

Aplikasi metabolit sekunder dari tiga isolat *Pseudomonas fluorescens* untuk mengendalikan penyakit antraknosa pada daun kakao

Application of secondary metabolites from three isolates of Pseudomonas fluorescens to control anthracnose on cocoa leaves

FITRIANTI¹⁾, Loekas SOESANTO^{1)*}, Endang MUGIASTUTI¹⁾, Murti Wisnu Ragil SASTYAWAN²⁾, & Abdul MANAN¹⁾

¹⁾Fakultas Pertanian, Universitas Jenderal Soedirman, Jl. dr. Suparno, Karangwangkal, Purwokerto, 53123

²⁾Fakultas Teknik Industri, Universitas Diponegoro, Jl. Prof. Soedarto, Tembalang, Semarang, 50275

Diterima tgl 26 Januari 2022/ Disetujui tgl 23 Maret 2022

Abstract

Anthrachnose caused by Colletotrichum gloeosporioides is an important disease in cocoa. This research aimed to determine the effectiveness of secondary metabolites derived from three isolates of Pseudomonas fluorescens to control cocoa leaves anthracnose, and their influence on the growth of cocoa plants. The research was conducted at a smallholder cocoa plantation in Putat Village, Patuk District, Gunung Kidul Regency, Yogyakarta for four months. A randomized block design was used with four replicates and seven treatments consisted of control, application of secondary metabolites from P. fluorescens P60, P. fluorescens P20, P. fluorescens P8, combination P. fluorescens P60 + P20, P. fluorescens P60 + P8, and P. fluorescens P20 + P8. Variables observed were disease intensity, infection rate, number of healthy shoots and qualitative phenolic compound. Results of the research showed that the secondary metabolites of P. fluorescens P60, P20 and P8 alone or in combination suppressed the disease intensity by 42.01-54.50%. The infection rate caused by metabolite secondary of P. fluorescens P60, P20, P8, P. fluorescens P60+P20, P. fluorescens P60+P8, and P. fluorescens P20+P8 was 0.23; 0.25; 0.26; 0.26; 0.31; and 0.24 units/day, respectively. The secondary metabolites of P. fluorescens P60 increased the number of healthy shoots by 67.44 %. The secondary metabolites of P. fluorescens P60 increased phenolic compounds (tannin, saponin, and glycosides) in cocoa leaves.

[Keyword: leaves anthracnose, Colletotrichum gloeosporioides, cocoa, secondary metabolites, Pseudomonas fluorescens]

Abstrak

Antraknosa yang disebabkan oleh *Colletotrichum gloeosporioides* merupakan penyakit penting pada tanaman kakao. Penelitian bertujuan mengkaji keefektifan metabolit sekunder dari tiga isolat *Pseudomonas fluorescens* untuk mengendalikan penyakit antraknosa pada daun kakao, serta pengaruhnya terhadap pertumbuhan tanaman kakao. Penelitian dilaksanakan di perkebunan kakao rakyat, Desa Putat, Kecamatan Patuk, Kabupaten Gunung Kidul, Yogyakarta selama empat bulan. Penelitian menggunakan rancangan acak kelompok untuk menguji 7 perlakuan yang diulang 4 kali, perlakuan yang diuji adalah kontrol, aplikasi metabolit sekunder *P. fluorescens* P60, *P. fluorescens* P20, *P. fluorescens* P8, kombinasi *P. fluorescens* P60+P20, *P. fluorescens* P60+P8, dan *P. fluorescens* P20+P8. Variabel pengamatan meliputi intensitas penyakit, laju infeksi, jumlah tunas sehat, dan kandungan senyawa fenol secara kualitatif. Hasil penelitian menunjukkan bahwa perlakuan metabolit sekunder *P. fluorescens* P60, P20, dan P8 secara tunggal dan gabungan mampu menekan intensitas penyakit berkisar 42,01-54,50%. Laju infeksi perlakuan metabolit sekunder *P. fluorescens* P60, *P. fluorescens* P20, *P. fluorescens* P8, kombinasi *P. fluorescens* P60+P20, *P. fluorescens* P60+P8 dan *P. fluorescens* P20+P8 berturut-turut 0,23; 0,25; 0,26; 0,26; 0,31; dan 0,24 unit/hari. Metabolit sekunder *P. fluorescens* P60 meningkatkan jumlah tunas sehat sebesar 67,44%. Perlakuan *P. fluorescens* P60 meningkatkan senyawa fenol (saponin, tanin, dan glikosida) pada daun kakao.

[Kata kunci: antraknosa daun, *Colletotrichum gloeosporioides*, kakao, metabolit sekunder, *Pseudomonas fluorescens*]

*Korespondensi penulis: lukassusanto26@gmail.com

Pendahuluan

Kakao (*Theobroma cacao* Linn.) merupakan salah satu komoditas perkebunan yang penting, selain berperan sebagai sumber devisa negara, juga berperan sebagai sumber pendapatan petani, menyediakan lapangan kerja, mendorong agribisnis dan agroindustri serta pengembangan wilayah (Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian, 2019). Menurut data Badan Pusat Statistik (2022), produksi kakao nasional mengalami penurunan dari 767,40 ton di tahun 2018 menjadi 713,40 ton di tahun 2020 atau penurunan sebesar 7%. Ada beberapa faktor yang menyebabkan penurunan produksi kakao antara lain genetika bahan tanam, iklim seperti curah hujan, suhu, dan kelembapan, serta faktor biotik seperti serangan hama dan patogen tanaman (Effendy *et al.*, 2019).

