

**AKTIVITAS BIOKONTROL KHAMIR ASAL DAUN
BINTARO (*Cerbera manghas* L.) TERHADAP
KAPANG PERUSAK PADA BUAH APEL MALANG
(*Malus sylvestris* Mill.) PASCAPANEN**

SKRIPSI

**Disusun untuk melengkapi syarat-syarat
guna memperoleh gelar Sarjana Sains**



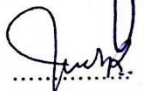
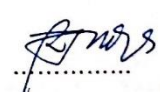

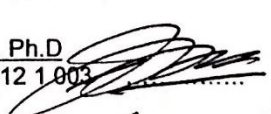



**ANDISA SHABRINA
3425122214**

**PROGRAM STUDI BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS NEGERI JAKARTA
2017**

**AKTIVITAS BOKONTROL KHAMIR ASAL DAUN BINTARO
(*Cerbera manghas* L.) TERHADAP KAPANG PERUSAK PADA BUAH APEL
MALANG (*Malus sylvestris* Mill.) PASCAPANEN**

Nama : Andisa Shabrina
No. Reg : 3425122214

Nama	Tanda Tangan	Tanggal
Penanggung Jawab		
Dekan : <u>Prof. Dr. Suyono, M.Si</u> NIP. 19671218 199303 1 005		16/2-2017
Wakil Penanggung Jawab		
Pembantu Dekan : <u>Dr. Muktiningsih, M.Si</u> NIP. 19640511 198903 2 001		16/2-2017
Ketua : <u>Dra. Yoswita Rustam, M.Si</u> NIP. 19530909 19800 2 002		13/2-2017
Sekretaris/Penguji I : <u>Dr. Reni Indrayanti, M.Si</u> NIP 19621023 199803 2 002		13/2-2017
Anggota		
Pembimbing I : <u>Dr. Dalia Sukmawati, M.Si</u> NIP 19730914 200604 2 001		13/2/2017
Pembimbing II : <u>Iman Hidayat, M.Sc., Ph.D</u> NIP. 19780119 200212 1 003		10/2-2017
Penguji II : <u>Dr. Tri Handayani Kurniati, M.Si</u> NIP. 19660316 199203 2 001		10/2-2017

Dinyatakan lulus ujian skripsi pada tanggal 7 Februari 2017

ABSTRAK

Andisa Shabrina. Aktivitas Biokontrol Khamir Asal Daun Bintaro (*Cerbera manghas* L.) Terhadap Kapang Perusak Pada Buah Apel Malang (*Malus sylvestris* Mill.) Pascapanen. Program Studi Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Negeri Jakarta.

Buah apel seringkali mengalami kerusakan pascapanen akibat diserang oleh kapang. Kapang perusak yang menginfeksi buah apel saat pascapanen diantaranya adalah *Aspergillus* sp., *Penicillium expansum*, *Botrytis cinerea*, dan *Venturia* sp. Pengendalian kapang patogen menggunakan fungisida menyebabkan terjadinya resistensi kapang perusak buah apel. Alternatif pengganti fungisida salah satunya dengan penggunaan khamir sebagai agen hayati. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui potensi isolat khamir dari daun bintaro dalam menghambat pertumbuhan kapang perusak pada buah apel serta melakukan identifikasi kapang perusak dan khamir potensial berdasarkan daerah sekuensing ITS rDNA. Sampel buah apel berasal dari Pasar Perumnas, Klender, Jakarta Timur. Isolasi dilakukan dengan teknik tanam langsung. Sebanyak 18 isolat kapang berhasil diisolasi dari buah apel bergejala busuk. Uji patogenitas dilakukan dengan menginfeksi kembali kapang hasil isolasi yang bersporulasi ke buah apel segar. Kapang *A. brasiliensis sensu lato* strain A1 (nilai KP 100%; KeP 50%) dan *A. flavus sensu lato* strain A17 (nilai KP 100%; KeP 31,25%) merupakan kapang paling perusak. Khamir *Rhodotorula mucilaginosa* strain T1 dan dua isolat baru yang masih berhubungan dekat dengan *Aureobasidium pullulans* (strain T3 dan T4) positif antagonisme dengan metode *dual culture*. Hasil uji biokontrol menunjukkan bahwa ketiga isolat khamir tersebut mampu mereduksi pertumbuhan *A. brasiliensis* dan khamir strain T1, T3 mereduksi pertumbuhan *A. flavus*.

Kata kunci: apel, *Aureobasidium pullulans*, biokontrol, fungi, *Rhodotorula mucilaginosa*

ABSTRACT

Andisa Shabrina. Biocontrol Activity of Yeast Isolated from Bintaro Leaf (*Cerbera manghas* L.) Against Fungal Postharvest Diseases on Malang Apple (*Malus sylvestris* Mill.). Department of Biology, Faculty of Mathematics and Natural Sciences, Universitas Negeri Jakarta.

Mold is one of causal agents of postharvest diseases in apples. These include *Aspergillus* sp., *Penicillium expansum*, *Botrytis cinerea*, and *Venturia* sp. Fungicide application in controlling postharvest diseases causing several problems such as fungal resistance, environmental pollution and health. Therefore, it is important to seek alternative solution which is safe to human and environment, such as biocontrol. The aims of this study were to examine biocontrol activity of yeast isolated from bintaro leaves in inhibiting the growth of fungal postharvest diseases in apples and to determine the identity of these yeasts by using molecular phylogenetic analysis of nucleotide sequencing from the ITS rDNA region. Samples of apples were collected from Perumnas Traditional Market, Klender, East Jakarta. Isolation was done by using direct isolation techniques. A total of 18 fungal isolates have been isolated from symptomatic apples. Pathogenicity assay showed that *A. brasiliensis sensu lato* strain A1 (KP value 100%; KeP 50%) and *A. flavus sensu lato* strain A17 (KP value 100%; KeP 31.25%) exhibit highest activity in deleterious apple fruits. *Rhodotorula mucilaginosa* strain T1 and two isolates of *Aureobasidium c.f. pullulans* (strain T3 and T4) showed highest antagonism activity against the fungal pathogens. Biocontrol assay showed that yeast isolates were capable to reduce the growth of *A. brasiliensis* and isolates T1 and T3 were capable to reduce the growth of *A. flavus*.

Keywords: apple, *Aureobasidium pullulans*, biocontrol, fungi, *Rhodotorula mucilaginosa*

KATA PENGANTAR

Alhamdulillahirabbil'alamiin, segala puji bagi Alloh SWT atas rahmat dan ridho-Nya, penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul "Aktivitas Biokontrol Khamir Asal Daun Bintaro (*Cerbera manghas* L.) Terhadap Kapang Perusak Pada Buah Apel Malang (*Malus sylvestris* Mill.) Pascapanen" dengan sebaik-baiknya. Penulisan skripsi ini dilakukan untuk mencapai gelar Sarjana Sains Biologi pada Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Negeri Jakarta.

Penulis menyadari bahwa terselesaikannya skripsi ini tidak lepas dari bantuan dan bimbingan dari berbagai pihak. Oleh karena itu, penulis mengucapkan terima kasih kepada:

Ibu Dr. Dalia Sukmawati, M.Si dan Bapak Iman Hidayat, M.Sc., Ph.D selaku dosen pembimbing yang telah memberikan bimbingan, motivasi, masukan serta kesabaran untuk membantu penulis dalam menyelesaikan skripsi ini. Ibu Dr. Tri Handayani Kurniati, M.Si dan Ibu Dr. Reni Indrayanti, M.Si selaku dosen penguji yang telah memberi masukan dan saran kepada penulis dalam penulisan skripsi ini.

Ibu Dra. Yoswita Rustam, M.Si selaku dosen mikrobiologi yang telah membantu dan memberikan saran kepada penulis. Ibu Sri Rahayu, M.Biomed selaku pembimbing akademik yang telah memberi arahan dan motivasi bagi penulis selama perkuliahan.

Ibu Titi dan Ibu Dwi serta seluruh pihak Balai Besar Uji Standar Karantina Pertanian yang telah memberikan izin penulis untuk

menggunakan mikroskop di Laboratorium Mikologi. Ibu Desi, Bapak Isnin dan Bapak Ato yang telah membantu selama di Laboratorium Mikrobiologi dan Genetika.

Kedua orang tua penulis yaitu Bapak Hadi Feisal dan Ibu Siti Gando Sary Zen serta kedua kakak penulis yaitu Feiga dan Milzam yang telah memberikan doa, dukungan, dan motivasi, sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini. Saudara sepupu penulis yaitu Chita, Zefty, Emira dan Zahra yang telah menyemangati dan menghibur penulis.

Keluarga besar Biologi Reguler 2012, terutama Puput, Stefani, Hazleini, Via, Tiya, dan Dinda, yang telah memberikan semangat dan dukungannya kepada penulis selama proses penelitian, sampai dengan terselesaikannya skripsi ini. Rekan seperjuangan penelitian tugas akhir di Laboratorium Mikrobiologi dan Genetika, yaitu Nurul Family, Agustina, Sherly, Lita, Tria dan Himatul yang telah menemani dan membantu penulis dalam melakukan penelitian hingga penyusunan skripsi. Ka Meilina, Ka Saida, Ka Deas dan Ka Hilma yang telah memberikan dukungan, bantuan, saran dan ilmunya kepada penulis. Cahya, Ega, Astrid, Marsha, Syera serta teman-teman dekat penulis yang tidak dapat disebutkan satu persatu yang telah memberikan motivasi, menyemangati, menghibur dan mendengarkan keluh kesah penulis.

Kritik dan saran yang bersifat membangun dari semua pihak sangat penulis harapkan demi kesempurnaan skripsi ini. Semoga tulisan ini dapat bermanfaat bagi semua pembaca dan dapat digunakan sebaik-baiknya.

Jakarta, Februari 2016

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN PENGESAHAN	ii
ABSTRAK	iii
ABSTRACT	iv
KATA PENGANTAR	v
DAFTAR ISI	vii
DAFTAR GAMBAR	x
DAFTAR TABEL	xi
DAFTAR LAMPIRAN	xii
BAB I. PENDAHULUAN	
A. Latar Belakang	1
B. Perumusan Masalah	4
C. Tujuan	5
D. Manfaat	5
BAB II. KAJIAN PUSTAKA, KERANGKA BERPIKIR, DAN PERUMUSAN HIPOTESIS	
A. Kajian Pustaka	6
1. Khamir dan Potensinya Sebagai Agen Antagonis	6
2. Tanaman Bintaro	9
3. Kerusakan Apel Pascapanen	11
4. Kapang Perusak pada Buah Apel	13
5. Identifikasi Kapang dan Khamir secara Molekuler	15
B. Kerangka Berpikir	18
C. Hipotesis Penelitian	19
BAB III. METODOLOGI PENELITIAN	
A. Tujuan Operasional	20
B. Tempat dan Waktu Penelitian	20
C. Metode Penelitian	21
D. Desain Penelitian	21

E. Prosedur Penelitian	22
1. Alat dan bahan	22
2. Cara kerja	23
A. Isolasi kapang perusak dari buah apel	23
B. Uji patogenitas kapang perusak buah apel (Postulat Koch).....	24
C. Uji antagonisme khamir asal daun bintaro terhadap kapang perusak buah apel dengan metode <i>dual</i> <i>culture</i>	26
D. Pembuatan kurva pertumbuhan khamir	27
E. Pengujian biokontrol khamir asal daun bintaro terhadap kapang perusak buah apel pascapanen ..	28
F. Identifikasi khamir potensial dan kapang perusak secara molekuler serta pengamatan morfologi koloni secara makroskopik dan mikroskopik	29
F. Analisis Data	34
BAB IV. HASIL DAN PEMBAHASAN	
A. Isolasi kapang perusak dari buah apel	35
B. Uji patogenitas kapang perusak buah apel (Postulat Koch)	36
C. Uji antagonisme khamir asal daun bintaro terhadap Kapang perusak buah apel dengan metode <i>dual culture</i> .	40
D. Pembuatan kurva pertumbuhan khamir	43
E. Uji biokontrol khamir asal daun bintaro terhadap kapang perusak buah apel dengan metode pelukaan	46
F. Identifikasi khamir potensial dan kapang perusak secara molekuler serta pengamatan morfologi koloni secara makroskopik dan mikroskopik	49
BAB V. KESIMPULAN, IMPLIKASI DAN SARAN	
A. Kesimpulan	60
B. Implikasi	60
C. Saran	61
DAFTAR PUSTAKA	62

LAMPIRAN	71
SURAT KETERANGAN PENELITIAN	
SURAT PERNYATAAN KEASLIAN SKRIPSI	
DAFTAR RIWAYAT HIDUP	

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Penampang daun bintaro.....	10
2. Apel malang manalagi	12
3. Alur penelitian	22
4. Uji antagonisme khamir dan kapang dengan metode <i>dual culture</i> .	26
5. Sampel buah apel bergejala kebusukan	35
6. Isolat murni kapang perusak buah apel	36
7. Kondisi buah apel setelah dilakukan pengujian patogenitas	37
8. Nilai persentase keterjadian penyakit buah apel (KP)	38
9. Nilai persentase keparahan penyakit buah apel (KeP)	38
10. Kriteria skoring pengamatan uji patogenitas	39
11. Hasil uji antagonisme membentuk zona hambat	41
12. Kurva pertumbuhan isolat khamir	44
13. Persentase KP dan KeP buah apel pada pengujian biokontrol khamir antagonis T1, T3, dan T4 terhadap kapang A1 dan A17 ...	47
14. Uji biokontrol khamir asal daun bintaro terhadap kapang perusak buah apel	48
15. Konstruksi pohon filogenetik isolat khamir antagonis asal daun bintaro	51
16. Morfologi makroskopik dan mikroskopik isolat khamir asal daun bintaro	53
17. Konstruksi pohon filogenetik isolat kapang perusak buah apel pascapanen.....	56
18. Morfologi makroskopik dan mikroskopik isolat kapang perusak buah apel pascapanen (A1)	57
19. Morfologi makroskopik dan mikroskopik isolat kapang perusak buah apel pascapanen (A17)	58
20. <i>Chromatogram</i> hasil sekuensing isolat khamir T1	79
21. <i>Chromatogram</i> hasil sekuensing isolat khamir T3	80

22. <i>Chromatogram</i> hasil sekuensing isolat khamir T4	81
23. <i>Chromatogram</i> hasil sekuensing isolat kapang A1	82
24. <i>Chromatogram</i> hasil sekuensing isolat kapang A17	83

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Komposisi mix PCR	31
2. Protokol PCR untuk amplifikasi DNA kapang dan khamir	32
3. Isolat kapang hasil isolasi buah apel pascapanen	36
4. Lebar zona hambat pada uji antagonisme	42
5. Hasil identifikasi isolat khamir antagonis berdasarkan analisis sekuen daerah ITS rDNA	50
6. Hasil identifikasi isolat kapang merusak buah apel pascapanen berdasarkan analisis sekuen daerah ITS rDNA	55
7. Kode isolat khamir asal daun bintaro (<i>Cerbera manghas</i>)	74
8. Rata-rata zona hambat pertumbuhan kapang dan khamir	75
9. Uji anava dua arah pengaruh pemberian isolat khamir terhadap penghambatan pertumbuhan kapang	76
10. Uji <i>Duncan</i> zona hambat pertumbuhan kapang dan khamir	77
11. Jumlah sel khamir	78
12. Hasil pengamatan makroskopik khamir asal daun bintaro	83
13. Hasil pengamatan makroskopik kapang asal buah apel busuk	84

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Pembuatan media	71
2. Sterilisasi peralatan dan media	73
3. Isolat khamir asal daun bintaro (<i>Cerbera manghas</i>) koleksi Laboratorium Mikrobiologi UNJ	74
4. Zona hambat pertumbuhan kapang dan khamir	75
5. Perhitungan statistik	76
6. Pengamatan kurva pertumbuhan khamir	78
7. <i>Chromatogram</i> Hasil Sekuensing Isolat Khamir dan Kapang	79
8. Pengamatan makroskopik khamir dan kapang	84

BAB I

PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

Apel merupakan salah satu jenis buah yang banyak diminati masyarakat Indonesia. Apel memiliki kandungan yang bermanfaat bagi tubuh manusia, seperti vitamin A, B, dan C, serta mineral (kalsium, fosfor, zat besi, klor, magnesium, natrium, potassium) (Wulandari, 2012). Menurut data dari Departemen Pertanian Nasional, produksi apel di Indonesia pada tahun 2012 sebesar 247,38 ton, pada tahun 2013 sebesar 255,33 ton dan mengalami penurunan pada tahun 2014 yaitu menjadi sebesar 242,91 ton.

Penurunan produksi buah apel pascapanen terjadi karena adanya kerusakan yang disebabkan oleh faktor fisik, kimiawi, dan biologis. Faktor fisik dapat berupa tekanan, suhu yang terlalu rendah (*chilling injury-freezing injury*) dan suhu yang terlalu tinggi. Faktor kimiawi berupa polusi udara (ozon dan sulfur dioksida) serta pestisida berlebihan. Faktor biologis disebabkan oleh mikroorganisme penyebab kerusakan pada buah (Utama & Rina, 2009). Salah satu mikroorganisme perusak buah apel adalah kapang (Semangun, 2007).

Kapang perusak yang menginfeksi buah apel saat pascapanen yaitu *Aspergillus* sp., *Penicillium expansum*, *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum acutatum*, *Monilia fructigena*, *Fusarium avenaceum*, *Mucor* sp., *Rhizopus stolonifer* (Maxin *et al*, 2014). Kapang menyebabkan timbulnya penyakit pada buah apel pascapanen. Kapang *B. cinerea*, menyebabkan busuk kapang kelabu (*gray mold rot*) pada buah apel pascapanen (Santoso, 2008).

Kapang *P. expansum*, menyebabkan busuk kapang biru (*blue mold rot*) pada buah apel pascapanen dan juga menghasilkan mikotoksin patulin (Winarti *et al*, 2009).

Kapang perusak pada buah apel dapat menghasilkan senyawa mikotoksin. Patulin merupakan salah satu mikotoksin yang diproduksi oleh genus kapang, antara lain: *Penicillium*, *Aspergillus*, dan *Byssochlamys* (Drusch & Ragab, 2003). Winarti *et al.*, (2009) melaporkan *Fusarium* sp., *Penicillium* sp., dan *Aspergillus* merupakan kapang penghasil patulin yang diisolasi dari buah apel varitas manalagi dan fuji. Hasil analisis kadar patulin pada buah apel var manalagi lebih rendah dibanding dengan apel Fuji. Kadar patulin pada apel Fuji melebihi batas maksimum yang ditetapkan WHO, yaitu 50 µg/l.

Umumnya fungisida digunakan untuk mengatasi serangan kapang perusak pada buah apel. Beberapa jenis fungisida yang umumnya digunakan, antara lain: *benzimidazole*, *captan*, *diphenylalamin*, *dithane* dan *dicarboximide* (Santoso, 2008). Namun, penggunaan fungisida menimbulkan terjadinya resistensi pada kapang perusak (Donowarti & Winahyu, 2008). Residu fungisida dapat menyebabkan penyakit pada manusia, antara lain: iritasi kulit, iritasi mata, gangguan saluran pernapasan, dan merangsang pertumbuhan sel kanker (Soemirat, 2003; Mahyuni, 2015).

Pencarian alternatif pengganti fungisida, mulai dikembangkan, salah satunya adalah penggunaan khamir sebagai agen hayati. Khamir memiliki kemampuan antagonisme yang berperan dalam menghambat pertumbuhan mikroorganisme lain. Agen antagonis kemudian dapat dikembangkan menjadi agen biokontrol. Kemampuan antagonisme khamir epifit ditunjukkan

melalui kemampuan khamir dalam menghambat pertumbuhan mikroorganisme lain di sekitarnya (Golubev, 2006).

Beberapa khamir epifit telah dilaporkan dapat menghambat pertumbuhan kapang perusak pada buah. Spadaro (2003) melaporkan *Metschnikowia pulcherrima* Pitt & M.W. Miller BIO126 dan *M. pulcherrima* GS37 yang diisolasi dari permukaan buah apel dapat menghambat pertumbuhan kapang patogen pada buah apel yaitu *Alternaria* sp. Widyastuti (2008) melaporkan *Rhodotorula glutinis* dapat menghambat pertumbuhan kapang patogen pada buah apel pascapanen *P. expansum* dengan melakukan pengujian secara in vivo dan in vitro. Li *et al.*, (2011) melaporkan *R. mucilaginosa* dapat menghambat pertumbuhan kapang *P. expansum* dan *B. cinerea* pada buah apel pascapanen. Hasil interaksi ditunjukkan melalui reduksi germinasi spora *B. cinerea* dan reduksi koloni yang lebih besar dibandingkan dengan kontrol.

Tanaman merupakan substrat yang dapat ditumbuhi oleh khamir (Deak, 2008). Jenis tanaman yang dapat ditumbuhi oleh khamir adalah tanaman bintaro (*Cerbera manghas* L.). Tanaman bintaro memiliki banyak manfaat, salah satunya adalah berkhasiat sebagai obat. Kandungan kimia daun, bunga dan buah pada tanaman bintaro diantaranya saponin, polifenol, tannin, steroid, dan flavonoid (Utami, 2010).

Identifikasi kapang dan khamir dapat dilakukan dengan teknik molekular. Metode identifikasi secara molekular dapat mengatasi kelemahan metode identifikasi secara konvensional (Ciardo *et al.*, 2006). Identitas kapang dan khamir dapat diketahui berdasarkan data sekuen daerah *Internal Transcribed Spacer* (ITS) dari ribosomal DNA (rDNA). Data sekuen

daerah ITS memiliki variabilitas yang tinggi antarspesies sehingga dapat digunakan untuk identifikasi khamir pada tingkat spesies (Hall, 2004). Sekuen daerah ITS untuk semua spesies khamir yang diketahui tersedia pada *database* DNA internasional pada situs <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>. Data sekuen daerah ITS yang diperoleh dapat dikirim melalui program pencarian homologi *Basic Local Alignment Search Tools* (BLAST) sehingga dapat diketahui identitas isolat berdasarkan tingkat homologinya terhadap spesies khamir terdekat yang ada di *database* DNA. Penelitian bertujuan untuk mengetahui potensi isolat khamir dari daun bintaro dalam menghambat pertumbuhan kapang perusak pada buah apel dan melakukan identifikasi kapang perusak dan khamir potensial berdasarkan sekuen daerah ITS rDNA.

B. Perumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang, adapun perumusan masalah sebagai berikut:

1. Apakah terdapat kapang perusak pada buah apel pascapanen?
2. Apakah khamir hasil isolasi dari daun bintaro memiliki kemampuan antagonisme terhadap kapang perusak pada buah apel pascapanen?
3. Apakah khamir hasil isolasi dari daun bintaro memiliki potensi sebagai agen biokontrol?
4. Apa sajakah jenis khamir asal daun bintaro yang berpotensi sebagai agen biokontrol dan jenis kapang perusak pada buah apel pascapanen berdasarkan identifikasi molekuler pada daerah sekuensing ITS rDNA?

C. Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk:

1. Mendapatkan isolat kapang perusak pada buah apel pascapanen.
2. Mendapatkan isolat khamir asal daun bintaro yang memiliki sifat antagonisme terhadap kapang perusak pada buah apel pascapanen.
3. Mendapatkan isolat khamir asal daun bintaro yang berpotensi sebagai agen biokontrol terhadap kapang perusak pada buah apel pascapanen.
4. Mengetahui jenis khamir asal daun bintaro yang berpotensi sebagai agen biokontrol dan jenis kapang perusak pada buah apel pascapanen.

