada rasio (3:1, 1:1, dan 5:2) dalam menghambat pertumbuhan cendawan penyebab penyakit antraknosa secara *in vitro*.

### **1.3 Manfaat Penelitian**

Penelitian ini diharapkan dapat menjadi sumber informasi mengenai pembuatan formula biofungisida berbasis mikroba dalam menghambat penyakit pasca panen (antraknosa) pada buah tomat.

### **1.4 Hipotesis**

Salah satu konsentrasi formula Kitosan-Tripolifosfat pada KBMR 0.2% : NaTPP 0.1% (3:1, 1:1, 5:2) diduga memberikan pengaruh yang berbeda nyata terhadap daya hambat pertumbuhan cendawan penyebab antraknosa pada buah tomat secara *in vitro*.

## **BAB II**

### **TINJAUAN PUSTAKA**

#### **2.1 Tanaman Tomat**

Klasifikasi buah tomat menurut (Dewanti, 2016):

Kingdom : Plantae  
Divisi : Spermatophyte  
Subdivisi : Angiospermae  
Kelas : Dicotylodena  
Ordo : Tubiflorae  
Sub ordo : Myrtales  
Family : Solanaceae  
Genus : Lycopersicum  
Spesies : *Lycopersicum esculentum* Mill.

Tomat merupakan salah satu tanaman hortikultura yang bernilai ekonomi tinggi. Tomat mengandung banyak manfaat bagi kesehatan, terutama bagi tubuh manusia. Tomat juga merupakan salah satu jenis hortikultura yang multifungsi, seperti sayuran, buah-buahan, bumbu masak, minuman, bahan kosmetik, pewarna makanan hingga obat-obatan. Tomat memiliki kadar air yang tinggi dan mencapai berat total 94%. Selain itu, tomat dikenal kaya akan vitamin dan antioksidan. Salah satu antioksidan yang terdapat pada tomat adalah likopen (Yuniastri 2020). Likopen yang sering disebut  $\alpha$ karoten merupakan pigmen karotenoid berwarna merah cerah yang terdapat pada tomat dan buah merah lainnya (Dewi, 2018).

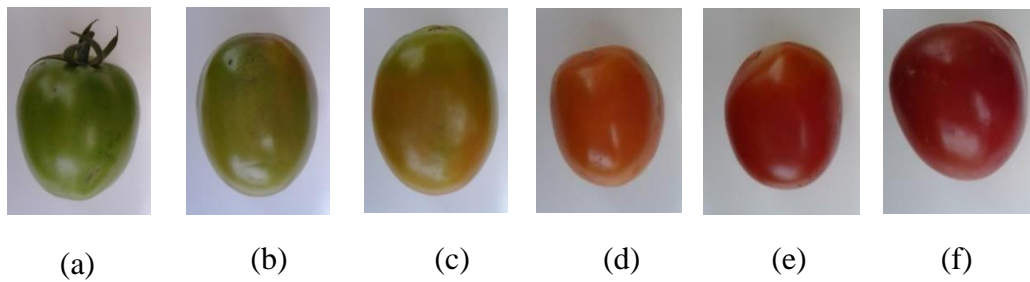
Tomat adalah tanaman tahunan yang dapat tumbuh setinggi 2 m bahkan lebih. Tanaman tomat memiliki akar tunggang yang kuat yang dapat menembus lebih dari 0,5 m atau lebih ke dalam tanah, dan akar lateral yang padat dan adventif. Batangnya kaku, berbulu dan kelenjar. Daun tomat ditutupi rambut (kelenjar) dan mengeluarkan aroma khas.

Bunga tomat hermaphrodit, dengan lima kelopak hijau berbulu dan lima mahkota kuning dengan bagian dasar yang menyatu, meruncing dan menyebar pada bagian atas seperti bintang. Alat kelamin terdiri dari benang sari (stamen) seperti sarung dan membalut putik (pistil). Karena memiliki tangkai sari yang pendek,

sehingga hanya kantong sari yang terlihat. Kantong sari memiliki 12 alur, sehingga berbentuk menyerupai ganat. Posisi kantong sari terkadang sama tinggidegan kepala putik (stigma), tetapi kadang-kadang kepala putiknya lebih tinggi dibanding kantong sarinya, tergantung varietas. Tepung sari (pollen) terdapat di kantong bagian dalam (theca). Tepung sari bersifat kering, sehingga setelah matang, pada hari yang cerah, dapat keluar dari kantong dengan mudah.

Buah pada tanaman tomat merupakan buah buni atau beri yang berdaging, ketika muda permukaan buahnya berbulu kasar dan berubah menjadi lebih halus ketika sudah matang. Sebagian besar buah pada tanaman tomat berbentuk bundar, namun ada juga yang memanjang, plum dan pir. Warna buah matang biasanya merata adalah merah, merah jambu, jingga muda, jingga, kuning, atau belum berwarna. Warna merah pada buah tomat disebabkan oleh pigmentasi likopen, warna kuning disebabkan karotenoid. Warna pertengahan disebabkan oleh perbedaan nisbah pigmen ini dalam kombinasi dengan warna kulit buah.

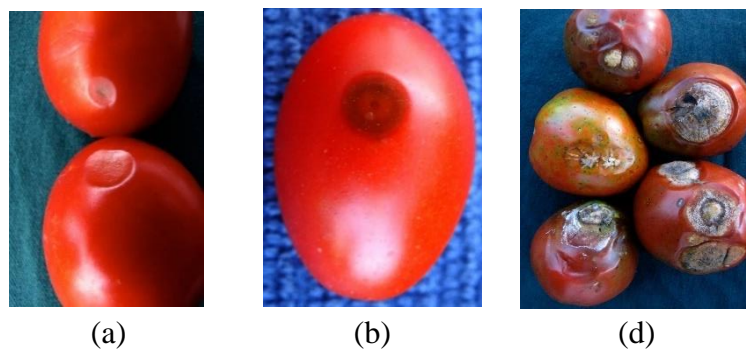
Buah tomat memiliki tingkat kematangan tertentu dalam kurun waktu yang singkat. Pendistribusian buah tomat diberbagai daerah menjadikan pentingnya melakukan klasifikasi tomat berdasarkan tingkat kematangannya. Menurut (Riska, 2016) terdapat enam level kematangan tomat yang dapat dibedakan berdasarkan warna dari tomat. Level kematangan dari tingkat tomat yang mentah adalah *mature geen, breakers, turning, pink, light red, dan red*. Warna dari tomat (Gambar 1) menjadi indikator yang penting dalam menentukan tingkat kematangan dan kualitas dari tomat tersebut. Klasifikasi kematangan tomat bertujuan untuk mengurangi risiko pembusukan tomat. Distribusi tomat dipengaruhi oleh jarak ke daerah pengiriman dan kematangan tomat.



**Gambar 1.** Indikator Kematangan Buah Tomat Tiap Level;  
 (a) *Mature green* (fase hijau) (b) *Breakers* (fase masak hijau) (c) *Turning* (fase pecah warna) (d) *Light red* (fase matang) (e) *Red* (fase matang sempurna)  
 (Riska, dkk., 2016)

## 2.2 Antraknosa pada Buah Tomat

Penyakit antraknosa merupakan salah satu penyakit penting pada beberapa komoditas hortikultura. Penyakit antraknosa diakibatkan oleh beberapa spesies cendawan dari genus *Colletotrichum*. Tiga spesies cendawan utama *Colletotrichum* yang menyebabkan antraknosa pada tomat di Amerika Serikat yaitu *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc., *Colletotrichum coccodes* (Wallr.) S.J. Hughes, dan *Colletotrichum dematium* (Pers. ex Fr.) Govea (Živković, dkk., 2010). Cendawan dari spesies *Colletotrichum* sp. mampu bertahan hidup di sisa-sisa tanaman yang terinfeksi dan di dalam tanah. Selama hujan, percikan air akan menyebarkan spora cendawan pada buah. Sebagian besar infeksi terjadi pada buah yang matang atau terlalu matang. Buah tomat yang belum matang juga dapat terinfeksi, meskipun gejala tidak berkembang sampai tomat mulai matang, dan biasanya cendawan akan berkembang pada suhu tinggi (Opeyemi, dkk., 2018).



**Gambar 2.** Gejala Awal Penyakit Antraknosa pada Buah Tomat;  
 (a) cincin konsentris, (b) bagian tomat yang terserang antraknosa menjadi gelap,  
 (c) antraknosa pada buah tomat  
 (Margaret MCGrath, 2022)

Gejala penyakit antraknosa terdapat pada (Gambar 2) awalnya bintik-bintik pada buah berukuran kecil, melingkar, dan cekung dari waktu ke waktu, dan dapat berkembang menjadi cincin konsentris. Setelah itu bagian tengah bintik antraknosa menjadi gelap karena cendawan menghasilkan struktur yang mengandung spora (mikrosklerotia dan acervuli) (Opeyemi, dkk., 2018). Cendawan *Colletotrichum gloeosporioides* memiliki spora yang berbentuk silindris, tumpul pada bagian ujungnya, berukuran  $16,1 \times 5,6 \mu\text{m}$  dengan kecepatan tumbuh  $12,5 \text{ mm}$  per hari. Cendawan *Colletotrichum acutatum* memiliki spora yang berbentuk silindris, meruncing pada bagian ujungnya, berukuran  $16,1 \times 5,3 \mu\text{m}$  dengan kecepatan tumbuh  $6,8 \text{ mm}$  per hari. Cendawan *Colletotrichum coccodes* memiliki spora yang berbentuk silindris, runcing pada bagian ujungnya, berukuran  $14,9 \times 4,2 \mu\text{m}$  dengan kecepatan tumbuh  $8,4 \text{ mm}$  per hari. Sedangkan cendawan *Colletotrichum capsici* memiliki spora yang berbentuk seperti bulan sabit, runcing pada bagian ujungnya, berukuran  $24,3 \times 4,4 \mu\text{m}$  dengan kecepatan tumbuh  $9,8 \text{ mm}$  per hari (Sudirga, 2016).

### **2.3 Bakteri Kitinolitik dan Bakteri Endofitik**

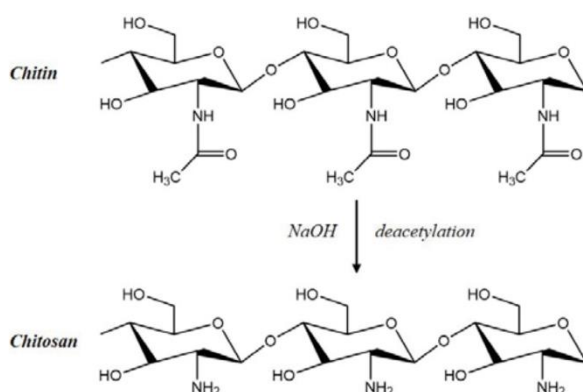
Enzim kitinase dapat dihasilkan oleh sekelompok bakteri, bakteri yang dapat menghasilkan enzim kitinase adalah bakteri kitinolitik (Ferniah, dkk., 2011). Enzim kitinase adalah enzim yang dapat mendegradasi kitin. Kitin adalah senyawa biopolimer terdapat pada eksoskeleton zooplankton, crustaceae, insekta, dan fungi (Haliza dan Suhartono, 2012). Kitinase merupakan enzim ekstraseluler yang dihasilkan oleh bakteri kitinolitik yang berperan penting dalam hidrolisis kitin (Sembiring, dkk., 2021). Pada perakaran beberapa tanaman bakteri kitinolitik dapat hidup secara endofit. Bakteri kitinolitik endofit dapat dimanfaatkan sebagai agen pengendali hayati serangga dan cendawan. Pada penelitian Ferniah, dkk., (2011), telah dibuktikan bahwa pertumbuhan cendawan *Fusarium oxysporum* dapat dihambat oleh bakteri kitinolitik. Hal tersebut dikarenakan dinding sel cendawan mengandung kitin sehingga bakteri kitinolitik dapat melisiskan dinding sel tersebut sampai rusak dan cendawan tidak dapat berkembang. Selain itu, kemampuan bakteri kitinolitik dalam melisiskan dinding sel cendawan *F. oxysporum* pada

pisang telah dibuktikan oleh Purba (2010). Dihasilkan empat isolat bakteri kitinolitik berasal dari rizosfer tanaman pisang yang sehingga dapat menghambat pertumbuhan *F. oxysporum*. Tumbuhan dapat bersimbiosis dengan ekosistemnya untuk berkembang di lingkungan alaminya. Mikroorganisme merupakan salah satu organisme terpenting yang dapat membentuk simbiosis yang menguntungkan dengan tanaman (Santoyo, dkk., 2016). Bakteri yang menguntungkan pada tanaman tersebut merupakan kelas bakteri yang memberikan banyak manfaat bagi tanaman inang, dan dapat membantu dalam menoleransi berbagai tekanan biotik dan abiotik yang dapat menghambat pertumbuhannya (Miliut, dkk., 2015). Mikroorganisme dapat hidup baik secara eksternal maupun internal di dalam tanaman inang (Afzal, dkk., 2019). Mikroorganisme yang terdapat pada jaringan dalam atau internal yaitu mikroba endofit (Kumar, 2017). Endofit adalah sekelompok mikroorganisme yang berada dalam tanaman sehat, dan tidak menyebabkan penyakit pada tanaman tersebut (Yan, dkk, 2018). Kata "endofit" berasal dari dua kata Yunani "*endo*" berarti di dalam dan "*phyton*" berarti tanaman. Mikroba endofit dapat didefinisikan sebagai mikroba yang terdapat pada jaringan internal tanaman termasuk sistem vaskular tanpa tanda infeksi atau efek berbahaya pada tanaman inang, endofit adalah endosimbion dengan bakteri (Kumar, 2017). Terdapat beberapa cara mekanisme invasi bakteri endofit kedalam jaringan tumbuhan yaitu melalui stomata, lentisel, luka alami, trachoma yang rusak, titik tumbuh akar lateral, radikula yang sedang tumbuh, dan jaringan akar meristematik yang tidak terdiferensiasi. Selain itu invasi melalui dinding sel rambut akar yang disebabkan oleh enzimatik juga dapat menjadi jalan masuknya bakteri ke dalam tanaman (Putri, dkk., 2018). Mulanya bakteri yang terdapat pada jaringan tanaman berkoloni di titik tempat bakteri masuk setelah itu melalui xylem bakteri menyebar ke seluruh bagian tanaman (Zulkifli, dkk., 2016). Mikroorganisme tersebut bisa hidup di dalam pembuluh vaskular atau di ruang intersel atau stomata. Sifat bakteri endofit sangat unik, ketika fisiologi tumbuhan berasal dari spesies yang sama tapi tumbuh di lingkungan yang berbeda, bakteri endofit yang dihasilkan akan berbeda sesuai kondisinya lingkungannya (Putri, dkk., 2018). Menurut penelitian Aji, dkk., (2017) Bakteri endofit yang telah diisolasi dari tanaman tomat berjumlah delapan isolat.

