

Saringan aktiviti antikulat *Bacillus* spp. secara in vitro terhadap *Colletotrichum gloeosporioides*, agen penyebab penyakit antraknos

(In vitro screening of *Bacillus* spp. against *Colletotrichum gloeosporioides*, causal agent of anthracnose disease)

Farah Farhanah Haron, Nurul Farisa Reward, Norzaimawati Aman Nejis dan Halizah Zainal

Pengenalan

Antraknos yang disebabkan oleh *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc. merupakan penyakit utama yang menjadi faktor yang mengehadkan pengeluaran buah-buahan dan sayuran seperti betik, mangga, pitaya, markisa dan cili di seluruh dunia. Penyakit ini dilaporkan telah mengakibatkan kerugian hasil lepas tuai sehingga boleh menurunkan kebolehpasaran hasil sebanyak 10 – 80% di beberapa negara membangun dan menjadikan antraknos sebagai penyakit yang terpenting dari segi ekonomi di dunia. Ini kerana antraknos mampu menyerang semua bahagian tumbuhan pada setiap peringkat pertumbuhan dengan gejala bintik kuning, coklat, sehingga bertukar menjadi coklat gelap atau hitam pada daun; manakala bintik-bintik kecil, bulat dan menjadi kehitaman pada buah; bintik-bintik lesi gelap pada peringkat pembungaan; dan lesi coklat gelap memanjang sehingga mengakibatkan kanker dan mati rosot pada batang pokok. Walau bagaimanapun, gejala antraknos paling ketara sering dikesan pada buah-buahan yang masak, semasa tempoh sebelum dan selepas tuaian. Jangkitan antraknos melibatkan beberapa proses iaitu; (i) perlekatan dan percambahan konidia pada permukaan tumbuhan, (ii) penghasilan tiub sporangia dan pembentukan apressoria, (iii) penembusan kutikel atau epidermis tumbuhan, (iv) kolonisasi tisu tumbuhan, serta (v) penghasilan aservuli dan sporulasi. Walaupun simptom antraknos sering diperhatikan pada buah-buahan matang, apressoria yang terbentuk pada buah-buahan yang belum matang akan kekal dormant dan akan menunjukkan gejala setelah sampai peringkat masak.

Kawalan kimia lazimnya merupakan kaedah yang paling meluas digunakan untuk mengawal penyakit antraknos. Penyakit ini dapat dikawal secara berkesan dengan menyembur racun kulat seperti propiconazole, carbendazim, chlorothalonil, benlate, zineb, thiram dan captan yang didapati dapat menghalang pertumbuhan *C. gloeosporioides*. Racun kulat sistemik benomyl dan prochloraz dilaporkan mampu menghalang sepenuhnya (100%) pertumbuhan *C. gloeosporioides*. Manakala racun kulat bukan sistemik mancozeb menghalang hampir 80% pertumbuhan patogen ini. Penggunaan mancozeb racun kulat kimia kebiasaannya akan meninggalkan sisa baki atau residu berbahaya yang mempengaruhi alam sekitar dan kesihatan manusia. Racun kulat kimia telah terbukti