D. Manfaat Penelitian

1. Menghasilkan dan memberikan informasi mengenai isolat kapang perusak asal buah apel pascapanen.
2. Menghasilkan dan memberikan informasi mengenai isolat khamir asal daun bintaro yang berpotensi sebagai agen biokontrol, yang selanjutnya bisa dikembangkan menjadi produk biokontrol terhadap kapang perusak buah apel.

BAB II

KAJIAN PUSTAKA, KERANGKA BERPIKIR, DAN PERUMUSAN HIPOTESIS

A. KAJIAN PUSTAKA

1. Khamir dan Potensinya Sebagai Agen Antagonis

Khamir merupakan fungi uniseluler yang memiliki ukuran sel panjang sekitar 2-3 μm hingga 20-50 μm dan lebar 1-10 μm , tidak berflagel, bereproduksi secara aseksual dengan budding, atau memproduksi beberapa jenis konidia yang disebut *stalked conidia*, *blastoconidia*, atau *anthroconidia* (Kavanagh, 2005). Khamir termasuk filum *Ascomycota* dan *Basidiomycota* (Webster & Weber, 2007). Khamir dapat melakukan reproduksi seksual menggunakan askospora pada khamir filum *Ascomycota* dan basidiospora pada filum *Basidiomycota* (Gandjar *et al.*, 2006).

Khamir adalah kelompok mikroorganisme uniseluler yang memiliki kelebihan yaitu bioekologinya lebih adaptif pada permukaan tanaman yang kering, tahan terhadap terpaan sinar matahari yang kuat, fluktuasi cuaca yang tajam dan miskin nutrisi (El-Tarabily & Sivasithamparam, 2006).

Khamir epifit adalah khamir yang tumbuh secara alami di permukaan bagian tumbuhan seperti batang, daun, bunga, dan buah (Fonseca & Inacio, 2006). Khamir pada permukaan tumbuhan dapat melakukan interaksi dengan mikroorganisme lain, salah satunya adalah interaksi antagonis (Janisiewicz & Korsten, 2002). Menurut

Batzing (2002), interaksi antagonis adalah interaksi yang menimbulkan efek merugikan pada pertumbuhan salah satu mikroorganisme, sedangkan mikroorganisme lain diuntungkan. Interaksi antagonisme dapat terjadi antar sesama fungi, antar sesama bakteri atau antar fungi dan bakteri (Ray, 2008). Kemampuan mikroorganisme dalam menghambat atau membunuh mikroorganisme lain disebut sebagai kemampuan antagonistik. Mikroorganisme yang memiliki kemampuan antagonistik disebut sebagai mikroorganisme antagonis (Handarini, 2009). Khamir epifit merupakan salah mikroorganisme antagonis (Batzing, 2002).

Khamir epifit yang bersifat antagonis dapat dimanfaatkan dalam menghambat pertumbuhan fungi seperti kapang patogen (Handarini, 2009). Khamir antagonis melakukan interaksi antagonisme dengan kapang melalui mekanisme yang berbeda-beda (Deak, 2008). Mekanisme antagonis yang dilakukan oleh khamir, antara lain: kompetisi ruang dan nutrisi, antibiosis, parasitisme dan predasi (Haggag & Mohamed, 2007).

Mekanisme kompetisi ruang dan nutrisi terjadi saat khamir ditumbuhkan bersama mikroorganisme lain dalam kondisi ruang dan nutrisi yang terbatas (Janisiewicz & Korsten, 2002). Khamir *Candida saitoana* pada buah apel dapat melindungi buah dari kapang perusak melalui deposisi papilla sepanjang dinding sel inang (Janisiewicz & Korsten, 2002). Druvefors (2004) melaporkan khamir yang memiliki kemampuan antagonis, yaitu *Pichia anomala*, *P. guilliermondii*, dan *Debaromyces hansenii* mampu menghambat pertumbuhan kapang

pengkotaminan dari genus *Penicillium* melalui mekanisme kompetisi nutrisi dan antibiosis.

Mekanisme antibiosis melibatkan penggunaan senyawa metabolit sekunder seperti enzim litik, senyawa volatile, siderophores atau senyawa toksik lainnya (Hagagg & Mohamed, 2007). Terbentuknya senyawa metabolit sekunder tersebut dapat menyebabkan fungistatik, lisis dinding sel, atau nekrotik, sehingga pertumbuhan kapang menjadi terhambat. Khamir *R. glutinis* telah dilaporkan memiliki kemampuan antagonisme terhadap kapang patogen *B. cinerea* melalui mekanisme antibiosis. Kedua khamir tersebut melekat pada hifa kapang kemudian mensekresikan enzim pendegradasi dinding sel, yaitu kitinase dan β -1,3 glukukanase. Aktivitas enzim kitinase dan β -1,3 glukukanase mengakibatkan dinding sel pada hifa kapang terdegradasi. Kerusakan tersebut menyebabkan germinasi spora dan pertumbuhan hifa menjadi terhambat (Ge *et al.*, 2010).

Mekanisme parasitisme terjadi melalui kontak langsung antara sel khamir dengan kapang. Sel khamir memanfaatkan kapang sebagai inang yang merupakan habitat dan sumber nutrisi untuk melakukan pertumbuhan (Sharma *et al.*, 2009). Droby *et al.*, (2001) melaporkan khamir *C. oleophila* dapat menghambat pertumbuhan *P. digitatum* melalui mekanisme parasitisme. Sel khamir menempel pada hifa kapang, kemudian mengeluarkan enzim β -glukanase dan kitinase untuk menguraikan komponen dinding hifa kapang. Hasil interaksi memperlihatkan hifa kapang berlubang dan reduksi lebar hifa kapang.

Mekanisme predasi terjadi melalui kontak langsung atau melalui struktur khusus dari khamir, misalnya appresoria, yang mampu menembus dinding sel hifa atau spora sehingga mengganggu viabilitas kapang (Morrica & Ragazzi, 2008).

2. Tanaman Bintaro

Bintaro merupakan bagian dari ekosistem hutan mangrove yang termasuk dalam familia *Apocynaceae* dan tumbuh secara luas di daerah pesisir selatan Asia Timur dan amudera Hindia (Utami, 2010). Tanaman Bintaro tersebar luas di kawasan tropis Indo pasifik termasuk Indonesia. Bintaro memiliki nama latin *Cerbera manghas* dan memiliki nama lain seperti *pong-pong tree*, *Indian suicide tree*, *othalanga*, *odollam tree*, *pink-eyed cerbera*, *sea mango* dan *dog bane* (Rohimatun, 2011). Klasifikasi tanaman bintaro sebagai berikut:

Divisi	: Spermatophyta
Sub Divisi	: Angiospermae
Kelas	: Dicotyledoneae
Sub Kelas	: Sympetalae
Bangsa	: Contortae / Apocynales
Suku	: Apocynaceae
Marga	: <i>Cerbera</i>
Jenis	: <i>Cerbera manghas</i> L. (Tjitrosoepomo, 2007)

Bintaro (*C. manghas*) merupakan tanaman berupa pohon. Secara morfologis, tanaman bintaro memiliki batang berkayu dan bercabang rendah. Daun tunggal dengan duduk daun tersebar, bangun daun bulat telur terbalik sampai lanset, tepi rata, apex daun meruncing, basal daun runcing, warna hijau mengkilat, permukaan licin, pertulangan daun menyirip (Kebler & Sidiyasa, 2005).



Gambar 1. Penampang daun bintaro

(Sumber: http://www.ntbg.org/plants/plant_details.php?plantid=2601)

Seluruh bagian tanaman bintaro beracun karena mengandung senyawa golongan alkaloid yang bersifat toksik, *repellent* dan aktivitas penghambat makan pada serangga (*anti feedant*) (Rohimatun, 2011). Buah Bintaro mengandung racun cerberrin yang bersifat mematikan. Cerberrin dapat menyebabkan denyut jantung berhenti, jika tertelan. Cerberrin merupakan golongan alkaloid atau glikosida yang diduga berperan terhadap mortalitas serangga (Yuda, 2013).

Bintaro dikenal sebagai salah satu tanaman tahunan yang banyak digunakan untuk penghijauan, penghias kota, bahan baku kerajinan bunga kering, pestisida nabati, serta tanaman obat (Utami, 2010). Kandungan senyawa dalam tanaman bintaro berpotensi sebagai antifungi, insektisida, antioksidatif, dan antitumor (Yan *et al.*, 2011). Daun, buah dan kulit batang bintaro mengandung saponin, kulit batangnya mengandung tanin, di samping itu daun dan buahnya juga mengandung polifenol (Tarmadi *et al.*, 2007). Akar bintaro mengandung saponin, tanin, steroid, flavonoid, dan gums (Rahman *et al.*, 2011).

Ekstrak metanol biji bintaro mengandung alkaloid, tanin, dan saponin (Ahmed *et al.*, 2008).

Penelitian Rahman *et al.*, (2011) menunjukkan bahwa ekstrak akar bintaro memiliki daya hambat terhadap beberapa bakteri Gram positif dan Gram negatif. Ekstrak metanol akar bintaro memiliki daya hambat 16,34 mm terhadap bakteri *Shigella sonnei*. Ahmed *et al.*, (2008) melaporkan bahwa biji bintaro memiliki aktivitas antibakteri terhadap beberapa bakteri seperti *Salmonella typhi*, *Streptococcus saprophyticus*, dan *S. pyogenes* dengan daya hambat masing-masing 15 mm, 11 mm, dan 16 mm. Tarmadi *et al.*, (2007) melaporkan bahwa *Cerbera odollam* dapat memberi efek signifikan terhadap mortalitas rayap tanah (*Coptotermes* sp.) dengan konsentrasi ekstrak sebesar 10%. Utami (2010) melaporkan ekstrak dari *Cerbera odollam* memberikan pengaruh yang signifikan terhadap mortalitas dan penghambatan perkembangan serangga hama *Eurema* spp. dengan pemberian konsentrasi sebesar 1%. Penelitian Sa'diyah (2013) menunjukkan ekstrak daun bintaro yang ditambahkan pada pakan (daun cabe rawit) dapat menghambat pertumbuhan dan perkembangan ulat grayak (*Spodoptera litura*) dengan pemberian konsentrasi 2%.

3. Kerusakan Apel Pascapanen

Apel merupakan salah satu buah yang banyak diminati oleh masyarakat di Indonesia karena memiliki rasa yang enak dan mengandung banyak vitamin. Jenis apel lokal yang dibudidayakan di Indonesia salah satunya adalah apel malang, yang menjadi ciri khas

Daerah Malang khususnya Kota Batu. Apel dapat tumbuh dengan baik di dataran tinggi dengan ketinggian 700 - 1200 meter di atas permukaan laut (Yulianti *et al.*, 2006). Klasifikasi buah apel sebagai berikut:

Divisi : Spermatophyta
Sub Divisi : Angiospermae
Kelas : Dicotyledoneae
Sub Kelas : Sympetalae
Bangsa : Rosale
Suku : Rosaceae
Marga : *Malus*
Jenis : *Malus sylvestris* (L.) Mill. (Tjitrosoepomo, 2007)



Gambar 2. Apel malang manalagi

(Sumber : <http://supplier-sayuranbuah.blogspot.com/p/home.html>)

Buah apel berbentuk bulat dengan ujung dan pangkal berlekuk dangkal, dengan diameter 4-7 cm dan berat 75-160 gram/ buah. Buah apel berwarna hijau muda kekuningan dengan aroma yang harum segar. Daging buahnya berwarna putih, sedikit air dan teksturnya agak liat. Bentuk bijinya bulat pendek dan berwarna coklat tua (Jannata *et al.*, 2014).

Apel merupakan salah satu komoditas hortikultura yang memiliki nilai gizi yang diperlukan untuk kesehatan. Menurut Ashari (2005) setiap 100 g buah apel mengandung kira-kira 85 g air, karbohidrat (terutama

fruktosa) 10-13.5 g, kalsium 10 mg, fosfor 10 mg, besi 0.2 mg, kalium 150 mg serta vitamin A, B1, B2, B6, dan vitamin C 10 mg. Protein dan lemak sangat rendah, sedangkan kalorinya 165-235 kJ/ 100 g. Serat pada buah apel mampu menurunkan kadar kolesterol darah dan resiko penyakit jantung koroner. Kulit buah apel mengandung flavonoid yang disebut quercitin. Quercitin ini mempunyai aktivitas antioksidan yang berfungsi mencegah serangan radikal bebas sehingga dapat melindungi tubuh dari kemungkinan serangan kanker (Morikawa, *et al.*, 2003).

Buah apel segar mengalami penurunan mutu sangat cepat. Berbeda dengan bagian tanaman yang masih melekat pada tanaman induknya yang mendapat suplai air dan nutrisi atau makanan secara berlanjut, bagian tanaman yang telah dipanen atau dilepas dari tanaman induknya tidak lagi mendapatkan suplai air dan makanan (Utama, 2010).

Penanganan pascapanen buah yang tidak memadai mengakibatkan kerusakan fisik, misalnya memar akibat benturan atau jatuh dalam transportasi. Buah memar atau yang mengalami kerusakan fisik lainnya akan mudah terinfeksi kapang (Miskiyah *et al.*, 2010).

4. Kapang Perusak pada Buah Apel

Buah apel dapat menjadi substrat bagi pertumbuhan mikroorganisme, berupa kapang. Keberadaan zat yang terkandung dalam buah apel, lamanya waktu penyimpanan buah apel, kondisi lingkungan dengan suhu dan kadar air yang tinggi serta aktifitas serangga merupakan faktor utama yang mempengaruhi kontaminasi kapang pada buah apel (Winarti *et al.*, 2009).

Kapang perusak buah apel dapat menyebabkan penyakit busuk buah, antara lain: busuk buah *Alternaria* (*Alternaria rot*) oleh *A. alternata*, busuk buah *Coprinus* (*Coprinus rot*) oleh *Coprinus psychromorbidus*, busuk buah *Mucor* (*Mucor rot*) oleh *M. piriformis* (Semangun, 2007), penyakit kudis apel (*apple scab*) oleh *Venturia* sp., busuk buah (*apple rot*) oleh *Colletotrichum* sp., dan busuk pahit (*bitter rot*) oleh *Monilia* sp. (Pradana *et al.*, 2013).

Beberapa spesies kapang dari *Penicillium* yaitu *P. expansum*, *P. solitum* dan *P. komune* menyebabkan penyakit busuk kapang biru. Gejala awal terlihat pada permukaan buah apel yang lembek, berair, dan berwarna cokelat muda. Kemudian timbul miselium jamur berwarna putih yang akhirnya membentuk spora berwarna biru kehijauan (Semangun, 2007).

Kapang *B. cinerea* menyebabkan penyakit busuk kapang kelabu. Busuk kapang kelabu terjadi akibat adanya luka seperti tusukan dan memar yang timbul pada saat panen dan selama proses penanganan pascapanen. Gejala awal terlihat pada daerah pembusukan yang berwarna cokelat muda hingga cokelat tua. Kemudian timbul miselium jamur berwarna putih keabu-abuan yang akhirnya membentuk spora berwarna cokelat (Semangun, 2010).

Kapang *Venturia inaequalis* menyebabkan penyakit kudis pada buah apel pascapanen. Gejala awal timbulnya bintik-bintik tidak teratur berwarna hitam kecokelatan dan pecah-pecah (Agrios, 2005). Kapang *Gleosporium perennans*, *Clasdosporium herbarum*, *C. gloeosporides* menyebabkan busuk antraknose. Serangan pada buah apel ditandai

dengan bercak cokelat atau hitam. Awalnya bercak berukuran kecil dan dapat bersatu dengan bercak lainya sehingga dapat berukuran lebih besar (Nugraheni *et al.*, 2014).

Kapang perusak pada buah apel menghasilkan senyawa mikotoksin yang dapat merusak kesehatan. Aminah dan Suprptini, (2003) melaporkan kapang perusak pada buah apel di pasar tradisional dan swalayan diantaranya ialah *Fusarium sp.*, *Aspergillus sp.*, *Colletotrichum*, *Penicillium sp.*, *Rhizopus sp.*, *B. cinerea*, dan *Mucor sp.*.

5. Identifikasi Kapang dan Khamir secara Molekular

Identifikasi adalah proses membandingkan organisme yang belum diketahui identitasnya dengan organisme yang telah diketahui identitasnya (Barnett *et al.*, 2000). Teknik molekular dapat digunakan untuk mengidentifikasi suatu spesies kapang maupun khamir. Identifikasi kapang dan khamir secara molekular dilakukan dengan menggunakan metode PCR dan analisis sekuen DNA (Kurtzman & Fell, 2006). Metode identifikasi molekular menggunakan analisis sekuen DNA terbukti akurat, relatif mudah untuk dilakukan sekuensing dan lebih cepat dibandingkan metode konvensional (Ciardo, *et al.*, 2006).

Kelompok gen yang umumnya digunakan untuk mengidentifikasi khamir dengan cepat dan akurat adalah gen-gen yang terdapat pada ribosomal DNA (rDNA) (Kurtzman *et al.*, 2003). Gen penyandi rDNA dimiliki oleh semua organisme dan terdapat *multiple copy* (100-200 kopi dalam genom) (Kurtzman & Fell, 2006). Keuntungan penggunaan gen pengkode rDNA antara lain adalah terdapat pada semua makhluk hidup, berasal dari nenek moyang yang sama dan mudah disekuen karena

menggunakan primer yang bersifat *universal* (dapat digunakan pada semua makhluk hidup) (Kurtzman & Fell, 2006).

Gen pengkode rDNA terdiri atas daerah *coding* dan *non-coding*. Daerah *coding* rDNA terdiri atas *small sub-unit* (SSU rDNA 18S), gen 5.8S, gen 5S dan *large sub-unit* (LSU rDNA 28S). Daerah *non-coding* terdiri atas *internal transcribed spacer* (ITS1 dan ITS2) dan *intergenic spacer* (IGS) (James & Stratford, 2003). Daerah ITS rDNA yang merupakan daerah *non-coding* memiliki laju mutasi yang lebih tinggi dibandingkan dengan daerah *coding* (SSU, 5.8S dan LSU) (James & Stratford, 2003), sehingga memiliki variasi urutan nukleotida yang tinggi antarspesies (Ciardo *et al.*, 2006).

Menurut James dan Stratford (2003), daerah ITS rDNA dapat digunakan untuk identifikasi spesies khamir yang berkerabat sangat dekat (*closely related species*). Tavanti *et al.*, (2005) melaporkan dua spesies baru yaitu *Candida orthopsilosis* dan *C. metapsilosis* yang dibedakan dari *C. parapsilosis* berdasarkan analisis sekuen daerah ITS.

Analisis sekuen daerah ITS terdiri atas beberapa tahapan. Tahapan-tahapan tersebut adalah isolasi DNA genom, *polymerase chain reaction* (PCR), elektroforesis, purifikasi produk PCR, *cycle sequencing*, purifikasi produk sekuensing dan sekuensing (Sjamsuridzal, 2008). Menurut Starr dan Taggart (2004), sekuensing merupakan pembacaan urutan basa nukleotida DNA dengan menggunakan metode Sanger *dideoxy-chain termination* (Sambrook & Russel, 2001). DNA cetakan diamplifikasi menggunakan DNA oligonukleotida (sebagai primer), DNA polymerase, deoksinukleotida (dNTP) dan dideoksinukleotida (ddNTP). Setiap

dideoksinukleotida diberi pewarna berfluoresensi yang bertindak sebagai label. Setiap fragmen DNA yang disintesis melekat pada ujung 3' dan hanya mengandung satu dideoksinukleotida. Fragmen-fragmen tersebut kemudian dipisahkan berdasarkan ukurannya melalui kapiler dan detector laser akan membaca label yang berfluoresen dari setiap fragmen (Moat *et al.*, 2002).

Data sekuen yang diperoleh dapat berupa elektroferogram (grafik yang menunjukkan basa-basa pada hasil sekuensing) dan *text file* (urutan basa-basa hasil sekuensing) (Oliphant, 2006). Urutan basa DNA pada hasil sekuensing dapat dilakukan editing secara manual dengan program *ChromasPro*.

Data sekuen berupa *text file* dapat digunakan untuk mencari identitas suatu isolat dengan cara mencari homologi sekuen spesies terdekatnya pada data sekuen dalam *database* (Hall, 2004). Selain itu, data sekuen juga dapat digunakan untuk melihat hubungan kekerabatan berdasarkan rekonstruksi pohon filogeni (Li & Graur, 1991). Salah satu program yang dapat digunakan untuk membuat pohon filogeni yaitu program *Mega5*. Data sekuen untuk proses pencarian homologi sekuen melalui *database* terlebih dahulu diubah ke dalam format FASTA, yaitu format *text file* yang dapat dikenali oleh program *BLAST* (Hall, 2004). Salah satu situs *database* sekuen DNA yang dapat diakses untuk pencarian homologi sekuen dengan program *BLAST* adalah <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> (Hall, 2004).

B. Kerangka Berpikir

Apel merupakan salah satu buah yang banyak diminati masyarakat Indonesia karena rasanya yang manis dan banyak mengandung vitamin A, B, dan C, mineral serta serat. Apel memiliki nilai ekonomis yang tinggi di Indonesia. Namun pada proses pascapanen sampai dengan pasar (market), terdapat beberapa kendala yaitu menurunnya kualitas buah akibat serangan kapang perusak buah. Kapang perusak buah apel, antara lain: *Fusarium*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Colletotrichum*, *Gloeosporium perennans*, dan *Cladosporium herbarum*.

Upaya untuk mengurangi pertumbuhan kapang perusak pada buah apel umumnya dilakukan dengan cara penggunaan fungisida. Namun pemakaian fungisida yang berlebihan dapat menyebabkan adanya residu fungisida pada buah apel yang telah dipanen. Residu dapat membahayakan bagi kesehatan manusia yang mengkonsumsinya. Penggunaan fungisida juga berdampak terjadinya resistensi pada kapang perusak.

Permasalahan dalam mengendalikan kapang-kapang perusak dalam buah apel merupakan permasalahan yang membutuhkan penanggulangan yang serius karena nilai ekonomi yang tinggi dan berhubungan erat dengan keselamatan/ kesehatan konsumen/ masyarakat. Alternatif untuk mengurangi penggunaan fungisida dapat dilakukan dengan menggunakan khamir sebagai agen hayati. Khamir dapat dijadikan salah satu alternatif karena memiliki kemampuan menghambat pertumbuhan mikroorganisme lain. Khamir yang dapat menghambat pertumbuhan mikroorganisme lain disebut khamir antagonis. Penelitian penggunaan khamir asal daun bintaro sebagai agen antagonis kapang perusak pada buah apel belum pernah

dilakukan. Uji antagonisme khamir pada kapang perusak buah apel merupakan upaya alternatif dalam mengurangi penggunaan fungisida.

C. Hipotesis Penelitian

Berdasarkan tinjauan pustaka dan kerangka berpikir, maka dapat dirumuskan hipotesis penelitian sebagai berikut:

1. Terdapat lebih dari satu jenis kapang perusak pada buah apel.
2. Khamir-khamir asal daun bintaro memiliki kemampuan antagonisme terhadap kapang perusak dari buah apel.

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

A. Tujuan Operasional

Tujuan operasional penelitian ini adalah:

1. Melakukan isolasi kapang perusak pada buah apel dengan teknik tanam langsung.
2. Melakukan pengujian patogenitas kapang perusak pada buah apel melalui metode Postulat Koch.
3. Melakukan pengujian antagonisme khamir potensial terhadap kapang perusak pada buah apel pascapanen melalui metode *dual culture*
4. Melakukan pengujian biokontrol dengan metode pelukaan.
5. Mengidentifikasi kapang perusak dan khamir potensial antagonis terhadap kapang perusak pada buah apel pascapanen secara molekular berdasarkan analisis sekuen daerah ITS rDNA.
6. Mengkarakterisasi kapang perusak pada buah apel pascapanen dan khamir potensial antagonis terhadap kapang perusak buah apel pascapanen melalui pengamatan morfologi koloni secara makroskopik dan mikroskopik.

B. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan pada bulan Oktober 2015 - Oktober 2016. Isolasi, uji antagonis dan uji patogenitas dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi, Jurusan Biologi, Universitas Negeri Jakarta (UNJ), Jakarta Timur. Identifikasi molekular kapang perusak buah apel dan khamir antagonis dilakukan di

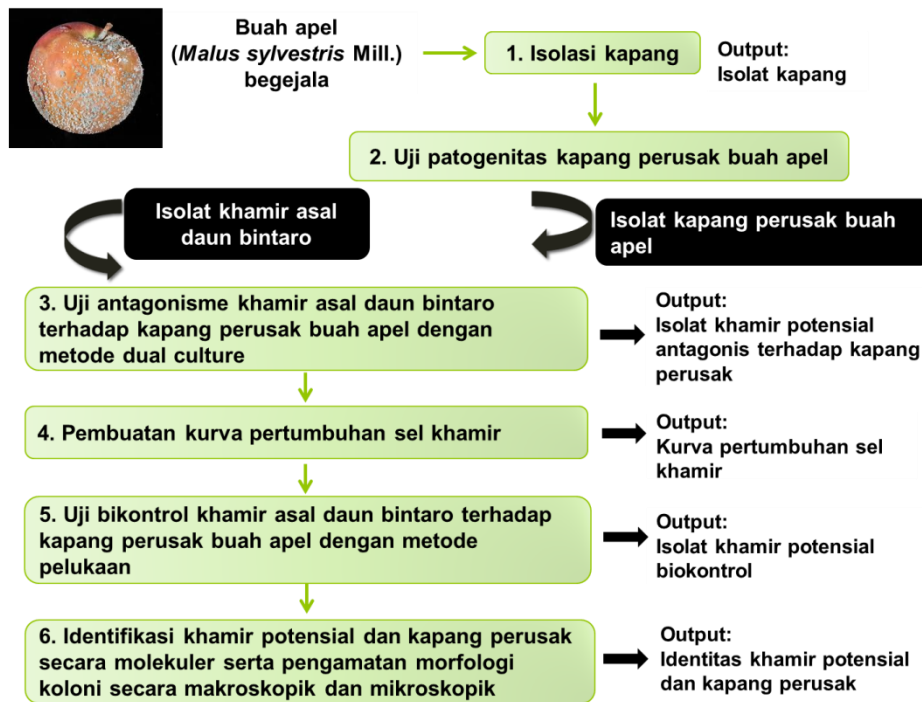
Laboratorium Molekuler, Bidang Mikrobiologi, Puslit Biologi, LIPI, Cibinong, Jawa Barat

C. Metode Penelitian

Metode yang digunakan adalah eksperimen. Rancangan penelitian yang digunakan adalah RAL (Rancangan Acak Lengkap). Isolat khamir yang digunakan adalah isolat khamir yang telah diisolasi dari daun bintaro, sebanyak 19 isolat yang merupakan koleksi Laboratorium Mikrobiologi, UNJ. Kapang yang digunakan adalah kapang hasil isolasi pada buah apel pascapanen yang mengalami gejala penyakit akibat kapang.

D. Desain Penelitian

Percobaan yang dilakukan meliputi: (1) Isolasi kapang perusak buah apel pascapanen; (2) Uji patogenitas kapang perusak buah apel (Postulat Koch); (3) Uji antagonisme khamir asal daun bintaro terhadap kapang perusak buah apel dengan metode *dual culture*; (4) Pembuatan kurva pertumbuhan khamir; (5) Uji biokontrol khamir asal daun bintaro terhadap kapang perusak buah apel dengan metode pelukaan; (6) Identifikasi khamir potensial dan kapang perusak secara molekuler serta pengamatan morfologi koloni secara makroskopik dan mikroskopik (Gambar 3).



Gambar 3. Alur Penelitian

E. Prosedur Penelitian

1. Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan pada penelitian terdiri dari autoklaf, Thermo Scientific™ Arktik™ Thermal Cycler, Mupid®-exU, Gel Doc™ XR system (Bio-Rad), Hemocytometer Neubauer, inkubator, laminar air flow, kompor gas, cawan petri, gelas ukur, tabung reaksi, labu erlenmeyer, gelas beaker, pengaduk kaca, kaca objek, kaca penutup, timbangan digital, rak tabung reaksi, jarum tanam bulat (ose), jarum dental (yang dimodifikasi pada bagian gagang), pinset, jarum tanam tajam, pembakar spiritus, *magnetic stirrer*, *centrifuge*, dan lemari pendingin.

Bahan yang digunakan dalam penelitian meliputi sampel buah apel malang, medium PDA (*Potato Dextrose Agar*), MEA (*Malt Extract Agar*), NYDA (*Nutrient Yeast Dextrose Agar*), NYDB, minyak imersi, akuades steril,

alkohol 70%, plastik tahan panas, kertas *yellow pages*, karet gelang, *aluminium foil*, *plastik warp*, kertas label, spidol marker, tisu, dan tali kasur.

2. Cara Kerja

A. Isolasi Kapang Perusak Buah Apel Pascapanen

Sampel buah apel diperoleh dari Pasar Perumnas, Klender, Jakarta Timur. Pengambilan sampel dilakukan secara acak dengan metode *purposive sampling* berdasarkan Sugiyono (2010). Buah apel yang diambil sebagai sampel adalah buah yang mengalami gejala busuk akibat kapang. Gejala ditandai dengan permukaan buah yang lembek, berair, adanya bintik-bintik kering berwarna coklat hingga bercak coklat yang berlekuk dan adanya miselium kapang (Semangun, 2007). Masing-masing sampel dimasukkan ke dalam map coklat dan diberi label nama.

Isolasi kapang perusak pada buah apel dilakukan berdasarkan modifikasi metode Bajpai *et al.*, (2010) dengan teknik tanam langsung yang sebelumnya dilakukan proses sterilisasi permukaan. Sampel buah apel dicuci menggunakan akuades steril, kemudian direndam dalam larutan sodium hipoklorit 0,5% (NaOCl) selama satu menit, selanjutnya, direndam dalam alkohol 70% selama 1 menit dan dibilas menggunakan akuades steril dengan tiga kali pembilasan. Buah dipotong setengah bagian yang rusak dan setengah bagian yang sehat dengan ukuran ± 1 cm. Potongan buah diletakkan pada cawan petri yang telah dilapisi kertas saring steril. Kemudian potongan buah ditumbuhkan pada media PDA ditambah *chloramphenicol*. Setiap cawan petri ditumbuhi 2 potongan buah dan diinkubasi selama 72 jam pada suhu 27-28° C.

Pemurnian isolat kapang dilakukan dengan metode *hyphal tips* berdasarkan Tuite (1969). Pengulangan pemurnian dilakukan dua sampai tiga kali hingga diperoleh koloni tunggal yang terbebas dari kontaminasi.

B. Uji Patogenitas Kapang Perusak Buah Apel (Postulat Koch)

Uji patogenitas (Postulate Koch) dilakukan menggunakan metode pelukaan berdasarkan Kwon *et al.*, (2011) dengan modifikasi. Kapang hasil isolasi dari buah apel busuk selanjutnya diujikan kembali pada buah apel sehat untuk mengetahui apakah isolat perusak yang didapat menyebabkan busuk pada buah apel (Michael, 2008; Masudi *et al.*, 2012).

Buah apel yang akan digunakan dalam pengujian, terlebih dahulu dilakukan sterilisasi permukaan. Buah apel dicuci menggunakan akuades steril, kemudian direndam dalam larutan sodium hipoklorit 0.5% (NaOCl) selama satu menit, selanjutnya direndam dalam alkohol 70% selama satu menit dan dibilas dengan akuades steril.

Buah apel dibuat tiga luka seragam dengan diameter 5 mm dan kedalaman 3 mm pada sisi permukaan buah (Fan & Tian, 2001; Spadaro *et al.*, 2011; Fard *et al.*, 2012). Kemudian pada bagian luka tersebut diinokulasikan suspensi kapang perusak. Buah apel yang telah dilukai diletakkan pada bak plastik dan ditutup rapat. Jumlah sampel buah apel yang digunakan pada pengujian ini sebanyak 68 buah (4 buah per bak plastic). Keempat sudut bak diletakkan kapas basah untuk menjaga kelembaban. selanjutnya diinkubasi selama 7 hari pada suhu 27-28° C.

Pengamatan dilakukan setiap hari hingga hari ke- 7 inkubasi setelah inokulasi, dengan menentukan skoring pada skala 0, 2, 4, 6, dan 8 (Wan *et al.*, 2008), dengan kriteria:

0 = tidak ada kerusakan

2 = $\leq 1/4$ dari bagian buah yang rusak

4 = $1/4 - 1/2$ dari bagian buah yang rusak

6 = $1/2 - 3/4$ dari bagian buah yang rusak

8 = seluruh bagian buah rusak

Identifikasi ketahanan tanaman dilakukan dengan menghitung persentase Keterjadian Penyakit (*Disease Incidence*) dan Keparahan penyakit (*Disease Severity*) berdasarkan Agrios (2005) dengan rumus:

Keterjadian Penyakit (Disease Incidence)

$$KP = \frac{n}{N} \times 100\%$$

Keterangan:

KP : keterjadian penyakit

n : jumlah tanaman atau bagian tanaman yang sakit

N : jumlah tanaman atau bagian tanaman yang sehat

Keparahan Penyakit (Disease Severity)

$$KeP = \frac{n \times v}{Z \times N} \times 100\%$$

Keterangan:

KeP : Keparahan Penyakit

n : jumlah jaringan terserang pada setiap kategori (skor)

V : kategori (skor) serangan

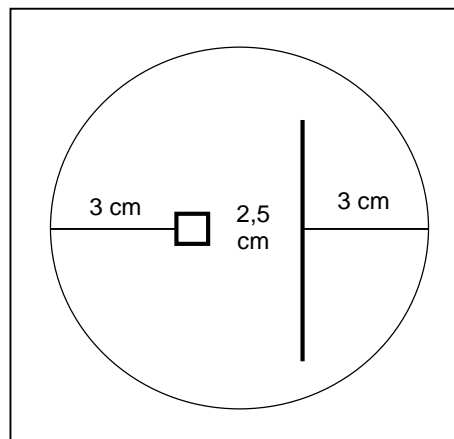
Z : nilai kategori serangan tertinggi

N : jumlah seluruh tanaman atau bagian tanaman yang diamati

C. Pengujian Antagonisme Khamir Asal Daun Bintaro terhadap Kapang Perusak Buah Apel Pascapanen

Metode pengujian antagonisme yang digunakan adalah metode dua biakan (*dual culture*) berdasarkan Sibounnavong (2009) dengan modifikasi. Isolat khamir antagonis ditumbuhkan bersama dengan isolat kapang perusak dalam cawan petri berisi media MEA. Isolat kapang perusak pada buah apel diinokulasikan ke dalam medium MEA lempeng dan diinkubasi selama 5 hari pada suhu 27-28° C. Biakan khamir diinokulasikan sebanyak 15 goresan ke dalam medium MEA miring, lalu diinkubasi selama 48 jam pada suhu 27-28° C.

Isolat khamir antagonis dan kapang perusak ditumbuhkan dengan jarak 3 cm dari masing-masing tepi cawan petri. Isolat khamir antagonis ditumbuhkan pada garis lurus sepanjang 6 cm dan diberi jarak 2,5 cm sejajar dari garis lurus untuk menumbuhkan isolat kapang perusak.



Keterangan: □ isolat kapang
I isolat khamir (dengan panjang 6 cm)

Gambar 4. Uji antagonisme khamir dan kapang dengan metode *dual culture*.

Biakan khamir antagonis dikerik dengan jarum ose bulat dan dibuat suspensi dalam 5 ml akuades steril, kemudian dihomogenkan menggunakan vorteks. Sebanyak 20 µl suspensi sel khamir, masing-masing diteteskan di sepanjang garis menggunakan mikropipet. Biakan kapang diambil dengan menggunakan jarum dental (yang dimodifikasi pada bagian gagang), kemudian ditumbuhkan sejajar dengan khamir, dengan jarak 2,5 cm pada medium MEA. Medium diinkubasi pada suhu 27-28° C selama 6 hari.

Kontrol yang digunakan dalam uji ini adalah medium MEA yang diinokulasi hifa/spora kapang tanpa diinokulasi suspensi khamir dan medium MEA yang diinokulasi suspensi sel khamir tanpa inokulasi hifa/spora kapang. Pengujian dilakukan dengan 3 kali pengulangan baik pada perlakuan maupun kontrol. Pengamatan dilakukan pada hari ke- 6 dengan mengukur lebar zona hambat antara khamir dengan kapang perusak menggunakan jangka sorong digital.

D. Pembuatan Kurva Pertumbuhan Sel Khamir

Pembuatan kurva pertumbuhan sel khamir berdasarkan Tang & Le (2013) dengan modifikasi. Hasil pengukuran jumlah dan lamanya fase log khamir sebagai acuan usia khamir yang akan digunakan untuk uji biokontrol.

Isolat khamir antagonis ditumbuhkan pada medium NYDA *slant* dengan metode *streak* sebanyak 15 gores, diinkubasi selama 48 jam pada suhu 27-28° C. Sebanyak satu ose kultur diinokulasikan ke dalam 5 ml medium NYDB, diinkubasi pada suhu 27-28° C selama 48 jam. Kultur khamir tersebut kemudian dihitung kepadatannya setiap 3 jam sekali selama 48 jam dengan menggunakan *haemocytometer*. Sel khamir yang terdapat

pada lima kotak besar (pojok kanan atas, pojok kiri atas, pojok kanan bawah, pojok kiri bawah dan tengah) setiap kotak besar mengandung 16 kotak kecil dihitung satu per satu. Jumlah sel dihitung berdasarkan rumus Hansen (2000) sebagai berikut:

$$\text{Jumlah sel/ mL} = \text{jumlah sel pada lima kotak} \times 5 \times 10.000$$

Keterangan:

Konstanta 5 dan 10.000 merupakan pengali, 10.000 merupakan pengali untuk mengkonversi sel/mm³ ke sel/mL dalam suspensi

E. Pengujian Biokontrol Khamir Asal Daun Bintaro terhadap Kapang Perusak Buah Apel Pascapanen

Varietas buah yang digunakan untuk pengujian biokontrol adalah apel malang. Sampel buah apel dipilih dengan tingkat kematangan yang sama berdasarkan tekstur, warna dan kisaran bobot per buah. Tekstur buah tidak mengerut dan tidak busuk. Buah apel berwarna hijau muda, hijau kekuningan hingga hijau dan kisaran bobot perbuah yaitu 110-130 gr.

Metode pengujian yang digunakan berdasarkan Zhang *et al* (2015) dengan modifikasi. Pengujian ini dilakukan dengan menggunakan metode pelukaan. Isolat kapang perusak dan khamir dibuat suspensi. Setiap pengujian dilakukan dengan 7 perlakuan, yaitu: 1) buah apel segar tanpa dicuci maupun sterilisasi permukaan; 2) buah apel dicuci dengan air kran; 3) buah apel dilakukan sterilisasi permukaan; 4) buah apel direndam dengan suspensi khamir; 5) buah apel diinokulasi kapang; 6) buah apel direndam dengan suspensi khamir kemudian diinokulasi kapang; 7) buah apel direndam dengan dithane M-45 0,3% kemudian diinokulasi kapang.

Buah apel direndam dengan suspensi khamir dan dithane M-45 0,3% selanjutnya diinkubasi selama 24 jam. Bagian luka diinokulasi kapang perusak. Buah apel yang telah diberi perlakuan diletakkan pada bak plastik dan ditutup rapat. Jumlah sampel buah apel yang digunakan untuk pengujian ini sebanyak 88 buah (4 buah per bak plastic). Keempat sudut bak diletakkan kapas basah untuk menjaga kelembaban, selanjutnya diinkubasi selama 7 hari pada suhu 27-28° C.

Pengamatan dilakukan setiap hari hingga hari ke- 7 inkubasi. Pengamatan pada buah apel dilakukan dengan menentukan skoring pada skala 0, 2, 4, 6, dan 8 (Wan *et al.*, 2008). Identifikasi ketahanan tanaman dilakukan dengan menghitung persentase Keterjadian Penyakit (*Disease Incidence*) dan Keparahan penyakit (*Disease Severity*) berdasarkan Agrios (2005).

F. Identifikasi khamir potensial dan kapang perusak secara molekuler serta pengamatan morfologi koloni secara makroskopik dan mikroskopik

a. Identifikasi khamir dan kapang secara molekular

Identifikasi molekular dilakukan pada kapang penyebab kebusukan pada buah apel dan pada khamir potensial antagonis terhadap kapang perusak buah apel pascapanen. Khamir ditumbuhkan pada medium PDA selama 48 jam pada suhu 27-28° C. Kapang ditumbuhkan pada medium PDB selama 3-5 hari pada suhu 27-28° C. Identifikasi dilakukan dengan cara sebagai berikut:

1. Ekstraksi DNA kapang

Isolasi DNA genom kapang mengikuti metode yang digunakan oleh Sukmawati *et al.*, (2015). Miselium yang tumbuh pada permukaan miselium diambil untuk ekstraksi DNA menggunakan tusuk sate steril kemudian dimasukkan ke dalam *microtube* 1,5 ml yang telah berisi 500 μ l akuabides. *Microtube* berisi miselium kapang disentrifugasi dengan kecepatan 14.500 rpm menggunakan *centrifuge* selama 10 menit. Supernatan dibuang menggunakan mikropipet, kemudian pelet berisi miselium digerus menggunakan *pestle*. Ekstraksi DNA kapang menggunakan tiga reagen yang berbeda dari Phytopure Kit, langkah-langkah yang dilakukan sebagai berikut:

1. Reagen 1 (Pytopure, 300 μ l) ditambahkan pada miselium kapang, kemudian ditambahkan RNAase (3 μ l) yang telah diaktivasi dengan pemanasan pada suhu 37° C di dalam *waterbath* selama 10 - 30 menit.
2. Reagen 2 (Phytopure, 200 μ l) ditambahkan, kemudian kloroform dan fenol (masing-masing 250 μ l), dan isopropanol (dengan volume setengah dari volume larutan DNA total).
3. Koloid miselium ditambahkan reagen 1 kemudian dihomogenisasi menggunakan tip dengan ujung yang telah dipotong.
4. RNAase (3 μ l) ditambahkan dan diinkubasi pada suhu 37° C selama 30 menit di *waterbath shaker*.
5. Suspensi DNA ditambahkan reagen 3 (*Sodium Dodecyl Sulphate*, SDS, 200 μ l), kemudian dihomogenisasi selama 10 menit.
6. Koloid DNA disimpan dalam es selama 20 menit.

7. Koloid DNA ditambahkan kloroform dan fenol (masing-masing 250 μ l), dan dihomogenisasi selama 3 menit.
8. Koloid DNA disentrifugasi pada 10.000 rpm selama 10 menit hingga terbentuk tiga lapisan. Lapisan yang terbentuk paling atas diambil secara hati-hati kemudian dipindahkan ke tabung *microtube*.
9. DNA ekstrak ditambahkan isopropanol sebanyak setengah dari volume DNA ekstrak, kemudian disentrifugasi pada 10.000 rpm selama 10 menit.
10. Supernatan dibuang, kemudian pelet ditambahkan etanol 99% (100 μ l) dan disentrifugasi kembali pada 10.000 rpm selama 10 menit.
11. Supernatan dibuang dan pelet pada *microtube* dikeringanginkan di atas kertas tisu selama 30 menit.
12. Pelet ditambahkan *nuclease free water* (50 μ l). DNA ekstrak (berupa pelet) disimpan dalam *freezer* sebelum digunakan untuk tahap selanjutnya.

Tabel 1. Komposisi Mix PCR untuk kapang dan khamir

Bahan	Kapang	Khamir
<i>Nuclease Free Water</i>	7,5 μ L	7,5 μ L
Go TaqGreen Mastermix	12.5 μ L	-
MgCl ₂	-	1,5 μ L
dNTP	-	0,5 μ L
Buffer 3G	-	12,5 μ L
DMSO	0,5 μ L	0,5 μ L
Primer F (ITS 5)	0,5 μ L	0,5 μ L
Primer R (ITS 4)	0,5 μ L	0,5 μ L
<i>Taq polymerase</i>	-	0,5 μ L
<i>TemplateDNA</i>	1,0 μ L	1,0 μ L
Total	25 μL	25 μL

Tabel 2. Protokol PCR untuk ampifikasi DNA kapang dan khamir

	1 temp	3 temp, 33 siklus		2 temp, 1 siklus		
Temperatur	95° C	95° C	55° C	72° C	72° C	4° C
Waktu	3'	30"	30"	1'	10'	∞

2. Amplifikasi daerah ITS rDNA dengan metode PCR

Khamir tidak dilakukan ekstraksi DNA genom, tetapi langsung dilakukan amplifikasi fragmen DNA dengan PCR menggunakan mastermix KAPA 3G. Amplifikasi daerah ITS rDNA menggunakan primer *forward* ITS5 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3') dan primer *reverse* ITS4 (5'TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (White *et al.*, 1990). Komposisi mix PCR yang digunakan dijelaskan pada tabel 1 dan protokol PCR dijelaskan pada tabel 2.

3. Visualisasi produk PCR

Visualisasi produk PCR khamir dan kapang menggunakan elektroforesis dengan gel agarosa 2% dan buffer TAE 1x (Tris Acetate EDTA) berdasarkan Sambrook dan Russell (2001). Produk PCR dan DNA marker 100 bp yang digunakan masing-masing sebanyak 3 µl dan ditambahkan loading dye (1 µl). Alat elektroforesis (Optima®: Mupid®-2 plus) digunakan pada tegangan 100 volt selama 25 menit. Perendaman gel agarosa dalam etidium bromide 1% selama 30 menit. Visualisasi fragmen DNA menggunakan sinar ultraviolet dengan Gel Doc™ XR system (BioRad). Daerah ITS rDNA khamir ataupun kapang positif terbaca pada 500bp.

4. Produk PCR

Produk amplifikasi dari hasil PCR khamir dan kapang digunakan untuk proses sekuensing. Produk PCR, siklus sekuensing dan sekuensing dikirim

ke jasa pelayanan servis sekuensing (1 st BASE, Malaysia) melalui PT. Genetika Science, Indonesia.

5. Analisis data sekuen

Data hasil sekuensing diedit secara manual dengan menggunakan program *ChromasPro* versi 2.6.2. Selain itu, dilakukan pencarian homologi spesies terdekat dengan program *BLAST* pada situs <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>. Data sekuen dibuat pohon filogeni dengan menggunakan program Mega5 (Tamura *et al.*, 2011). Konstruksi pohon filogenetik berdasarkan jarak kekerabatan genetik dengan metode *Neighbor Joining* (NJ). Konstruksi jarak evolusi dalam derajat kepercayaan menggunakan *bootstrapping* (Sukmawati *et al.*, 2015).

b. Pengamatan morfologi koloni secara makroskopik dan mikroskopik

Pengamatan morfologi kapang dilakukan berdsarkan Gandjar *et al.*, (2006). Isolat kapang ditumbuhkan pada medium PDA dan diinkubasi selama 5 hari pada suhu 27-28° C. Pengamatan karakter morfologi secara makroskopis maupun secara mikroskopis. Pengamatan morfologi koloni kapang secara makroskopis dilakukan dengan mengamati permukaan koloni (granular, seperti tepung, menggunung, licin), zonasi, daerah tumbuh, garis-garis radial dan konsentris, warna balik koloni (*reverse color*), dan tetes eksudat (*exudate drops*). Pengamatan secara mikroskopis menggunakan metode *henric's slide culture* berdasarkan Benson (2001). Pengamatan secara mikroskopis meliputi ada tidaknya spora seksual dan spora aseksual, struktur penghasil spora seksual dan spora aseksual, bentuk dan jenis

spora, jenis hifa, ukuran hifa, septa pada hifa, ada tidaknya metula dan vesikel (Gandjar *et al.*, 2006).