Delapan isolat tersebut tiga diantaranya diisolasi dari buah tomat matang, tiga isolat dari buah tomat mentah dan dua isolat dari batang tanaman tomat.

## 2.4 Kitosan

Kitosan berasal dari kitin. Kitosan adalah hasil produk dari turunan kitin yang memiliki struktur [ $\beta$ -(1-4)-2-amina -2-deoksi-D- glukosa] adalah produk dari deasetilasi kitin (Agustina, dkk., 2015). Kitin adalah polisakarida yang memiliki polimer rantai lurus dengan struktur [ $\beta$ -(1,4)-2-asetamida-2-dioksi-D-glukosa] (Nurhikmawati, dkk., 2014). Kitin dapat ditemukan pada eksoskeleton hewan arthropoda seperti kepiting, serangga, kepiting, udang serangga, cangkang moluska seperti kerang, bekicot, spines of diatoms, hewan invertebrata, dinding sel cendawan, mold dan yeast (Younes dan Rinaudo, 2015). Kitin yang terdapat pada cangkang udang merupakan mukopolisakarida yang saling berikatan bersama garam anorganik, terutama dengan kalsium karbonat ( $\text{CaCO}_3$ ), protein dan lipida juga pigmen-pigmen. Untuk itu cara memperoleh kitin dari cangkang udang harus melalui proses pemisahan protein atau deproteinasi dan pemisahan mineral atau demineralisasi, sedangkan dilanjutkan untuk mendapatkan melalui proses deasetilasi (Isnawati, dkk., 2015).



**Gambar 3.** Proses Deasetilasi pada Kitin

(Harjanti, 2014)

Deasetilasi pada (Gambar 3) adalah proses pengubahan gugus asetamida ( $\text{NHCOCH}_3$ ) yang terdapat dalam kitin menjadi gugus amina ( $\text{NH}_2$ ) pada kitosan dengan ditambahkan  $\text{NaOH}$  pekat atau ditambahkan larutan basa kuat yang memiliki konsentrasi tinggi (Wahyuni, dkk., 2016). Reaksi tersebut adalah reaksi

hidrolisis amida oleh suatu basa. Kitin berperan sebagai amida dan NaOH bertindak sebagai basa. Mekanisme pertama, hal yang terjadi adalah reaksi adisi, dimana padagugus  $-OH$  masuk ke dalam gugus  $NHCOCH_3$  lalu terjadi eliminasi gugus  $CH_3COO^-$  sehingga dihasilkan suatu amina yaitu kitosan. Sehingga melibatkan reaksi adisi dan eliminasi untuk hidrolisis dari kitin menjadi kitosan (Susilowati, 2015).

### **2.5 Kitosan Bobot Molekul Rendah (KBMR)**

Kitosan Bobot Molekul Rendah (KBMR) adalah kitosan yang telah dihidrolisis sehingga bobot molekul yang dimiliki oleh kitosan lebih rendah dari sebelumnya. Hidrolisis ini bisa menggunakan berbagai macam metode salah satunya secara enzimatik menggunakan enzim kitinase. Kitosan biasanya digunakan untuk biofungisida. Kitosan akan lebih efektif dalam fungsinya sebagai biofungisida ketika sudah berubah menjadi KBMR (Mulyaningtyas dkk., 2016). Kitosan diubah menjadi KBMR melalui mekanisme pemotongan ikatan  $\beta$ -(1-4)-glikosida oleh enzim kitinase karena enzim ini memanfaatkan kitin atau kitosan sebagai substratnya sehingga akan didegradasi yang menyebabkan ukurannya menjadi lebih kecil dan terbentuklah KBMR (Purkan dkk., 2016). KBMR dapat diperkecil lagi ukuran molekulnya menjadi nano dengan metode gelas ionik yang mana partikel nano tersebut terbentuk karena adanya interaksi elektrostatik antar muatan positif polimer dengan muatan negatif polianion salah satunya Natrium Tripolifosfat (NaTPP) yang bekerja melalui ikatan silang. KBMR yang diubah ukurannya menjadi nano oleh NaTPP akan memiliki sifat yang lebih stabil dan bisa dengan mudah menembus dinding membran dengan lebih baik (Mulyaningtyas dkk., 2016). Ukuran nano kitosan ini memiliki beberapa kelebihan antara lain tidak toksik, daya adsorpsi kitosan meningkat, kemampuan untuk penghantaran meningkat, dan stabilitas molekul lebih stabil sehingga untuk mengatasi patogen cendawan akan lebih efektif (Suryadi, dkk., 2017).



## **BAB III**

### **BAHAN DAN METODE PENELITIAN**

#### **3.1 Waktu dan Tempat**

Penelitian ini telah dilaksanakan di laboratorium Pusat Riset Holtikultura dan Perkebunan (BRIN) berlangsung 3 bulan, pada bulan Juli sampai September 2022.

#### **3.2 Alat dan Bahan**

##### **3.2.1 Alat**

Cawan petri, autoklaf, tabung reaksi, tabung ulir, LAF, pisau, timbangan analitik, *beaker glass*, aluminium foil, gelas ukur, *microwave*, magnetik stirer, erlenmeyer, saringan, rak tabung reaksi, jarum ose, spatula lab, *centrifuge*, mikroskop cahaya, *tube eppendorf* 1.5 mL dan 2 ml, inkubator, *freezer*, mikropipet, *microtip*, *microcentrifuge tube rack*, *water bath*, *vortex*, botol kaca kecil 10 mL, tusuk gigi, sedotan (*cork borer*), rak blue tip, spiritus, korek api, tissue, karet, plastik tahan panas, kertas label, lumpung dan alu.

##### **3.2.2 Bahan**

Buah tomat matang dan mentah varietas permata, isolat cendawan *Colletotrichum* sp. koleksi Pusat Riset Holtikultura dan Perkebunan (BRIN), kentang, aquadest, alkohol 70%, alkohol 96%, dextrosa, nutrient broth, agar powder, yeast ekstrak, pepton,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , L-Cystein HCL,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{CaCl}_2$ , koloidal kitin, kristal violet, iodium, sapranin, NaCl, KCl,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , HCl,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  70%,  $\text{CH}_3\text{COOH}$  100%, NaOH, kitosan (serbuk), asam asetat 100%, NaTPP (serbuk), Tween 80.

#### **3.3 Prosedur Penelitian**

##### **3.3.1 Pembuatan Media PDA (Potato Dextrose Agar)**

200 g kentang dikupas, setelah itu dicuci hingga bersih, lalu dipotong seperti dadu. Kentang dimasukkan kedalam *beaker glass* lalu ditambahkan 500 mL aquadest. Setelah itu kentang di *microwave* sampai empuk dan sari kentang keluar. Sari kentang dituang kedalam gelas ukur ditambahkan aquadest sampai 1 L. Setelah itu sari kentang yang telah ditambahkan aquadest dimasukkan kedalam *beaker*

*glass* lalu ditambahkan *dextrose* 20 g dan agar powder 20 g kemudian diaduk menggunakan *magnetic stirrer* dan dipanaskan pada gelombang mikro pada suhu 50°C. Setelah semua larut dimasukkan kedalam *Erlenmeyer*, ditutup menggunakan kapas dan aluminium foil, selanjutnya dilakukan sterilisasi menggunakan autoklaf suhu 121°C selama 15 menit. Setelah di sterilisasi, media PDA dimasukkan kedalam LAF untuk dilakukan penuangan ke cawan petri. Media PDA dapat dituangkan jika sudah tidak terlalu panas agar permukaan media tidak mengembun dan dibiarkan sampai mengeras.

### **3.3.2 Pembuatan Media NA (*Nutrient Agar*)**

28 g *nutrient agar* dilarutkan dalam 1 L aquadest. Larutan diaduk menggunakan *magnetic stirrer* dan dipanaskan dalam gelombang mikro pada suhu 50°C sampai larut. Setelah itu larutan disterilisasi pada suhu 121°C selama 15 menit pada *autoclave*. Setelah itu dilakukan penuangan ke cawan petri didalam LAF. Untuk pembuatan media NA miring, larutan yang telah dipanaskan dipipet kedalam tabung reaksi masing-masing sebanyak 9 mL. Tabung reaksi yang berisi larutan *nutrient agar* ditutup menggunakan kapas dan aluminium foil kemudian diikat menggunakan karet gelang. Larutan yang telah steril didinginkan diatas cetakan miring sehingga media yang dihasilkan dalam posisi miring.

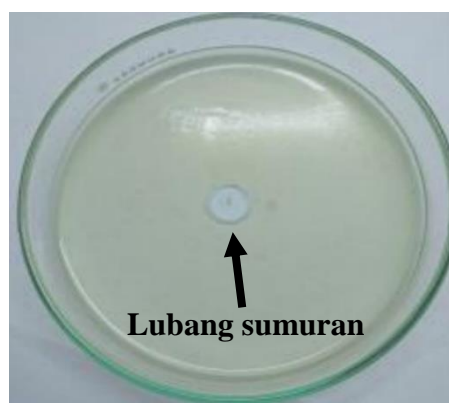
### **3.3.3 Pembuatan Media Kitin Cair**

Media kitin cair dibuat dengan komposisi yeast ekstrak 0.225 gr, pepton 0.65 gram, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.15 gr, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.29 gr, L-Systein HCL 0.05 gr, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.13 gr, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0.125 gr, MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O 0.005 gr, CaCl<sub>2</sub> 0.1 gr, kolodal kitin 1 mL. Semua bahan tersebut dilarutkan dalam 50 mL aquadest lalu diaduk menggunakan *magnetic stirrer* sampai larut dan dimasukkan kedalam botol sampel masing-masing sebanyak 10 mL. Setelah itu media tersebut di sterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit.

### **3.3.4 Peremajaan Isolat Cendawan *Colletotrichum* sp.**

Isolat cendawan *Colletotrichum* sp. yang akan digunakan dalam penelitian ini diperoleh dari laboratorium Pusat Riset Holtikultura dan Perkebunan (BRIN), yang telah dibuktikan patogenitasnya dengan Postulat Koch, pengamatan mikroskopis dan pengamatan makroskopis. Peremajaan dilakukan pada media PDA

(*Potato Dextrose Agar*) menggunakan metode sumuran didalam LAF dalam keadaan aseptik. Media PDA yang telah disiapkan dilubangi bagian tengahnya menggunakan *cork borer* steril ukuran 8 mm. Isolat cendawan *Colletotrichum* sp. diambil menggunakan *cork borer* steril ukuran 8 mm lalu diambil menggunakan tusuk gigi steril kemudin diletakan pada media PDA yang telah dilubangi. Setelah itu diinkubasi pada suhu ruang selama 7 hari (Purba, dkk., 2021).

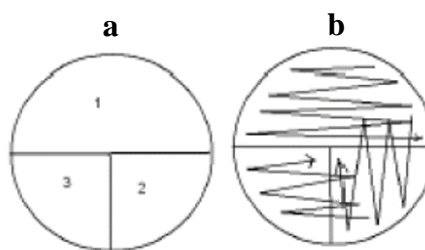


**Gambar 4.** Metode Sumuran Peremajaan Isolat Cendawan

### 3.3.5 Isolasi Bakteri Endofit

Isolasi bakteri endofit dilakukan terhadap sampel buah tomat varietas permata, dengan tingkat kematangan mentah (*mature green*) dan matang (*light red*) yang dipetik langsung dari perkebunan Cipanas, Puncak. Sampel dibawa ke laboratorium Pusat Riset Holtikultura dan Perkebunan (BRIN). Metode yang digunakan dalam isolasi bakteri endofit yaitu menurut (Yandila, dkk., 2018) dengan modifikasi. Sampel tomat dicuci dengan air mengalir sampai bersih dari kotoran. Kemudian sampel dipotong menjadi beberapa bagian sepanjang 1-3 cm menggunakan pisau steril dan sebanyak 1 g diambil. Setelah itu disterilisasi permukaannya berturut-turut menggunakan alkohol 70% selama 1 menit, lalu disterilisasi pada larutan NaOCl 1% selama 3 menit, kemudian dibilas menggunakan *aquadest* steril. Setelah steril buah tomat ditumbuhkan pada media NA untuk memastikan tidak ada bakteri filosoffer yang tumbuh, kemudian diinkubasi selama 24 jam. Jika tidak ada bakteri filosoffer yang tumbuh setelah inkubasi, dilakukan metode pengenceran untuk isolasi. 1 g buah tomat ditambahkan 1 mL *aquadest* steril lalu dihaluskan dengan lumpung dan alu. Dilakukan pengenceran bertingkat sampai  $10^{-6}$ . Pada pengenceran pertama sebanyak 1 mL larutan sampel

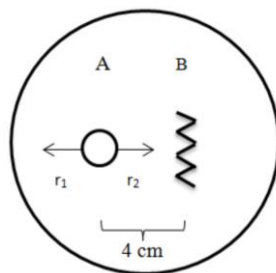
diencerkan dengan *aquadest* steril sebanyak 9 mL ke dalam tube. Pengenceran kedua dan seterusnya diambil sebanyak 1 mL dari tabung sebelumnya lalu diencerkan pada *aquadest* steril 9 mL. Dilakukan sampai pengenceran  $10^{-6}$ . Sampel pada pengenceran ke  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  dan  $10^{-6}$  diinokulasikan sebanyak 100 $\mu$ l pada media NA menggunakan metode *spread plate*. Penumbuhan bakteri dilakukan duplo dan diratakan sampai kering pada permukaan media agar membentuk koloni. Setelah itu diinkubasi pada suhu 30°C selama 48 jam. Dipilih 10 isolat bakteri, lalu dimurnikan satu persatu menggunakan metode *streak plate* goresan T kuadran 3 pada media NA (Gambar 5). Setelah itu dipilih 10 isolat bakteri lalu dilakukan pemurnian pada media agar miring.