Salah satu patogen tanaman yang menyerang tanaman kakao adalah *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Sacc., yang menyebabkan penyakit antraknosa pada kakao (Rojas *et al.*, 2010). Serangan berat jamur *C. gloeosporioides* mampu menurunkan jumlah daun dan buah, sehingga memengaruhi produksi tanaman kakao (Aksare *et al.*, 2021). Jamur dapat disebarkan oleh angin kencang yang menerbangkan spora dari daun yang bergerak, oleh tenaga pembibitan yang menangani tanaman yang sakit, dan oleh pergerakan siput dan hama lainnya (Uchida & Kadooka, 1997). Dari hasil pengamatan yang dilakukan di Jawa Timur, serangan pada buah muda dari klon kakao rentan mencapai 73% dan kehilangan hasil diduga dapat mencapai 75%. Pada tanaman yang terserang berat, jumlah daun dan buah hanya sedikit, sehingga produksi sangat rendah (Sri-Sukamto, 2008).

Beberapa cara dapat dilakukan untuk mengurangi kerugian akibat penyakit antraknosa daun kakao, namun yang sering dilakukan yaitu menggunakan fungisida sintesis. Penggunaan fungisida secara intensif berimplikasi pada akumulasi senyawa toksin yang dapat membahayakan manusia, lingkungan, serta timbulnya patotipe baru (Rajmohan *et al.*, 2020). Salah satu pengendalian yang ramah lingkungan yaitu memanfaatkan mikroba antagonis dan metabolit sekunder agensia pengendali hayati.

Beberapa mikroba antagonis telah diteliti dan digunakan untuk mengendalikan penyakit antraknosa, misalnya *Enterobacter* sp., *Enterobacter cloacae*, and *Bacillus* sp. pada daun kakao (Suryanto *et al.*, 2014) serta *Trichoderma harzianum*, *Gliocladium roseum*, *B. subtilis*, *Streptomyces natalensis*, dan *S. noursei* pada bebuahan (Živković *et al.*, 2010). Akan tetapi, aplikasi mikroba antagonis berbasis spora sering menghadapi beberapa kendala, seperti faktor cekaman abiotik (Azubuike *et al.*, 2016) dan kestabilan produksi spora (Hojnik *et al.*, 2019). Oleh karenanya, perlu teknologi inovasi untuk

mengatasi masalah tersebut, yaitu dengan menggunakan metabolit sekunder dari mikroba antagonis. Metabolit sekunder yang dihasilkan oleh agensia pengendali hayati dapat dijadikan alternatif dalam mengendalikan penyakit tanaman.

Metabolit sekunder merupakan senyawa organik yang tidak secara langsung terlibat dalam pertumbuhan, perkembangan dan reproduksi organisme secara normal dan dibentuk selama akhir atau mendekati tahap stasioner pertumbuhan organisme (Kliebenstein & Osbourn, 2012; Li *et al.*, 2016). Senyawa di dalam metabolit sekunder dari mikroba antagonis memiliki kemampuan mengendalikan organisme pengganggu tanaman (He *et al.*, 2021). Salah satu bakteri antagonis yang menghasilkan metabolit sekunder adalah *Pseudomonas fluorescens*.

Bakteri antagonis *P. fluorescens* mampu menghasilkan antibiotika, seperti antifungi, antibakteri, antitumor, dan antivirus (Hagag & El Soud, 2012). Menurut Soesanto *et al.* (2011), pemberian *P. fluorescens* selama 5 kali mampu menekan penyakit layu Fusarium pada tanaman tomat. Namun demikian, pemanfaatan metabolit sekunder *P. fluorescens* dalam mengendalikan penyakit antraknosa daun kakao belum banyak dilakukan, sehingga perlu dilakukan kajian tentang aplikasi metabolit sekunder *P. fluorescens* terhadap penekanan penyakit antraknosa daun kakao. Penelitian ini bertujuan untuk mengkaji keefektifan metabolit sekunder dari tiga isolat *P. fluorescens* yaitu P60, P20, dan P8 terhadap penyakit antraknosa daun kakao, serta pengaruhnya terhadap pertumbuhan tanaman kakao.

Bahan dan Metode

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Perlindungan Tanaman, Fakultas Pertanian, Universitas Jenderal Soedirman, Purwokerto dan di perkebunan kakao rakyat di Dusun Plumbungan, Desa Putat, Kecamatan Patuk, Kabupaten Gunung Kidul, Yogyakarta selama empat bulan.

Persiapan isolat *P. fluorescens*

Isolat *P. fluorescens* yang digunakan adalah P60 (Soesanto *et al.*, 2003) serta P20 dan P8 (Kurniasih *et al.*, 2020). Masing-masing isolat dibiakkan pada medium King's B dalam cawan Petri selama 2 × 24 jam pada suhu ruang (Labhasetwar *et al.*, 2019).

Persiapan metabolit sekunder

Metabolit sekunder setiap isolat *P. fluorescens* disiapkan dalam media kaldu keong, dengan cara 400 g keong dipecah cangkangnya dan diambil daging keong, dicuci bersih, kemudian direbus sampai daging keong lunak dalam 1 L air dengan

ditambahkan 2 g terasi. Selanjutnya dalam kondisi panas disaring menggunakan kapas ke dalam wadah jeriken steril dan didinginkan (Soesanto *et al.*, 2011). Sebanyak 1 jarum ose biakan masing-masing isolat *P. fluorescens* dimasukkan ke dalam masing-masing 125 mL media kaldu keong di dalam labu Erlenmeyer 250 mL dan ditutup rapat, kemudian diletakkan di atas *shaker* (Daiki Orbital) dengan kecepatan 150 rpm pada suhu kamar selama 3 hari. Selanjutnya, kepadatan sel dihitung untuk aplikasi metabolit sekunder di lapangan dan kepadatan yang digunakan adalah 10^9 cfu mL⁻¹ (Han *et al.*, 2012). Larutan kemudian disentrifugasi pada kecepatan 9000 rpm selama 10 menit (Bhakare *et al.*, 2020). Supernatan yang terbentuk dipisahkan dan digunakan pada penelitian ini.

Persiapan tanaman kakao

Tanaman kakao yang digunakan ditanam di Dusun Plumbungan, Desa Putat, Kecamatan Patuk, Kabupaten Gunung Kidul dengan jarak tanam 3 m x 4 m, pohon penayang lamtoro, dan berumur 4-5 tahun. Tanaman kakao menunjukkan gejala penyakit antraknosa pada daun kakao, terutama daun muda (Zaedar *et al.*, 2021). Tanaman kakao yang digunakan dalam penelitian diusahakan yang relatif seragam.