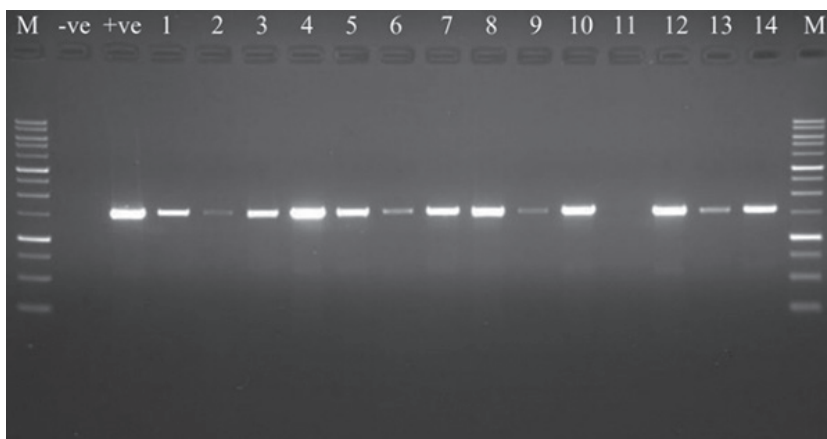
sangat berkesan untuk mengawal penyakit kulat dalam pelbagai tanaman, namun tidak dianggap sebagai penyelesaian untuk jangka masa panjang kerana risiko pendedahan yang berbahaya kepada kesihatan manusia dan alam sekitar, meninggalkan residu serta mampu meningkatkan kerintangan terhadap racun itu sendiri. Racun kimia ini memerlukan penggunaan secara berulang dengan kaedah semburan yang mempunyai kemungkinan besar untuk dilepaskan ke udara atau diserap ke dalam tanah dan saliran yang akan menjurus kepada perubahan dalam gas rumah hijau yang membawa kepada pemanasan global. Oleh itu, untuk mengelakkan risiko sedemikian, kaedah kawalan alternatif yang lebih selamat wajar dibangunkan. Kawalan biologi adalah salah satu strategi untuk mengawal penyakit ini yang merangkumi penggunaan mikroorganisma bermanfaat atau bersifat antagonis.

Bakteria endofit seperti bakteria daripada genus *Bacillus* secara umumnya telah diketahui mempunyai pelbagai ciri bermanfaat yang membantu tumbuhan secara langsung atau tidak langsung dalam pengambilan nutrien, peningkatan pertumbuhan, penghasilan fitohormon, perlindungan daripada patogen dan tekanan abiotik yang lain. Bacteria daripada genus ini adalah paling banyak dieksploitasi secara komersial dalam industri agroteknologi. *Bacillus* spp. sering dilaporkan mempunyai aktiviti antimikrob yang kuat terhadap patogen tumbuhan. Namun, potensinya masih terus diterokai melalui kajian-kajian penyelidikan ke arah pembangunan teknologi pertanian sebagai salah satu agen kawalan biologi berpotensi bagi kawalan penyakit tanaman. Oleh itu, seiring dengan usaha terkini MARDI dalam mengadaptasi penanaman bawang di Malaysia untuk sekuriti makanan negara, bakteria bermanfaat yang berasosiasi dengan tanaman bawang kecil, *Allium cepa* var. *aggregatum* telah dipencilkan. Kajian ini bertujuan untuk menilai aktiviti antikulat *Bacillus* spp. yang dipencilkan terhadap *C. gloeosporioides* iaitu agen penyebab penyakit antraknos.

Pemencilan dan pengenalpastian bakteria antagonis

Bakteria antagonis telah dipencilkan daripada tanaman bawang merah, *Allium cepa* var. *aggregatum*. Tisu tumbuhan daripada bahagian akar dan daun dipotong menjadi kepingan kecil dan kemudian permukaannya disterilkan dengan larutan etanol (1%) diikuti dengan larutan sodium hipoklorit (10%) dan seterusnya dibilas dengan air suling steril. Tisu tumbuhan telah dikeringkan dan diletakkan di atas medium agar nutrien (NA) dalam piring Petri dan diinkubasi selama 24 – 48 jam di bawah keadaan makmal. Kultur bakteria tulen diperoleh setelah proses subkultur secara berterusan. Seterusnya, pengenalpastian secara molekul telah dijalankan melalui analisis jujukan 16S rRNA. Pengekstrakan genomik DNA dengan menggunakan kit (Qiagen, Jerman) dan amplifikasi PCR telah dilakukan bagi mendapatkan jujukan gen rRNA 16S. Produk PCR diasingkan dalam gel agaros dan divisualisasikan bawah cahaya UV selepas proses elektroforesis

(Gambar 1). Proses blast dijalankan bagi mendapatkan persamaan jujukan bagi setiap pencilan dibandingkan dengan pangkalan data NCBI.