**Gambar 5.** *Streak Plate* Goresan T Kuadran 3;  
(a) pembagian kuadran pada cawan petri; (b) langkah-langkah streak pada kuadran 3

### 3.3.6 Uji Daya Hambat Isolat Bakteri Terhadap Cendawan *Colletotrichum* sp.

10 isolat bakteri yang telah dimurnikan pada media agar miring diambil untuk dilakukan uji daya hambat bakteri terhadap cendawan *Colletotrichum* sp. menggunakan metode biakan ganda/*dual culture* (Gambar 6) menurut Pitasari (2018) dengan modifikasi. Uji tersebut dilakukan dalam cawan petri pada media PDA. Kepingan bulat isolat *Colletotrichum* sp. yang telah diambil menggunakan *cork borer* diletakkan dengan bantuan tusuk gigi steril pada media PDA yang telah dilubangi dengan jarak 4 cm dari isolat bakteri. Satu ose isolat bakteri diinokulasi dengan cara digoreskan sepanjang 3 cm. Selain itu, dibuat kontrol yang terdiri dari inokulasi cendawan tanpa bakteri. Kemudian diinkubasi pada suhu kamar. Pengamatan dilakukan setiap hari sampai hari ke 6.



**Gambar 6.** Uji Daya Hambat Isolat Bakteri Endofit Terhadap Cendawan *Colletotrichum* sp.

Keterangan : A = Cendawan patogen *Colletotrichum* sp.

B = Bakteri endofit dari buah tomat

$r_1$  = Jari-jari koloni cendawan yang menjauhi bakteri endofit

$r_2$  = Jari-jari koloni cendawan yang mendekati bakteri

Untuk mengetahui persentase daya hambat isolat bakteri terhadap cendawan *Colletotrichum* sp. dilakukan dengan mengukur diameter cendawan secara vertikal dan horizontal. Sedangkan perhitungan daya hambat menggunakan rumus menurut (Mayadianti, dkk., 2020):

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

### 3.3.7 Pengamatan Isolat Bakteri Secara Makroskopis

Satu isolat bakteri yang memiliki daya hambat paling baik dipilih untuk dilakukan pengamatan makroskopis. Pengamatan dilakukan pada media *Nutrient Agar* (NA). Media NA dituang pada cawan petri dan dibiarkan mengeras. Satu isolat bakteri endofit yang memiliki daya hambat paling baik diambil dan digoreskan menggunakan metode metode *streak plate* goresan T kuadran tiga menurut (Purwanto, dkk., 2014). Setelah itu diinkubasi selama 24 jam lalu diidentifikasi morfologinya berdasarkan bentuk tepian, elevasi, ukuran, penampilan, property optic, texture dan pigmentasi.

### 3.3.8 Pengamatan Isolat Bakteri Secara Mikroskopis

Satu isolat bakteri yang memiliki daya hambat paling baik dipilih untuk dilakukan pengamatan mikroskopis. Pengamatan isolat bakteri secara mikroskopis menggunakan metode pewarnaan gram menurut Panjaitan, dkk (2020). Objek glas disterilisasi terlebih dahulu diatas api. Setelah itu dipanaskan ose, kemudian

diambil satu tetes aquadest steril menggunakan ose, lalu simpan diatas *obyek glass* yang telah disterilisasi. Isolat bakteri endofit yang telah diamati secara makroskopis diambil satu ose lalu diletakkan diatas *obyek glass* yang ditetesi aquadest steril. Setelah itu fiksasi di atas api. Preparat yang telah siap kemudian ditetesi kristal violet selama satu menit, kemudian dicuci dengan *aquadest* secara perlahan dan ditiriskan. Setelah itu preparat ditetesi dengan lugol/iodine dan didiamkan selama dua menit lalu dibilas menggunakan *aquadest*. Preparat kemudian ditetesi etanol 98% selama lima detik kemudian bilas dengan *aquadest* lalu ditiriskan. Setelah itu preparat ditetesi safranin dan dibiarkan selama 1 menit dan dicuci. Setelah itu diamati jenis gram dan bentuk selnya menggunakan mikroskop cahaya yang terhubung dengan komputer.

### **3.3.9 Ekstraksi Enzim Kitinase**

Isolat bakteri ditumbuhkan pada media *Nutrient Broth* sebanyak 10 mL. Lalu di shaker selama 24 jam. Setelah itu diambil 1 mL biakan dari media *Nutrient Broth* dan dipindahkan ke media kitin cair sebanyak 10 mL lalu di shaker selama 72 jam. Hasil shaker dimasukkan kedalam eppendorf 1,5 mL dan di sentrifugasi pada kecepatan 10.000 rpm selama 30 menit dengan suhu 4°C. Supernatan hasil sentrifugasi diambil sebanyak 2,5 mL dan dicampur dengan ammonium sulfat 70% sebanyak 2.5 mL dan dihomogenkan dengan vorteks. Campuran tersebut disentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm selama 30 menit pada suhu 4°C. Pelet yang diperoleh dipisahkan dan dilarutkan dalam PBS pH 6,8 dalam jumlah yang minimal di dalam eppendorf 2 ml. Setelah itu enzim disimpan dalam suhu -21 °C sebelum digunakan (Mulyaningtyas dkk, 2016).

### **3.3.10 Pembuatan Kitosan Bobot Molekul Rendah (KBMR)**

Kitosan Bobot Molekul Rendah (KBMR) dibuat dengan cara, 2 g kitosan dilarutkan dalam 100 mL larutan asam asetat 1%. Larutan tersebut diukur pHnya menjadi pH 3.5. Campuran tersebut diaduk menggunakan *magnetic stirrer* selama 24 jam agar kitosan larut. Kitosan yang sudah larut diatur pHnya menjadi 5.3 dengan ditambahkan NaOH. Diambil larutan kitosan sebanyak 20 mL kemudian dihidrolisis menggunakan 0.2 mL enzim kitinase yang telah diekstraksi dari biakan isolat bakteri kitinolitik kemudian di *shaker* selama 24 jam. Proses hidrolisis

dihentikan dengan dididihkan pada *waterbath* suhu 100°C selama 5 menit. Kitosan hasil hidrolisis dipresipitasi dengan sentrifugasi 10.000 rpm selama 10 menit, kemudian pelet dicuci beberapa kali dengan air destilasi hingga pH netral. Pellet tersebut merupakan Kitosan Berat Molekul Rendah (KBMR). Kemudian pelet disimpan pada suhu 4°C (Mulyaningtyas dkk, 2016).

### 3.3.11 Pembuatan Kitosan Tripolifosfat (KTTP) Metode Gelasi Ionik

Untuk membuat larutan Kitosan Tripolifosfat (KTTP) diperlukan Kitosan Bobot Molekul Rendah (KBMR) 0.2%, Natrium Tripolifosfat (NaTPP) 0.1% dan Tween-80 0.2%.

Pembuatan Kitosan Bobot Molekul Rendah (KBMR) 0.2% yaitu sebanyak 0.2 g Kitosan Bobot Molekul Rendah (KBMR) dilarutkan dalam 100 mL asam asetat 1% menjadi larutan Kitosan Bobot Molekul Rendah (KBMR) 0.2%. Asam asetat 1% dibuat dengan komposisi asam asetat 1 mL ditambahkan 100 mL aquadest.

Setelah itu Kitosan Bobot Molekul Rendah (KBMR) 0.2% dicampurkan dengan larutan Natrium Tripolifosfat (NaTPP) 0.1%. Larutan Natrium Tripolifosfat (NaTPP) 0.1% dibuat dengan komposisi 0.1 g NaTPP ditambahkan 100 mL aquadest.

Larutan Kitosan Bobot Molekul Rendah (KBMR) 0.2% dicampurkan dengan larutan Natrium Tripolifosfat (NaTPP) 0.1%. Dibuat perbandingan (5:2, 1:1, 3:1) dalam 50 mL (**Tabel 1**). Setelah dicampurkan dengan perbandingan tertentu, larutan Kitosan Tripolifosfat (KTTP) ditambahkan tween 80 0.2% sebanyak 0.25 mL, kemudian diaduk dengan *shaker* selama 24 jam sebelum digunakan. Tween 80 0.2% dibuat dengan komposisi 0.2 mL tween 80 ditambah aquadest 100 mL (Mulyaningtyas dkk, 2016).

**Tabel 1.** Perbandingan formula Kitosan Tripolifosfat (KTTP) dalam 50 mL.

Rasio (KBMR 0.2% : NaTPP 0.1%)	KBMR 0.2%	NaTPP 0.1%
3:1	37.5 mL	12.5 mL
1:1	25 mL	25 mL
5:2	36 mL	14 mL

### 3.3.12 Uji Daya Hambat Cendawan Metode Tuang Secara In Vitro

Uji ini dilakukan menggunakan metode *pour plate*. *Pour plate* merupakan cara inokulasi dengan mencampurkan mikrobia dengan media yang masih hangat (45°C) kemudian didinginkan (Yastanto, 2020). Terdapat 4 perlakuan dan 9 ulangan yaitu kontrol dan media yang ditambahkan larutan Kitosan Tripolifosfat (KTTP). Untuk perlakuan kontrol, media PDA tidak dicampur dengan larutan Kitosan KTTP. Media PDA dilubangi bagian tengahnya menggunakan *cork borer* steril kemudian isolat cendawan *Colletotrichum* sp. diinokulasikan ke lubang tersebut lalu diinkubasi. Untuk perlakuan dengan media yang ditambahkan larutan KTTP, media PDA pada cawan petri yang masih hangat dicampurkan dengan 1 mL larutan KTPP dengan perbandingan KBMR 0.2% : NaTPP 0.1% (3:1, 1:1, 5:2). Kemudian media dibiarkan mengeras. Setelah mengeras, media tersebut dilubangi bagian tengahnya dengan *cork borer* steril kemudian isolat cendawan *Colletotrichum* Sp. diinokulasikan ke lubang tersebut dan diinkubasi pada suhu ruang (20-25°C). Pengamatan dilakukan sampai 7 hari masa inkubasi dengan membandingkan antara luas koloni kontrol dengan perlakuan KTPP. Setelah kontrol penuh dengan cendawan *Colletotrichum* sp. pada permukaan medianya, diukur luas pertumbuhan cendawan menggunakan mistar pada setiap perlakuan untuk mengetahui daya hambat yang diberi larutan K-TPP (Mulyaningtyas dkk, 2016).

### 3.3.13 Analisa Data

Analisa data menggunakan program SPSS dengan metode Rancang Acak Lengkap (RAL) pola sederhana. Kemudian akan dianalisis menggunakan ANOVA satu arah. Terdapat 4 perlakuan, setiap perlakuan dilakukan pengulangan sebanyak 9 kali. Perlakuan yang diberikan yaitu berupa kontrol dan formula Kitosan Tripolifosfat (KTTP) dengan rasio (5:2, 1:1, 3:1). Jika terdapat perbedaan, dilanjutkan dengan uji lanjut DUNCAN taraf signifikansi 5%.



## BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

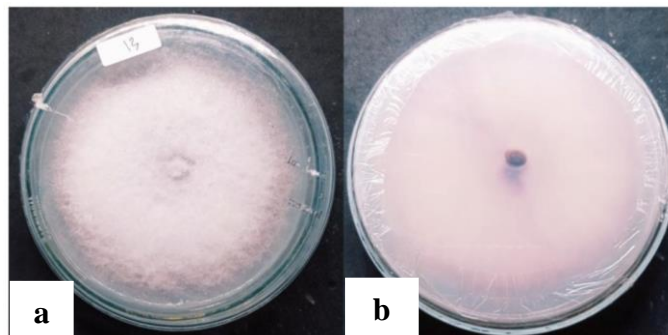
### 4.1 Peremajaan Isolat Cendawan *Colletotrichum* sp.

Peremajaan isolat cendawan *Colletotrichum* sp. dilakukan pada media PDA menggunakan metode sumuran (Gambar 7). Cendawan diperoleh dari di Laboratorium Pusat Riset Hortikultura dan Perkebunan (BRIN) yang telah diisolasi dari buah tomat permata yang bergejala antraknosa lalu dibuktikan patogenitasnya dengan Postulat Koch untuk pengamatan mikroskopis dan makroskopis.



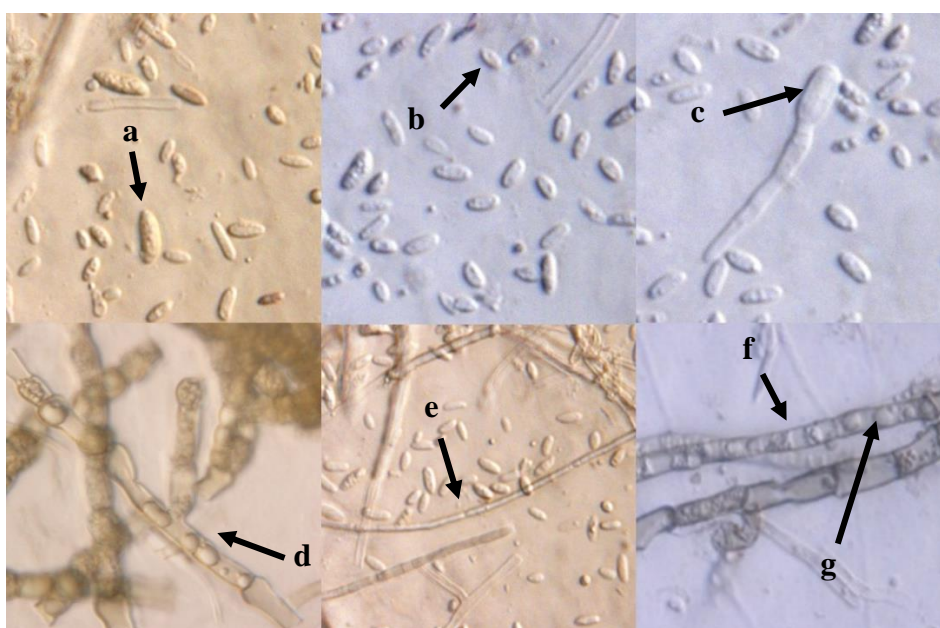
**Gambar 7.** Peremajaan Cendawan *Colletotrichum* sp. pada Media PDA Menggunakan Metode Sumuran

Peremajaan cendawan dilakukan sampai hari ke 7. Isolat cendawan *Colletotrichum* sp. yang diperoleh dari Laboratorium Konservasi Mikroorganisme BB-Biogen memiliki karakteristik makromorfologis miselium yang banyak, seperti kapas dan halus, koloni putih hingga merah muda, pusat koloni berwarna merah muda dan keunguan dan keabuan, arah pertumbuhan keatas dan kesamping, tepi koloni rata (Gambar 8).