Aplikasi metabolit sekunder

Metabolit sekunder dari setiap isolat *P. fluorescens* disiapkan dengan dosis 500 mL per tanaman, yang diperoleh dari kepadatan 10^9 cfu mL⁻¹. Selanjutnya metabolit sekunder disemprotkan ke permukaan daun tanaman kakao bagian bawah sesuai perlakuan dengan menggunakan alat penyemprot gendong, dilakukan pada sore hari, dan diulang penyemprotannya sebanyak enam kali dengan interval 7 hari.

Rancangan percobaan

Penelitian menggunakan rancangan acak kelompok, dengan 7 perlakuan yaitu kontrol, metabolit sekunder *P. fluorescens* P60, metabolit sekunder *P. fluorescens* P20, metabolit sekunder *P. fluorescens* P8, metabolit sekunder *P. fluorescens* P60 dan P20, metabolit sekunder *P. fluorescens* P60 dan P8, dan metabolit sekunder *P. fluorescens* P20 dan P8, yang diulang empat kali. Setiap unit percobaan terdiri atas 2 tanaman kakao.

Variabel dan pengukuran

Variabel dan pengukuran terhadap semua tanaman penelitian adalah intensitas penyakit, dihitung menggunakan persamaan: $IP (\%) = \{(\sum(n_i \times v_i) / (Z \times N))\} \times 100\%$ dengan IP = Intensitas Penyakit (%), n_i = jumlah bagian tanaman terserang dalam kategori ke- i , v_i = nilai numerik pada masing-masing kategori, N = jumlah tanaman/bagian tanaman contoh

yang diamati, dan Z = nilai kategori serangan tertinggi. Skala keparahan penyakit antraknosa (Bowen, 2007), yaitu skala 0 = tidak ada gejala, skala 1 = keparahan penyakit 0-20 %, skala 2 = 21-40 %, skala 3 = 41-60 %, skala 4 = 61-80 %, dan skala 5 = > 81 %. Laju infeksi, dihitung berdasarkan rumus Van der Plank (1963), yaitu:

$$r = \frac{2,30259}{t_2 - t_1} \left(\log_{10} \frac{X_2(1 - X_1)}{X_1(1 - X_2)} \right),$$

dengan: r = laju infeksi, t_2 = waktu pengamatan ke-2, t_1 = waktu pengamatan ke-1, X_2 = proporsi daun sakit selang waktu ke t_2 , dan X_1 = proporsi daun sakit selang waktu awal.

Tunas sehat, dihitung dengan menghitung jumlah daun akhir setelah perlakuan dan jumlah daun awal sebelum perlakuan. Analisis jaringan dilakukan dengan menguji kandungan senyawa fenol yaitu uji tanin, saponin, dan glikosida secara kualitatif (Chairul, 2003). Uji tanin, saponin, dan glikosida dilakukan dengan mengekstraksi 10 g bahan tumbuhan dengan etanol 80% kemudian disaring dan ditambahkan 10 mL akuades. Sebanyak 5 mL ekstrak tumbuhan kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Tambahkan 3 tetes FeCl₃ ke dalam ekstrak. Tanin terhidrolisis memberikan warna biru kehitaman, sedangkan tanin terkondensasi memberikan warna hijau biru, kemudian dibandingkan dengan kontrol. Uji saponin dilakukan dengan mengambil 1 tetes lerak kemudian ditambahkan 10 mL air (sebagai kontrol) ke dalam tabung reaksi. Ekstrak yang telah disaring dimasukkan ke dalam tabung reaksi 5-10 mL, kemudian dikocok kuat-kuat selama 30 detik dan didiamkan selama 30 menit. Busa yang terbentuk lebih dari 3 cm dari permukaan larutan berarti positif mengandung saponin. Uji glikosida dilakukan dengan cara menambahkan 10 g bahan tumbuhan dengan etanol 80% dan dikeringkan di atas penangas air, kemudian ditambah 10 mL kloroform dan diaduk hingga homogen. Larutan dibagi dua tabung, di salah satu tabung ditambahkan 3 tetes asam asetat anhidrit, kemudian ditambahkan H₂SO₄ pekat secara perlahan dan diamati perubahan warna berupa cincin coklat kemerahan.

Analisis data

Data dianalisis dengan analisis varian pada taraf nyata 5%. Beda nyata antar-perlakuan diuji lanjut menggunakan *Duncan's Multiple Range Test (DMRT)* pada taraf nyata yang sama.

Hasil dan Pembahasan

Intensitas penyakit awal

Hasil analisis statistika terhadap intensitas penyakit antraknosa sebelum perlakuan (awal) menunjukkan bahwa semua tanaman terserang patogen antraknosa yang sama (Tabel 1). Hal tersebut

menunjukkan bahwa penyakit antraknosa daun kakao menyebar secara merata di lahan kakao atau sebaran penyakitnya homogen. Munculnya penyakit antraknosa daun kakao karena serangan jamur *C. gloeosporioides*. Gejala penyakit antraknosa yang disebabkan oleh *C. gloeosporioides* pada daun kakao berupa bercak kecoklatan dan gejala halo klorosis. Bercak ini memiliki pusat berwarna coklat dan kemudian menyatu menjadi busuk (Suryanto *et al.*, 2014). *Colletotrichum* menyebabkan tiga jenis gejala pada daun, yaitu hawar daun, lubang tembak, dan bercak daun tidak beraturan. Dari jumlah tersebut, hawar daun dan lubang tembak tersebar luas dan terjadi pada tanaman dari semua kelompok umur. Beberapa faktor memengaruhi munculnya penyakit antraknosa, di antaranya suhu, kelembapan relatif, kelembapan tanah, pH tanah, jenis tanah, dan kesuburan tanah (Velásquez *et al.*, 2018).