Gambar 1. Gel agarose menunjukkan amplifikasi DNA daripada spesies *Bacillus* berbeza

Terdapat 14 bakteria telah berjaya dipencilkan dan lima spesies *Bacillus* telah dikenal pasti (Jadual 1) iaitu *B. subtilis*, *B. velezensis*, *B. licheniformis*, *B. cereus* dan *B. megaterium*. Kelima-lima spesies *Bacillus* yang dikenal pasti ini adalah antara spesies yang dikatakan mempunyai aktiviti antimikrob yang berkesan terhadap patogen tumbuhan terpilih. Ini kerana spesies *Bacillus* dikatakan mempunyai aktiviti antimikrobial yang tinggi melalui penghasilan metabolit sekunder, mempunyai kebolehan untuk mengaruh kerintangan sistemik dalam tumbuhan perumah serta berkebolehan untuk bersaing dari segi ruang dan nutrien dengan fitopatogen tertentu. Kehadiran metabolit sekunder seperti bakteriosins, peptida, lipopeptida, dan siderofora juga dapat dikesan. Selain mempunyai sifat antimikrob, ia juga menunjukkan sifat menggalak pertumbuhan tanaman.

Jadual 1. Pengenalpastian *Bacillus* spp. yang berasosiasi dengan *Allium cepa* var. *aggregatum* berdasarkan jujukan gen 16s rDNA

Isolat	Kesamaan (%)	Spesies
BB1	99	<i>Bacillus subtilis</i>
BB2	100	<i>B. velezensis</i>
BB3	100	<i>B. subtilis</i>
BB4	100	<i>B. licheniformis</i>
BB5	100	<i>B. subtilis</i>
BB6	100	<i>B. cereus</i>
BB7	100	<i>B. cereus</i>
BB8	100	<i>B. megaterium</i>
BB9	100	<i>B. velezensis</i>
BB10	100	<i>B. velezensis</i>
BB11	n.d	n.d
BB12	99	<i>B. megaterium</i>
BB13	99	<i>B. velezensis</i>
BB14	100	<i>B. subtilis</i>

n.d. = tidak dikenal pasti

Saringan aktiviti antikulat *Bacillus* spp. terhadap *C. gloeosporioides*

Saringan aktiviti antikulat bagi *B. subtilis*, *B. velezensis*, *B. licheniformis*, *B. cereus* dan *B. megaterium* terhadap *C. gloeosporioides* telah dijalankan dengan menggunakan teknik

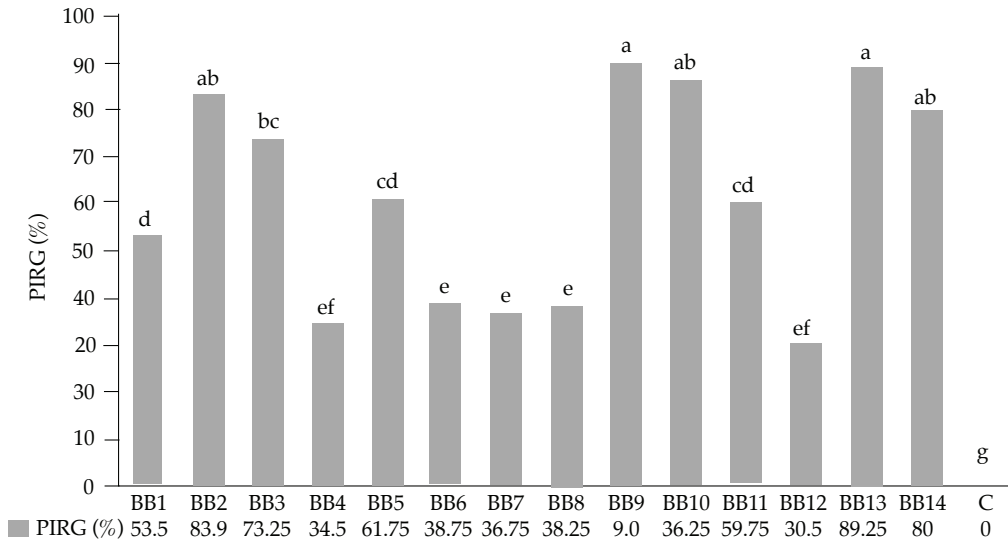
dwikultur. Medium *potato dextrose agar* (PDA) dituang ke dalam piring Petri berdiameter 9 cm. Bakteria dan kulat (0.5 cm) telah dikultur di kiri dan kanan pada jarak 2 cm dari pertengahan piring Petri yang sama dalam empat replikasi pada suhu bilik. Kesemua piring Petri dalam ujian dwikultur ini diinkubasi dan pertumbuhan serta zon perencatan di antara kulat dan bakteria diperhatikan berbanding dengan kawalan. Perencatan peratusan pertumbuhan jejari (PIRG) diukur selepas tujuh hari tempoh inkubasi menggunakan formula standard seperti yang berikut:

$$\text{PIRG} = \frac{(R1 - R2)}{(R1)} \times 100$$

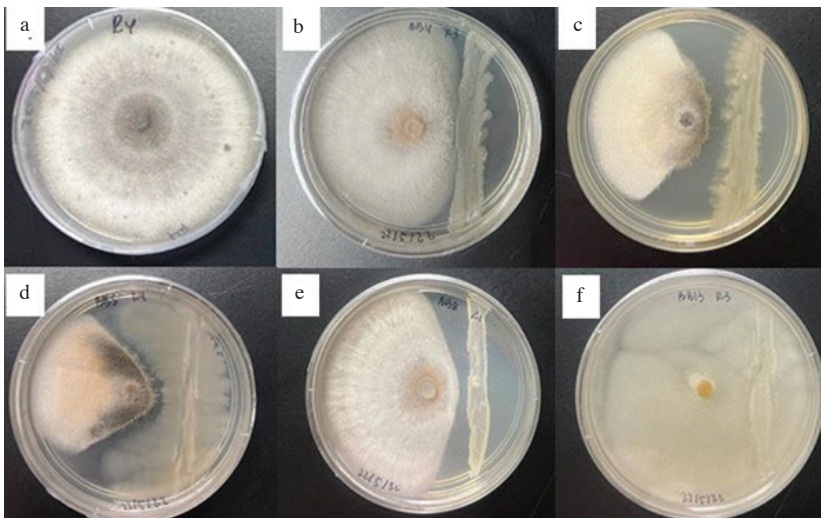
iaitu R1 adalah pertumbuhan jejari kulat di dalam piring Petri kawalan (cm) manakala R2 pula adalah pertumbuhan jejari kulat di dalam piring dwikultur (cm).

Keputusan kajian menunjukkan kesemua 14 isolat mempunyai kesan antikulat terhadap *C. gloesporioides* yang signifikan ($p < 0.05$) berbanding dengan kawalan yang menghalang pertumbuhan jejari koloni kulat secara in vitro. *Bacillus velezensis* menunjukkan peratus perencatan pertumbuhan jejari (PIRG) tertinggi; 90% (BB9), 89.25% (BB13), 86.25% (BB10) dan 83.5% (BB2) diikuti oleh *B. subtilis*; BB14 (80%) dan BB3 (73%) manakala *B. cereus*; BB6 (38.75%) dan BB7 (36.75%), *B. licheniformis*; BB4 (34.5%) dan *B. megaterium*; BB8 (38.25%) dan BB12 (30.5%) menunjukkan peratusan perencatan yang sederhana berbanding dengan kawalan (*Rajah 1*). Spesies *Bacillus* telah dilaporkan mempunyai aktiviti antimikrob yang kuat terhadap pelbagai jenis patogen tumbuhan dan *B. velezensis* turut dilaporkan mempunyai kesan yang kuat terhadap *Botrytis cinerea*, *Fusarium verticillioides*, *F. oxysporum*, *F. solani*, *Magnaporthe oryzae* dan *Ralstonia solanacearum*. Menurut kajian terkini yang dilaporkan pada 2022, *B. velezensis* berjaya menurunkan populasi patogen *Burkholderia glumae* yang merupakan patogen utama bagi tanaman padi. Hal ini disebabkan oleh sebatian bioaktif utama yang dihasilkan oleh *Bacillus* spp. seperti surfactin, iturin dan fengycin yang merupakan lipopeptida yang menyerang membran sel dan membawa kepada perubahan struktur dan pemusnahan sel.