**Gambar 8.** Makromorfologi Isolat Cendawan *Colletotrichum* sp. pada Media PDA;  
(a) tampak atas, (b) tampak bawah.

Hal ini sesuai dengan pernyataan Živković (2010) isolat *Colletotrichum acutatum* yang diisolasi dari buah tomat dan ditumbuhkan pada media PDA mulanya warna putih atau putih krem, lalu berwarna abu-abu dan kemudian berwarna abu-abu gelap. Selain itu menurut Anggaraeni (2019) cendawan anggota spesies *Colletotrichum* sp. mempunyai makromorfologis dengan karakteristik yakni koloni cendawan berwarna putih dan memiliki hifa yang tebal seperti kapas juga halus memiliki tepi koloni rata. Bagian bawah koloni cendawan berwarna putih hingga krem muda dengan pusat koloni berwarna merah muda hingga keunguan.



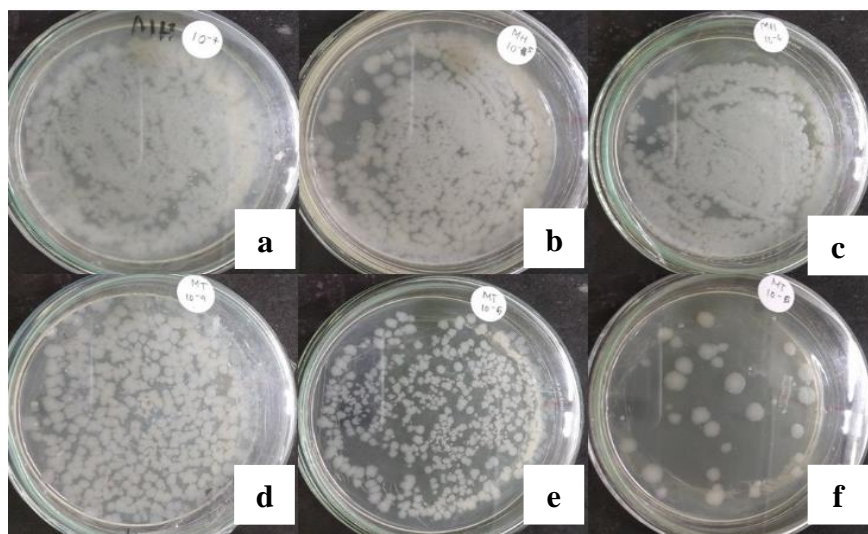
**Gambar 9.** Mikromorfologi Isolat Cendawan *Colletotrichum* sp.; (a) makrokonidia, (b) mikrokonidia, (c) appresorium, (d) konidiofor, (e) hifa bersekat, (f) askus, (g) askospora.

Secara mikromorfologis (Gambar 9) karakteristik pada isolat cendawan *Colletotrichum* sp. yakni terdapat konidia tidak bersekat dan bersifat hialin. Makrokonidia berbentuk silindris dengan membulat pada ujungnya, dan mikrokonidia berbentuk seperti telur (*ovoid*). Konidiofor bersifat hialin, tidak memiliki cabang dan bersekat. Askospora pada isolat cendawan tersebut berbentuk bulat hingga *ovoid* terbungkus didalam askus yang Panjang dan silinder. Memiliki hifa yang bersifat hialin, bersekat dan bercabang. Berdasarkan pernyataan tersebut, memiliki kesamaan dengan mikromorfologis cendawan *Colletotrichum* sp. yang diisolasi dari buah cabai rawit bergejala antraknosa. Hal ini sesuai dengan

pernyataan Anggraeni (2019) *Colletotrichum* sp. memiliki makrokonidia berbentuk lonjong/silindris dengan ujung tumpul, mikrokonidia berbentuk ovoid. Hifa bersekat, memanjang dan bercabang serta konidiofor bersekat dan tidak bercabang.

#### 4.2 Isolasi Bakteri Endofit

Bakteri endofit adalah suatu mikroorganisme seperti cendawan, aktinomisetes atau bakteri yang berkoloni dan hidup pada jaringan inang tanpa memiliki dampak/efek negatif, bahkan inang dan lingkungannya dapat diuntungkan (Desriani dkk, 2014). Penggunaan bakteri endofit merupakan alat pengendalian hayati yang saat ini sedang dikembangkan untuk mengendalikan berbagai penyakit tanaman. Endofit dilaporkan menghasilkan antibiotik dan enzim degradatif yang dapat menghambat perkembangan patogen (Temaja dkk, 2019). Bakteri endofit dapat hidup dan tumbuh di pembuluh vaskular atau ruang antar sel, akar, batang, daun, biji dan buah (Abedinzadeh dkk, 2018).

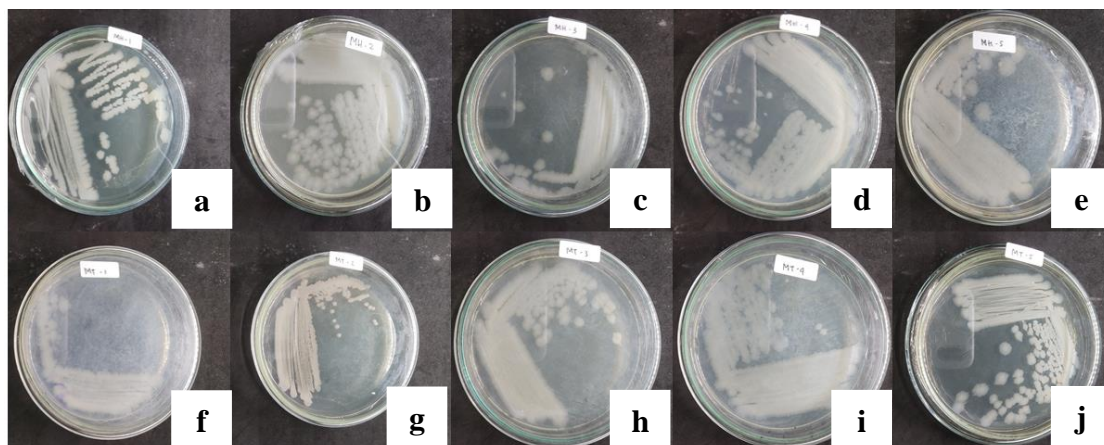


**Gambar 10.** Koloni Bakteri pada Tomat Mentah (MH) dan Tomat Matang (MT) dalam Pengenceran;

(a) MH  $10^{-4}$ , (b) MH  $10^{-5}$ , (c) MH  $10^{-6}$ , (d) MT  $10^{-4}$ , (e) MT  $10^{-5}$ , (f) MT  $10^{-6}$

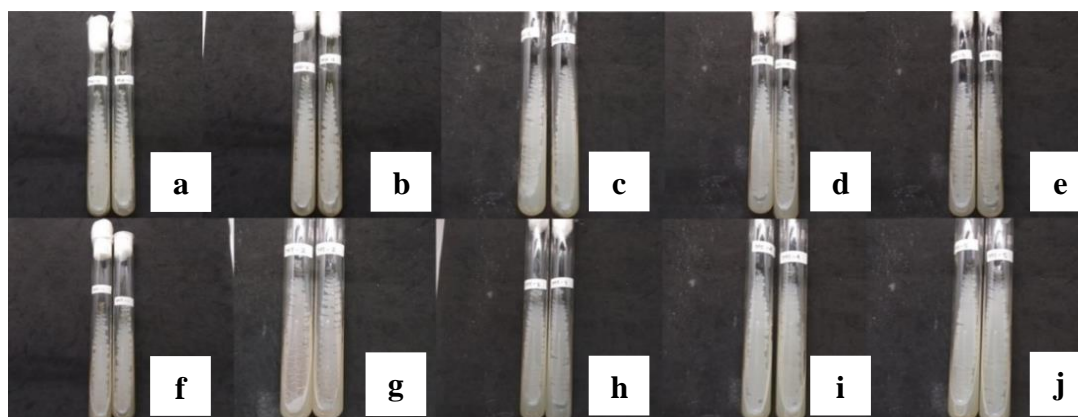
Bakteri endofit dapat ditemukan dengan cara mengisolasi pada media agar. Isolasi bakteri endofit dilakukan terhadap sampel buah tomat varietas permata, dengan tingkat kematangan *mature green* dan *light red* yang dipetik langsung dari perkebunan Cipanas, Puncak, Cianjur kemudian dilakukan isolasi bakteri endofit. Hasil inkubasi bakteri pada tiga pengenceran tertinggi yang telah ditumbuhkan pada

media NA terdapat pada (Gambar 10). Masing-masing sampel diencerkan sampai pangkat  $10^{-6}$ . Untuk sampel tomat *mature green* diberi kode MH, sedangkan untuk tomat *light red* diberi kode MT.



**Gambar 11.** Pemurnian Koloni Bakteri Metode *Streak Plate* Goresan T Kuadran 3 Tomat Mentah (MH) dan Tomat Matang (MT);  
(a) MH-1, (b) MH-2, (c) MH-3, (d) MH-5, (e) MH-6, (f) MT-1, (g) MT-2, (h) MT-3, (i), MT-4, (j) MT-5

Koloni bakteri yang terpisah pada sampel tomat MH dan MT dipilih sebanyak lima koloni. Setelah itu dilakukan pemurnian menggunakan metode *streak plate* goresan T kuadran tiga pada media NA untuk memperoleh kultur murni (Gambar 11).

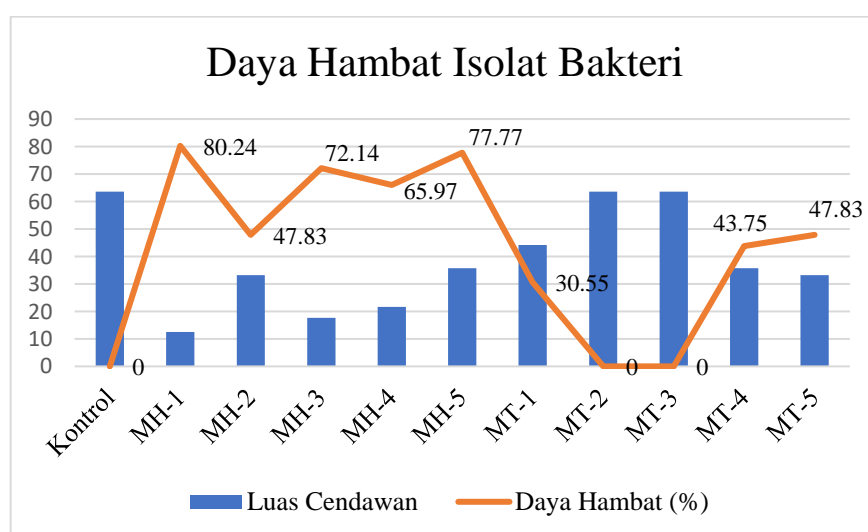


**Gambar 12.** Kultur Murni Bakteri Tomat Mentah (MH) dan Tomat Matang (MT) pada Media Agar Miring;  
(a) MH-1, (b) MH-2, (c) MH-3, (d) MH-5, (e) MH-6, (f) MT-1, (g) MT-2, (h) MT-3, (i), MT-4, (j) MT-5

Bakteri yang telah dimurnikan menggunakan metode *streak plate* goresan T kuadran tiga dipilih sebanyak lima koloni tunggal secara acak pada sampel tomat

MH dan MT lalu ditumbuhkan pada media agar miring untuk mendapatkan kultur murni (Gambar 12). Sampel tomat mature green diberi kode MH-1, MH-2, MH-3, MH-4 dan MH-5. Sedangkan untuk sampel tomat light red diberi kode MT-1, MT-2, MT-3, MT-4 dan MT-5. Berdasarkan penelitian Aji, dkk (2017) didapatkan delapan isolat bakteri endofit yang diisolasi dari tanaman tomat cherry, tiga diantaranya diisolasi dari buah tomat matang, tiga isolat dari buah tomat mentah dan dua isolat dari batang tanaman tomat.

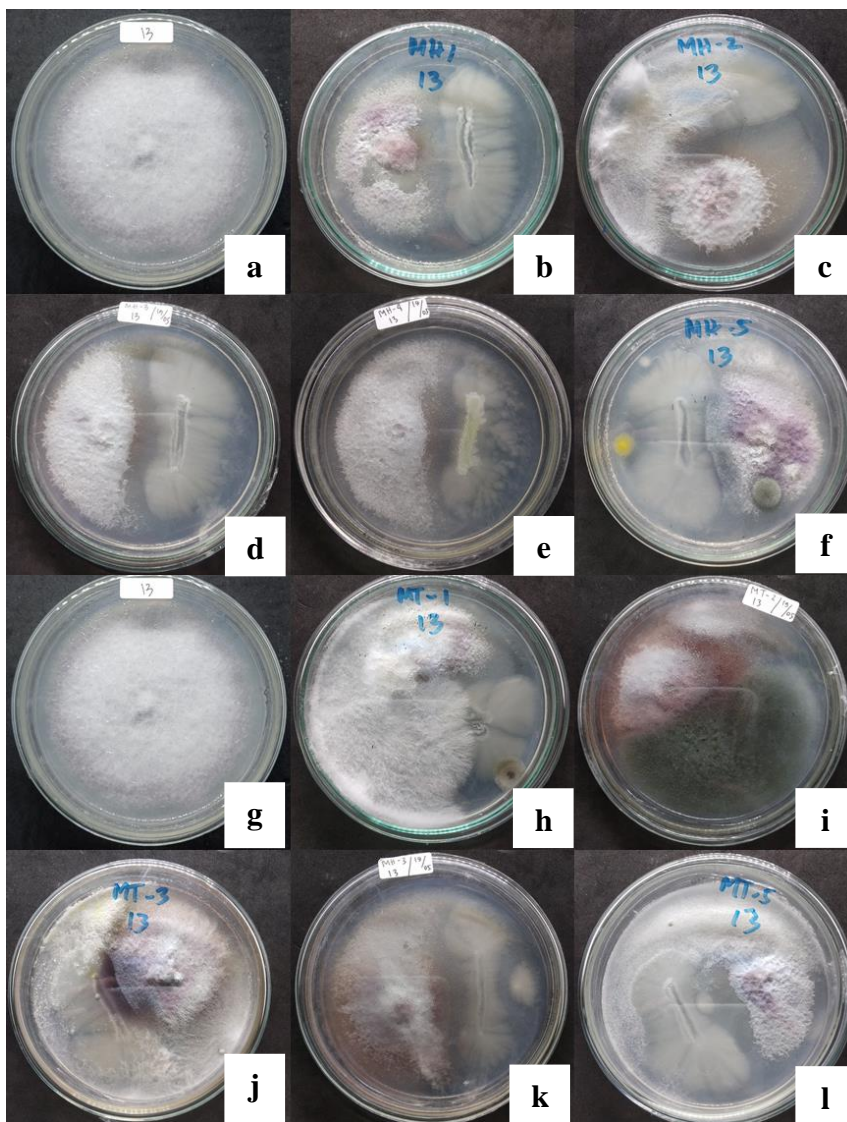
#### 4.3 Uji Daya Hambat Isolat Bakteri Terhadap Cendawan *Colletotrichum sp.*