Patogen akan mudah menyerang tipe kakao rentan dan tipe kakao yang dibudidayakan petani yaitu Lindak lokal atau Forastero. Menurut Wickramasuriya & Dunwell (2018), klon kakao Lindak atau kakao Forastero memiliki ketahanan terhadap hama dan penyakit. Namun demikian ketahanan tersebut sudah dipatahkan, sehingga tanaman terserang *C. gloeosporioides* (Cruz *et al.*, 2015). Lingkungan yang mendukung dapat membantu patogen menginfeksi tanaman kakao. Suhu pengamatan di lapang antara 28-30 °C dan kelembapan lahan berkisar 67,5-75,25%. Hal ini didukung oleh Fadilah *et al.* (2013) yang menyatakan bahwa di daerah Karang Anyar dengan suhu 26,4 °C dan kelembapan 76% mampu menimbulkan keparahan penyakit antraknosa kakao sebesar 78,6%.

Intensitas penyakit antraknosa pada akhir pengamatan

Perlakuan metabolit sekunder *P. fluorescens* P60, P20, P8 secara tunggal dan gabungan berpengaruh nyata dalam menekan intensitas penyakit antraknosa daun kakao dibandingkan kontrol (Tabel 1). Keefektifan penekanan intensitas penyakit dari semua perlakuan berkisar antara 42,01-54,49% terhadap kontrol. Hal ini diduga metabolit sekunder yang dihasilkan oleh *P. fluorescens* memiliki kemampuan dalam menghambat perkembangan *C. gloeosporioides* dan menekan perkembangan gejala penyakit antraknosa. Sesuai dengan pernyataan Thrane *et al.* (2006) dan Vacheron *et al.* (2013), bahwa *P. fluorescens* mampu menghasilkan beberapa senyawa anti-jamur, seperti phenazines, pyoluteorin, oomycin A, sulphonamide, dan pyocyanin, yang mampu menekan pertumbuhan patogen. Lebih lanjut dikatakan Vacheron *et al.* (2013), bahwa *P. fluorescens* menghasilkan antibiotika 2,4-diacetilfluoroglucosinol atau DAPG, yang menghambat dengan jelas pertumbuhan jamur patogen dan berfungsi sebagai anti-jamur. Sesuai dengan pendapat

Hassani *et al.* (2018), yaitu eukariota berfilamen diketahui menghasilkan banyak metabolit sekunder dengan berat molekul rendah yang memiliki aktivitas anti-jamur terhadap mikroba yang tidak terkait secara filogenetika. *P. fluorescens* juga mendorong pertumbuhan tanaman melalui modulasi jalur hormon tanaman (Brazelton *et al.*, 2008). Hal ini didukung hasil penelitian Widiastuti *et al.* (2020), yang menggunakan fungisida organik dalam memulihkan kesehatan kelapa sawit yang terinfeksi *Ganoderma* sp. Namun demikian, antar-isolat *P. fluorescens* yang dicoba baik tunggal maupun gabungan tidak menunjukkan adanya perbedaan nyata. Hal tersebut diduga bahwa metabolit sekunder yang dihasilkan *P. fluorescens* P60, P20, dan P8 memiliki kemampuan yang sama dalam menekan intensitas penyakit antraknosa daun kakao. Hal tersebut sesuai dengan pendapat Olanrewaju *et al.* (2017), bahwa aplikasi gabungan metabolit sekunder *P. fluorescens* memiliki kemampuan yang sama dengan perlakuan tunggal *P. fluorescens* dalam menghambat pertumbuhan *Colletotrichum musae*. Thambugala *et al.* (2020) mengatakan bahwa kombinasi antar-mikroba antagonis memiliki 3 kemungkinan, yaitu sinergis, aditif dan antagonis.

Laju infeksi

Berdasarkan Tabel 1, laju infeksi pada semua perlakuan terjadi relatif lebih lambat dibandingkan kontrol. Perlakuan metabolit sekunder *P. fluorescens* P60 memiliki laju infeksi penyakit paling kecil yaitu 0,23 unit/hari. Kondisi ini selaras dengan intensitas penyakit. Laju infeksi perlakuan yang lebih kecil dibanding dengan kontrol menunjukkan bahwa semua perlakuan metabolit sekunder *P. fluorescens* mampu menghambat perkembangan patogen. Nilai laju infeksi yang rendah membuktikan bahwa *P. fluorescens* mampu berperan sebagai pesaing patogen dan mampu menekan laju infeksi patogen tanaman (Yang & Luo, 2021).

Perkembangan infeksi patogen tiap pengamatan menunjukkan fluktuasi dari masing-masing perlakuan (Gambar 1). Infeksi patogen awal pada kontrol memiliki nilai lebih tinggi dibanding dengan perlakuan metabolit sekunder *P. fluorescens*. Demikian juga dengan infeksi patogen akhir, yang menunjukkan kontrol memiliki nilai lebih tinggi dibanding dengan perlakuan metabolit sekunder *P. fluorescens*. Hal tersebut selaras dengan intensitas penyakit, yang menunjukkan bahwa perlakuan metabolit sekunder *P. fluorescens* mampu menurunkan intensitas penyakit dibanding dengan kontrol. Perkembangan penyakit yang fluktuatif sangat dipengaruhi oleh beberapa faktor, terutama faktor lingkungan. Sesuai dengan pendapat Velásquez *et al.* (2018), bahwa perubahan kondisi lingkungan dapat berpengaruh penting pada perkembangan penyakit tanaman.