Selain peratus perencatan pertumbuhan jejari yang menunjukkan aktiviti antikulat, interaksi antara *Bacillus* spp. dan *C. gloesporioides* turut diperhatikan melalui bioasai dwikultur seperti dalam *Gambar 2*. Zon perencatan terlihat jelas pada piring dwikultur (b) *B. licheniformis*, (c) *B. cereus*, (d) *B. subtilis*, (e) *B. megaterium* dan (f) *B. velezensis* berbanding dengan (a) kawalan. Piring F dan D menunjukkan pertumbuhan *B. velezensis* dan *B. subtilis* yang amat agresif sehingga wujudnya persaingan ruang pertumbuhan koloni dengan *C. gloesporioides*. Oleh itu, kedua-dua spesies ini boleh diketengahkan sebagai spesies berpotensi sebagai agen kawalan biologi kepada agen penyebab antraknos ini.



Rajah 2. Aktiwiti antikulat *Bacillus* spp. terhadap *C. gloeosporioides* pada hari ketujuh selepas inkubasi (²Min antara graf palang diikuti oleh huruf yang sama adalah tidak berbeza secara bererti, ujian LSD; $p < 0.05$)



Gambar 2. Zon perencatan *C. gloeosporioides* melalui ujian dwikultur pada hari ketujuh selepas inkubasi berbanding dengan (a) kawalan, (b) *B. licheniformis*, (c) *B. cereus*, (d) *B. subtilis*, (e) *B. megaterium* dan (f) *B. velezensis*

Kesimpulan

Bakteria bermanfaat daripada rizosfera *Allium cepa* var. *aggregatum* telah dikenal pasti terdiri daripada genus *Bacillus* iaitu *B. velezensis*, *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. cereus* dan *B. megaterium*. Kesemua spesies *Bacillus* ini mempunyai aktiviti antikulat yang mampu merencat pertumbuhan *C. gloeosporioides* dan berpotensi menjadi agen kawalan biologi yang berkesan terhadap penyakit

antraknos dalam pelbagai tanaman buah-buahan dan juga sayuran. Berdasarkan saringan, *B. velezensis* dan *B. subtilis* telah menunjukkan kesan antikulat yang paling tinggi. Oleh itu, kajian keberkesanan sedang dijalankan untuk mengesahkan aktiviti antikulat di peringkat lapangan.

Penghargaan

Pengarang merakamkan ucapan terima kasih kepada semua staf yang terlibat dalam kajian ini.

Bibliografi

- Akgül, D.S. dan Mirik, M. (2008). Biocontrol of *Phytophthora capsici* on pepper plants by *Bacillus megaterium* strains. *Journal of Plant Pathology* 1: 29 – 34
- Ashwini, N. dan Srividya, S. (2014). Potentiality of *Bacillus subtilis* as biocontrol agent for management of anthracnose disease of chilli caused by *Colletotrichum gloeosporioides* OGC1. *Biotech.* 4: 127 – 136
- Hafiz Husnain Nawaz, M.J. Nelly, R., Qiguang, H., Usmani, A., Chunhua, L. dan Weiguo, M. (2018). Evaluation of antifungal metabolites activity from *Bacillus licheniformis* OE-04 against *Colletotrichum gossypii*. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 146: 33 – 42
- Jiang, C.H, Chen, Y., Yan, F., Fan, Z.H. dan Guo, J.H. (2017). Whole-genome sequence of *Bacillus cereus* AR156, a potential biocontrol agent with high soilborne disease biocontrol efficacy and plant growth promotion. *Genome Announce* 5: 00886-17
- Kim, T.Y., Seo, H.H., Jun, S.N., Jeong-Yong, C. dan Chaw Ei, H.M. (2022). Antifungal potential of *Bacillus velezensis* CE 100 for the control of different *colletotrichum* species through isolation of active sipeptide, cyclo-(D-phenylalanyl-D-prolyl). *International Journal of Molecular Sciences* 23(14): 7786
- Ongena, M. dan Jacques, P. (2008). *Bacillus* lipopeptides: Versatile weapons for plant disease biocontrol. *Trends Microbiol.* 16: 115 – 125
- Paula, A.P., Luz, A.P., Pascale, B.B. dan Daniel, U.V. (2022). A biocontrol *Bacillus velezensis* strain decreases pathogen *Burkholderia glumae* population and occupies a similar niche in rice plants. *Biological Control* 176: 1 – 16
- Pengfei, J., Haonan, W., Zheng, T., Zhe, X., Ghulam Yaseen, D., Qing, X.L., Weiguo, M. dan Wenbo, L. (2020). Antifungal mechanism of bacillomycin D from *Bacillus velezensis* HN-2 against *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 163: 102 – 107
- Sijam dan Dikin (2005). Biochemical and physiological characterization of *Burkholderia cepacia* as biological control agent. *International Journal of Agriculture and Biology* 7: 1,560 – 8,530
- Snowdon, A.L. (2005). Reproduced from the crop protection compendium. CAB International, Wallingford, UK