**Gambar 13.** Diagram Daya Hambat Isolat Bakteri Terhadap Cendawan *Colletotrichum sp.*

Metode yang digunakan dalam uji daya hambat isolat bakteri yaitu metode *dual culture*. Metode tersebut dilakukan untuk mengamati interaksi langsung yang terjadi antara isolat bakteri dan patogen dengan menumbuhkan isolat bakteri dan patogen *Colletotrichum sp.* dalam satu cawan petri. Pengujian dilakukan menggunakan media *Potato Dektrose Agar* (PDA). Terdapat 10 isolat bakteri yang diuji yaitu MH-1, MH-2, MH-3, MH-4, MH-5, MT-1, MT-2, MT-3, MT-4 dan MT-5. Masing-masing isolat bakteri diuji daya hambatnya terhadap cendawan *Colletotrichum sp.* berdasarkan hasil pengamatan, isolat bakteri MH-1, MH-2, MH-3, MH-4, MH-5, MT-1, MT-4 dan MT-5 memiliki kemampuan untuk menghambat pertumbuhan cendawan *Colletotrichum sp.* sedangkan pada perlakuan kontrol,

MH-2 dan MH-3 tidak memiliki kemampuan untuk menghambat pertumbuhan cendawan *Colletotrichum* sp. (Gambar 14).



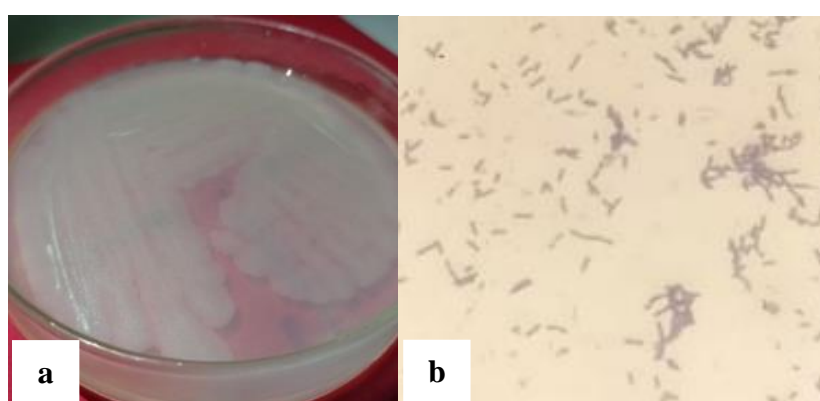
**Gambar 14.** Uji Daya Hambat Isolat Bakteri Tomat Mentah (MH) dan Tomat Matang (MT) Terhadap Cendawan *Colletotrichum* sp. Metode *Dual Culture* pada Media PDA;

(a) Kontrol, (b) MH-1, (c) MH-2, (d) MH-3, (e) MH-4, (f) MT-5, (g) Kontrol, (h) MT-1, (i) MT-2, (j), MT-3, (k) MT-4, (l) MT-5.

Berdasarkan perhitungan (Lampiran 3). Isolat bakteri MH-1 memiliki kemampuan untuk menghambat pertumbuhan cendawan dengan persentase daya hambat 80,24%. Hal ini disebabkan oleh luas zona bening yang dihasilkan isolat bakteri MH-1 sehingga dapat menghambat pertumbuhan cendawan *Colletotrichum* sp. Isolat bakteri memiliki perbedaan dalam menghambat pertumbuhan cendawan,

hal tersebut disebabkan oleh enzim yang dihasilkan bakteri jenis kitinolitik. Aktivitas kitinolitik yang dapat dihasilkan oleh beberapa bakteri antara lain adalah *Serratia* sp., *Pseudomonas* sp., *Vibrio* sp., *Bacillus* sp., *Pseudomonas* sp., dan *Aeromonas* sp., *Vibrio* sp. hal ini disebabkan oleh kemampuan bakteri yang bisa mensekresikan enzim kitinase dan dapat dimanfaatkan untuk asimilasi kitin untuk sumber karbon dan nitrogennya (Pratiwi dkk, 2015). Mekanisme yang dilakukan bakteri kitinolitik dalam menghambat pertumbuhan cendawan dengan cara melisis hifa cendawan sebagai substrat untuk pertumbuhannya (Harni & Rita, 2012). Zona bening yang dihasilkan memiliki ukuran diameter yang berbeda hal tersebut karena jumlah monomer N-asetil glukosamin yang terbentuk dari hasil pemecahan kitin oleh enzim kitinase. Jika semakin besar zona bening yang terbentuk, maka semakin banyak enzim kitinase yang dihasilkan sehingga aktivitas kitinolitik dari isolat bakteri akan semakin tinggi. Isolat yang memiliki aktivitas kitinolitik tinggi kemudian dipilih untuk memproduksi enzim (Pratiwi dkk, 2015). Bakteri kitinolitik menghasilkan enzim kitinase yang dapat menghidrolisis ikatan  $\beta$ -1,4 antar N-asetilglukosamina (NacGlc) pada kitin yaitu suatu polimer polisakarida penyusun dinding sel beberapa cendawan patogen dan eksoskeleton invertebrata. Oleh karena itu, kitinase sangat dikenal sebagai salah satu anti cendawan atau mikroba. Enzim ini disintesis sebagai respon tanaman terhadap infeksi patogen (Harni & Rita, 2012).

#### 4.4 Pengamatan Isolat Bakteri secara Makroskopis dan Mikroskopis



**Gambar 15.** Pengamatan Isolat bakteri;  
(a) Makroskopis, (b) Mikroskopis.

Berdasarkan hasil uji daya hambat isolat bakteri terhadap cendawan *Colletotrichum* sp. dipilih satu isolat yang memiliki daya hambat paling tinggi, yaitu isolat bakteri MH-1 yang memiliki persentase daya hambat sebesar 80,24%. Isolat bakteri MH-1 berasal dari tomat permata dengan tingkat kematangan *mature green*. Hasil pengamatan makroskopis, isolat bakteri MH-1 memiliki pertumbuhan dan bentuk koloni yang menyebar, permukaan halus, bentuk tepian luar rata, elevasi flat-datar dan berwarna putih keruh (Gambar 15). Hasil pengamatan mikroskopis menggunakan mikroskop dengan perbesaran 1000x, koloni bakteri MH-1 merupakan bakteri gram positif (berwarna ungu) dan berbentuk batang (Gambar 15). Bakteri gram positif pada pewarnaan Gram berwarna ungu disebabkan kompleks zat warna kristal violet-yodium yang tetap dipertahankan meskipun diberi larutan pemucat yaitu aseton alkohol, sedangkan bakteri gram negatif berwarna merah disebabkan kompleks tersebut larut pada saat pemberian larutan pemucat aseton alkohol sehingga mengambil warna merah safranin. Perbedaan warna pada bakteri gram positif dan gram negatif menunjukkan bahwa adanya perbedaan struktur dinding sel antara kedua jenis bakteri tersebut. Bakteri gram positif memiliki struktur dinding sel dengan kandungan peptidoglikan yang tebal sedangkan bakteri gram negatif memiliki struktur dinding sel dengan kandungan lipid yang tinggi (Fitri dkk, 2011). Pada penelitian (Nawangsih dkk, 2011) bakteri endofit berhasil diseleksi dari tanaman tomat. Terdapat 6 isolat bakteri endofit yang berhasil diisolasi, 2 isolat bakteri menghasilkan daya hambat paling tinggi pada *uji in vitro*. Bakteri tersebut yaitu *Staphylococcus epidermidis* dan *Bacillus amyloliquefaciens*.

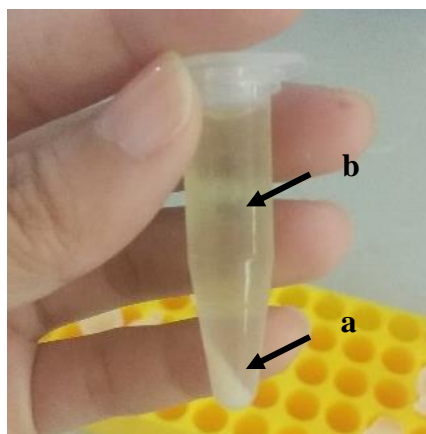
#### 4.5 Ekstraksi Enzim Kitinase



**Gambar 16.** Media Kitin Cair



Tahap awal untuk ekstraksi enzim kitinase yaitu memproduksi enzim kitinase dengan menumbuhkan isolat bakteri MH-1 pada media yang mengandung kitin (Pratiwi, dkk 2015). Kandungan kitin yang terdapat dalam tepung cangkang udang akan menginduksi sel bakteri untuk mensekresikan kitinase yang akan digunakan untuk memecah kitin menjadi monomernya (Muamaroh dkk, 2015). Isolat bakteri MH-1 ditumbuhkan pada media kitin cair selama 72 jam (Gambar 16). Berdasarkan penelitian, waktu produksi enzim kitinase dari setiap bakteri berbeda. Menurut (Narayana, dkk 2009) waktu produksi enzim kitinase dari isolat *Streptomyces* sp. adalah 6 hari dan isolat bakteri *B. licheniformis* memerlukan waktu produksi enzim kitinase yaitu 3 hari. Setelah ditumbuhkan pada media kitin cair, kultur di sentrifugasi untuk memisahkan enzim dan partikel non-enzim.



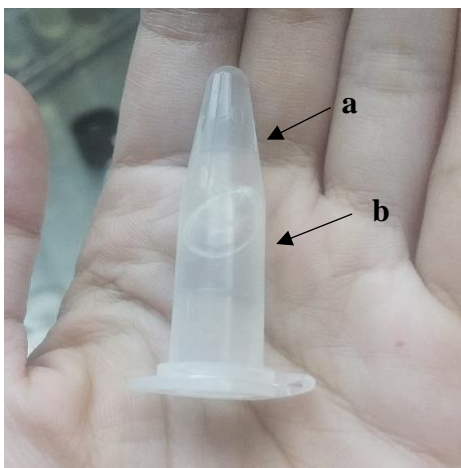
**Gambar 17.** Hasil Sentrifugasi; (a) pelet, (b) supernatan

Hasil sentrifugasi berupa ekstrak kasar ezim dan pelet. Ekstrak kasar enzim digunakan lalu ditambahkan larutan amonium sulfat 70%. Penambahan amonium sulfat dilakukan untuk mengendapkan protein. Pengendapan protein menggunakan amonium sulfat 70% didasarkan pada penelitian (Suryadi, dkk 2013) bahwa penggunaan amonium sulfat dengan konsentrasi 50%-80% memiliki kemampuan yang baik dalam mengendapkan protein. Setelah pengendapan protein menggunakan amonium sulfat 70%, dilakukan sentrifugasi untuk memisahkan enzim dari campuran partikel non-enzim. Hasil dari sentrifugasi berupa supernatan dan pelet (Gambar 17). Pelet hasil sentrifugasi merupakan ekstrak enzim dari bakteri. Ekstrak enzim kemudian dilarutkan dalam larutan PBS pH 6.8 (Gambar 18).



**Gambar 18.** Pelet Hasil Ekstraksi Enzim Kitinase

#### 4.6 Pembuatan Kitosan Bobot Molekul Rendah (KBMR)



**Gambar 19.** Hasil Sentrifugasi;  
(a) pelet, (b) supernatan

Tahap awal dalam pembuatan kitosan bobot molekul rendah (KBMR) yaitu melarutkan kitosan dalam asam asetat 1%. Kitosan merupakan senyawa dengan rumus kimia poli(2-amino-2-dioksi- $\beta$ (1-4)-D-Glukosa) yang dapat dihasilkan dengan proses hidrolisis kitin menggunakan basa kuat (Hargono dkk, 2008). Kitosan tidak larut dalam air namun larut dalam asam (Heriyanto dkk, 2012) hal tersebut membuat kitosan sering dibatasi penggunaannya karena memiliki berat molekul yang tinggi, kelarutan yang rendah terutama pada pH di atas 7 dan viskositasnya yang tinggi. Berdasarkan hal tersebut peningkatan kelarutan dan penurunan viskositas merupakan langkah penting untuk aplikasi kitosan (Rokhati, 2015). Pemilihan konsentrasi asam asetat 1% dalam penelitian ini berdasarkan penelitian yang dilakukan Suryadi (2020) dalam pembuatan kitosan bobot molekul

rendah (KBMR). Selain itu Nisa (2005) menjelaskan bahwa konsentrasi asam asetat 1-2% merupakan pelarut yang baik untuk kitosan. Enzim kitinase hasil ekstraksi dari isolat bakteri MH-1 ditambahkan kedalam kitosan yang telah larut dalam asam asetat 1%. Enzim kitinase merupakan alternatif yang bisa digunakan untuk degradasi kitosan (Goncalves dkk, 2020) karena harganya yang murah, tahan terhadap berbagai faktor lingkungan serta proses produksinya yang sederhana (Nafiah dkk, 2017). Enzim kitinase akan mendegradasi kitosan menjadi kitosan bobot molekul rendah (KBMR). Penurunan berat molekul kitosan setelah hidrolisis secara enzimatik ini terjadi karena adanya pemutusan ikatan  $\beta(1,4)$ -glikosidik pada rantai polimer kitosan sehingga menjadi lebih pendek dan berat molekul kitosan menjadi lebih rendah (Suryadi, 2020). Proses hidrolisis oleh enzim kitinase dilakukan selama 24 jam lalu dipanaskan pada *waterbath* suhu  $100^{\circ}\text{C}$  untuk menonaktifkan enzim. KBMR berupa pelet (Gambar 19) diperoleh setelah kitosan disentrifugasi pada kecepatan 10000 rpm selama 10 menit (Mulyaningtyas dkk, 2016).