Pengaruh perlakuan terhadap tunas sehat

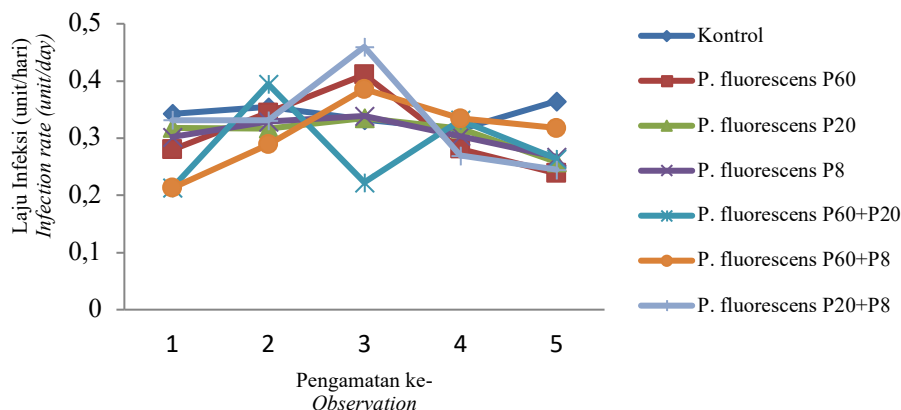
Berdasarkan hasil analisis bahwa jumlah tunas awal menunjukkan perbedaan antar-perlakuan, dimana jumlah tunas sehat pada perlakuan metabolit sekunder *P. fluorescens* P8, *P. fluorescens* P60+P20, *P. fluorescens* P60+P8, dan *P. fluorescens* P20+P8 berbeda sangat nyata dibanding kontrol dan *P. fluorescens* P20 (Tabel 2). Perbedaan jumlah tunas sehat diduga karena aplikasi metabolit sekunder bakteri antagonis (*P. fluorescens*) dapat mengatasi infeksi lanjut dari patogen antraknosa. Jamur patogen antraknosa dapat dihambat pertumbuhan dan

perkembangannya dengan senyawa yang terkandung di dalam metabolit sekunder, sehingga menyebabkan tunas yang muncul menjadi sehat. Hal ini sesuai pendapat Raaijmakers & Mazzola (2012), bahwa produksi metabolit sekunder antimikroba dengan pengaruh penghambatan terhadap patogen adalah cara kerja langsung dari mikroba antagonis. Mekanisme utama parasitisme adalah ekskresi enzim perusak dinding sel yang dikombinasikan dengan ekskresi metabolit sekunder dalam kontak dekat dengan sel inang yang mengarah ke bukaan di dinding sel dan selanjutnya disorganisasi sitoplasma (Kohl *et al.*, 2019).

Tabel 1. Intensitas penyakit dan laju infeksi penyakit antraknosa daun kakao
 Table 1. Disease intensity and infection rate of cocoa leaf anthracnose

Perlakuan <i>Treatments</i>	Intensitas penyakit awal (%) <i>Early disease intensity (%)</i>	Intensitas penyakit akhir (%) <i>Late disease intensity (%)</i>	Penekanan intensitas penyakit (%) <i>Suppression of disease intensity (%)</i>	Laju infeksi (unit/hari) <i>Infection rate (unit/days)</i>
Kontrol/ <i>Control</i>	25,78 a	29,23 a	0,00	0,36
<i>P. fluorescens</i> P60	22,51 a	14,75 b	49,53	0,23
<i>P. fluorescens</i> P20	24,08 a	15,79 b	45,98	0,25
<i>P. fluorescens</i> P8	22,20 a	14,55 b	50,22	0,26
<i>P. fluorescens</i> P60+P20	23,06 a	13,30 b	54,49	0,26
<i>P. fluorescens</i> P60+P8	26,32 a	16,95 b	42,01	0,31
<i>P. fluorescens</i> P20+P8	18,70 a	13,92 b	52,37	0,24

Keterangan: Angka yang diikuti huruf yang sama dalam kolom yang sama tidak berbeda nyata menurut DMRT 5%
 Note: Numbers followed by the same letter in the same column are not significantly different according to DMRT 5%



Gambar 1. Perkembangan laju infeksi penyakit antraknosa selama pengamatan
 Figure 1. Development of the disease infection rate during observation

Tabel 2. Pengaruh metabolit sekunder dari isolat *P. fluorescens* terhadap jumlah tunas sehat
 Table 2. Effect of secondary metabolites from *P. fluorescens* isolates on number of healthy shoots

Perlakuan/ <i>Treatments</i>	Jumlah tunas awal/ <i>Number of early shoots</i>	Jumlah tunas akhir/ <i>Number of late shoots</i>	Selisih tunas sehat/ <i>Difference of healthy shoots</i>
Kontrol/ <i>Contol</i>	9,87 b	15,12 c	5,25 b
<i>P. fluorescens</i> P60	15,00 ab	31,12 a	16,12 a
<i>P. fluorescens</i> P20	9,87 b	16,87 c	7,00 b
<i>P. fluorescens</i> P8	17,50 a	23,37 abc	5,87 b
<i>P. fluorescens</i> P60+P20	18,62 a	27,62 ab	9,00 ab
<i>P. fluorescens</i> P60+P8	17,25 a	28,25 a	11,00 ab
<i>P. fluorescens</i> P20+P8	10,75 a	19,75 bc	9,00 ab

Keterangan: Angka yang diikuti huruf yang sama dalam kolom yang sama tidak berbeda nyata menurut DMRT 5%
 Note: Numbers followed by the same letter in the same column are not significantly different according to DMRT 5%