Pengamatan morfologi khamir dilakukan berdasarkan Barnett *et al* (2000). Isolat khamir ditumbuhkan pada medium PDA dan diinkubaasi selama 48 jam pada suhu 27-28° C. Pengamatan morfologi koloni khamir secara makroskopis dilakukan dengan mengamati warna koloni, permukaan koloni, tekstur koloni, profil koloni, dan tepi koloni. Pengamatan secara mikroskopis meliputi bentuk sel, ukuran sel, ada atau tidak pertunasan (*budding*), tipe pertunasan, ukuran sel, ada atau tidak ada hifa yang dihasilkan.

F. Teknik Analisis Data

Data pengukuran zona hambat hasil uji antagonisme dianalisis menggunakan uji F melalui ANAVA dua arah. Jika menunjukkan hasil yang signifikan dilanjutkan dengan uji DUNCAN 5% untuk mengetahui adanya perbedaan pertumbuhan miselium kapang oleh isolat khamir.

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Isolasi kapang perusak dari buah apel

Sampel buah apel yang diisolasi berasal dari Pasar Perumnas, Klender, Jakarta Timur. Kapang perusak diisolasi dari buah apel yang memperlihatkan gejala busuk dengan ciri tekstur buah lunak, kulit buah berkerut atau terdapat spora maupun miselium pada buah (Gambar 5). Menurut Santoso (2008), ciri-ciri buah apel yang mengalami kebusukan yaitu kulit buah berkerut dan lunak, kulit buah berwarna kuning kecokelatan dan ditumbuhi miselium maupun spora pada permukaan buah. Isolat kapang yang berhasil diisolasi dari 10 sampel buah apel sebanyak 18 isolat (Tabel 3 dan Gambar 6).



Gambar 5. Sampel buah apel bergejala kebusukan

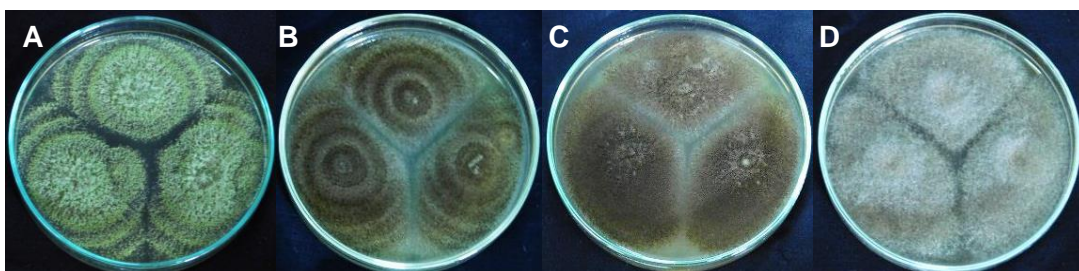
Isolat kapang hasil isolasi dipilih dengan kriteria kapang yang bersporulasi dan tumbuh cepat di medium. Pemilihan kapang tersebut digunakan untuk mendapatkan isolat kapang perusak pada buah apel. Kapang yang bersporulasi diduga lebih dapat merusak buah pascapanen dibandingkan dengan kapang yang bermiselium. Hal ini disebabkan karena

spora kapang dapat terbawa oleh angin kemudian menempel di permukaan buah dan menyebar.

Tabel 3. Isolat kapang hasil isolasi buah apel pascapanen

No.	Ciri isolat	Jumlah isolat	Kode isolat
1.	Sporulasi hijau granul	3	A16, A17, A18
2.	Sporulasi hitam granul	13	A1, A2, A3, A5, A6, A8, A9, A10, A11, A12, A13, A14, A15
3.	Sporulasi abu-abu	1	A7
4.	Miselium abu-abu	1	A4

Menurut Nurhayati (2011), kapang patogen yang mampu menghasilkan inokulum dalam jumlah banyak lebih berpeluang untuk menimbulkan kerusakan buah, demikian juga patogen yang mempunyai virulensi yang tinggi akan mampu menginfeksi buah dengan cepat. Kapang patogen yang mempunyai virulensi yang tinggi juga mempunyai kemampuan sporulasi yang tinggi. Penyebaran kapang patogen dapat melalui angin, serangga, air dan manusia. Spora dapat diterbangkan oleh angin dan dapat mencapai jarak yang jauh.



Gambar 6. Isolat murni kapang perusak buah apel pada medium PDA berumur 5 hari, suhu 27-28° C; A. Koloni bersporulasi hijau granul; B. Koloni bersporulasi koloni hitam granul; C. Koloni bersporulasi abu-abu; dan D. Koloni bermiselium abu-abu.

B. Uji patogenitas kapang perusak buah apel (Postulat Koch)

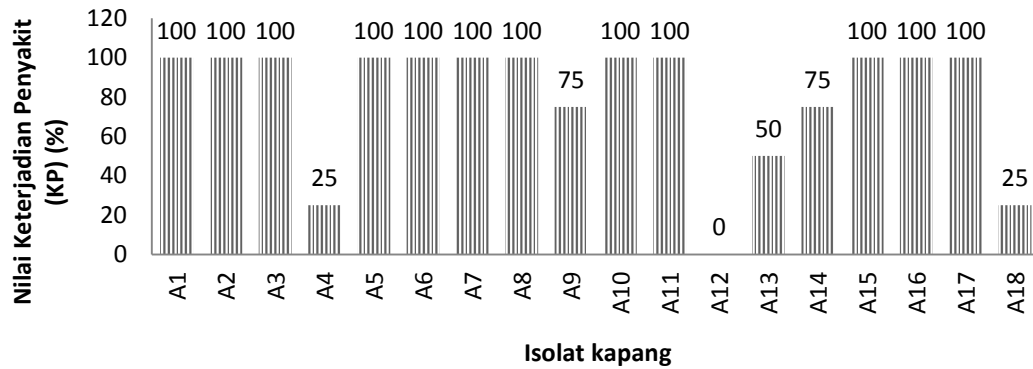
Pengujian patogenitas dilakukan berdasarkan metode Postulat Koch dengan inokulasi kapang menggunakan metode pelukaan. Isolat kapang yang digunakan pada pengujian patogenitas adalah kapang terpilih hasil isolasi yaitu sebanyak 17 isolat (A1, A2, A3, A5, A6, A7, A8, A9, A10, A11, A12, A13, A14, A15, A16, A17, A18).



Gambar 7. Kondisi buah apel setelah dilakukan pengujian patogenitas; A. Buah apel ditumbuhi kapang A1; B. Buah apel ditumbuhi kapang A17; C. Kontrol buah apel inkubasi 7 hari pada suhu 27-28° C.

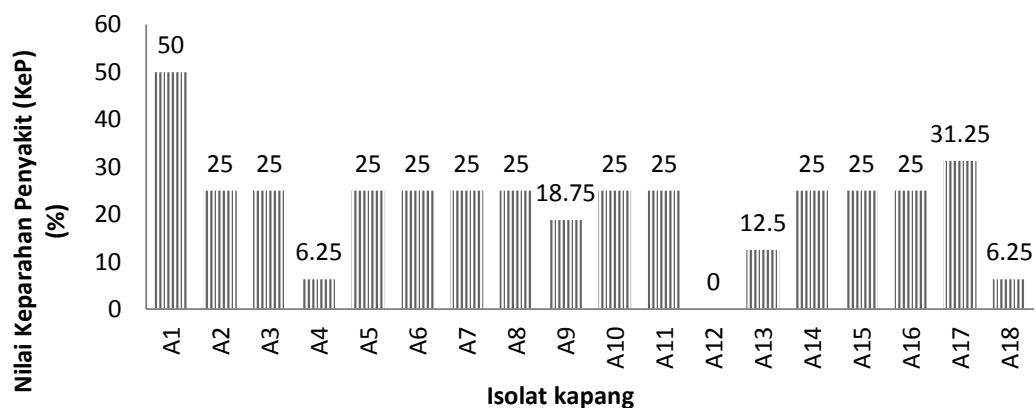
Hasil pengujian ini menunjukkan kerusakan buah tertinggi terjadi pada buah yang diinokulasi dengan isolat kapang A1 (sporulasi hitam granul) dan A17 (sporulasi hijau granul) (Gambar 7). Ciri-ciri terjadinya kerusakan tertinggi pada buah apel ditunjukkan dengan tingginya nilai persentase Keterjadian Penyakit (KP) dan Keparahan Penyakit (KeP) dengan masa inkubasi 7 hari (Gambar 9 dan Gambar 10). Persentase nilai KP (100%) dan KeP (50%) isolat kapang A1 lebih unggul dibandingkan dengan isolat kapang lain yang sama-sama memiliki sporulasi berwarna hitam. Gejala kerusakan buah apel akibat kapang sporulasi hitam adalah munculnya spora berwarna hitam yang menyebar di sekitar bekas luka dan

terdapat lingkaran coklat kekuningan disekitar spora. Permukaan buah sedikit berkerut, tekstur kulit lunak dan berbau.



Gambar 8. Nilai persentase Keterjadian Penyakit (KP) buah apel

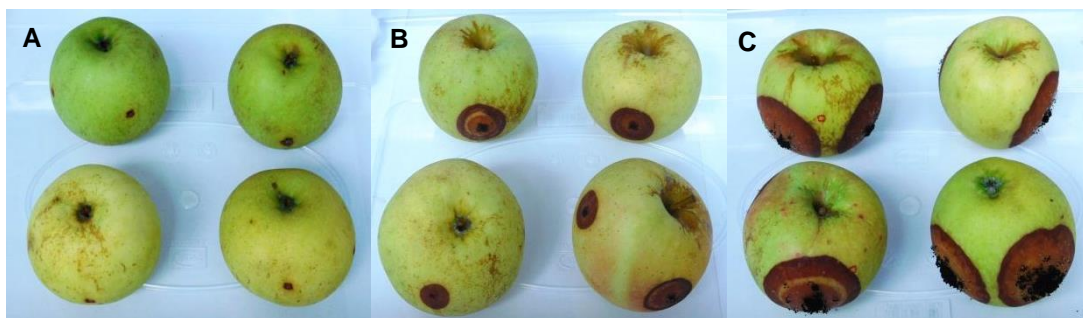
Persentase nilai KP (100%) dan KeP (31,25%) isolat kapang A17 lebih tinggi dibandingkan isolat kapang dengan sporulasi hijau lainnya. Gejala kerusakan yang terjadi pada buah apel akibat kapang sporulasi hijau adalah munculnya spora berwarna hijau yang tumbuh di sekitar bekas luka yang dikelilingi lingkaran coklat muda. Permukaan buah sedikit berkerut dan berbau.



Gambar 9. Nilai persentase Keparahan Penyakit (KeP) buah apel

Kapang bersporulasi hitam menyebabkan kerusakan buah apel lebih tinggi dibandingkan dengan kapang bersporulasi hijau. Hal ini diduga disebabkan karena efektivitas *germ tube* dan apresorium masing-masing kapang yang menembus dinding sel, menginfeksi dan merusak buah apel.

Beberapa peneliti telah melakukan pengujian patogenitas kapang yang diisolasi dari buah busuk. Rumahlewang *et al.*, (2012) melaporkan kapang *Colletotrichum musae* dari buah pisang pascapanen dapat menyebabkan gejala patogenitas. Intensitas kerusakan sebesar 32,53% dengan rata-rata masa inkubasi 3,5 hari. Hafsah & Zuyasna (2013) melaporkan isolat kapang dari buah kakao dapat menyebabkan gejala patogenitas dengan rata-rata masa inkubasi 2,11 sampai 3,06 hari dan diameter gejala pada 3 hari setelah inokulasi 2,39 sampai 3,64 cm. Persentase kemunculan gejala tergolong tinggi dengan kisaran 75 sampai 99%.



Gambar 10. Kriteria skoring pengamatan uji patogenitas; A. skoring 0; B. skoring 2; C. skoring 4; inkubasi 7 hari pada suhu 27-28° C .

Pengujian patogenitas membuktikan bahwa kedua isolat kapang (A1, A17) asal buah apel busuk merupakan kapang penyebab kebusukan pada buah dengan patogenitas tinggi dan memenuhi kriteria sesuai Postulat Koch. Menurut Kavanagh (2005), Postulat Koch dapat digunakan sebagai

kriteria patogenitas suatu isolat kapang. Berdasarkan prinsip tersebut, suatu isolat dapat menyebabkan penyakit apabila memenuhi syarat yaitu, 1) Isolat dapat diisolasi dari inang yang sakit; 2) Isolat tersebut dapat dibiakkan di laboratorium; 3) Isolat hasil isolasi akan menimbulkan gejala yang sama pada saat diinokulasi ulang ke inang yang sehat; 4) Isolat tersebut dapat diisolasi kembali dari inang yang sehat dengan ciri morfologi yang sama.

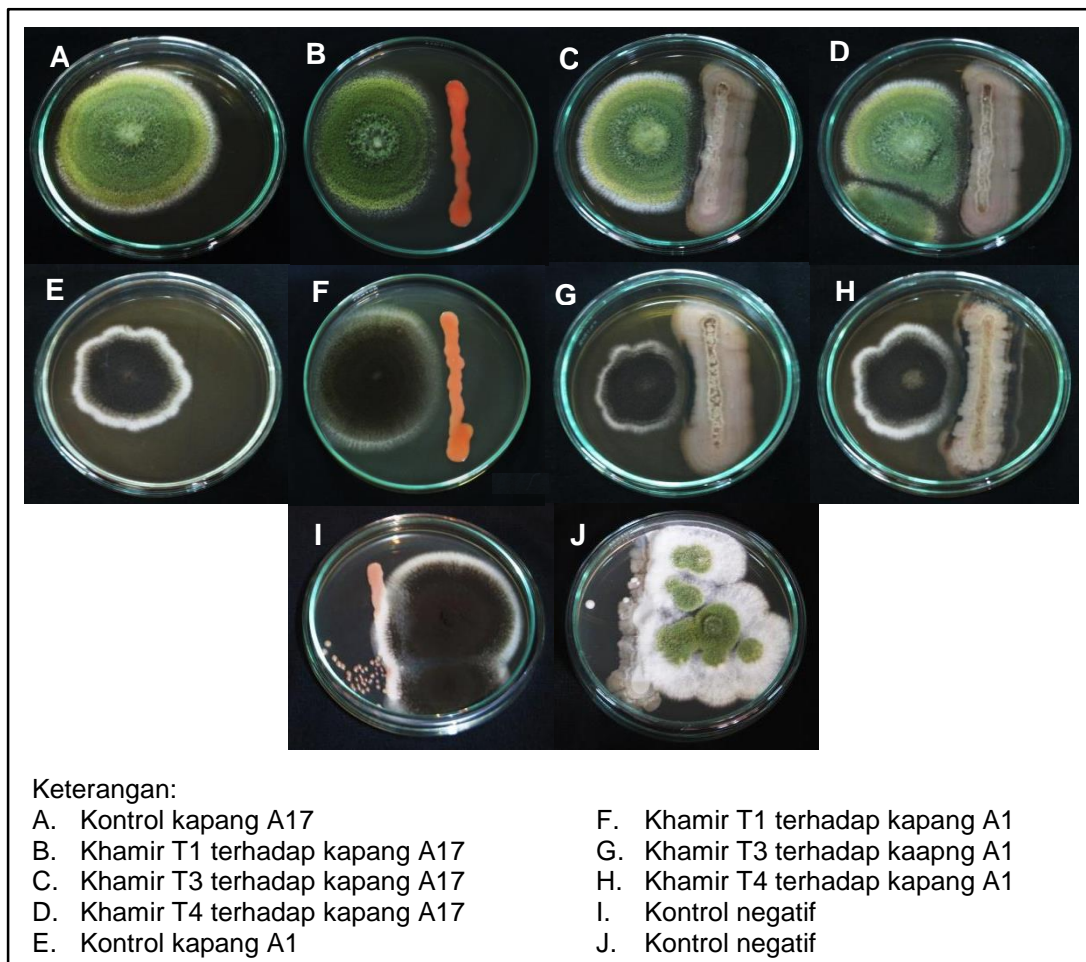
Berdasarkan nilai KP dan KeP pada pengujian ini, isolat kapang A1 dan A17 merupakan potensial sebagai kapang perusak. Maka untuk pengujian antagonisme khamir terhadap kapang digunakan kedua isolat kapang tersebut.

C. Uji antagonisme khamir asal daun bintaro terhadap kapang perusak buah apel dengan metode *dual culture*

Pengujian antagonisme dengan menggunakan metode *dual culture* berdasarkan Sibounnavong (2009) dengan modifikasi. Pengujian dilakukan pada 19 isolat khamir asal daun bintaro (Lampiran 4) terhadap dua kapang perusak buah apel (A1 dan A17). Hasil pengujian antagonisme menunjukkan isolat-isolat khamir asal daun bintaro pada medium MEA dapat menghambat pertumbuhan kapang perusak buah apel. Hal ini ditunjukkan dengan adanya zona bening antara koloni kapang dengan khamir. Zona bening tersebut merupakan zona hambat pertumbuhan miselium koloni kapang.

Hasil pengujian antagonisme menunjukkan tiga isolat khamir (T1, T3, T4) positif antagonis terhadap dua kapang perusak (Gambar 11), sedangkan isolat lainnya tidak memiliki zona hambat. Isolat khamir T1 memiliki zona

hambat terhadap isolat kapang A1 (1,06 mm) dan A17 (0,67 cm). Isolat khamir T3 memiliki zona hambat terhadap isolat kapang A1 (1,16 mm) dan A17 (1,52 mm). Isolat khamir T4 memiliki zona hambat terhadap isolat kapang A1 (1,00 mm) dan A17 (0,70 mm).



Gambar 11. Hasil uji antagonisme membentuk zona hambat di medium MEA, inkubasi 6 hari pada suhu 27-28° C.

Hasil analisis anava dua arah (Lampiran 2) menunjukkan bahwa terdapat perbedaan pengaruh pemberian isolat khamir terhadap lebar zona hambat kapang uji yaitu nilai Sig. $0,00 < \alpha$ (0,05%). Berdasarkan uji *Duncan* pada level 5% dapat diketahui bahwa isolat khamir T1 dan T4 memiliki perbedaan yang nyata dengan isolat khamir T3. Isolat khamir T3 merupakan

khamir paling potensial dalam menghambat pertumbuhan isolat kapang A1 dan A17. Lebar zona hambat oleh isolat khamir T3 yaitu sebesar 1,33 mm (Tabel 4).

Tabel 4. Lebar zona hambat yang terbentuk pada uji antagonis khamir asal daun bintaro terhadap dua kapang perusak buah apel pada medium PDA, inkubasi 6 hari dengan suhu 27-28° C

Khamir	Lebar zona hambat (mm)
	(Mean ^D ± SE)
	Kapang
T1	0,87 ^a ± 0,20
T3	1,33 ^b ± 0,18
T4	0,86 ^a ± 0,13

Keterangan: Angka yang diikuti oleh huruf yang sama tidak berbeda nyata pada $\alpha = 0,05$ uji Duncan. Hasil yang memiliki nilai zona hambat 0 (negatif) tidak ditampilkan

Semakin besar nilai zona hambat yang terbentuk, maka dapat diasumsikan semakin besar pula kemampuan khamir dalam menghambat pertumbuhan kapang. Penghambatan pertumbuhan miselium pada koloni kapang diduga karena adanya kompetisi untuk mendapatkan nutrisi dan ruang.

Kompetisi antara khamir dengan kapang dapat diperlihatkan melalui peningkatan pertumbuhan khamir dalam medium. Pertumbuhan khamir lebih mendominasi dan melebar. Hal tersebut disebabkan sel khamir memiliki kemampuan menyerap nutrisi pada medium lebih banyak dibandingkan sel kapang. Kapang akan kekurangan nutrisi untuk melakukan pertumbuhan saat ditumbuhkan bersama sel khamir di medium yang sama, sehingga miselium yang terbentuk menjadi lebih sedikit atau mengalami reduksi pada pertumbuhan kapang. Janisiewicz & Korsen (2002) menyatakan bahwa mekanisme kompetisi ruang dan nutrisi terjadi apabila khamir berusaha

memperoleh ruang dan nutrisi yang terbatas ketika ditumbuhkan bersama patogen. Aktivitas pertumbuhan koloni kapang terganggu karena kekurangan nutrisi dan ruang untuk tumbuh (Sharma *et al.*, 2009).

Beberapa peneliti telah melakukan pengujian antagonis khamir terhadap kapang perusak buah apel. Gholamnejad *et al.*, (2009) melakukan pengujian antagonisme *Penicillium expansum* penyebab penyakit kapang biru (*blue mold*) pada buah apel terhadap *Pichia guilliermondii* dan *R. mucilaginosa* dengan menggunakan metode *dual culture*. Rata-rata persentase zona hambat yang dibentuk oleh *P. guilliermondii* sebesar 57.62% dan *R. mucilaginosa* sebesar 34.51%. Chan dan Tian (2005) melakukan pengujian antagonisme antara khamir *P. membranifaciens* dan kapang *Moniliella fructicola*. Mekanisme antagonisme yang terjadi antara khamir dan kapang tersebut karena kompetisi ruang dan nutrisi. Hal ini diperlihatkan dengan peningkatan jumlah sel khamir dan penempelan sel khamir pada kapang. Hasil interaksi berupa penipisan dinding hifa kapang dan reduksi lebar hifa kapang *M. fructicola*.

Hasil penelitian menunjukkan isolat khamir T1, T3, dan T4 merupakan khamir potensial dalam menghambat pertumbuhan kapang perusak buah apel A1 dan A17. Isolat khamir potensial yang diperoleh kemudian digunakan untuk uji biokontrol pada buah apel pascapanen.

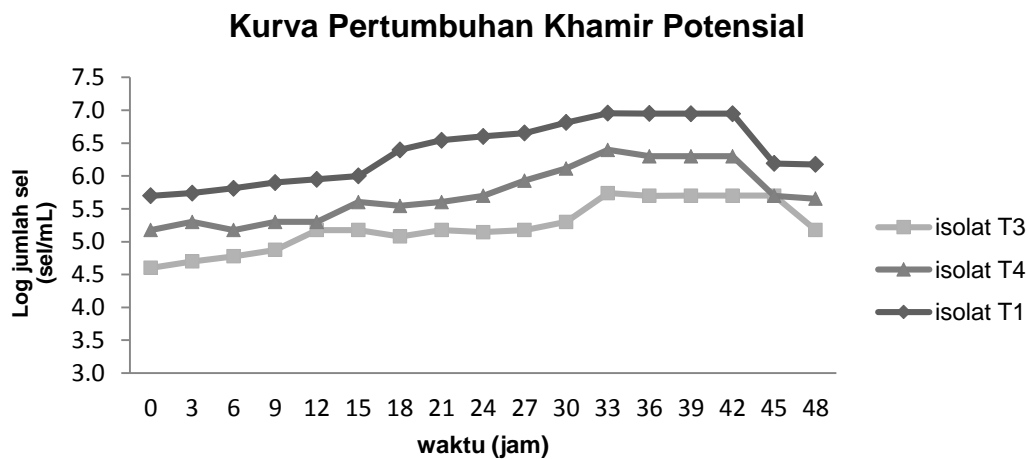
D. Pembuatan kurva pertumbuhan khamir

Perhitungan sel khamir dilakukan dengan menggunakan *haemocytometer*. Perhitungan dilakukan setiap 3 jam selama 48 jam, media yang digunakan untuk menumbuhkan sel khamir adalah media NYDB. Hasil

pengamatan dihitung menggunakan rumus Hansen (2000). Kurva pertumbuhan dibuat untuk mengetahui fase eksponensial akhir dan jumlah sel dari isolat khamir untuk digunakan pada pengujian biokontrol.