#### 4.7 Pembuatan Kitosan Tripolifosfat (KTTP) Metode Gelasi Ionik



**Gambar 20.** Pembuatan Kitosan Tripolifosfat (KTTP)

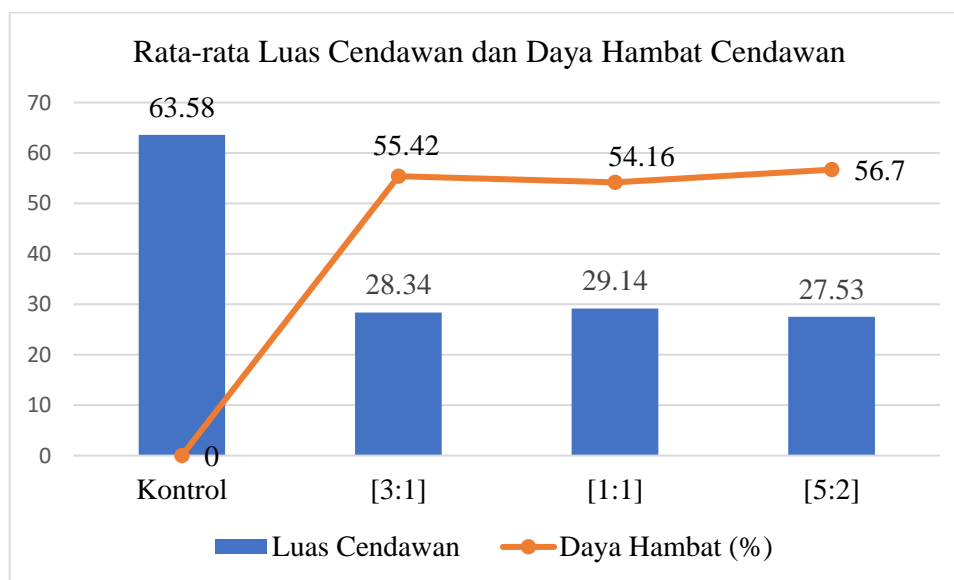
Kitosan tripolifosfat (KTTP) adalah senyawa turunan dari kitosan yang dihasilkan dari proses taut silang ionik kitosan dengan senyawa tripolifosfat. Gelasi ionik merupakan salah satu metode yang digunakan dalam pembuatan kitosan tripolifosfat (KTTP) dengan hasil akhir berupa nanopartikel atau nano kitosan (Suryadi dkk, 2016). Ukuran nano kitosan memiliki beberapa kelebihan antara lain

tidak toksik, daya adsorpsi kitosan meningkat, kemampuan penghantaran meningkat, dan stabilitas molekul lebih konstan sehingga untuk mengatasi patogen cendawan akan lebih efektif (Suryadi dkk, 2017). Pemilihan metode gelasi ionik dalam pembuatan kitosan tripolifosfat (KTTP) karena prosesnya yang sederhana, tidak menggunakan pelarut organik berbahaya, tidak menggunakan pemanasan yang dapat merusak bahan aktif dan prosesnya dapat dikontrol dengan mudah (Mardiyadi dkk, 2012). Tahap pertama yang dilakukan dalam pembuatan kitosan tripolifosfat (KTTP) yaitu membuat larutan kitosan bobot molekul rendah (KBMR) 0.2 % dan larutan natrium tripolifosfat (NaTPP) 0.1% (Mulyaningtyas dkk, 2016). Konsentrasi pada larutan kitosan bobot molekul rendah (KBMR) dan larutan natrium tripolifosfat (NaTPP) dipilih berdasarkan penelitian Suryadi (2019) mengenai Aktifitas Antifungi Kitosan Hasil Hidrolisis Enzimatis terhadap Penyakit Antraknosa. Pada beberapa konsentrasi larutan, kitosan bobot molekul rendah (KBMR) 0.2 % dan larutan natrium tripolifosfat (NaTPP) 0.1% menghasilkan daya hambat paling tinggi yaitu 95.06%. Rasio larutan kitosan bobot molekul rendah (KBMR) 0.2 % dan larutan natrium tripolifosfat (NaTPP) 0.1% diketahui menjadi parameter penting untuk pembentukan kitosan tripolifosfat (KTTP). Rasio yang digunakan pada penelitian ini yaitu (3:1, 1:1 dan 5:2) dalam 50 mL (Gambar 20). Pencampuran variasi konsentrasi larutan kitosan bobot molekul rendah (KBMR) dan larutan natrium tripolifosfat (NaTPP) akan menghasilkan interaksi antara polimer yang bermuatan positif pada gugus amino kitosan dengan polimer yang bermuatan negatif dari tri-poli-fosfat. Dengan mengatur rasio kitosan bobot molekul rendah (KBMR) dan larutan natrium tripolifosfat (NaTPP) yang digunakan dapat mempengaruhi karakteristik fisik dari nanopartikel (Samudra dkk, 2021).

#### **4.8 Uji Daya Hambat Cendawan Metode Tuang Secara In Vitro**

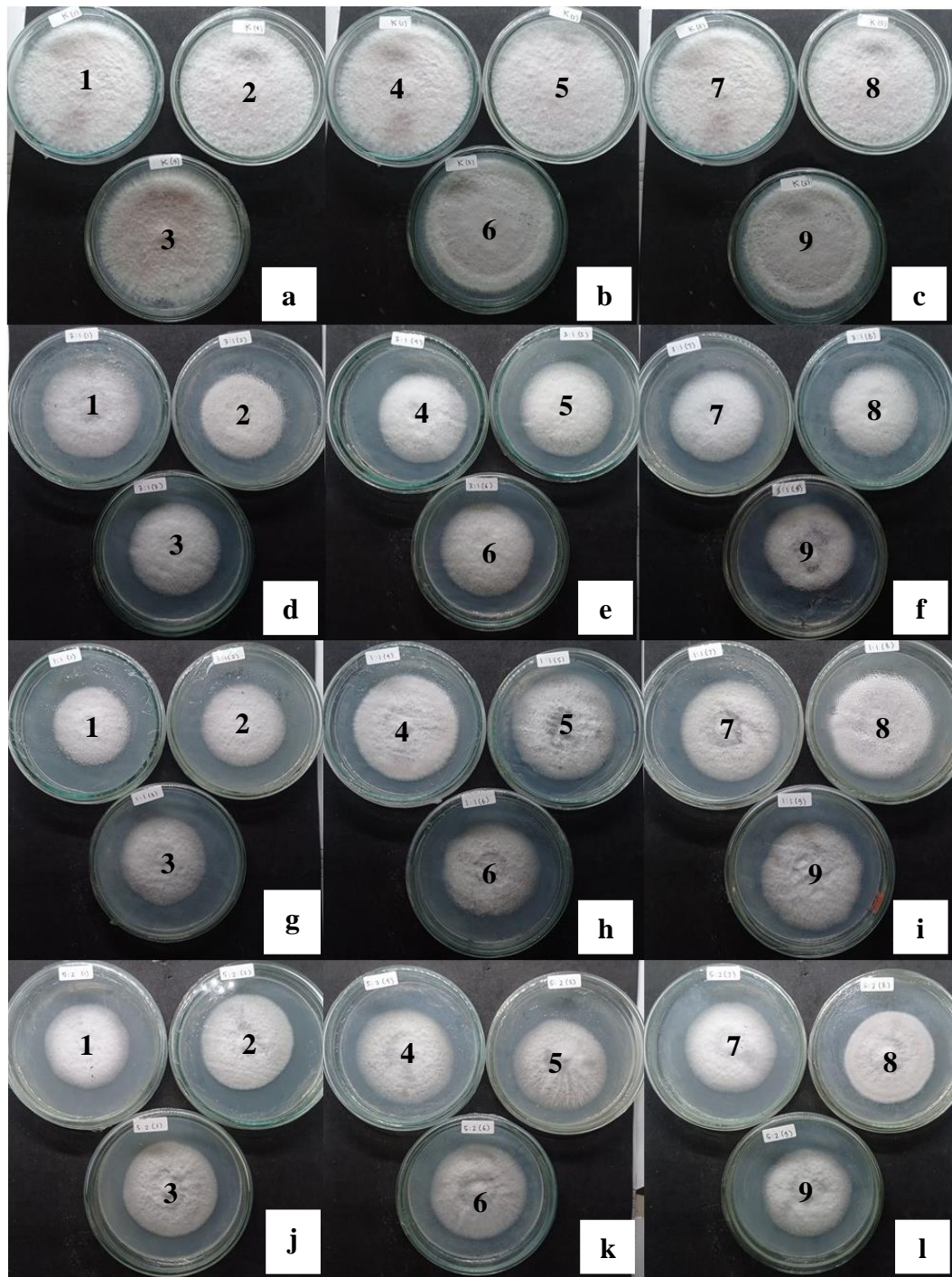
Pengujian persentase daya hambat pertumbuhan *Colletotrichum* sp. secara *in vitro* dilakukan menggunakan media *Potato Dekstrose Agar* (PDA). Media PDA yang masih hangat ditambah kitosan bobot molekul rendah (KBMR) 0.2 % dan natrium tripolifosfat (NaTPP) 0.1% dengan rasio (3:1, 1:1 dan 5:2) sebanyak 1 mL dengan pengulangan sebanyak 9 kali. Berdasarkan hasil pengamatan terhadap luas koloni *Colletotrichum* sp. (Gambar 21), diketahui pemberian kitosan bobot molekul

rendah (KBMR) yang termodifikasi natrium tripolifosfat (NaTPP) dengan berbagai rasio mempunyai kemampuan untuk menghambat pertumbuhan cendawan. Pada perlakuan kontrol cendawan dapat tumbuh dengan baik, sedangkan pada cendawan yang diberi perlakuan terjadi penekanan pertumbuhan



**Gambar 21.** Hasil Rata-rata Luas Cendawan dan Daya Hambat Cendawan

Perlakuan kontrol menunjukkan luas cendawan paling tinggi dengan rata-rata yaitu 63.58 cm<sup>2</sup>. Pada hari ke tujuh, luas cendawan perlakuan kontrol telah menyebar penuh (Gambar 22). Hal tersebut mengindikasikan pengamatan diberhentikan pada hari ke tujuh. Menurut (Sopialena dkk, 2021) pengendalian penyakit antraknosa pada tomat (*Solanum Lycopersicum*) menggunakan cendawan endofit memiliki masa inkubasi patogen sampai hari ke tujuh setelah inokulasi. Masa inkubasi merupakan waktu yang diperlukan patogen untuk melakukan infeksi dihitung berdasarkan waktu gejala pertama muncul pada inang setelah inokulasi (Syabana dkk, 2015). Berdasarkan perhitungan, persentase daya hambat untuk menekan pertumbuhan cendawan *Colletotrichum* sp. tertinggi yaitu pada perlakuan kitosan tripolifosfat (KTTP) rasio 5:2 sebesar 56.7% sedangkan persentase terendah yaitu pada perlakuan kitosan tripolifosfat (KTTP) rasio 1:1 sebesar 54.16%.



**Gambar 22.** Hasil Uji Daya Hambat Pertumbuhan *Colletotrichum* sp. pada Media PDA Sebanyak 9 Ulangan Hari ke-7;

- (a) Kontrol (ulangan 1, 2, 3), (b) Kontrol (ulangan 4, 5, 6), (c) Kontrol (ulangan 7, 8, 9), (d) 3:1 (ulangan 1, 2, 3), (e) 3:1 (ulangan 4, 5, 6), (f) 3:1 (ulangan 7, 8, 9), (g) 1:1 (ulangan 1, 2, 3), (h) 1:1 (ulangan 4, 5, 6), (i) 1:1 (ulangan 7, 8, 9), (j) 5:2 (ulangan 1, 2, 3), (k) 5:2 (ulangan 4, 5, 6), (l) 1:1 (ulangan 7, 8, 9).

**Tabel 2.** Hasil Analisis Dengan Menggunakan Uji Duncan Sebagai Penentu Daya Hambat Cendawan Paling Paling Tinggi

Perlakuan	Daya Hambat
Kontrol	0.0000 <sup>a</sup>
1:1	54.1622 <sup>b</sup>
3:1	55.4267 <sup>b</sup>
5:2	56.7011 <sup>b</sup>

Ket: huruf yang sama tidak berbeda nyatapada uji Duncan taraf 5%

Setelah dilakukan analisis (Lampiran 5) terdapat perbedaan yang signifikan antara perlakuan kontrol dan perlakuan media yang diberi formula. Hal ini berdasarkan pengamatan parameter pertumbuhan cendawan yang berbeda. Berdasarkan hasil analisis uji Duncan, penambahan formula kitosan bobot molekul rendah (KBMR) 0.2 % dan natrium tripolifosfat (NaTPP) 0.1% rasio (3:1, 1:1 dan 5:2) pada media PDA berpengaruh nyata terhadap perlakuan kontrol, namun tidak berpengaruh nyata antar perlakuan yang diberi formula. Hal ini berdasarkan ukuran partikel kitosan yang dihasilkan. Pada penelitian sebelumnya yaitu pada buah cabai menggunakan hidrolisis kitosan secara enzimatik oleh bakteri kitinolitik, pada konsentrasi Kitosan Bobot Molekul Rendah (KBMR) 0.2% : Natrium Tripolifosfat (NaTPP) 0.1% (5:2) menghasilkan daya hambat pertumbuhan cendawan sebesar 65-68% (Suryadi, 2019). Selain itu pada buah cabai, KBMR 0.2 % : Natrium Tripolifosfat (NaTPP) 0.1% (3:1) menghasilkan daya hambat sebesar 91% (Mulyaningtyas, 2016).

## **BAB V**

### **KESIMPULAN DAN SARAN**

#### **5.1 Kesimpulan**

Berdasarkan hasil yang diperoleh dalam penelitian ini, dapat disimpulkan beberapa hal sebagai berikut:

1. Diperoleh sepuluh isolat bakteri endofit yang berasal dari buah tomat mentah (MH) dan buah tomat matang (MT). Bakteri endofit MH-1, MH-2, MH-3, MH-4, MH-5, MT-1, MT-4 dan MT-5 memiliki kemampuan untuk menghambat pertumbuhan cendawan. Isolat bakteri MH-1 memiliki daya hambat paling tinggi dengan persentase daya hambat 80,24% sehingga dipilih untuk formulasi Kitosan-Tripolifosfat.
2. Konsentrasi formula kitosan bobot molekul rendah (KBMR) 0.2 % dan natrium tripolifosfat (NaTPP) 0.1% dalam 50 mL rasio (3:1, 1:1 dan 5:2) tidak berbeda nyata terhadap antar perlakuan, namun berbeda nyata terhadap perlakuan kontrol.