Hasil analisis selisih tunas sehat menunjukkan bahwa perlakuan metabolit sekunder *P. fluorescens* P60 mampu meningkatkan jumlah tunas sehat dan berbeda sangat nyata terhadap kontrol (Tabel 2). Persentase peningkatan tunas perlakuan metabolit sekunder *P. fluorescens* P60 sebesar 67,44%. Peningkatan jumlah tunas sehat ini sejalan dengan kemampuan metabolit sekunder *P. fluorescens* P60 dalam menghambat intensitas penyakit antraknosa daun kakao (Tabel 1). Laju infeksi patogen yang lambat diduga berpengaruh terhadap pertumbuhan tanaman kakao, terlihat dari pertumbuhan tunas sehat. Soesanto *et al.* (2010) menyatakan bahwa *P. fluorescens* P60 menghasilkan hormon tumbuh dan dikenal sebagai *Plant Growth Promoting Rhizobacteria* (PGPR). Soesanto *et al.* (2011) melaporkan bahwa aplikasi formula cair *P. fluorescens* P60 dapat mengendalikan penyakit busuk pangkal batang yang disebabkan infeksi pathogen jamur *Sclerotium rolfsii* pada tanaman mentimun. Namun demikian perlakuan secara gabungan metabolit sekunder semua isolat *P. fluorescens* menunjukkan tidak berbeda nyata dibanding kontrol. Hal tersebut diduga bahwa metabolit sekunder yang digabung belum mampu bersinergi dalam meningkatkan pertumbuhan tunas sehat pada kakao karena jumlah metabolit sekunder rendah. Hal ini sesuai dengan pendapat Kohl *et al.* (2019), yang mengatakan bahwa metabolit sekunder yang disekresikan dalam jumlah rendah mendukung antagonis untuk mendapatkan keunggulan kompetitif.

Analisis senyawa fenol secara kualitatif

Hasil pengujian senyawa fenol secara kualitatif menunjukkan bahwa semua daun kakao mengandung senyawa fenol (Tabel 3). Perlakuan metabolit sekunder tunggal yaitu *P. fluorescens* P60 memiliki

jumlah senyawa fenol terbesar dibandingkan perlakuan lainnya. Hal ini menunjukkan bahwa metabolit sekunder *P. fluorescens* P60 dapat mendukung ketahanan laten tanaman secara biokimia terhadap infeksi patogen antraknosa. Hal ini sesuai dengan pendapat Jacoby *et al.* (2021), bahwa tanaman menghasilkan sejumlah besar metabolit sekunder yang beragam secara kimiawi, banyak di antaranya memberikan pengaruh bioaktif pada mikroba, dan metabolit sekunder tanaman memengaruhi komposisi dan fungsi mikrobioma.

Namun demikian, perlakuan metabolit sekunder *P. fluorescens* secara gabungan tidak menunjukkan adanya peningkatan senyawa fenol dibanding dengan perlakuan secara tunggal. Perlakuan metabolit sekunder *P. fluorescens* P20 dan gabungan *P. fluorescens* P20+P8 menunjukkan hasil senyawa fenol yang lebih rendah dibanding kontrol (Tabel 3). Perbedaan senyawa fenol pada setiap perlakuan diduga bahwa masing-masing tanaman memiliki kemampuan yang berbeda dalam menghasilkan senyawa fenol. Pencampuran dua atau lebih metabolit sekunder mikroba antagonis akan berdampak kepada penurunan kemampuannya. Selain itu, masing-masing isolat tidak sama jumlahnya dalam menghasilkan metabolit sekunder. Metabolit sekunder yang diproduksi akan berbeda tergantung masing-masing strain bakteri sesuai kondisi ekologi bakteri (Jacoby *et al.*, 2021). Hal ini sejalan dengan Soesanto *et al.* (2010), bahwa *P. fluorescens* P60 mampu meningkatkan senyawa fenol, dan sejalan pula dengan kemampuannya dalam menurunkan intensitas penyakit yang disebabkan oleh *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*.

Tabel 3. Pengaruh metabolit sekunder dari isolat *P. fluorescens* terhadap kandungan senyawa fenol dalam daun secara kualitatifTable 3. Effect of secondary metabolites from *P. fluorescens* isolates on phenolic compound content in cocoa leaf qualitatively

Perlakuan/ Treatments	Analisis kandungan senyawa fenol/ Analysis of phenolic compound content			Jumlah tanda +/ Number of signs +
	Tanin/ Tannins	Saponin/ Saponins	Glikosida/ Glycosides	
Kontrol / Control	++	+	+++	6
<i>P. fluorescens</i> P60	+++	++	+++	8
<i>P. fluorescens</i> P20	+	+	+++	5
<i>P. fluorescens</i> P8	+	+++	+++	7
<i>P. fluorescens</i> P60+P20	+	+++	+++	7
<i>P. fluorescens</i> P60+P8	++	++	++	6
<i>P. fluorescens</i> P20+P8	+	+	+++	5

Keterangan: += sedikit mengandung fenol, ++ = cukup mengandung fenol, dan +++ = banyak mengandung fenol
 Note: += contains a little phenol, ++ = contains sufficient phenol, and +++ = contains a lot of phenol

Kandungan fenol seperti senyawa tanin, saponin, dan glikosida pada sampel yang diamati diduga berpengaruh terhadap ketahanan tanaman, yang sejalan dengan data intensitas penyakit dan laju infeksi (Tabel 1). Hal tersebut sesuai dengan hasil pengamatan intensitas serangan penyakit antraknosa, bahwa perlakuan *P. fluorescens* mampu menekan intensitas serangan patogen. Menurut Freeman & Beattie (2008) dan Prasannath (2017), pertahanan tanaman terhadap serangan patogen dapat terjadi melalui satu atau gabungan cara struktur dengan membentuk pertahanan fisik dan reaksi biokimia. Ramírez-Gómez *et al.* (2019) menyatakan bahwa senyawa fenol pada tanaman dapat meracuni patogen.

Kesimpulan

Perlakuan metabolit sekunder *P. fluorescens* P60, P20 dan P8 secara tunggal dan gabungan mampu menekan intensitas penyakit antraknosa, dengan persentase penekanan penyakit berkisar 42,01-54,49%. Perlakuan metabolit sekunder *P. fluorescens* P60 meningkatkan jumlah tunas sehat sebesar 67,44% dan meningkatkan senyawa fenol pada daun kakao secara kualitatif.

Daftar Pustaka

Aksare EK, O Domfeh, SW Avicor, P Pobee, Y Bukari & I Amoako-Attah (2021). *Colletotrichum gloeosporioides* s.l. causes an outbreak of anthracnose of cacao in Ghana. *South African J Plant Soil* 38(2), 107-115. DOI: 10.1080/02571862.2020.186348.