Hasil pembuatan kurva menunjukkan bahwa ketiga isolat khamir (T1, T3, T4) memiliki empat fase pertumbuhan, yaitu yaitu fase lag, fase eksponensial, fase stasioner, dan fase kematian. Fase eksponensial ketiga isolat khamir terjadi pada jam ke- 33 (Gambar 12).

Berdasarkan kurva pertumbuhan tersebut diketahui bahwa pola pertumbuhan isolat khamir T1, T3, dan T4 berbeda yaitu pada jam ke- 0 sampai jam ke- 15. Isolat khamir T1 mengalami fase lag (1×10^6 sel/ml) pada jam tersebut. Isolat khamir T3 mengalami fase lag hanya sampai jam ke- 9 ($7,5 \times 10^4$ sel/ml) dan isolat khamir T4 mengalami fase lag hanya sampai jam ke -12 (2×10^5 sel/ml).



Gambar 12. Kurva pertumbuhan isolat khamir T1, T3, dan T4 pada medium NYDB dengan interval waktu 3 jam selama 48 jam pada suhu 27-28° C.

Fase lag merupakan fase penyesuaian sel-sel dengan lingkungan (Gandjar *et al.*, 2006). Faktor yang mempengaruhi waktu fase lag adalah jenis dan umur sel, ukuran inokulum dan kondisi lingkungan media tumbuh. Apabila sel tumbuh di dalam medium yang kekurangan nutrisi, maka waktu fase lag lebih lama. Karena sel harus menghasilkan enzim yang sesuai dengan jenis nutrisi yang ada (Mahreni & Suhenry, 2011).

Fase eksponensial pada isolat khamir T1 terjadi pada jam ke- 15 hingga jam ke- 33. Fase eksponensial pada isolat khamir T3 terjadi pada jam ke- 9 hingga jam ke- 33. Sedangkan pada isolat khamir T4, fase eksponensial terjadi pada jam ke- 12 hingga jam ke- 33. Menurut Asaduzzaman (2007), Fase eksponensial merupakan fase dimana sel-sel tumbuh paling cepat. Waktu peningkatan jumlah sel pada fase ini disebut waktu generasi. Fase eksponensial akhir pada sel khamir terjadi lebih dari jam ke- 24 dan kurang dari jam ke- 48. Faktor yang mempengaruhi fase eksponensial adalah organisme itu sendiri, media pertumbuhan, dan suhu untuk menentukan waktu generasi. Fase eksponensial akhir pada ketiga isolat khamir terjadi pada jam ke- 33, dengan jumlah sel 9×10^6 sel/ml (isolat T1), $5,5 \times 10^5$ sel/ml (isolat T3), dan $2,5 \times 10^6$ sel/ml (isolat T4). Fase eksponensial akhir ini digunakan sebagai lamanya waktu inkubasi khamir pada uji biokontrol. Menurut Collins & Lyne (2004), jumlah inokulum mempengaruhi efektivitas antifungi dalam menghambat mikroorganisme uji saat dilakukan pengujian kemampuan antifungi.

Fase stasioner isolat khamir T1 dan T4 terjadi pada jam ke- 33 sampai jam ke- 42, sedangkan isolat khamir T3 terjadi pada jam ke- 33 sampai jam ke- 45. Jumlah populasi sel pada fase ini tidak terjadi

perbanyak sel atau stabil. Hal ini dapat terlihat dari jumlah sel yang stabil dalam jangka waktu tersebut. Menurut Asaduzzaman (2007), fase stasioner merupakan fase pertumbuhan yang konstan karena nutrisi semakin berkurang dan populasi semakin padat.

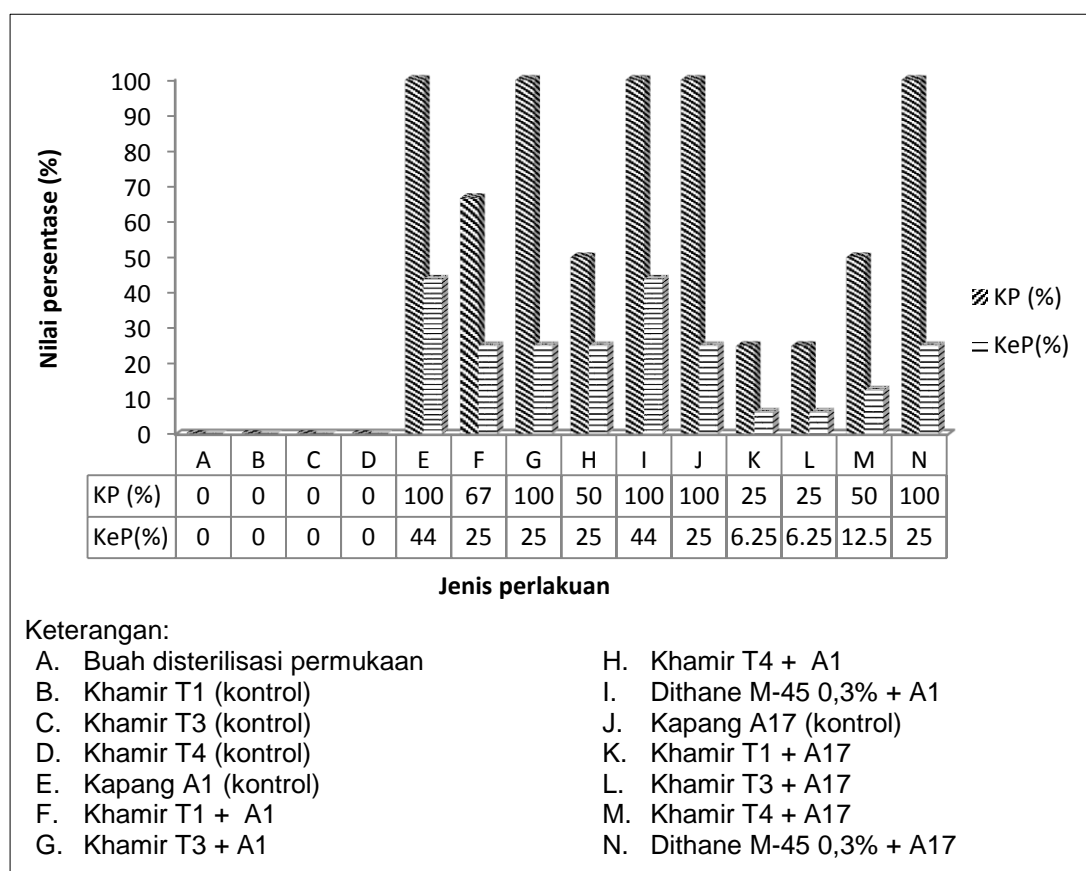
Fase kematian isolat khamir T1 dan T4 terjadi pada jam ke- 48 dengan nilai log 6,19 ($1,55 \times 10^6$ sel/ml) dan 5,7 (5×10^5 sel/ml). Isolat T3 mengalami fase kematian pada jam ke- 42 dengan nilai log 5,7 (5×10^5 sel/ml).

E. Uji biokontrol khamir asal daun bintaro terhadap kapang perusak buah apel dengan metode pelukaan

Isolat khamir T1, T3 dan T4 memiliki potensi sebagai agen biokontrol isolat kapang A1 dan A17. Isolat khamir tersebut menunjukkan kemampuan yang berbeda antara satu dengan yang lainnya. Pengujian biokontrol khamir antagonis terhadap kapang perusak buah apel memperlihatkan hasil persentase buah apel busuk yang bervariasi dengan inkubasi 6 hari. Isolat khamir T4 (KP 50%; KeP 25%) memiliki kemampuan sebagai agen biokontrol yang lebih unggul terhadap pertumbuhan isolat kapang A1 dibandingkan dengan isolat khamir T1 (KP 67%; KeP 25%) dan T3 (KP 100%; KeP 25%). Kemampuan isolat khamir T1, T3, dan T4 dalam mereduksi pertumbuhan isolat kapang A1 lebih baik dibandingkan dengan fungisida sintetik Dithane M-45 0,3% (KP 100%; KeP 44%) (Gambar 13 dan Gambar 14).

Isolat khamir T1, T3, dan T4 dapat mereduksi pertumbuhan isolat kapang A17 sehingga mengurangi kebusukan buah apel. Isolat khamir T1

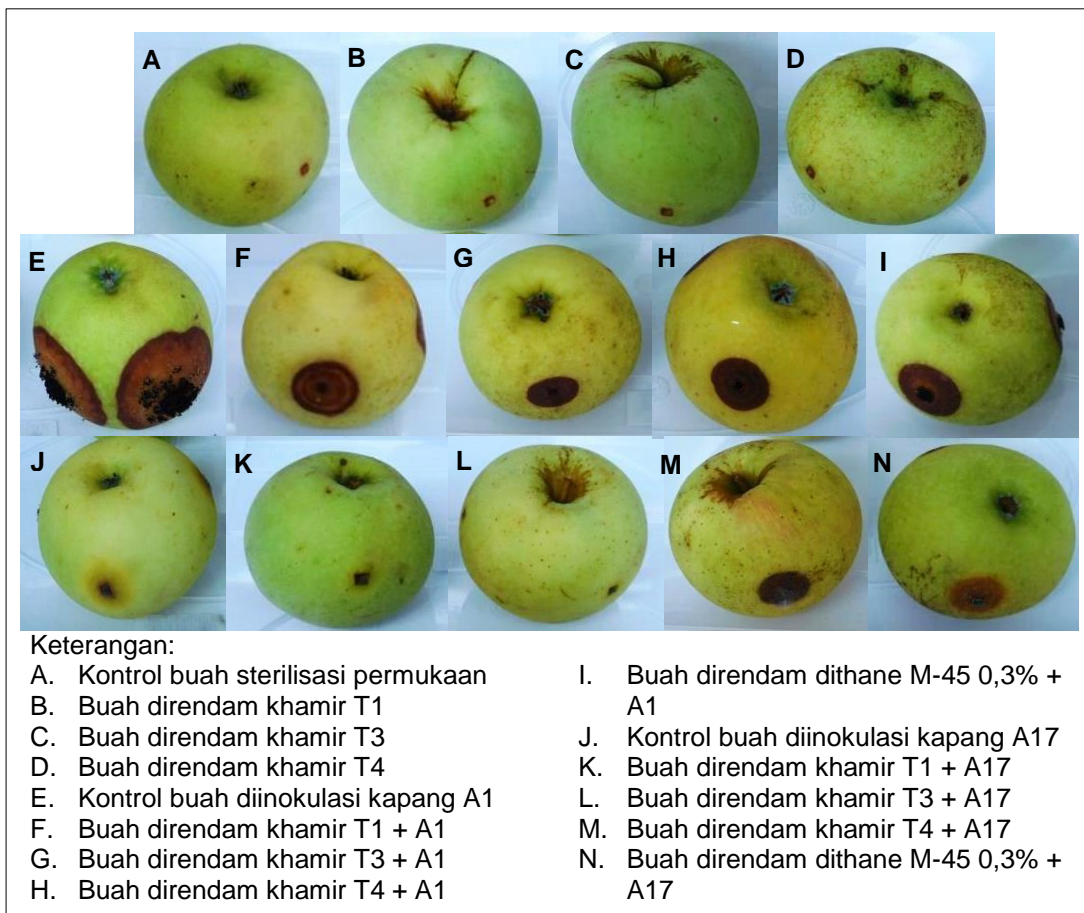
dan T3 (KP 25%; KeP 6,25%) memiliki kemampuan sebagai agen biokontrol yang lebih unggul terhadap pertumbuhan isolat kapang A17 dibandingkan dengan isolat khamir T4 (KP 50%; KeP 12,5%). Kemampuan T1 dan khamir T3 dalam mereduksi pertumbuhan A17 dalam mengurangi kebusukan buah apel lebih baik dibandingkan dengan fungisida sintetik Dithane M-45 0,3% (KP 100%; KeP 25%) (Gambar 13 dan Gambar 14).



Gambar 13. Persentase KP dan KeP buah apel pada pengujian biokontrol khamir antagonis T1, T3, dan T4 terhadap kapang A1 dan A17 inkubasi 7 hari pada suhu 27-28° C

Beberapa penelitian telah dilaporkan mengenai kemampuan khamir sebagai agen biokontrol kapang buah pascapanen. Khamir *Pichia anomala*, *P. guilliermondii*, *Lipomyces tetrasporus*, dan *Metschnikowia lunata* memiliki

kemampuan sebagai agen biokontrol kapang pada buah jambu (Hasham & Alamri, 2009). Gholamnejad *et al.*, (2009) melaporkan bahwa khamir *C. membranifaciens* dan *R. mucilaginosa* dapat mencegah pertumbuhan miselium kapang patogen *P. expansum* pada buah apel pascapanen sebesar 185,07-1738,037 mm² dengan inkubasi 15 hari pada suhu 20° C. khamir *P. anomala* dalam menghambat pertumbuhan *Colletotrichum gloeosporioides* penyebab antraknose pada buah alpukat sebesar 34% (Fitriati, *et al.*, 2013).



Gambar 14. Uji biokontrol khamir asal daun bintaro terhadap kapang perusak buah apel dengan inkubasi 7 hari pada suhu 27-28° C.

Perendaman suspensi khamir (T1, T3, dan T4) pada buah apel diketahui mampu menghambat pertumbuhan kapang perusak (A1 dan A17). Hal ini diketahui dengan tidak adanya gejala kerusakan pada buah dengan perlakuan tersebut (Gambar 14). Suspensi khamir yang diaplikasikan pada buah mengkolonisasi pada permukaan buah, menempati ruang dan mengambil nutrisi yang tersedia. Sehingga, pertumbuhan kapang menjadi terhambat. Penggunaan khamir pada permukaan buah telah banyak dipilih untuk mengendalikan penyakit pascapanen. Khamir digunakan sebagai agen biokontrol pada penyakit pascapanen karena cepat mengkolonisasi dan bertahan pada permukaan buah dalam waktu yang cukup lama pada berbagai kondisi, mampu berkompetisi dalam penggunaan nutrisi dengan patogen, kebutuhan nutrisi khamir sederhana, dapat tumbuh cepat dengan menghasilkan sel dalam jumlah besar, tidak menghasilkan spora alergik atau mikotoksin, serta menghasilkan vitamin dan mineral (Hashem & Alamri 2009).

F. Percobaan 6. Identifikasi khamir potensial dan kapang perusak secara molekuler serta pengamatan morfologi koloni secara makroskopik dan mikroskopik

a. Khamir

Identitas isolat khamir antagonis asal daun bintaro diperoleh berdasarkan nilai homologi sekuen pada daerah ITS dengan spesies terdekatnya menggunakan metode BLAST dari NCBI. Data hasil identifikasi isolat-isolat khamir antagonis disajikan pada Tabel 5.

Hasil pencarian homologi sekuen daerah ITS rDNA menggunakan program BLAST menunjukkan isolat khamir T1 teridentifikasi sebagai *R.*

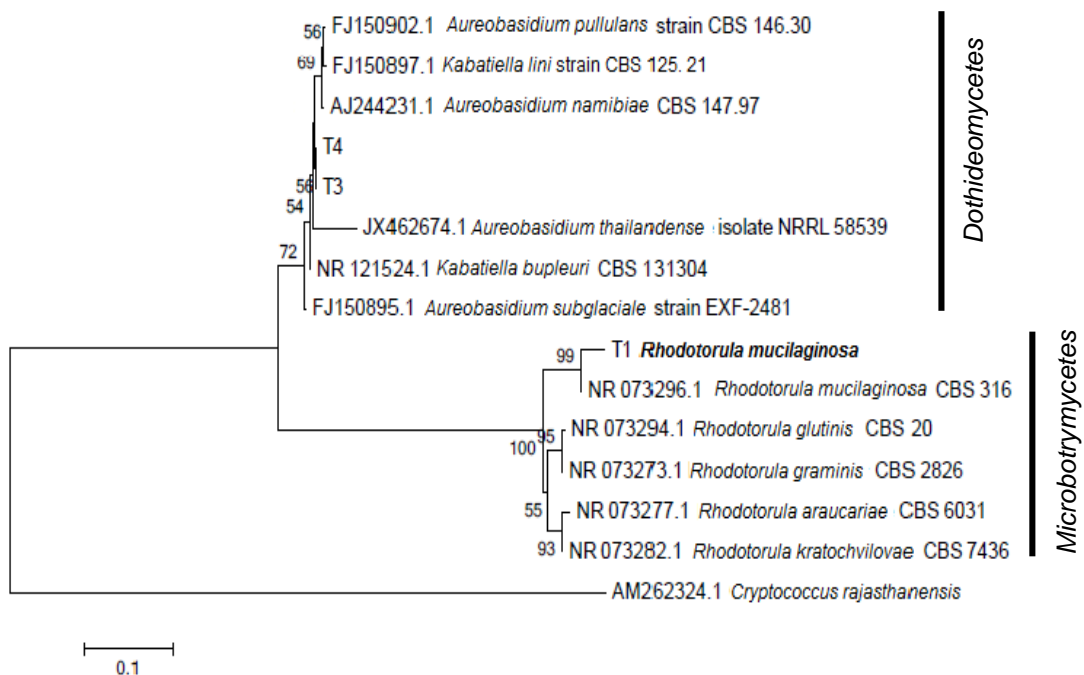
*mucilaginos*a dengan homologi sekuen daerah ITS sebesar 94% dengan spesies terdekatnya yaitu *R. mucilaginos*a CBS 316. Isolat khamir T3 dan T4 kemungkinan merupakan spesies baru. Hal ini dilihat dari data hasil BLAST di NCBI dan analisis filogenetik berdasarkan data sekuen dari daerah ITS rDNA (Gambar 15).

Tabel 5. Hasil identifikasi isolat khamir antagonis berdasarkan analisis sekuen daerah ITS rDNA

Kode isolat	Takson terdekat hasil BLAST di NCBI	Max score	Query (%)	E-value	Accession	Similarity (%)	Gaps
T1	<i>Rhodotorula mucilaginos</i> a CBS 316	876	99	0.0	NR 07329 6.1	94	6/637 (0,94%)
	<i>Aureobasidium pullulans</i> strain CBS 146.30	894	97	0.0	FJ150 902.1	98	1/637 (0,15%)
T3 dan T4	<i>Kabatiella lini</i> strain CBS 125.21	821	91	0.0	FJ150 897.1	98	2/637 (0,31%)
	<i>Aurobasidium namibiae</i> CBS 147.97	828	90	0.0	AJ244 231.1	99	1/637 (0,15%)

Perbandingan sekuen dapat diketahui dengan melakukan penjajaran seluruh sekuen yang dianalisis terlebih dahulu. Penjajaran dilakukan dengan tujuan untuk menentukan tingkat homologi dari urutan basa DNA isolat yang dianalisis dengan spesies pembanding (Dewi, 2012). Hasil sekuen isolat khamir T1, T3 dan T4 dijajarkan dengan berbagai sekuen *A. namibiae*, *A. thailandense*, *A. subglaciale*, *K. bupleuri*, *R. glutinis*, *R. graminis*, *R. araucariae*, dan *R. kratochvilovae* yang diunduh dari database DNA *GenBank* NCBI. Penjajaran dilakukan menggunakan program *ClustalW* dengan software MEGA 5.

Penjajaran sekuen isolat khamir T3 dan T4 menunjukkan adanya perbedaan basa nukleotida dibandingkan dengan ketiga sekuen, yaitu *A. pullulans* (0,15%), *K. lini* (0,31%) dan *A. namibiae* (0,15%). Sekuen isolat khamir T1 terdapat perbedaan yaitu 0,94% dengan sekuen *R. mucilaginosa* yang diunduh dari NCBI.



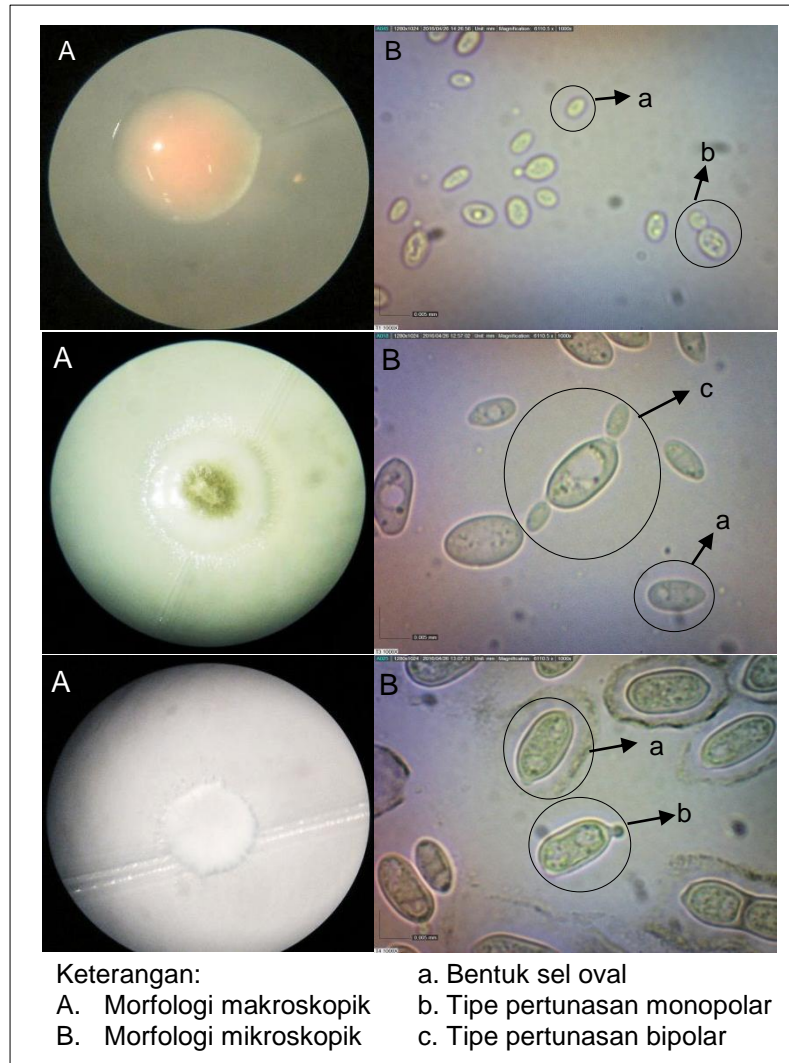
Gambar 15. Konstruksi pohon filogenetik isolat khamir antagonis asal daun bintaro berdasarkan analisis sekuen daerah ITS rDNA dengan metode *Neighbor Joining 1000x bootstrap*, MEGA5. *Cryptococcus rajasthanensis* sebagai *outgroup*.

Pohon filogenetik dibuat menggunakan software MEGA 5 dengan metoda *Neighbour Joining* (NJ). Pohon filogenetik digunakan untuk mengetahui hubungan kekerabatan antar spesies sampel dengan berbagai spesies lainnya. Filogenetik molekuler mengombinasikan teknik biologi molekuler dengan statistik untuk merekonstruksi hubungan filogenetika (Hidayat & Pancoro, 2008).

Isolat khamir T1 teridentifikasi sebagai *R. mucilaginosa* karena berada dalam satu klade monofiletik bersama dengan *R. mucilaginosa* CBS 316 dengan nilai *bootstrap* 99%. Isolat khamir T3 dan T4 kemungkinann merupakan spesies baru, hal ini disebabkan karena sekuen T3 dan T4 membentuk klade sendiri dari sekuen-sekuen terdekatnya yaitu *A. pullulans*, *K. lini* dan *A. namibiae* dengan nilai *bootstrap* 56%. Hal ini menunjukkan bahwa isolat T3 dan T4 memiliki tingkat homologi yang dekat dengan ketiga sekuen tersebut.