#### **5.2 Saran**

Perlu dilakukan uji lanjutan untuk aplikasi formula secara *in vivo* (pada tomat) untuk menguji efektifitasnya dalam menghambat pertumbuhan cendawan penyebab penyakit antraknosa yang disebabkan oleh cendawan *Colletotrichum* sp.



## DAFTAR PUSTAKA

- Afzan, I., Shinwari, Z., K., Sikandar, S., Shahzad, S. 2019. Plant Beneficial Endophytic Bacteria: Mechanisms, Diversity, Host Range And Genetic Determinants. *Microbiological Research*. 221; 36-49.
- Aji, O., R., Utami, L., B. 2017. Isolasi Dan Karakterisasi Bakteri Endofit Tanaman Tomat Cherry (*Solanum lycopersicum* var. cerasiforme) Dalam Kemampuannya Menghasilkan Hormon Indol Asetat (AIA). *Gontor AGOTECH Science Journal*. 3(1): 55-69.
- Agustina, S., Swantara, I., M., D., Suartha, I., N. 2015. Isolasi Kitin, Karakterisasi, dan Sintesis Kitosan dari Kulit Udang. *JURNAL KIMIA*. 9(2): 271-278.
- Alemu, K. 2014. Dynamics and Management of Major Postharvest Fungal Diseases of Mango Fruits. *Journal of Biology, Agriculture and Healthcare*. 4(27):13-21.
- Amiarsi, D. 2012. Pengaruh Konsentrasi Oksigen dan Karbondioksida Dalam Kemasan Terhadap Daya Simpan Buah Mangga Gedong. *J. Hort*. 22(2): 196-203.
- Anggraeni, W., Wardoyono, ERP., Rahmawati. 2019. Isolasi dan Identifikasi Jamur Pada Buah Cabai Rawit (*Capsicum frutescens* L.) Yang Bergejala Antraknosa Dari Lahan Pertanian Di Dusun Jeruk. *Protobiont*. 8(2): 94-100.
- Aqlinia, M., Pujiyanto, S., Wijanarka. 2020. Isolasi Bakteri Endofit Bangle (*Zingiber cassumunar* Roxb.) Dan Uji Antibakteri Supernatan Crude Metabolit Sekunder Isolat Potensial terhadap *Staphylococcus aureus*. *Jurnal Akademika Biologi*. 9(1): 23-31.
- Bhattacharya S, Chakraborty S, Das A. 2012. Optimization of Process Parameters for Chitinase Production by a Marine Isolate of *Serratia marcescens*. *J. Pharm. Biol. Sci*. 2:2, 8-20
- Chebotar VK, Malfanova NV, Shcherbakov AV, Ahtemova GA, Borisov AY, Lugtenberg B, Tikhonovich IA. 2015. Endophytic Bacteria in Microbial Preparations that Improve Plant Development. *Appl Biochem Microbiol*. 51(3): 283-289.

- Dewanti, R., A. 2016. Pelapisan Kitosan Pada Buah Tomat (*Solanum lycopersicum* syn. *Lycopersicum esculentum*) Sebagai Upaya Memperpanjang Umur Simpan Buah
- Dewi, E., S. 2018. Isolasi Likopen Dari Buah Tomat (*Lycopersicum esculentum*) Dengan Pelarut Heksana. *Jurnal Agotek Ummat*. 5(2): 123-125.
- Farida, K., Sutari, W., Hamdani., J., S., Mubarak., S. 2018. Pengaruh Waktu Simpan Terhadap Nilai Total Padatan Terlarut, Kekerasan dan Susut Bobot Buah Mangga Arummanis. *Jurnal Kultivasi*. 17(3): 766-711.
- Ferniah RS, Pujiyanto S, Purwantisari S. dan Supriyadi, 2011. Interaksi Kapang Patogen *Fusarium oxysporum* dengan Bakteri Kitinolitik Rizosfer Tanaman Jahe dan Pisang. *Jurnal Natur Indonesia*. 14(1): 56-60
- Haggag, W., M. 2010. Mango Diseases in Egypt. *Agriculture and Biology Journal Of North America*. 1(3): 285-289.
- Haliza W dan Suhartono MT, 2012. Karakteristik Kitinase dari Mikrobial. *Buletin Teknologi Pascapanenan Pertanian*. 8(1): 1-14
- Harjadi, S.S. dan H. Sunarjono. 1990. Budidaya tomat, hal 1-26. Dalam S.S. Harjadi (Ed). Dasar-Dasar Hortikultura. Jurusan Budidaya Pertanian. Fakultas Pertanian. Institut Pertanian Bogor.
- Isnawati, N., Wahyuningsih., Adlhani, E. 2015. Pembuatan Kitosan dari Kulit Udang Putih (*Penaeus merguensis*) dan Aplikasinya Sebagai Pengawet Alami Untuk Udang Segar. *Jurnal Teknologi Agro Industri*. 2(2): 1-7.
- Kumar, J., Singh, D., Ghosh, P., Kumar, A. 2017. Endophytic and Epiphytic Modes of Microbial Interactions and Benefits. *Research Gate*. 12: 227-251.
- Mahagiani I, 2008. Isolasi Enzim Kitinase dari Bakteri Perakaran Tanaman Cabai dan Aplikasi Nya pada Kutu Kebul. Skripsi tidak dipublikasikan. Bogor: Institut Pertanian Bogor
- Mayadiani, I., A., I., Khalimi, K., Suniti, N., W. 2020. Uji Daya Hambat Bakteri *Paenibacillus polymyxa* Terhadap Pertumbuhan Jamur *Colletotrichum* sp. Secara In Vitro. *Jurnal Agoekoteknologi Tropika*. 9(4): 229-237.

- Miliute, I., Buzaitė, O., Baniulis, D., Stanys, V. 2015. Bacterial Endophytes In Agricultural Crops And Their Role In Stress Tolerance: A Review. *Zemdirbyste-Agriculture*. 102(4): 465-478.
- Mulyaningtyas, D., Purwantisari, S., Kusdiyantini, E., dan Suryadi, Y. 2016. Produksi Kitosan Secara Enzimatis Oleh *Bacillus Firmus* E65 Untuk Pengendalian Penyakit Antraknosa Pada Buah Mangga (*Mangifera Indica* L.). *Jurnal Biologi*.5(4): 8-17
- Narayana K, Vijayalakshmi M. 2009. Chitinase Production by *Streptomyces* sp. ANU 6277. *J. Microbial*. 40, 725-733.
- Noer Shafa. 2021. Identifikasi Bakteri Secara Molekular Menggunakan 16S rRNA. *Edu Biologia*. 1(1):1-6.
- Nurhikmawati, F., Manurung, M., Laksmiwati, M. 2014. Penggunaan Kitosan Dari Limbah Udang Sebagai Inhibitor Keasaman Tuak. *JURNAL KIMIA*. 8(2): 191-197.
- Oktavianto, Y., Sunaryo, dan A. Suryanto. 2015. Karakterisasi Tanaman Mangga (*Mangifera Indica* L.) Cantek, Ireng, Empok, Jempol Di Desa Tiron, Kecamatan Banyakan Kabupaten Kediri. *Jurnal Produksi Tanaman*.3(2):91-97.
- Opeyemi, B., S., Temidayo, B., R., Oyinkansade, B., Y., Busayo, E., I., Temitope, O., M., Folake, A., B. 2018. Biological Control of Anthracnose Disease of Tomato Using Ethanolic Extracts of *Azadirachta Indica* and *Nicotiana Tabacum*. *International Annals of Science*. 4(1): 20-26.
- Panjaitan, F., J. Bachtiar, T. Arsyad, I. Lele, O., K. Indriyani, W. 2020. Karakterisasi Mikroskopis Dan Uji Biokimia Bakteri Pelarut Fosfat (BPF) Dari Rhizosfer Tanaman Jagung Fase Vegetatif. *Jurnal Ilmu Pertanian dan Lingkungan*. 1(1):9-16.
- Purkan, P., A. Baktir, dan A.R. Sayyidah. 2016. Produksi Enzim Kitinase dari *Aspergillus niger* Menggunakan Limbah Cangkang Rajungan sebagai Induser. *Journal Kimia Riset*. 1(1):34-41.

- Pitasari, A., Ali, M. 2018. Isolasi Dan Uji Antagonis Bakteri Endofit Dari Tanaman Bawang Merah (*Allium ascalonicum* L.) Terhadap Jamur *Alternaria porri* Ellis Cif. *JOM Faperta*. 5(1); 1-12.
- Pratiwi, N., W., Juliantari, E., Napsiyah, L., K. 2016. Identifikasi Jamur Penyebab Penyakit Pascapanen pada Beberapa Komoditas Bahan Pangan. *Jurnal Riau Biologia* .1(14): 86-94.
- Pradana, Ankardiansyah & Munif, Abdul & Mulyadisastra, Supramana. 2016. Bakteri Endofit Asal Berbagai Akar Tanaman sebagai Agens Pengendali Nematoda Puru Akar *Meloidogyne incognita* pada Tomat. *Jurnal Fitopatologi Indonesia*. 12(3). 75-82.
- PROSEA. 1994. Plant Resources of South-East Asia 8. Vegetables. J.S. Siemonsma and Kasem Piluek (Eds). Bogor.
- Purwanto, U., M., S., Pasaribu, F., H., Bintang, M. 2014. Isolasi Bakteri Endofit Dari Tanaman Sirih Hijau (*Piper betle* L.) dan Potensinya Sebagai Penghasil Senyawa Antibakteri. *Current Biochemistry*. 1(1): 51-57.
- Purba F, 2010. Kelimpahan Bakteri Kelompok Kitinolitik, Tahan Panas, dan Kelompok Fluoresen pada Rizosfer Pisang (*Musa* spp.) serta Potensinya dalam Menghambat *Fusarium oxysporum*, *F. cubense*. Skripsi tidak dipublikasikan. Bogor: Institut Pertanian Bogor
- Purba, K., S., Khalimi, K., Suniti, N., W. 2021. Uji Aktivitas Antijamur *Bacillus cereus* terhadap *Colletotrichum fructicola* KRCR Penyebab Penyakit Antraknosa pada Buah Cabai Rawit (*Capsicum frutescens* L.). *Jurnal Agoekoteknologi Tropika*. 10(1):50-58.
- Putri, M., P., Fifendy, M., Putri, D., H. 2018. Diversitas Bakteri Endofit Pada Daun Muda Dan Tua Tumbuhan Andaleh (*Morus macroura* miq.). *EKSAKTA*. 19(1): 125-130.
- Rangkuti EE, Suryanto D, Nurtjahja K, dan Munir E, 2014. Kemampuan Bakteri Endofit Tanaman Semangka Dalam Menekan Perkembangan Penyakit Bercak Daun Yang Disebabkan Oleh Jamur *Colletotrichum* Sp. *Jurnal HPT Tropika*. 14 (2): 170 – 177