Azubuikwe CC, CB Chikere & GC Okpokwasili (2016). Bioremediation techniques-classification based on site of application: Principles, advantages, limitations and prospects. *World J Microbiol Biotechnol.* 32, 180. DOI: 10.1007/s11274-016-2137-x.

Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian (2019). Prospek dan arah pengembangan agribisnis: Kakao. <https://www.litbang.pertanian.go.id/special/komoditas/kakao>. [Diakses 25 Januari 2022]

Badan Pusat Statistik (2022). Produksi tanaman perkebunan (Ribu Ton), 2018-2020. (On-line). <https://www.bps.go.id/indicator/54/132/1/produksi-tanaman-perkebunan.html> [Diakses 25 Januari 2022.]

Bhakare S, PM Tumane & DD Wasnik (2020). Isolation and screening of bacterial exopolysaccharide from leguminous soil as a potential of indole acetic acid. *Bull Environment, Pharmacol and Life Sci.* 9(4), 96-101.

Bowen KL (2007). Plant disease epidemiology. In: Trigiano RN *et al.* (eds.) *Plant Pathology, Concepts and Laboratory Exercises*. 2nd Ed. CRC Press, New York. pp. 281-294.

Brazelton JN, EE Pfeufer, TA Sweat, BBM Gardener & C Coenen (2008). 2,4-diacetylphloroglucinol alters plant root development. *Mol Plant-Microbe Interact* 21: 1349-1358. DOI: 10.1094 / MPMI - 21-10-1349.

Chairul (2003). Identifikasi secara cepat bahan bioaktif pada tumbuhan di lapangan. *Berita Biologi* 6(4), 621-628.

- Cruz JFM, PB Leite, SE Soares & ES Bispo (2015). Bioactive compounds in different cocoa (*Theobroma cacao* L.) cultivars during fermentation. *Food Sci. Technol*, Campinas, 35(2), 279-284. DOI: 10.1590/1678-457X.6541.
- Effendy, MF Pratama, RA Rauf, M Antara, M Basir-Cyio, Mahfudz & Muhardi (2019). Factors influencing the efficiency of cocoa farms: A study to increase income in rural Indonesia. *PLoS ONE* 14(4), e0214569. DOI: 10.1371/journal.pone.0214569.
- Fadilah HHT, L Lubis & Hasanuddin (2013). Efek temperatur terhadap virulensi jamur *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. Sacc. penyebab penyakit antraknosa pada tanaman kakao (*Theobroma cacao* L.). *Jurnal Online Agroekoteknologi* 2(1), 441-420.
- Freeman BC & GA Beattie (2008). An overview of plant defenses against pathogens and herbivores. *The Plant Health Instructor*. DOI: 10.1094/PHI-I-2008-0226-01.
- Haggag WM & MA El Soud (2012). Production and optimization of *Pseudomonas fluorescens* biomass and metabolites for biocontrol of strawberry grey mould. *American J Plant Sci.* 3, 836-845. DOI: 10.4236/ajps.2012.37101.
- Han JS, JH Cheng, TM Yoon, J Song, A Rajkarnikar, WG Kim, ID Yoo, YY Yang & JW Suh (2012). Biological control agent of common scab disease by antagonistic strain *Bacillus* sp. *sunhua*. *J Appl Microbiol* 99, 213–221.
- Hassani MA, P Durán & S Hacquard (2018). Microbial interactions within the plant holobiont. *Microbiome* 6(58). DOI: 10.1186/s40168-018-0445-0.
- He D-C, M-H He, DM Amalin, W Liu, DG Alvindia & J Zhan (2021). Biological control of plant diseases: An evolutionary and eco-economic consideration. *Pathogens* 10(10), 1311. DOI: 10.3390/pathogens10101311.
- Hojnik M, M Modic, Y Ni, G Filipič, U Cvelbar & JL Walsh (2019). Effective fungal spore inactivation with an environmentally friendly approach based on atmospheric pressure air plasma. *Environ Sci Technol* 53(4), 1893–1904. DOI: 10.1021/acs.est.8b05386.
- Jacoby RP, A Koprivova & S Kopriva (2021). Pinpointing secondary metabolites that shape the composition and function of the plant microbiome. *J Exp Bot* 72(1), 57–69. DOI: 10.1093/jxb/eraa424.
- Kliebenstein DJ & A Osbourn (2012). Making new molecules - evolution of pathways for novel metabolites in plants. *Curr Opin Plant Biol* 15(4), 415-423. DOI: 10.1016/j.pbi.2012.05.005.
- Köhl J, R Kolnaar & WJ Ravensberg (2019). Mode of action of microbial biological control agents against plant diseases: Relevance beyond efficacy. *Front Plant Sci* 10, 845. DOI: 10.3389/fpls.2019.00845.
- Kurniasih H, N Prihatiningsih, E Mugiastuti & L Soesanto (2020). Aplikasi *Pseudomonas fluorescens* P20 formula cair tepung ikan terhadap rebah semai mentimun. *Jurnal Agro* 7(2), 158-168. DOI: 10.15575/8591.
- Labhasetwar AA, SB Bramhankar, TS Pillai, SS Isokar, GT Dinkwar, SS Bhure & VM Kharat (2019). Biochemical and physiological characterizations of *Pseudomonas fluorescens*. *International J Chem Studies* 7(1), 1785-1788.
- Li S, P Wang, W Yuan, Z Su, & SH Bullard (2016). Endocidal regulation of secondary metabolites in the producing organisms. *Sci Rep* 6, 29315. DOI: 10.1038/srep29315.
- Olanrewaju OS, BR Glick & OO Babalola (2017). Mechanisms of action of plant growth promoting bacteria. *World J Microbiol Biotechnol* 33(11), 197. DOI: 10.1007/s11274-017-2364-9.
- Prasannath K (2017). Plant defense-related enzymes against pathogens: a review. *AGRIEAST J Agric Sci* 11(1), 38. DOI: 10.4038/agrieast.v11i1.33
- Raaijmakers JM & M Mazzola (2012). Diversity and natural functions of antibiotics produced by beneficial and plant pathogenic bacteria. *Annu Rev Phytopathol.* 50, 403-424. DOI: 10.1146/annurev-phyto-081211-172908.
- Rajmohan KS, R Chandrasekaran & S Varjani (2020). A Review on occurrence of pesticides in environment and current technologies for their remediation and management. *Indian J Microbiol* 60(2), 125–138. DOI: 10.1007/s12088-019-00841-x.
- Ramírez-Gómez XS, SN Jiménez-García, VB Campos & LG Campos (2019). Plant Metabolites in plant defense against pathogens. *IntechOpen Book Series*. DOI: 10.5772/intechopen.87958.
- Rojas EI, SA Rehner, GJ Samuels, SA Van Bael, EA Herre, P Cannon, R Chen, J Pang, R Wang, Y Zhang, Y-Q Peng & T Sha (2010). *Colletotrichum gloeosporioides* s.l. associated with *Theobroma cacao* and other plants in Panama: Multilocus phylogenies distinguish host-associated pathogens from asymptomatic endophytes. *Mycologia* 102(6), 1318-1338. DOI: 10.3852/09-244.