Sutton, B.C. (1992). The genus *Glomerella* and its anamorph *Colletotrichum*. Dalam: *Colletotrichum: Biology, Pathology and Control*, (Bailey, J.A. dan Jeger, M.J., ed.), Wallingford, UK. 1: 1 – 26

Ringkasan

Antraknos adalah salah satu penyakit utama yang disebabkan oleh patogen kulat *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc. yang sering menjadi punca kehilangan hasil dalam penanaman buah-buahan dan sayuran seperti betik dan cili. Rizobakteria telah lama diakui berpotensi sebagai agen kawalan biologi dan mempunyai sifat antimikrob yang boleh dijadikan sebagai alternatif yang lebih selamat dan mesra alam dalam pengurusan penyakit tumbuhan bagi mengurangkan kebergantungan terhadap penggunaan racun kimia. Dalam kajian ini, aktiviti antikulat *Bacillus* spp. terhadap *C. gloeosporioides* telah disaring secara in vitro melalui ujian dwikultur. Aktiviti antikulat *Bacillus subtilis*, *B. velezensis*, *B. licheniformis*, *B. cereus* dan *B. megaterium* ditentukan dengan mengukur peratus perencatan pertumbuhan jejari kulat. Hasil kajian mencadangkan bahawa kesemua spesies *Bacillus* yang diuji menunjukkan aktiviti antikulat terhadap *C. gloeosporioides* yang mampu mengawal penyakit antraknos pada pelbagai tanaman.

Summary

Anthrachnose is one of the most serious diseases caused by the fungal pathogen *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc which often causing yield losses in fruit and vegetable cultivations such as papaya and chili. Rhizobacteria have long been recognized as potential biological control agents and have antimicrobial properties that can be used as a safer and more environmentally friendly alternative in plant disease management in order to reduce dependence on the use of chemical pesticides. In this study, the antifungal activity of *Bacillus* spp. against *C. gloeosporioides* was screened in vitro through a dual culture test. The antifungal activity of *Bacillus subtilis*, *B. velezensis*, *B. licheniformis*, *B. cereus* and *B. megaterium* was determined by measuring the percent inhibition of radial growth. The results of the study suggest that all the bacillus species tested show antifungal activity against *C. gloeosporioides* which is able to control anthracnose disease in various crops.

Pengarang

Farah Farhanah Haron (Dr.)
Pusat Penyelidikan Agrobiodiversiti dan Persekitaran
Ibu Pejabat MARDI, Persiaran MARDI-UPM
43400 Serdang, Selangor
E-mel: farahfarhanah@mardi.gov.my

Nurul Farisa Reward, Norzaimawati Aman Nejis dan Halizah Zainal
Pusat Penyelidikan Agrobiodiversiti dan Persekitaran
Ibu Pejabat MARDI, Persiaran MARDI-UPM
43400 Serdang, Selangor