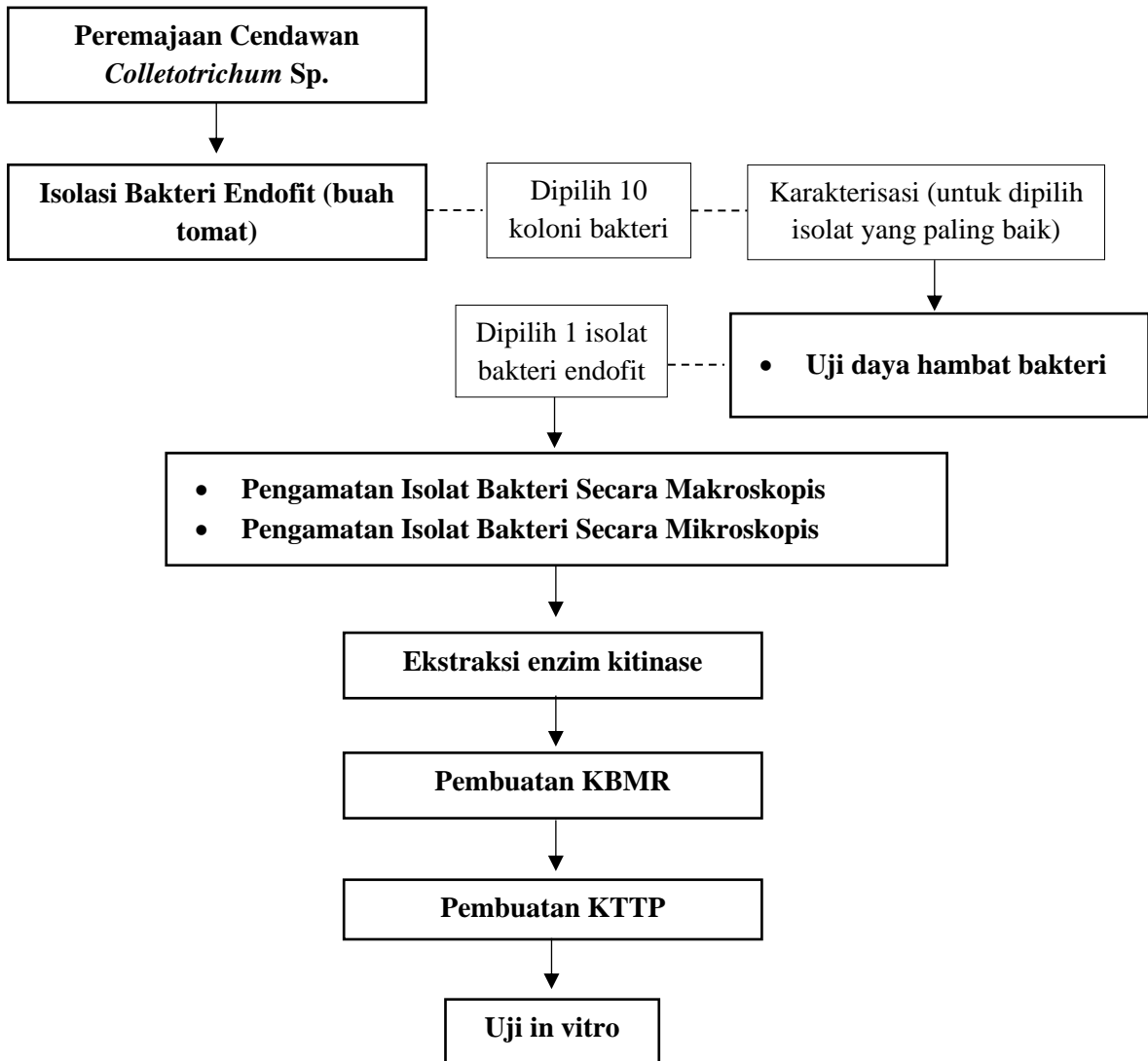
- Revia, A., Yulianty., Lande, M., L., Wahyuningsih, S. 2020. Ketahanan Kultivar Buah Tomat (*Solanum lycopersicum* L.) Terhadap Jamur *Colletotrichum acutatum* J. H. Simmonds Penyebab Penyakit Antraknosa. *Jurnal Medika Malahayati*. 4(3): 210-216.
- Riska, S., Y. 2015. Klasifikasi Level Kematangan Tomat Berdasarkan Perbedaan Perbaikan Citra Menggunakan Rata-Rata RGB Dan Index Pixel. *Jurnal Ilmiah Teknologi dan Informasia ASIA (JITIKA)*. 9(2): 18-26.
- Ristiari, N., P., N., Julyasih, K., S., M., Suryanti, I., A., P. 2018. Isolasi Dan Identifikasi Jamur Makroskopis Pada Rizosfer Tanaman Jeruk Siam (*Citrus nobilis* Lour.) Di Kecamatan Kintamani, Bali. *Jurnal Pendidikan Biologi Undiksha*. 6(1): 10-19.
- Rubatzky, V.E. dan M. Yamaguchi. Sayuran Dunia 3 Prinsip Produksi dan Gizi. Edisi Kedua. ITB. Bandung.
- Santoyo, G., Gabriel Moreno-Hagelsieb, Ma. del Carmen Orozco-Mosqueda, Bernard R. Glick. 2016. Plant growth-promoting bacterial endophytes. *Microbiological Research*. 183: 92-99.
- Sembiring, S C. Br., Warouw, V., Wullur, S., Bara, R. A., Salaki, M., Ginting, E l. 2021. Isolasi dan Penapisan Bakteri Penghasil Kitinase dan Protease yang Bersimbiosis dengan Spons *Dracopis* sp dari Teluk Manado, Sulawesi Utara. *Jurnal Ilmiah Platax*. 9(1): 123-131.
- Siniapar, G., W., S., Sartini., Riyanto. 2020. Isolasi dan Karakteristik Bakteri Endofit pada Akar Pepaya (*Carica papaya* L). *Jurnal Ilmiah Biologi UMA (JIBIOMA)*. 2(2): 83-92.
- Sopialena, S., Subiono, T., Rosyidin, A., U., Tantiani, D. 2021. Control of Antracnose Disease in Tomato (*Solanum Lycopersicum*) Using Endophytic Fungi. *KnE Life Sciences*. 393-408.
- Sudirga, S. K. 2016. Isolasi dan Identifikasi Jamur *Colletotrichum* spp. Isolat PCS Penyebab Penyakit Antraknosa pada Buah Cabai Besar (*Capsicum annum* L.) di Bali. *Jurnal Metamorfosa*. 3(1): 23-30.

- Suryadi, Y., Susilowati, D., dan Samudra, I. M., Priyatno, P., P. 2019. Pengaruh Aplikasi Kitosan Antifungi Untuk Pengendalian Penyakit Antraknosa Pada Cabai. *Jurnal Pertanian Tropik*. 6(1): 108-118.
- Suryadi, Y., Susilowati, D., dan Samudra, I. M. 2020. Pengaruh Rasio Kitosan-Sodium Tripolifosfat Terhadap Pengendalian Antraknosa (*Colletotrichum gleosporioides*) Pada Mangga Kultivar Manalagi. *Jurnal Penelitian Sains*. 22(3): 133-143.
- Suryadi, Y., Susilowati, D., dan Samudra, I. M., 2019. Aktivitas Antifungi Kitosan Hasil Hidrolisis Enzimatis Terhadap Penyakit Antraknosa. *Sainmatika*. 16(2):88.
- Susilowati., Somar, E., Sutarno. 2015. Pembuatan Bioadsorben IIC-Zn dari Kulit Udang Asal Teluk Bintuni. *Mekanika*. 14(1): 1-7.
- Syabana, M., A., Saylendra, A., Ramdhani, D. 2015. Aktivitas Anti Cendawan Ekstrak Daun Sereh Wangi (*Cymbopogon nardus* L.) terhadap *Colletotrichum* sp Penyebab Penyakit Antraknosa pada Buah Cabai (*Capsicum annum* L.) secara *In Vitro* dan *In Vivo*. *Agrolgia*. 4(1): 21-27.
- Wardhani HAK, (2010) Isolasi dan Identifikasi Bakteri Endofit dari Akar Tanaman Kentang Sebagai Anti Nematoda Sista Kuning (*Globodera rostochiensis*). Skripsi tidak dipublikasikan. Malang: Jurusan Biologi Fakultas Sains dan Teknologi UIN MMI Malang.
- Yan, X., Wang, Z., Mei, Y., Wang L., Wang, X., Xu, Q., Peng, S., Zhou, Y., dan Wei, C. 2018. Isolation, Diversity, and Growth-Promoting Activities of Endophytic Bacteria From Tea Cultivars of Zijuan and Yunkang-10. *Frontiers In Microbiology*. 9(1848):1-11.
- Younes, I dan Rianudo, M. 2015. "Chitin and chitosan preparation from marine sources.structure, properties and applications". *Journal Marine Drugs*. 13: 1133-1174.
- Yandila, S., Putri, D., H., Fifendy, M. 2018. Kolonisasi Bakteri Endofit Pada Akar Tumbuhan Andaleh (*Morus macroura* Mid.). *Bio-site*. 4(2):61-67.

- Yuniastri, R., Ismawati., Atkhiyah, V., M., Faqih, K., A. 2020. Karakteristik Kerusakan Fisik Dan Kimia Buah Tomat (Tomato Physical and Chemical Damage Characteristics). *Journal of Food and Agoindustry*. 2(1): 1-8.
- Živković<sup>1</sup>, S., Stojanović, S., Ivanović, Ž., Trkulja, N., Dolovac, N., Aleksić, G., Balaž, J. 2010. Morphological and Molecular Identification of *Colletotrichum acutatum* from Tomato Fruit. *Pestic Phytomed (Belgrade)*. 25(3): 231–239.

## LAMPIRAN

### Lampiran 1. Diagram Alur Penelitian



### Lampiran 2. Proses Isolasi Bakteri





**Lampiran 3. Hasil Daya Hambat Isolat Bakteri Terhadap Cendawan *Colletotrichum* sp.**

Perlakuan	D1 (cm)	D2 (cm)	Rata-rata diameter pertumbuhan cendawan (cm)	Jari-jari (cm)	Luas cendawan (cm <sup>2</sup> )	Daya hambat (%)
Kontrol	9	9	9	4,5	63,58	0
MH-1	5	3	4	2	12,56	80,24
MH-2	8.5	4.5	6,5	3,25	33,16	47,84
MH-3	6	3.5	4,75	2,37	17,71	72,14
MH-4	7	3.5	5,25	2,62	21,63	65,97
MH-5	9	4.5	6,75	3,37	35,76	77,77
MT-1	9	6	7,5	3,75	44,15	30,55
MT-2	9	9	9	4,5	63,58	0
MT-3	9	9	9	4,5	63,58	0
MT-4	9	4.5	6,75	3,37	35,76	43,75
MT-5	9	4	6,5	3,25	33,16	47,84

Contoh perhitungan :

- Kontrol:

Rata-rata diameter pertumbuhan cendawan:  $\frac{18}{2} = 9$  cm

Luas Cendawan:  $\pi r^2 = 3.14(4.5)^2 = 63.58$  cm<sup>2</sup>

Daya hambat:  $\frac{\text{Kontrol-perlakuan}}{\text{kontrol}} \times 100\% = \frac{63.58-63.58}{63.58} \times 100\% = 0\%$

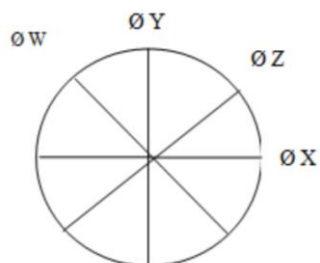
- MH-1

Rata-rata diameter pertumbuhan cendawan:  $\frac{8}{2} = 4$  cm

Luas Cendawan:  $\pi r^2 = 3.14(2)^2 = 12.56$  cm<sup>2</sup>

Daya hambat:  $\frac{\text{Kontrol-perlakuan}}{\text{kontrol}} \times 100\% = \frac{63.58-12.56}{63.58} \times 100\% = 80.24\%$

#### Lampiran 4. Hasil Uji Daya Hambat Pertumbuhan Cendawan Pada Berbagai Perlakuan



Skema pengukuran diameter pertumbuhan cendawan

Diketahui:

Perlakuan	Ulangan	Diameter pertumbuhan cendawan			
		W (cm)	Y (cm)	Z (cm)	X (cm)
Kontrol	1	9	9	9	9
	2	9	9	9	9
	3	9	9	9	9
	4	9	9	9	9
	5	9	9	9	9
	6	9	9	9	9
	7	9	9	9	9
	8	9	9	9	9
	9	9	9	9	9
3:1	1	6.5	6.4	6.5	6.4
	2	5.7	5.6	5.5	5.6
	3	6.6	6	6	5.8
	4	6.1	6	5.8	5.9
	5	6.4	6.3	6.1	6.1
	6	6.3	6.2	6.2	6
	7	6.1	6	6	6
	8	6.1	5.7	5.9	5.9
	9	5.7	5.6	5.6	5.5
1:1	1	5.1	5.2	5.1	5.1
	2	5.6	5.4	5.5	5.6
	3	5.7	5.6	5.5	5.6
	4	6.7	6.4	6.6	6.6
	5	6.8	7	6.4	6.8
	6	6	6	6.1	6.5
	7	6.3	6.5	6.2	6.3
	8	6.4	6.3	6.1	6.3

	9	6.7	6	6.3	6.3
5:2	1	5.3	5.3	5.3	5.3
	2	5.6	5.9	5.9	5.7
	3	5.9	5.9	6	6
	4	6	6.1	6.4	6.8
	5	5.9	6	6	5.7
	6	6.5	6.5	6.5	6.3
	7	5.8	6	6	5.8
	8	6	5.8	5.8	5.7
	9	5.7	5.8	5.9	5.8

Perlakuan	Ulangan	Rata-rata pertumbuhan cendawan (cm)	jari-jari (cm)	luas cendawan (cm <sup>2</sup> )	daya hambat (%)
Kontrol	1	9	4,5	63,59	0
	2	9	4,5	63,59	0
	3	9	4,5	63,59	0
	4	9	4,5	63,59	0
	5	9	4,5	63,59	0
	6	9	4,5	63,59	0
	7	9	4,5	63,59	0
	8	9	4,5	63,59	0
	9	9	4,5	63,59	0
Rata-rata				63,59	0
3:1	1	6,45	3,23	32,66	48,64
	2	5,6	2,8	24,62	61,28
	3	6,1	3,05	29,21	54,06
	4	5,95	2,98	27,79	56,29
	5	6,23	3,11	30,42	52,16
	6	6,18	3,09	29,93	52,93
	7	6,03	3,01	28,5	55,18
	8	5,9	2,95	27,33	57,02
	9	5,6	2,8	24,62	61,28
Rata-rata				28,3422	55,4267
1:!	1	5,13	2,56	20,62	67,57
	2	5,53	2,76	23,96	62,31
	3	5,6	2,8	24,62	61,28
	4	6,58	3,29	33,94	46,63

	5	6,75	3,38	35,77	43,75
	6	6,15	3,08	29,69	53,31
	7	6,33	3,16	31,4	50,61
	8	6,28	3,14	30,91	51,39
	9	6,33	3,16	31,4	50,61
Rata-rata				29,1456	54,1622
5:2	1	5,3	2,65	22,05	65,32
	2	5,78	2,89	26,18	58,83
	3	5,95	2,98	27,79	56,29
	4	6,33	3,16	31,4	50,61
	5	5,9	2,95	27,33	57,02
	6	6,45	3,23	32,66	48,64
	7	5,9	2,95	27,33	57,02
	8	5,83	2,91	26,64	58,11
Rata-rata				27,6725	56,48

Contoh perhitungan:

- Kontrol:

Rata-rata diameter pertumbuhan cendawan:  $\frac{9+9+9+9}{4} = 9$  cm.

Luas Cendawan:  $\pi r^2 = 3.14(4.5)^2 = 63.58$  cm<sup>2</sup>

Daya hambat:  $\frac{\text{Kontrol-perlakuan}}{\text{kontrol}} \times 100\% = \frac{63.58-63.58}{63.58} \times 100\% = 0\%$

- 3:1

Rata-rata diameter pertumbuhan cendawan:  $\frac{6.5+6.4+6.5+6.4}{4} = 6.45$  cm.

Luas Cendawan:  $\pi r^2 = 3.14(3.23)^2 = 32,66$  cm<sup>2</sup>.

Daya hambat:  $\frac{\text{Kontrol-perlakuan}}{\text{kontrol}} \times 100\% = \frac{63.58-32.66}{63.58} \times 100\% = 48,64$  %

## Lampiran 5. Hasil Analisis Data Uji Daya Hambat Pertumbuhan Cendawan Pada Berbagai Perlakuan

### Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: Daya Hambat Pertumbuhan Jamur

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	20768.280 <sup>a</sup>	3	6922.760	270.585	.000
Intercept	62217.819	1	62217.819	2431.867	.000
Perlakuan	20768.280	3	6922.760	270.585	.000
Error	818.700	32	25.584		
Total	83804.800	36			
Corrected Total	21586.980	35			

a. R Squared = .962 (Adjusted R Squared = .959)

### Daya Hambat Pertumbuhan Jamur

Duncan<sup>a,b</sup>

Perlakuan	N	Subset	
		1	2
Kontrol	9	.0000	
1:1	9		54.1622
3:1	9		55.4267
5:2	9		56.7011
Sig.		1.000	.324

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = 25.584.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 9.000.

b. Alpha = .05.