- Soesanto L, CN Pradipta & E Mugiastuti (2021). Raw secondary metabolites of chitosan-enriched *Pseudomonas fluorescens* P60 to control corn sheath blight. *Biosaintifika: J Biology & Biology Education* 13(1), 113-120. DOI: 10.15294/biosaintifika.v13i1.28775.
- Soesanto L, E Mugiastuti & RF Rahayuniati (2010). Kajian mekanisme antagonis *Pseudomonas fluorescens* P60 terhadap *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* pada tanaman tomat *in vivo*. *Jurnal HPT Tropika* 10(2), 108-115.
- Soesanto L, E Mugiastuti & RF Rahayuniati (2011). Pemanfaatan beberapa kaldu hewan sebagai bahan formula cair *Pseudomonas fluorescens* P60 untuk mengendalikan *Sclerotium rolfsii* pada tanaman mentimun. *Jurnal Perlindungan Tanaman Indonesia* 17(1), 7-17.
- Soesanto L, R Hidayat, & DS Utami (2003). Prospek pemanfaatan *Pseudomonas fluorescens* P60 untuk pengendalian penyakit busuk batang pada kacang tanah. *J Fitopatologi Indonesia* 7(1), 1-6.
- Sri-Sukanto (2008). Pengendalian penyakit. Pp. 154-169. In: T Wahyudi, R Panggabean & Pujiyanto (Eds.). *Panduan Lengkap Kakao: Manajemen Agribisnis dari Hulu hingga Hilir*. Penebar Swadaya, Jakarta.
- Suryanto D, S Wahyuni, EBM Siregar & E Munir (2014). Utilization of chitinolytic bacterial isolates to control anthracnose of cocoa leaf caused by *Colletotrichum gloeosporioides*. *African J Biotechnol* 13(15), 1631-1637.
- Thambugala KM, DA Daranagama, AJL Phillips, SD Kannangara & I Promputtha (2020). Fungi vs fungi in biocontrol: An overview of fungal antagonists applied against fungal plant pathogens. *Front Cell Infect Microbiol.* 10, 604923. DOI: 10.3389/fcimb.2020.604923.
- Thrane C, S Olsson, TH Nielsen & JJ Sørensen (2006). Vital fluorescent stains for detection of stress in *Pythium ultimum* and *Rhizoctonia solani* challenged with viscosinamide from *Pseudomonas fluorescens* DR54. *FEMS Microbiol Ecology* 30(1), 11-23. DOI: 10.1111/j.1574-6941.1999.tb00631.x.
- Uchida JY & CY Kadooka (1997). *Colletotrichum leaf spot of red sealingwax palm*. Plant Disease. Department of Plant Pathology, College of Tropical Agriculture and Human Resources, University of Hawaii, Manoa. pp. 1-4.
- Vacheron J, G Desbrosses, M-L Bouffaud, B Touraine, Y Moenne-Loccoz, D Muller & C Prigent-Combaret (2013). Plant growth-promoting rhizobacteria and root system functioning. *Front Plant Sci* 4, 356. DOI: 10.3389/fpls.2013.00356.
- Van der Plank JE (1963). *Plant Disease Epidemic and Control*. Academic Press, New York and London.
- Velásquez AC, CDM Castroverde & SY He (2018). Plant and pathogen warfare under changing climate conditions. *Curr Biol* 28(10), R619-R634. DOI: 10.1016/j.cub.2018.03.054.
- Wickramasuriya AM & JM Dunwell (2018). Cacao biotechnology: current status and future prospects. *Plant Biotechnol J* 16(1), 4-17. DOI: 10.1111/pbi.12848.
- Widiastuti H, H Minarsih, D Santoso, DD Eris & GW Permatasari (2020). Application of organic fungicide in controlling basal stem rot disease for mature oil palm. *Menara Perkebunan* 88(1), 29-34. DOI: 10.22302/iribb.jur.mp.v88i1.368.
- Yang H & P Luo (2021). Changes in photosynthesis could provide important insight into the interaction between wheat and fungal pathogens. *Int J Mol Sci* 22(16), 8865. DOI: 10.3390/ijms22168865.
- Zaedar, A Rosmana, T Kuswinanti & Nasaruddin (2021). Isolation and identification of endophytic fungi on cocoa plant (*Theobroma cacao* L.) and antagonist activity against *Colletotrichum gloeosporioides*. *Int J Curr Microbiol App Sci* 10(9), 419-430. DOI: 10.20546/ijemas.2021.1009.049.
- Živković S, S Stojanović, Ž Ivanović, V Gavrilović, T Popović & J Balaž (2010). Screening of antagonistic activity of microorganisms against *Colletotrichum acutatum* and *Colletotrichum gloeosporioides*. *Arch Biol Sci, Belgrade* 62(3), 611-623. DOI: 10.2298/ABS1003611Z.