Pengamatan morfologi koloni isolat khamir secara makroskopik pada medium PDA dengan umur 48 jam (Lampiran 4 dan Gambar 16). Hasil pengamatan secara makroskopik pada koloni tunggal isolat khamir T1 sebagai berikut: koloni berwarna oranye, tesktur koloni *muroid* (berlendir), memiliki permukaan koloni yang licin. Tepian koloni berbentuk rata dan profil koloni terlihat menggunung. Hasil pengamatan karakter morfologi secara mikroskopik sebagai berikut; sel berbentuk oval, tipe pertunasan (*budding*) adalah monopolar dan tidak terdapat hifa maupun pseudohifa.

Hasil pengamatan secara makroskopik pada koloni tunggal isolat khamir T3 sebagai berikut: koloni berwarna putih, tesktur koloni *muroid* (berlendir), memiliki permukaan koloni yang licin. Tepi koloni berfilamen dan profil koloni terlihat menggunung. Hasil pengamatan karakter morfologi secara mikroskopik sebagai berikut; sel berbentuk oval, tipe pertunasan (*budding*) adalah bipolar dan tidak terdapat hifa maupun pseudohifa.



Gambar 16. Morfologi koloni secara makroskopik dan mikroskopik isolat khamir kode T1, T3, T4 (atas ke bawah) asal daun bintaro pada medium PDA berumur 48 jam pada suhu 27-28° C.

Hasil pengamatan secara makroskopik pada koloni tunggal isolat khamir T4 sebagai berikut: koloni berwarna putih, tekstur koloni *butyrous* (seperti mentega), memiliki permukaan koloni yang kusam. Tepi koloni berfilamen dan profil koloni terlihat menggunung. Hasil pengamatan karakter morfologi secara mikroskopik sebagai berikut; sel berbentuk oval, tipe pertunasan (*budding*) adalah monopolar dan tidak terdapat hifa maupun pseudohifa.

Berdasarkan hasil identifikasi molekular bahwa isolat khamir T1 merupakan khamir *R. mucilaginosa*. Hasil tersebut diperkuat oleh hasil pengamatan makroskopik dan mikroskopik isolat khamir T1 yang menunjukkan kemiripan dengan *R. mucilaginosa*. Menurut Barnet (1983), morfologi *R. mucilaginosa* yaitu koloni berwarna *cream*, oranye, merah muda sampai merah, tekstur koloni *mucoïd*, reproduksi vegetatif dengan tunas dan memiliki atau tidak memiliki pseudohifa.

Hasil identifikasi molekular khamir T3 dan T4 belum dapat ditentukan dengan pasti, namun jika diamati berdasarkan morfologi makroskopik dan mikroskopik, khamir tersebut memiliki ciri-ciri yang sama dengan *A. pullulans*. Zalar *et al.*, (2008) menumbuhkan *A. pullulans* pada medium PDA dengan suhu 25° C. Hasil pengamatan setelah 7 hari inkubasi, memiliki ciri makroskopik yaitu berwarna putih dengan tepi berfilamen. Ciri mikroskopik yaitu tipe pertunasan monopolar.

Beberapa penelitian melaporkan bahwa *R. mucilaginosa* dan *A. pullulans* dapat digunakan sebagai agen biokontrol terhadap kapang perusak buah pascapanen. Robiglio *et al.*, (2011) melaporkan *R. mucilaginosa* dapat menekan infeksi *P. expansum* pada buah pir dan mengurangi insidensi penyakit hingga 33%. Mari *et al.*, (2012) melaporkan bahwa *A. pullulans* dapat menghambat pertumbuhan kapang *C. acutatum* (*bitter rot*) dan *Botrytis cinerea* (*grey mold*) pada buah apel pascapanen. Francesco *et al.*, (2015) melaporkan *A. pullulans* dapat digunakan sebagai agen biokontrol kapang *Monilinia laxa* pada buah peach.

b. Kapang

Identitas isolat kapang perusak buah apel pascapanen diperoleh berdasarkan nilai homologi sekuen pada daerah ITS dengan spesies terdekatnya menggunakan metode BLAST dari NCBI. Data hasil identifikasi isolat-isolat khamir antagonis disajikan pada Tabel 6.

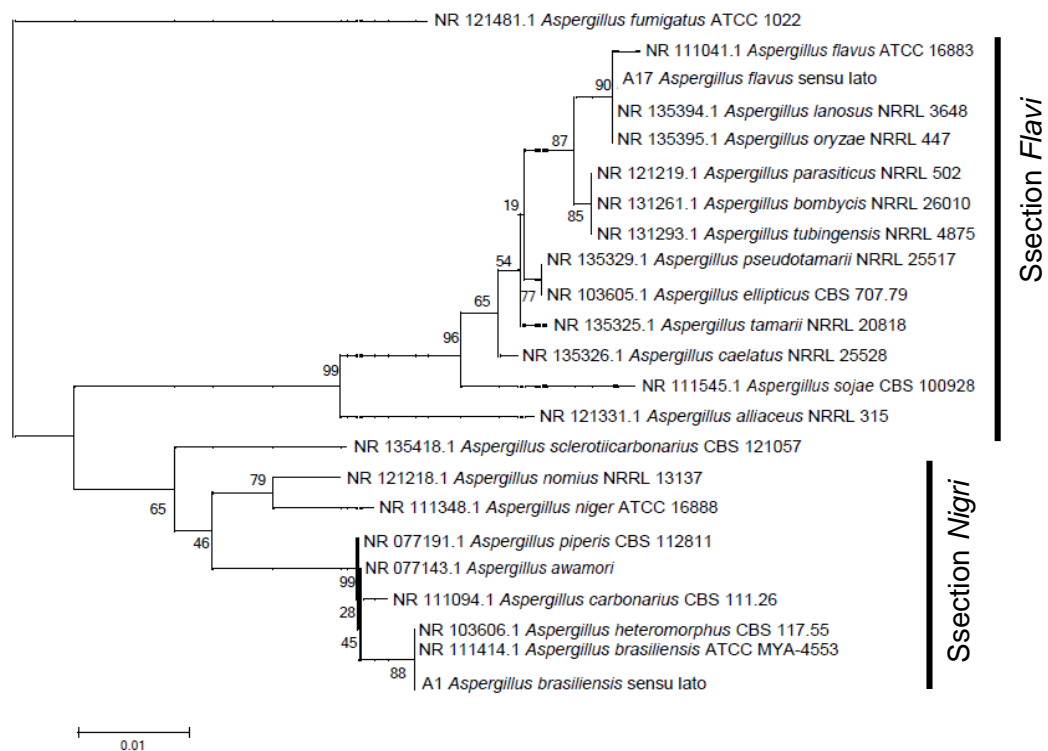
Hasil pencarian homologi sekuen daerah ITS rDNA menggunakan program BLAST menunjukkan isolat kapang A1 teridentifikasi sebagai *A. brasiliensis sensu lato* dengan homologi sekuen daerah ITS sebesar 98% dengan spesies terdekatnya yaitu *A. brasiliensis* ATCC MYA-4553. Isolat kapang A17 teridentifikasi sebagai *A. flavus sensu lato* dengan homologi sekuen daerah ITS sebesar 99%. Spesies terdekatnya yaitu *A. flavus* ATCC 16883.

Tabel 6. Hasil identifikasi isolat kapang perusak buah apel pascapanen berdasarkan analisis sekuen daerah ITS rDNA

Kode isolat	Takson terdekat hasil BLAST di NCBI	Max score	Query (%)	E-value	Accesion	Similarity (%)	Gaps
A1	<i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC MYA-4553	924	97	0.0	NR 111414.1	98	1/534 (0,18%)
A17	<i>Aspergillus flavus</i> ATCC 16883	1000	99	0.0	NR 111041.1	99	1/534 (0,18%)

Hasil sekuen isolat kapang A1 dan A17 kemudian diujarkan dengan berbagai sekuen-sekuen dari spesies *Aspergillus* yang ada pada database DNA *GenBank* NCBI. Berdasarkan pohon filogenetik (Gambar 17), isolat kapang A1 dan A17 berada dalam klade yang berbeda. Isolat

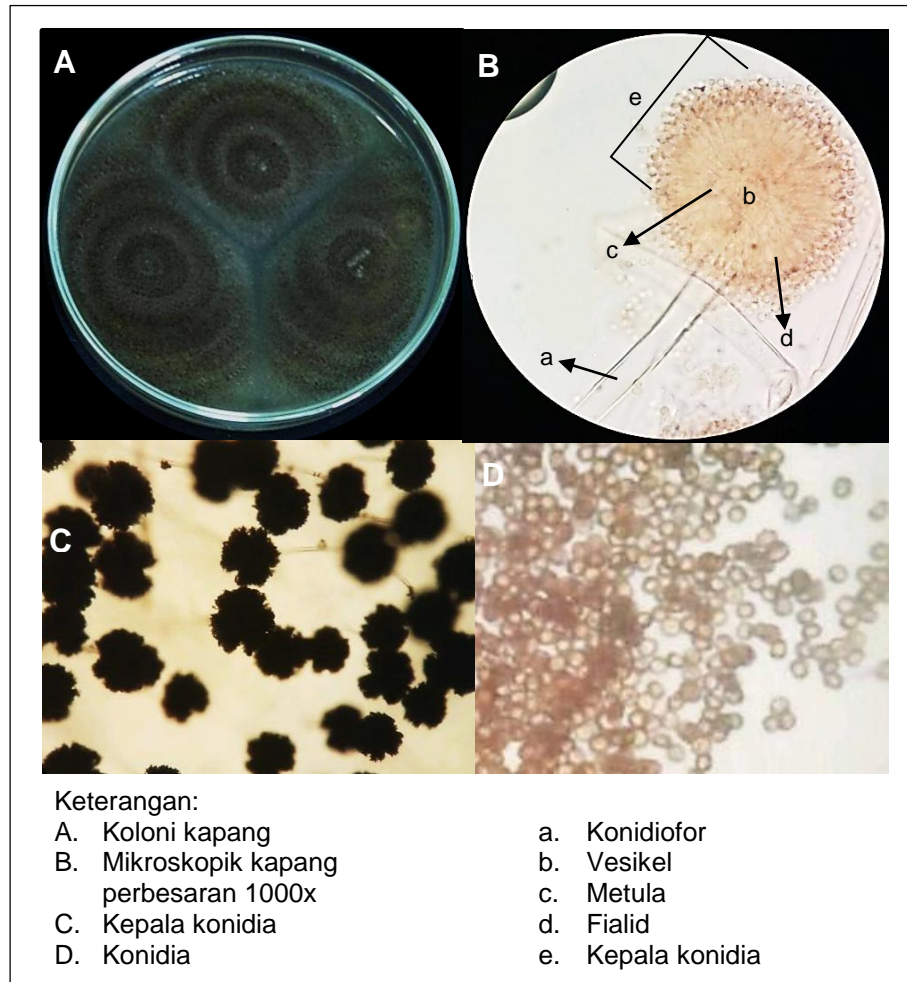
kapang A1 juga berada dalam klade monofiletik dalam section *nigri* bersama *A. heteromorphus* CBS 117.55 dan *A. brasiliensis* ATCC MYA-4553 dengan nilai *bootstrap* 88%. Isolat kapang A17 berada dalam klade monofiletik dalam section *flavi* bersama *A. flavus* ATCC 16883, *A. lanosus* NRRL 3648 dan *A. oryzae* NRRL 447 dengan nilai *bootstrap* 90%.



Gambar 17. Konstruksi pohon filogenetik isolat kapang perusak buah apel pascapanen berdasarkan analisis sekuen daerah ITS rDNA dengan metode *Neighbor Joining* 1000x *bootstrap*, MEGA5. *Aspergillus fumigatus* ATCC 1022 sebagai *outgroup*.

Nilai *bootstrap* memperlihatkan cukup tingginya tingkat kepercayaan klade yang terbentuk. Semakin besar nilai *bootstrap* yang muncul maka semakin tinggi tingkat kepercayaan pohon hasil rekonstruksi. Menurut Simpson (2006), nilai *bootstrap* diantara 70-100

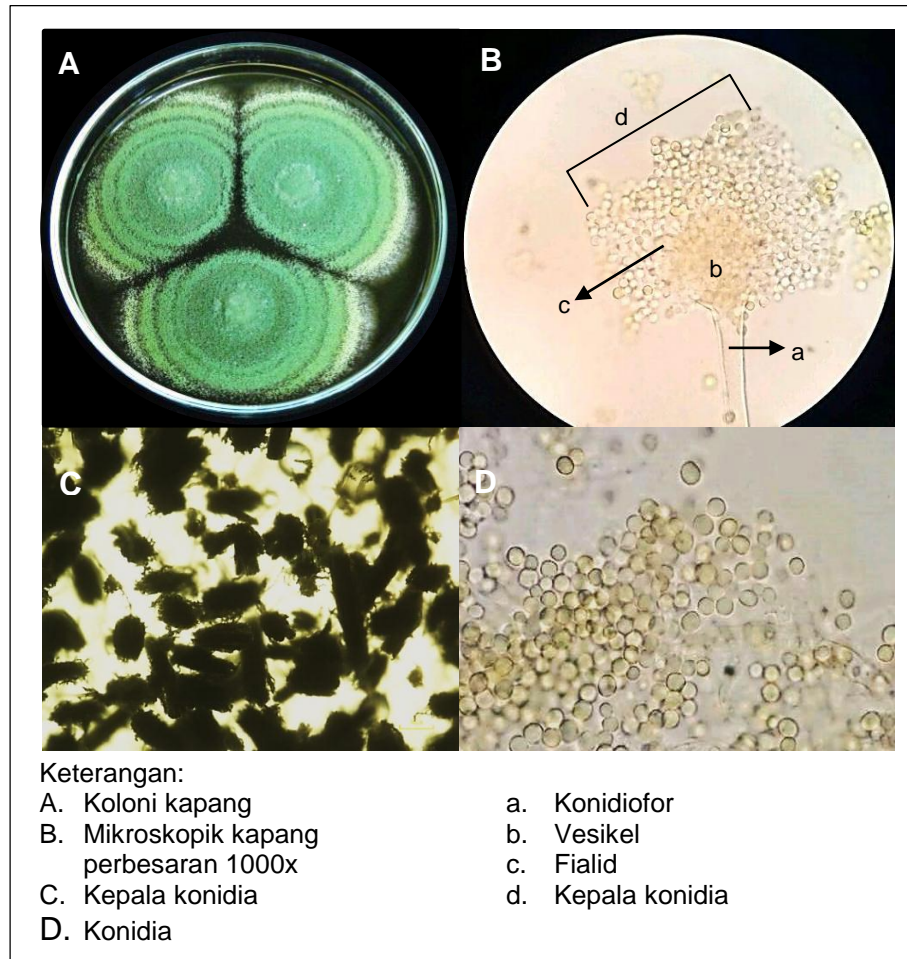
menunjukkan bahwa percabangan dan pohon filogenetik tidak akan berubah.



Gambar 18. Morfologi makroskopik dan mikroskopik isolat kapang perusak buah apel pascapanen (kode isolat A1) pada medium MEA berumur 7 hari pada suhu 27-28° C.

Pengamatan morfologi secara makroskopik isolat kapang perusak buah apel pada medium MEA yang berumur 7 hari dan diinkubasi pada 27-28° C (Lampiran 4, Gambar 18, Gambar 19). Hasil pengamatan makroskopik koloni tunggal isolat kapang A1 menunjukkan koloni kapang berwarna *soft black* dengan tepi putih, tekstur granula, memiliki *growing zone*, *zonasi* dan *radial furrow*. Isolat kapang A1 tidak memiliki *exudate*

drops. Pengamatan secara mikroskopik isolat kapang A1 terdapat konidiofor, vesikel, metula, fialid, dan konidia.



Gambar 19. Morfologi makroskopik dan mikroskopik isolat kapang perusak buah apel pascapanen (kode A17) pada medium MEA berumur 7 hari pada suhu 27-28° C.

Hasil pengamatan secara makroskopik koloni tunggal isolat kapang A17 menunjukkan koloni kapang berwarna *moss green* dengan tepi putih, tekstur granula pada bagian tengah tekstur koloni *floccose*, memiliki *growing zone* dan *zonasi*. Tidak memiliki *exudate drops* dan *radial furrow*. Morfologi koloni *A. flavus* sensu lato sesuai dengan Klich (1988), yaitu konidia berwarna *olive-dark green*, miselium berwarna

putih, tidak ada *exudate drops*, koloni bagian bawah tidak berwarna-kuning kusam, tekstur koloni *floccose* pada bagian tengah.

Pengamatan morfologi koloni secara mikroskopik menunjukkan kepala konidia berbentuk *columnar*, konidiofor dan pada ujung konidiofor terdapat vesikel tipe *uniseriate*, vesikel hanya terlihat filid dan konidia. Morfologi mikroskopik ini sesuai dengan Klich (1988), *A. flavus* memiliki tipe *biseriate* pada medium CYA dan pada medium MEA sering ditemukan tipe *uniseriate*. Kepala konidia *radiate* sampai *columnar*, panjang konidiofor 250-25000 μm umumnya tidak berwarna sampai coklat kusam, vesikel *globose* dengan diameter 12-85 μm , metula menutupi tiga perempat permukaan vesikel.

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

A. KESIMPULAN

Berdasarkan data hasil penelitian, dapat disimpulkan bahwa:

1. Sebanyak 18 isolat kapang berhasil diisolasi dari buah apel pascapanen, dengan kode isolat A1, A2, A3, A4, A5, A6, A7, A8, A9, A10, A11, A12, A13, A14, A15, A16, A17, A18.
2. Tiga isolat khamir (T1, T3, T4) memiliki kemampuan antagonisme terhadap kapang perusak (A1, A17) buah apel pascapanen.
3. Tiga isolat khamir (T1, T3, T4) mampu mengontrol kapang A1 dan dua isolat khamir (T3 dan T4) mampu mengontrol kapang A17 yang menyebabkan kebusukan pada buah apel pascapanen.
4. Isolat kapang A1 diidentifikasi sebagai *Aspergillus brasiliensis* dan isolat kapang A17 diidentifikasi sebagai *Aspergillus flavus*. Isolat khamir T1 diidentifikasi sebagai *Rhodotorula mucilaginosa* serta isolat khamir T3 dan T4 merupakan isolat baru yang masih berhubungan dekat dengan *Aureobasidium pullulans*.

B. Implikasi

Hasil penelitian ini dapat memberikan informasi tentang khamir asal daun bintaro yang memiliki kemampuan sebagai agen biokontrol dalam menghambat pertumbuhan kapang perusak buah apel pascapanen.

Penelitian ini diharapkan mampu menjadi dasar penelitian lanjutan untuk diaplikasikan dan dijadikan produk biokontrol kapang perusak buah apel pascapanen.

C. SARAN

Saran untuk penelitian selanjutnya adalah perlu dilakukan analisis multilokus untuk mengidentifikasi nama spesies dari isolat T3 dan T4. Sehingga dapat dilakukan pengujian selanjutnya untuk mengaplikasikan khamir-khamir potensial tersebut menjadi produk biokontrol kapang perusak buah apel.

DAFTAR PUSTAKA

- Asaduzzaman, M.D. 2007. *Standardization of Yeast Growth Curves from Several Curves with Different Initial Sizes*. Thesis. Division of Mathematical Statistics Department of Mathematical Sciences Chalmers University of Technology and Göteborg University SE - 412 96 Göteborg Sweden.
- Ahmed, F. 2008. Antibacterial, cytotoxic, and neuropharmacological activities of *Cerbera odollam* seeds. *Oriental Pharmacy and Experimental Medicine* 4: 323-328.
- Agrios, N.G. 2005. *Plant pathology*. 5th ed. Departemen of Plant Pathology. University of Florida. United States of America.
- Aminah, N.S., & Supraptini. 2003. Jamur pada buah-buahan, sayuran, kaki lalat dan lingkungan di pasar tradisional dan swalayan. *J. Ekologi Kesehatan* 2(3): 299-305.
- Ashari, S. 2005. *Hortikultura Aspek Budidaya*. Universitas Indonesia Press. Jakarta.
- Atlas, R.M. 2010. *Handbook of Microbiological Media*. CRC Press Inc., Florida.
- Bajpai, V.K., Yoon, J.I., Choi, S.W., & Kang, S.C. 2010. Isolation and Morphological Characterization of *Monilinia* spp. KV-27 Associated with Apple Anthracnose of Fuji Apples in Korea. *J. Plant Pathol* 26 (2): 185-188.
- Barnett, J.A., Payne, R.W., & Yarrow, D. 2000. *Yeast characteristics and identification*. 3th ed. Cambridge University Press. UK.
- Batzing, B.L. 2002. *Microbiology: An introduction*: Brooks/ Cole Thomsom Learning, Inc., London.
- Benson, H. J. 2001. *Microbiological application: Laboratory manual in general microbiology*. The McGraw-Hills Company, Inc., New York.
- Chan, Z & S. Tian. 2005. Interaction of antagonistic yeasts against postharvest pathogens of apple fruit and possible mode of action. *Postharvest Biol. Technol.* 36: 215-223.
- Ciaro, D.E., Schar, G., Bottger, E.C., Altwegg, M., & Bosshard, P.P. 2006. Internal transcribed spacer sequencing versus biochemical profiling for identification of medically important yeasts. *J. Clinical Microbiol* 44(1): 77-84.

- Collins, C.H., & Lyne, P.M. 2004. *Microbiological methods*. 8th ed. Arnold England.
- Deak, T. 2008. *Handbook of food spoilage yeast*. 2nd ed. CRC Press. New York.
- Dewi, C.L.H. 2012. *Analisis Biomolekuler Gen Internal Transcribed Spacer (ITS) Dalam Studi Filogenetik Loerzingii Valetton (Zingiberaceae)*. Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Donowarti, I. & Winahyu, S.T. 2008. Analisis ekonomi produksi apel di Desa Poncokusumo Kabupaten Malang. *Primordia* 4 (2): 150-156.
- Droby, S., Vinokur, V., Weiss, B., Cohen, L., Daus, A., Goldschidt, E.E., & Porat, R. 2001. Induction of resistance *Penicillium digitatum* in grapefruit, by the yeast biocontrol agent *Candida oleophila*. *Biol Control* 92(4): 393-399.
- Druvefors, U.A. 2004. Yeast biocontrol of grain spoilage moulds: Mode of action of *Pichia anomala*. *Doctoral Thesis*, Department of Biology, Swedish University of Agriculture Science, Uppsala.
- Drusch, S & Ragab, W. 2003. Mycotoxin in fruits and fruits juices and dried fruits. *J. Food Protection* 8: 1514-1527.
- El-tarabily K, & Sivacithamparam, AK. 2006. Potential of yeast as biocontrol agents of soil-borne fungal plant pathogens and as plant growth promoters. *Mycoscience* 47: 25-35.
- Fan, Q., & Tian, S. 2001. Postharvest biological control of grey mold and blue mold on apple by *Cryptococcus albidus* (Saito) Skinner. *Postharvest Biol and Technol* 21: 341-350. DOI: 10.1016/S0925-5214(00)00182-4
- Fard, F.A., Etebarian, H.R., Sahebani, N. 2012. Biological control of gray mold of apple by *Candida membranifaciens*, *Rhodotorula mucilaginosa* and *Pichia guilliermondii*. *Plant Path* 48(1): 17-26
- Fitriati, Y., Wiyono, S., Sumarauw, I.O. 2013. Khamir antagonis untuk pengendalian penyakit antraknosa pada buah avokad selama penyimpanan. *J. Fitopatol Indones* 9(5): 153-159.
- Fonseca, A., & Inacio, J. 2006. Phylloplane yeast. Di dalam: Peter, G & Rosa, C. 2006. *The Yeast Handbook: Biodiversity and Ecophysiology of Yeast*. Springer-Verlag. Berlin Heidelberg: 263-301.
- Francesco, A.D., Roberti, R., Martini, C., Baraldi, E., Mari, M. 2015. Activities of *Aureobasidium pullulans* cell filtrates against *Monilinia laxa* of

peaches. *Microbiol Res* 181: 61-67. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.micres.2015.09.003>

- Gandjar, I., Sjamsuridzal, W., & Oetari, A. 2006. *Mikologi dasar dan terapan*. Yayasan Obor Indonesia. Jakarta.
- Gholamnejad, J., Etebarian, H.R., Sahebani, N.A., & Roustaei, A. 2009. Characterization of biocontrol activity of two yeast strains from Iran against blue mould of apple in order to reduce the environmental pollution. *J. Int Environ App and Sci* 4(1): 28-36.
- Gholamnejad, J., Etebarian, H.R., & Sahebani, N. 2009. Biological Control of Apple Blue Mold with *Candida membranifaciens* and *Rhodotorula mucilaginosa*. Department of Plant Protection, Aboureihan Campus, University of Tehran, Iran.
- Golubev, W.I. 2006. Antagonistic interactions among yeast. Di dalam: Rosa C.A. & G. Peter (eds). 2006. *The yeast handbook*. Springer, Germany: 197-219.
- Ge, L., Zhang, H., Chen, K., Ma, L., & Xu, Z. 2010. Effect of chitin on the antagonistic activity of *Rhodotorula glutinis* against *Botrytis cinerea* in strawberries and the possible mechanisms involved. *Food Chemistry* 120: 490-495.
- Haggag, W.M., & Mohamed, H.A.A. 2007. Biotechnological aspects of microorganisms used in plant biological control. *American-Eurasian J. Sustainable Agric* 1(1): 7-12.
- Hall, B.G. 2004. *Phylogenetic trees made easy: A how to manual*. 2nd ed. Sinauer Associates, Inc., Massachusetts.
- Handarini. 2009. Pengujian kemampuan antagonistik khamir epifit asal Kebun Raya Cibodas terhadap kapang dari tanaman tomat terinfeksi. Di dalam: *Pengujian kemampuan antagonistic khamir epifit asal Kebun Raya Cibodas dan potensi Candida sp. Berkhout UICC-328 sebagai agen biokontrol Aspergillus ochraceus Wilhem pada tomat pascapanen*. Tesis. Universitas Indonesia. Depok.
- Hansen. 2000. *Laboratory Procedures "Hemacytometer"*. University of Florida.
- Hashem, M. & Alamri S. 2009. The biocontrol of postharvest disease (*Botryodiplodia theobromae*) of guava (*Psidium guajava* L.) by the application of yeast strains. *Postharvest Biol Technol*. 53: 123-130. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.postharvbio.2009.04.001>.
- Hidayat, T. & Pancoro, A. 2008. Kajian Filogenetika Molekuler dan Peranannya dalam Menyediakan Informasi Dasar untuk

- Meningkatkan Kualitas Sumber Genetik anggrek. *J. Agro Biogen* 4: 35-40.
- James, S.A. & Startford, M. 2003. Spoilage yeast with emphasis on the genus *Zygosaccharomyces*. Di dalam: Boekhout, T. & V. Robert (eds.). 2003. *Yeast in food*. Woodhead Publishing Limited, Cambridge: 171-191.
- Janisiewicz, W.J. & Korsten, L. 2002. Biological control of postharvest disease of fruits. *Annual Rev.* 40: 411-441.
- Jannata, R.H., Gunadi, A., & Ermawati, T. 2014. Daya antibakteri ekstrak kulit apel manalagi (*Malus sylvestris* Mill.) terhadap pertumbuhan *Streptococcus mutans*. *Jurnal Pustaka Kesehatan* 2: 246
- Kavanagh, K. 2005. *Fungi, biology and applications*. John Wiley & Sons Ltd, West Sussex.
- Kebler, P.J.A. & Sidiyasa. K. 2005. Pohon-pohon hutan Kalimantan Timur. Tropenbos Kalimantan Series 2. Kalimantan.
- Kementerian Pertanian. 2014. *Volume ekspor, nilai ekspor, volume impor dan nilai impor komoditas apel holtikultura di Indonesia*. <https://aplikasi.pertanian.go.id/bdsp/newdata.asp>. [10 November 2015].
- Klich, M.A., & Pitt, J.I. 1988. *A laboratory guide to the common aspergillus species and their teleomorphs*. North Ryde, N.S.W.: Commonwealth Scientific and Industrial Research Organisation, Division of Food Processing.
- Kurtzman, C.P., Boekhout, T., Robert, V., Fell, J.W., & Deak, T. 2003. Methods to identify yeasts. Di dalam: Boekhout, T. & V. Robert. (eds.). 2003. *Yeasts in food: Beneficial and detrimental aspects*. CRC Press, Boca Raton: 69-121.
- Kurtzman, C.P. & Fell J.W. 2006. Yeast systematics and phylogeny-implications of molecular identification method for studies in ecology. Di dalam: Rosa C.A. & G. Peter (eds.). 2006. *The yeast handbook* Springer, German: 11-30.
- Kwon, J., Kim, J., & Kim, W. 2011. First Report of *Rhizopus oryzae* as a Postharvest Pathogen of Apple in Korea. *Mycobiology* 39(2): 140-142.
- Li, W.H. & Graur, D. 1991. *Fundamentals of molecular evolution*. Sinauer Associates, Inc. Publishers, Sunderland.

- Li, R., Zhang, H., Liu, W., & Zheng, X. 2011. Biocontrol of postharvest gray and blue mold decay of apples with *Rhodotorula nucilaginosa* and possible mechanisms of action. *Int. J. Food Microbiol* 146: 151-156.
- Mahyuni, E.L. 2015. Faktor risiko dalam penggunaan pestisida terhadap keluhan kesehatan pada petani di Kecamatan Berastagi Kabupaten Karo. *Kesmas* 9:79-89.
- Mahreni & Suhenry, S. 2011. *Kinetika Pertumbuhan Sel Saccharomyces Cerevisiae Dalam Media Tepung Kulit Pisang*. Seminar Rekayasa Kimia Dan Proses. Universitas Pembangunan Nasional "Veteran". Yogyakarta.
- Mari, M., Martini, C., Spadoni, A., Rouissi, W., Bertolini, P. 2012. Biocontrol of apple postharvest decay by *Aureobasidium pullulans*. *Postharvest Biol and Technol* 73:56-62. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.postharvbio.2012.05.014>
- Maxin, P., Williams, M., & Weber, R.W.S. 2014. Control of fungal storage rots of apples by hot water treatments: A northern European perspective. *Erwebs-Obstbau* 56: 25-34. DOI: 10.1007/s10341-014-0200-z
- Masudi, S. & Golam, H.S.B. 2012. Fulfillment of Koch postulates for in vitro pathogenicity of *Musicilium theobrome* (TURCONI) Zare & W. Gams as the cause of banana cigar end rot disease. *J. Plant Protect Res* 52(4): 410-414.
- Michael, S. & Arora, N.K. 2011. Evaluation of rhizospheric *Pseudomonas* and *Bacillus* as biocontrol tool for *Xanthomonas campestris* pv *compestris*. *World J Microbiol Biotechnol*. 28(2): 693-702. DOI: 10.1007/s11274-011-0865-5.
- Miskiyah, Winarti, C., & Broto, W. 2010. Kontaminasi mikotoksin pada buah segar dan produk olahannya serta penanggulangannya. *Jurnal Litbang Pertanian* 29(3): 79-85.
- Moat, A.G., Foaster, J.W., & Spector, M.P. 2002. *Microbial physiology*. 4th ed. Wiley-Liss, Inc., New York.
- Morikawa, K., Nonaka, M., Narahara, M, Torii, I., Kawaguchi, K., Yoshikawa, T., Kumazawa, Y., & Morikawa, S., 2003, Inhibitory effect of quercetin on carrageenan-induced inflammation in rats. *Life Sci* 26(6): 709-721.
- Morrice, S. & Ragazzi, A. 2008. Biological and integrated means to control rust diseases. Di dalam: Ciancio, A. & K.J. Mukerji. 2008. *Integrated management of diseases cause by fungi, phytoplasma, and bacteria*. Springer, German: 303-324.

- Nugraheni, Astri, S., Djauhari, S., Cholil, A., & Utomo, E.P. 2014. Potensi Minyak Atsiri Serai Wangi (*Cymbopogon winterianus*) sebagai Fungisida Nabati terhadap Penyakit Antraknosa (*Colletotrichum gloeosporioides*) pada Buah Apel (*Malus sylvestris* Mill). *J. Hama dan Penyakit Tumbuhan* 2(4): 2338-4336.
- Nurhayati. 2011. *Epidemiologi Penyakit Tumbuhan*. Penerbit Universitas Sriwijaya. Palembang
- Olliphant. 2006. BioEdit. htlm. <http://cae.wisc.edu>. [6 Februari 2016].
- Pradana, Galuh, S., Ardyati, Tri, A., & Luqman Q. 2013. *Eksplorasi kapang antagonis dan kapang patogen tanaman apel di lahan perkebunan apel poncokusumo*. Skripsi Program Sarjana. Universitas Brawijaya. Malang.
- Rahman, M.D.A., Paul, P., & Rahman, A.A. 2011. Antinociceptive, Antibacterial & Diuretic Activities of *Cerbera odollam* Gaertn Roots. *Research J of Pharmaceutical, Biol and Chemic Sci* 2(3): 16-23.
- Ray, B. 2008. *Fundamental food microbiology*. 3th ed. CRC Press, USA.
- Robiglio A, Sosa MC, Lutz MC, Lopes CA, Sangorr'n MP. 2011. Yeast biocontrol of fungal spoilage of pears stored at low temperature. *Int J Food Microbiol* 147(3): 211–216. DOI:<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.04.007>.
- Rohimatun, S.S. 2011. Bintaro (*Cerbera manghas*) sebagai Pestisida Nabati. *Warta Penelitian dan Pengembangan Tanaman Industri* 17(1): 1-4.
- Rumahlewang, W. & Amanupunyo, H.R.D. 2012. Patogenesis *Colletotrichum musae* Penyebab Penyakit Antraknosa Pada Beberapa Varietas Buah Pisang. *Agrologia* 1(1): 76-81.
- Sa'diyah, N.A., Purwani, K.I., & Wijayawati, L. 2013. Pengaruh ekstrak daun bintaro (*Cerbera odollam*) terhadap perkembangan ulat grayak (*Spodoptera litura*). *J. Sains dan Seni Pomits*. 2 (2): 2337-3520.
- Sambrook, J. & Russel, D.W. 2001. *Molecular cloning: A laboratory manual*. 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Santoso, B. 2008. *Penyakit Pasca Panen Komoditi Hortikultura*. Rineka Cipta. Jakarta.
- Semangun, H. 2007. *Penyakit-Penyakit Tanaman Hortikultura di Indonesia* (Edisi Kedua). Penerbit Universitas Gajah Mada. Yogyakarta.

- Sharma, R. R., Singh, D., & Singh, R. 2009. Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables by microbial antagonists: A review. *Biol Control* 50: 205-221.
- Sibounnavong, P., Soyong, K., Divina, C.C., & Kalaw, S.P. 2009. In-vitro biological activities of *Emericella nidulans*, a new fungal antagonist, against *Fusarium oxysporum* f. sp. lycopersici. *J. Agr Technol* 5(1): 75-84.
- Simpson, M.G. 2006. *Plant Systematic*. California: Elsevier Academic Press.
- Sjamsuridzal, W. 2008. Workshop on rapid identification of yeasts by molecular method and the use of bioinformatics tools for phylogenetic analysis. Center of Excellence Indigenous Biological Resources-Genome Studies, Depok.
- Soemirat, J. 2003. *Toksikologi Lingkungan*, Gadjah Mada University Press. Yogyakarta.
- Spadaro, D. 2003. *Biological control of postharvest diseases of pome fruit using yeast antagonist*. Doctoral Thesis. Plant Pathology Sector University of Turin. Turin.
- Spadaro, D., Zhang, D., Garibaldi, A., Gullino, M.L. 2011. Potential biocontrol activity of a strain of *Pichia guilliermondii* against grey mold of apples and its possible modes of action. *Biol control* 57: 193-201. DOI: 10.1016/j.biocontrol.2011.02.011
- Starr, C. & Taggart, R. 2004. *Biology: The unity and diversity of life*. 10th ed. Brooks/ Cole-Thomson Learning, Belmont.
- Sugiyono. 2010. *Metode Ppenelitian kuantitatif dan RND*. Alfabeta. Bandung.
- Sukmawati, D., Ariyanti, O., Dian, H., Mega, A., & Wellyzar, S. 2015. Identification of phylloplane yeasts from paper mulberry (*Broussonetia papyrifera* (L) L'Her ex Vent) in Java, Indonesia. *Mal J. Microbiol.* 11(4): 324-240.
- Tang, P.D.P. & Le, V.V.M. 2013. Fermentation performance of free and immobilized yeast on cork (*Sonneratia caseolaris*) root- application of immobilized yeast to repeated batch ethanol fermentation. *J Int Food Res* 20(4): 1813-1817.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., Kumar, S. 2011. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Bio. Evol* 28(10): 2731-2739.

- Tarmadi, D., Prianto, A.H. Guswenrivo, I., Kartika, T., & Yusuf, S., 2007, Pengaruh ekstrak bintaro (*Carbera odollam* Gaertn) dan kecubung (*Brugmansia candida* Pers) terhadap rayap tanah *Coptotermes* sp. *J. Tropical Wood Sci and Technol* 5 (1): 38-42.
- Tavanti, A., Davidson, A.D., Maiden, M.C., Shaw, D.J., Gow, N.A., & Odss, F.C. 2005. *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* spp. nov. to replace *Candida parapsilosis* Groups II and III. *J Clin Microbiol* 43(1): 284-292.
- Tuite, J. 1969. *Plant pathological methods: fungi and bacteria*. USA. Burgess publishing company.
- Utama, S.I.M. 2010. *Teknologi pascapanen hortikultura: permasalahan dan usaha perbaikan*. Lokakarya Strategi Pengembangan Hortikultura di Bali. PPBT-UNUD dan Dinas Pertanian Tanaman Pangan Propinsi Bali.
- Utama, S.I.M. & Rina, P.I.A. 2009. *Stres Produk Pascapanen Holtikultura*. Universitas Udayana. PPBT-UNUD.
- Utami, S. 2010. Aktivitas insektisida bintaro terhadap hama *Eurema* sp. pada skala laboratorium. *J. Penelitian Hutan Tanaman* 7(4): 211-220.
- Wan M, Li G, Zhang J, Jiang D, & Huang HC. 2008. Effect of volatile substances of *Steptomyces platensis* F-1 on control of plant fungal diseases. *Biol Control* 46: 552-559.
- Wang, P.H. & Chang, C.W. 2002. Six *Rhodotorula* species from Taiwan. *Fung Sci*. 17: 23-26.
- Webster, J. & Weber, R. W. S. 2007. *Introduction to fungi. 3th ed*. Cambridge University Press. United Kingdom.
- White, T.J., Bruns, T., Lee, S., Taylor, J.W. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ, editor. *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. New York: Academic Press Inc.
- Widyastuti, S. 2008. Pengendalian penyakit pascapanen, *Penicillium expansum* dengan sel khamir *Rhodotorula glutinis*. Prosiding Seminar Nasional Teknik Pertanian. Yogyakarta.
- Winarti, C., Miskiyah, & Munarso, S.J. 2009. Kontaminasi patulin pada buah dan produk olahan apel. *Buletin Teknologi Pascapanen Pertanian*. Balai Besar Penelitian Pascapanen Pertanian. Bogor.

- Wulandari, A. 2012. Daya antibakteri ekstrak buah apel manalagi terhadap bakteri *Salmonella thyposa*. *J. Healthy Sci AAKMAL* 2: 1-3.
- Yan, X., Tao, F., & Ping, T.W. 2011. Chemical and bioactivity of mangrove plants in the Genus *Cerbera*. *J. Guangxi Academy of Sci* 2: 11-13.
- Yuda, W.H. 2013. Efektifitas Esktrak Buah Bintaro (*Cerbera odollam*) sebagai larvasida lalat rumah (*Musca domestica*). Skripsi Program Sarjana. Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Yulianti, S., Irlansyah, & Junaedi, E.. 2006. *Khasiat dan manfaat apel*. Agromedia Pustaka. Jakarta.
- Zalar P, Gostincar C, De Hoog GS, Ursic V, Sudhadham M, GundeCimerman N. 2008. Redefinition of *Aureobasidium pullulans* and its varieties. *Stud. Mycol.* 61: 21-38.
- Zhang, H., Mahunu, G.K., Yang, Q., Zhang, X., Li. D., & Zhou, Y., 2015. Improving the biocontrol efficacy of *Pichia caribbica* with phytic acid against postharvest blue mold and natural decay in apples. *Biol Control* 92: 172-189.

LAMPIRAN

Lampiran 1. Pembuatan Medium

1. *Potato Dextrose Agar (PDA)*

Medium PDA dibuat dengan melarutkan PDA sebanyak 39 g dengan 1000 ml akuades berdasarkan cara yang tertera pada kemasan [oxid]. Medium dididihkan di atas kompor dengan dialaskan kasa dan aduk agar hingga agar larut sempurna. Medium PDA disterilkan dalam autoklaf selama 15 menit pada suhu 121° C dan tekanan 2 atm. Medium yang telah disterilkan ditunggu hingga mencapai suhu sekitar kurang lebih 40° C. Medium dituang ke dalam cawan petri sebanyak ± 20 ml secara aseptis.

Medium PDA pada tabung reaksi, setelah medium di didihkan, tuang medium ke dalam tabung reaksi dengan menggunakan pipet sebanyak ± 5 ml. Medium disterilkan dalam autoklaf selama 15 menit dengan suhu 121° C dan pada tekanan 2 atm. Tabung reaksi berisi medium yang telah steril diletakkan pada papan yang dimiringkan hingga agar mengeras.

2. *Malt Extract Agar (MEA)*

Medium MEA dibuat dengan melarutkan MEA sebanyak 50 g dengan 1000 ml akuades berdasarkan cara yang tertera pada kemasan [oxid]. Medium dididihkan di atas kompor dengan dialaskan kasa dan aduk agar hingga agar larut sempurna. Medium MEA disterilkan dalam autoklaf selama 15 menit pada suhu 121° C dan tekanan 2 atm. Medium yang telah disterilkan ditunggu hingga mencapai suhu sekitar kurang lebih

40°C. Medium dituang ke dalam cawan petri sebanyak \pm 20 ml secara aseptis.

Medium MEA pada tabung reaksi, setelah medium di didihkan, tuang medium ke dalam tabung reaksi dengan menggunakan pipet sebanyak \pm 5 ml. Medium disterilkan dalam autoklaf selama 15 menit dengan suhu 121° C dan pada tekanan 2 atm. Tabung reaksi berisi medium yang telah steril diletakkan pada papan yang dimiringkan hingga agar mengeras.

3. *Nutrient Yeast Dextrose Agar (NYDA)*

Medium NYDA dibuat dengan melarutkan 8 g *Nutrient Broth* (NB), 5 g *yeast extract*, 10 g *dextrose*, dan 15 g agar (untuk medium NYDB tanpa agar) dalam 1000 ml akuades (Atlas, 2010). Medium dididihkan di atas kompor dengan dialaskan kasa hingga agar larut sempurna. Medium NYDA pada tabung reaksi, setelah medium di didihkan, tuang medium ke dalam tabung reaksi dengan menggunakan pipet sebanyak \pm 5 ml. Medium disterilkan dalam autoklaf selama 15 menit dengan suhu 121° C dan pada tekanan 2 atm. Tabung reaksi berisi medium yang telah steril diletakkan pada papan yang dimiringkan hingga agar mengeras.

Medium NYDB pada tabung reaksi, setelah medium didihkan, tuang tuang medium ke dalam tabung reaksi dengan menggunakan pipet sebanyak \pm 5 ml. Medium disterilkan dalam autoklaf selama 15 menit dengan suhu 121° C dan pada tekanan 2 atm.

Lampiran 2. Sterilisasi Peralatan dan Medium

Cawan petri dimasukkan ke dalam plastik tahan panas. Labu erlenmeyer berisi medium diberi label dan ditutup dengan sumbat kapas yang dibalut kertas *yellow pages*. Tabung reaksi berisi medium diberi sumbat kapas, dan dimasukkan ke dalam gelas *beaker* yang kemudian ditutup dengan kertas *yellow pages*. Seluruh peralatan dan medium disterilisasi dengan autoklaf pada suhu 121°C dan tekanan 2 atm selama 15 menit.

Lampiran 3. Isolat khamir asal daun bintaro (*Cerbera manghas*) koleksi Laboratorium Mikrobiologi UNJ

Tabel 7. Kode isolat khamir asal daun bintaro (*Cerbera manghas*)

No	Kode isolat asli	Kode Isolat	Asal Isolat/Tahun
1.	T.1.2.1	T1	Daun <i>Cerbera manghas</i> /2011
2.	T.1.1.2.R	T2	Daun <i>Cerbera manghas</i> /2011
3.	T.1.3.2	T3	Daun <i>Cerbera manghas</i> /2011
4.	T.1.3.3	T4	Daun <i>Cerbera manghas</i> /2011
5.	T.1.3.4	T5	Daun <i>Cerbera manghas</i> /2011
6.	T.1.3.5	T6	Daun <i>Cerbera manghas</i> /2011
7.	T.2.2.1	T7	Daun <i>Cerbera manghas</i> /2011
8.	T.2.2.2	T8	Daun <i>Cerbera manghas</i> /2011
9.	T.2.2.3	T9	Daun <i>Cerbera manghas</i> /2011
10	T.2.2.1.R	T10	Daun <i>Cerbera manghas</i> /2011
11.	T.2.3.1	T11	Daun <i>Cerbera manghas</i> /2011
12.	T.2.5.1	T12	Daun <i>Cerbera manghas</i> /2011
13.	T.3.1.1	T13	Daun <i>Cerbera manghas</i> /2011
14.	T.3.1.2	T14	Daun <i>Cerbera manghas</i> /2011
15.	T.3.1.3	T15	Daun <i>Cerbera manghas</i> /2011
16.	T.3.1.4	T16	Daun <i>Cerbera manghas</i> /2011
17.	T.4.2.2	T17	Daun <i>Cerbera manghas</i> /2011
18.	T.4.5.1.R	T18	Daun <i>Cerbera manghas</i> /2011
19.	T.4.5.3.R	19	Daun <i>Cerbera manghas</i> /2011

Lampiran 4. Zona hambat pertumbuhan kapang dan khamir

Tabel 8. Rata-rata zona hambat pertumbuhan kapang dan khamir

Isolat Khamir	Isolat Kapang	Zona hambat ulangan			Rata-rata zona hambat (mm)
		1 (mm)	2 (mm)	3 (mm)	
T1	A1	0,70	1,56	0,95	1,07
	A17	1,34	0,18	0,50	0,67
T3	A1	1,33	1,12	1,01	1,15
	A17	1,26	1,29	2,01	1,52
T4	A1	1,18	0,68	1,14	1,00
	A17	0,52	1,07	0,61	0,73

Keterangan: Isolat khamir T2, T5, T6, T7, T8, T9, T10, T11, T12, T13, T14, T15, T16, T17, T18, T19 tidak menghasilkan zona hambat

Lampiran 5. Perhitungan Statistik

Tabel 9. Uji anava dua arah pengaruh pemberian isolat khamir terhadap penghambatan pertumbuhan kapang

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable:zona_hambat

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	17.152 ^a	37	.464	19.502	.000
Intercept	2.938	1	2.938	123.585	.000
Kapang	.009	1	.009	.369	.545
Khamir	16.590	18	.922	38.774	.000
kapang * khamir	.554	18	.031	1.294	.216
Error	1.807	76	.024		
Total	21.896	114			
Corrected Total	18.959	113			

a. R Squared = .905 (Adjusted R Squared = .858)

Keterangan $\alpha = 0.05$

Kriteria pengujian:

Terima H_0 jika $\alpha < \text{Sig}$

Tolak H_0 jika $\alpha > \text{Sig}$

Kesimpulan :

$\alpha > \text{Sig} = 0.05 > 0.00$, maka tolak H_0 yang artinya terdapat pengaruh pemberian isolat khamir terhadap penghambatan pertumbuhan kapang. Tidak terdapat pengaruh pemberian isolat kapang terhadap penghambatan pertumbuhan kapang. Tidak terdapat interaksi antara isolat khamir dengan isolat kapang terhadap penghambatan pertumbuhan kapang

Tabel 10. Uji *Duncan* zona hambat pertumbuhan kapang dan khamir

zona_hambat

Duncan

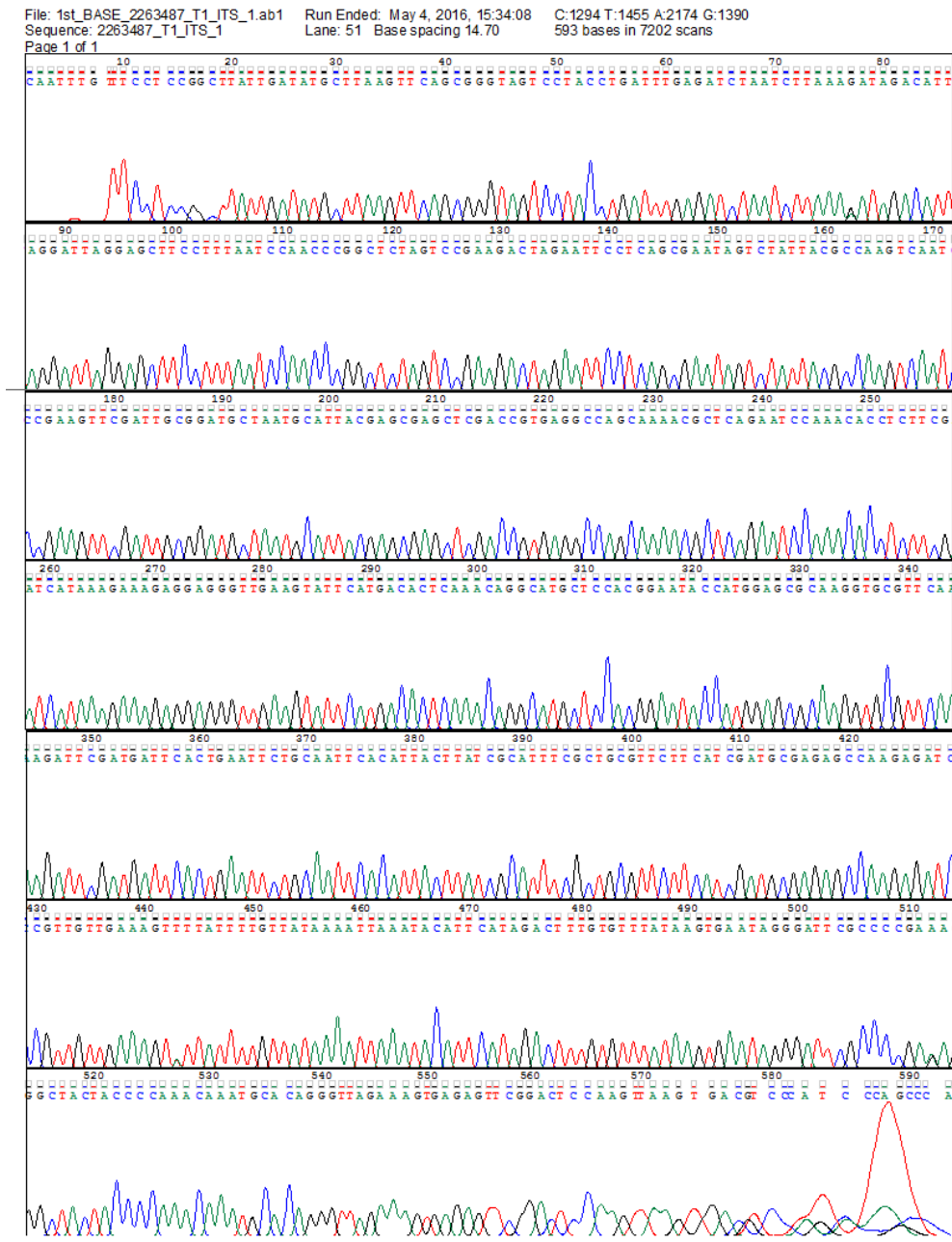
isolat_k hamir	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
T2	2	.0000		
T5	2	.0000		
T6	2	.0000		
T7	2	.0000		
T8	2	.0000		
T9	2	.0000		
T10	2	.0000		
T11	2	.0000		
T12	2	.0000		
T13	2	.0000		
T14	2	.0000		
T15	2	.0000		
T16	2	.0000		
T17	2	.0000		
T18	2	.0000		
T19	2	.0000		
T4	2		.8650	
T1	2		.8700	
T3	2			1.3350
Sig.		1.000	.960	1.000

Lampiran 6. Hasil pengamatan kurva pertumbuhan sel khamir

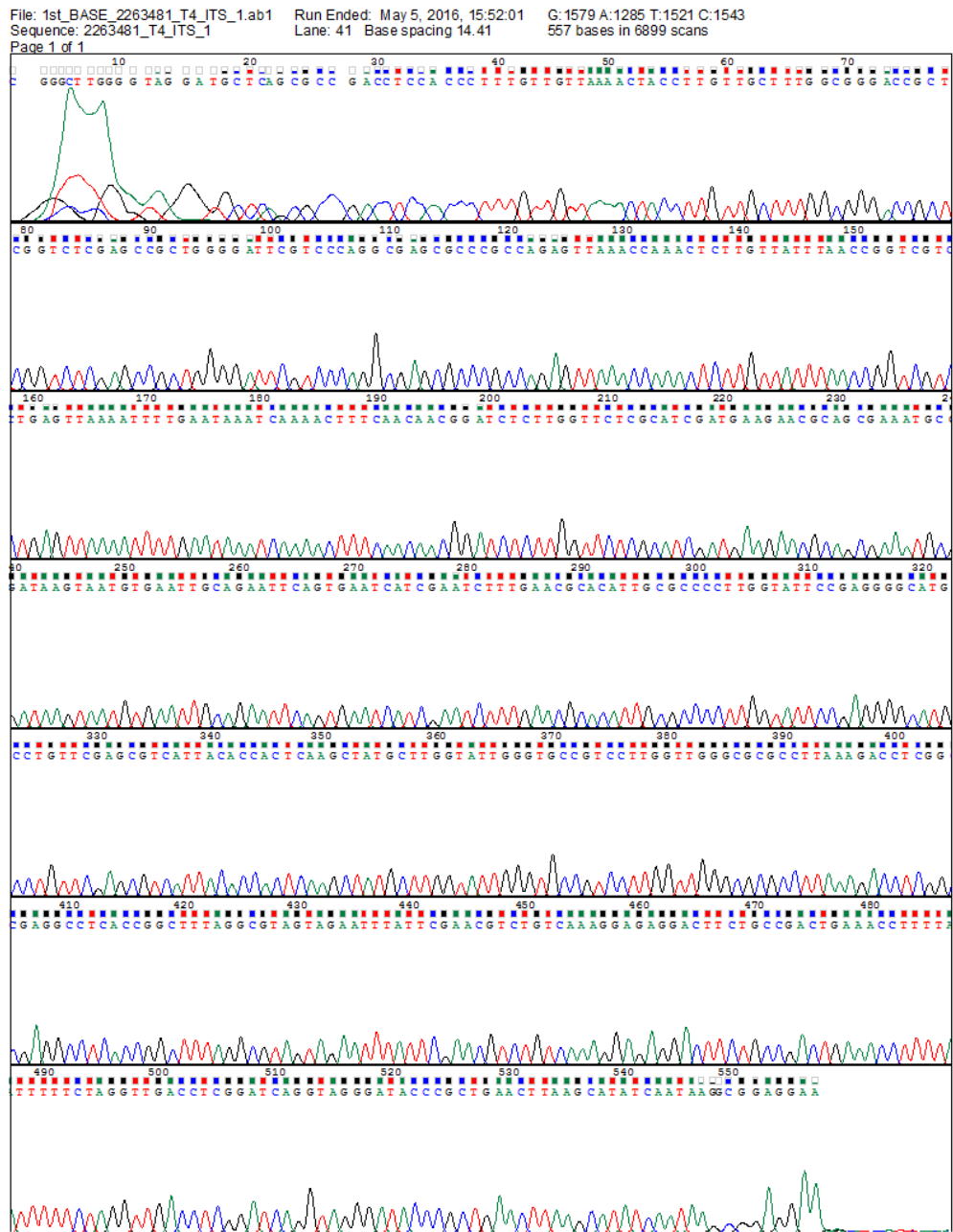
Tabel 11. Jumlah sel khamir pada media NYDB inkubasi selama 48 jam pada suhu 27-28°C.

Waktu (jam)	Isolat T1		Isolat T3		Isolat T4	
	Jumlah sel/ml	Jumlah sel (log)	Jumlah sel/ml	Jumlah sel (log)	Jumlah sel/ml	Jumlah sel (log)
0	500000	5.70	40000	4.60	150000	5.18
3	550000	5.74	50000	4.70	200000	5.30
6	650000	5.81	60000	4.78	150000	5.18
9	800000	5.90	75000	4.88	200000	5.30
12	900000	5.95	150000	5.18	200000	5.30
15	1000000	6.00	150000	5.18	400000	5.60
18	2500000	6.40	120000	5.08	350000	5.54
21	3500000	6.54	150000	5.18	400000	5.60
24	4000000	6.60	140000	5.15	500000	5.70
27	4500000	6.65	150000	5.18	850000	5.93
30	6500000	6.81	200000	5.30	1300000	6.11
33	9000000	6.95	550000	5.74	2500000	6.40
36	9000000	6.95	500000	5.70	2000000	6.30
39	9000000	6.95	500000	5.70	2000000	6.30
42	8900000	6.95	500000	5.70	2000000	6.30
45	8900000	6.95	500000	5.70	2000000	6.30
48	1550000	6.19	500000	5.70	500000	5.70

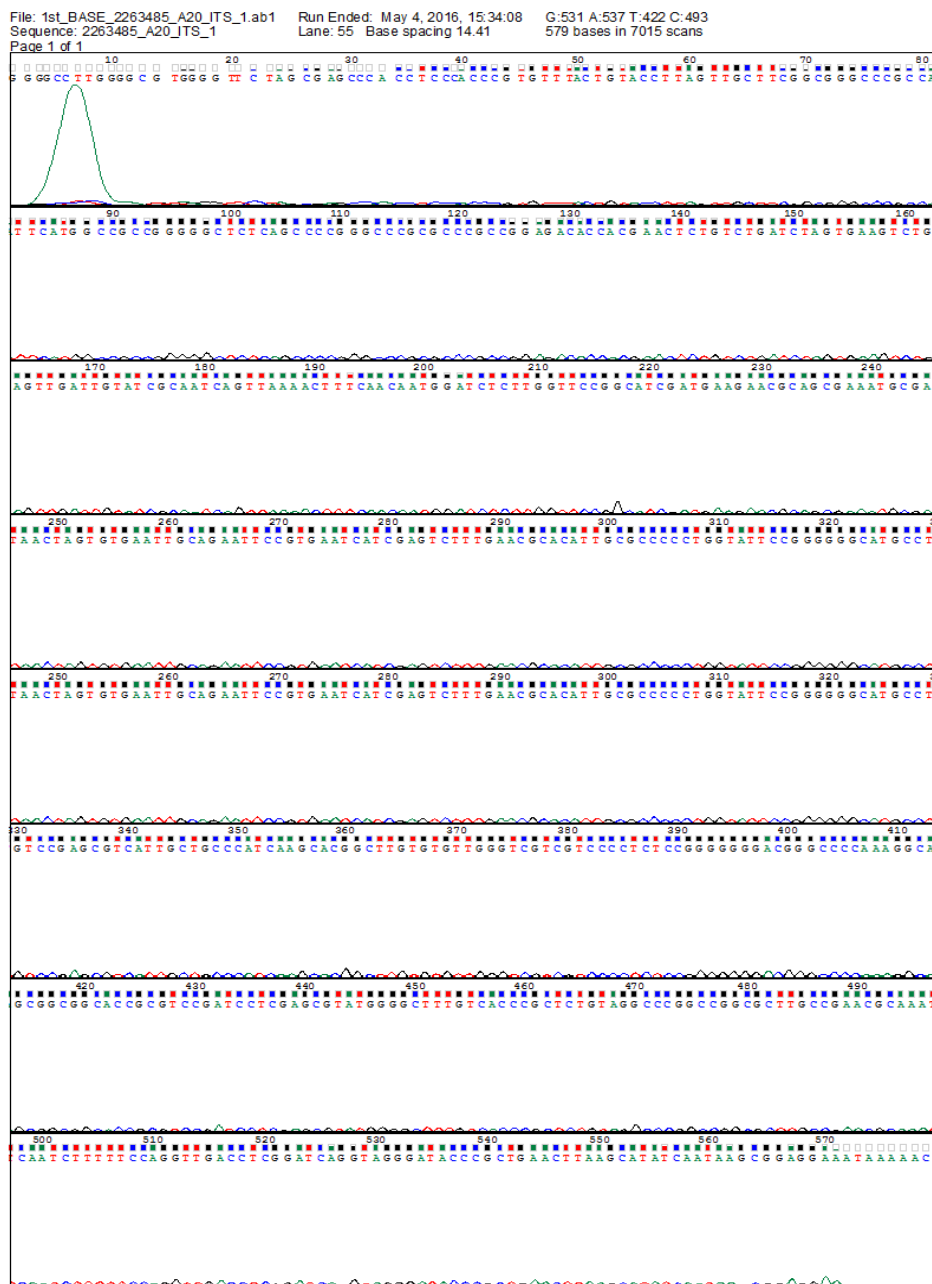
Lampiran 7. *Chromatogram* Hasil Sekuensing Isolat Khamir dan Kapang



Gambar 20. *Chromatogram* hasil sekuensing isolat khamir T1



Gambar 22. *Chromatogram* hasil sekuensing isolat khamir T4



Gambar 24. Chromatogram hasil sekuensing isolat kapang A17

Lampiran 8. Pengamatan Makroskopik Khamir dan Kapang

Tabel 12. Hasil pengamatan makroskopik khamir asal daun bintaro pada medium PDA berumur 48 jam, 27-28° C

Kode Isolat	Warna Koloni	Permukaan Koloni	Tekstur Koloni	Profil Koloni	Tepi Koloni
T.1	Oranye	Licin	<i>Mucoid</i>	Menggunung	Rata
T.15	Krem	Licin	<i>Mucoid</i>	Rata	Rata
T.18	Oranye	Kusam	<i>Butyrous</i>	Menggunung	Rata
T.13	Krem	Kusam	<i>Butyrous</i>	Rata	Rata
T.16	Putih	Kusam	<i>Butyrous</i>	Rata	Rata
T.14	Pink	Kusam	<i>Mucoid</i>	Rata	Rata
T.17	Putih	Kusam	<i>Butyrous</i>	Menggunung	Gerigi
T.5	Oranye	Licin	<i>Mucoid</i>	Menggunung	Rata
T.4	Putih	Kusam	<i>Butyrous</i>	Menggunung	<i>Filamentous</i>
T.12	Putih	Kusam	<i>Butyrous</i>	Rata	Rata
T.7	Putih	Kusam	<i>Butyrous</i>	Menggunung	<i>Filamentous</i>
T.8	Putih	Kusam	<i>Butyrous</i>	Rata	<i>Filamentous</i>
T.9	Krem	Licin	<i>Mucoid</i>	Menggunung	<i>Filamentous</i>
T.11	Putih	Kusam	<i>Butyrous</i>	Menggunung	<i>Filamentous</i>
T.6	Oranye	Kusam	<i>Mucoid</i>	Menggunung	Rata
T.2	Putih	Kusam	<i>Butyrous</i>	Menggunung	<i>Filamentous</i>
T.19	Putih	Kusam	<i>Butyrous</i>	Menggunung	Bergerigi
T.10	Putih	Kusam	<i>Butyrous</i>	Rata	Rata
T.3	Putih	Licin	<i>Mucoid</i>	Menggunung	<i>Filamentous</i>

Tabel 13. Hasil pengamatan makroskopik kapang asal buah apel busuk pada medium MEA berumur 7 hari, 27-28° C

No.	Kode isolat	Warna koloni	Tekstur koloni	Zonasi	Growing zone	Exudate drops	Radial furrow
1.	A1	<i>soft black</i> dengan tepi putih	Granula	Ada	Ada	Tidak ada	Ada
2.	A2	black dengan tepi putih	Granula	Ada	Ada	Tidak ada	Ada
3.	A3	black dengan tepi putih	Granula	Ada	Ada	Tidak ada	Ada
4.	A4	warm grey V		Tidak ada	Tidak ada	Tidak ada	Tidak ada
5.	A5	black dengan tepi putih	Granula	Ada	Ada	Tidak ada	Ada
6.	A6	black dengan tepi putih	Granulaa	Ada	Ada	Tidak ada	Ada
7.	A7	black dengan tepi putih	Granula	Ada	Ada	Tidak ada	Ada
8.	A8	black dengan tepi putih	Granula	Ada	Ada	Tidak ada	Ada
9.	A9	<i>soft black</i> dengan tepi putih	Granula	Ada	Ada	Tidak ada	Ada
10.	A10	<i>soft black</i> dengan tepi putih	Granula	Ada	Ada	Tidak ada	Ada
11.	A11	<i>soft black</i> dengan tepi putih	Granula	Ada	Ada	Tidak ada	Ada
12.	A12	<i>soft black</i> dengan tepi putih	Granula	Ada	Ada	Tidak ada	Ada
13.	A13	black dengan tepi putih	Granula	Ada	Ada	Tidak ada	Ada
14.	A14	black dengan tepi putih	Granula	Ada	Ada	Tidak ada	Ada
15.	A15	black dengan tepi putih	Granula	Ada	Ada	Tidak ada	Ada
16.	A16	<i>moss green</i> dengan tepi putih	Granula	Ada	Ada	Tidak ada	Tidak ada
17.	A17	<i>moss green</i> dengan tepi putih	Granula	Ada	Ada	Tidak ada	Tidak ada
18.	A18	<i>moss green</i> dengan tepi putih	Granula	Ada	Ada	Tidak ada	Tidak ada



LABORATORIUM BIOLOGI

Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
UNIVERSITAS NEGERI JAKARTA

Gedung C Kampus B UNJ Rawamangun, Jl. Perintis Ikn. 10 Jakarta 15922
Telp. 021-6694333

SURAT KETERANGAN Nomor : 04/Lab_Bio.B/KP/II/2017

Yang bertandatangan di bawah ini, Kepala Laboratorium Biologi FMIPA Universitas Negeri Jakarta, dengan ini menerangkan bahwa :

Nama : Andisa Shabrina

NIM : 3425122214

Program Studi : Biologi

Telah melakukan kegiatan penelitian di Laboratorium Mikrobiologi dan Genetika, Laboratorium Biologi, FMIPA Universitas Negeri Jakarta dengan judul penelitian "Aktivitas Biokontrol Khamir Asal Daun Bintaro (*Cerbera manghas* L.) Terhadap Kapang Perusak Buah Apel Malang (*Malus sylvestris* Mill.) Pascapanen" pada bulan Oktober 2015-Oktober 2016, dibimbing oleh Dr. Dalia Sukmawati, M.Si dan Iman Hidayat, Ph.D.

Demikian surat keterangan ini kami buat untuk dapat dipergunakan seperlunya.

Jakarta, 8 Februari 2017

Kepala Laboratorium Biologi
FMIPA Universitas Negeri Jakarta


Aming Sedayu, M.Sc
NIP. 19750911 200112 1 004

SURAT PERNYATAAN KEASLIAN SKRIPSI

Saya yang bertanda tangan di bawah ini, mahasiswa Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Negeri Jakarta:

Nama : Andisa Shabrina
No. Registrasi : 3425122214
Jurusan : Biologi
Program Studi : Biologi

Menyatakan bahwa skripsi yang saya buat dengan judul "AKTIVITAS BOKONTROL KHAMIR ASAL DAUN BINTARO (*Cerbera manghas* L.) TERHADAP KAPANG PERUSAK BUAH APEL MALANG (*Malus sylvestris* Mill.) PASCAPANEN" adalah

1. Dibuat dan diselesaikan oleh saya sendiri, berdasarkan data yang diperoleh dari hasil percobaan pada bulan Oktober 2015 - Oktober 2016.
2. Bukan merupakan duplikat skripsi yang pernah dibuat oleh orang lain atau jiplakan karya tulis orang lain dan bukan terjemahan karya tulis orang lain.

Demikian surat pernyataan ini saya buat dengan sesungguhnya dan saya bersedia menanggung segala akibat yang timbul jika pernyataan saya tidak benar.

Jakarta, Januari 2017

Pembuat pernyataan



Andisa Shabrina
NRM. 3425122214

DAFTAR RIWAYAT HIDUP PENULIS



ANDISA SHABRINA. Dilahirkan di Jakarta pada tanggal 2 Agustus 1994. Anak ketiga dari tiga bersaudara dari pasangan suami istri Bapak Hady Feisal dan Ibu Siti Gando Sary Zen. Penulis sekarang bertempat tinggal di Jalan Kecubung IV, Duren Sawit, Jakarta Timur. Pendidikan formal yang pernah ditempuh adalah SD Muhammadiyah 24 Rawamangun, lulus tahun 2006. Kemudian melanjutkan di SMPN 27 Jakarta lulus tahun 2009 dan melanjutkan di SMAN 54 Jakarta, lulus pada tahun 2012. Pada tahun 2012, penulis diterima sebagai mahasiswa program S1 Biologi di Universitas Negeri Jakarta melalui jalur SNMPTN tulis.

Selama masa perkuliahan, penulis mengikuti organisasi Kelompok Studi CMC *Acropora* UNJ. Penulis mengikuti kegiatan Cakrawala Biologi di Gunung Bunder pada tahun 2012, Studi Ilmiah Biologi pada tahun 2013.

Seminar yang pernah diikuti penulis diantaranya Seminar Nasional Biologi UNJ 2012 “Isu-Isu Kritis Lingkungan”; Workshop “*Analyzing Stem Cell Using Real Time PCR*” 2015. Pada tahun 2014-2016, penulis menjadi asisten praktikum untuk mata kuliah Mikrobiologi.

Pada tahun 2014, penulis mengikuti kegiatan KKL (Kuliah Kerja Lapangan) dengan judul penelitian “Isolasi *Plant Growth Promoting Rhizobacteria* (PGPR) dari Perakaran Tanaman Di Kawasan Hutan Wanagama” yang dilakukan di Gunung Kidul, Yogyakarta, dan PKL (Praktek Kerja Lapangan) “Deteksi dan Identifikasi Bakteri *Pantoea Stewartii* Pada

Benih Jagung (*Zea Mays*)” di Balai Besar Uji Standar Karantina Pertanian (BBUSKP) pada tahun 2015.