

ABSTRAK DAN RINGKASAN EXECUTIVE



PAKET TEKNOLOGI FORMULASI BIOPESTISIDA BERBAHAN AKTIF BAKTERI *PSEUDOMONAS FLUORESCENS* DAN *BACILLUS SUBTILLIS* SEBAGAI AGENS PENGENDALI HAYATI PENYAKIT RHIZOCTONIA KEDELAI

**Penelitian Dilaksanakan sesuai dengan SPK antara Peneliti dengan
Lembaga Penelitian Universitas Jember Nomor :
312/UN25.3.1/LT.6/2013**

Ir. Abdul Majid, MP

NIDN. 0006096707

Ir. Paniman Ashna Miharjo, MP

NIDN. 0003095004

Ir. Usmani, MP

NIDN. 0008086206

**UNIVERSITAS JEMBER
DESEMBER, 2013**

Paket Teknologi Formulasi Biopestisida Berbahan Aktif Bakteri *Pseudomonas fluorescens* dan *Bacillus subtilis* sebagai Agens Pengendali Hayati Penyakit *Rhizoctonia* Kedelai

Peneliti : Abdul Majid¹, Paniman Ashna Miharjo¹, Usmadi¹
Mahasiswa terlibat : Musa Khadim¹ dan Agung¹
Sumber Dana :
• Sumber Dana Kerjasama : DIKTI 2013

¹Program Studi Agroteknologi, Fakultas Pertanian Universitas Jember

ABSTRAK

Penyakit *Rhizoctonia* pada kedelai disebabkan oleh jamur *Rhizoctonia solani* kuh. merupakan penyakit yang berbahaya.. Target penelitian adalah produk formulasi Biopestisida berbahan aktif kombinasi agens hayati *Pseudomonas fluorescens* dan *Bacillus subtilis* untuk pengendalian penyakit *rhizoctonia* pada kedelai. Hasil eksplorasi terbaru dan identifikasi, didapatkan bakteri antagonis sejumlah 155 isolat, yang terdiri dari bakteri *P.fluorescens* 148 isolat (dengan kode isolat Pf. 01 sampai Pf. 155) dan *Bacillus* 148 isolat dengan kode isolat (Bs. 01 sampi Bs. 145). Dan semua tidak menunjukkan sifat patogenik. Hasil penelitian secara invitro menunjukkan bahwa semua isolat bakteri antagonis yang telah terpilih memiliki kemampuan dalam menghambat jamur *R. solani* dengan besar daya penghambatan adalah 66 % sampai 77.6 %. Dan daya hambat terbesar adalah pada isolat BS 05, dan sekaligus memiliki konsistensi yang baik, baik pada isolat RS.1 sebesar (77,3 %) maupun pada isolat RS.2 yaitu sebesar (77,6 %) . Hasil penelitian juga dapat dilihat bahwa bakteri BS 80, PF 06, dan BS 58 memiliki konsistensi yang baik . Dengan demikian sangat memungkinkan dalam aplikasi pengujian di rumah kaca maupun aplikasi dilapangan untuk dilakukan kombinasi antar isolat *Pseudomonas* dan *Bacillus* yaitu khususnya pada strain BS-58, BS-91, PF-12, Pf-38 dan PF-88. Kombinasi isolat ini diharapkan mampu meningkatkan adaptibilitasnya dan dapat meningkatkan efektifitasnya

Kata Kunci : *P. fluorescens*, *B.subtillis*, *Rhizoctonia*, kedelai

Biopesticide Formulation Technology of *Pseudomonas fluorescens* and *Bacillus subtilis* Antagonistic Bacteria as biological control Rhizoctonia Soybean Diseases

Abdul Majid¹, Paniman Ashna Miharjo¹, Usmadi¹

¹The Program Study of Agroteknology, Agriculture Faculty , Jember University .

ABSTRAC

Rhizoctonia diseases on soybean caused by the fungus *Rhizoctonia solani* kuh. is a dangerous disease. Utilization of antagonistic bacteria formulation *P. fluorescens* and *B. subtilis* as biological control is expected to reduce the negative impact caused by the use of chemical pesticides. The research targeted is a biopesticide formulation product made from a combination of biological control agent *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas fluorescens* for control of Rhizoctonia diseases in soybean. Recent exploration results and the identification of bacteria recovered a total of 155 isolates antagonist, consisting of 148 bacterial isolates *P. fluorescens* (Pf isolates code. 01 to Pf. 155) and 148 isolates of Bacillus isolates code (Bs. 01 Sampi Bs. 145) . And all showed no pathogenic properties. Results of in vitro research showed that all isolates have been selected antagonistic bacteria have the ability to inhibit the fungus R. with great power solani inhibition was 66% to 77.6%. And the biggest resistor is in isolates BS 05, and thus has a good consistency, good at Rs.1 big isolates (77.3%) or at Rs.2 taker isolates (77.6%). The results can also be seen that bacteria BS 80, PF 06, and BS 58 has a good consistency. With so very possible in testing applications in the greenhouse or in field applications to be a combination between isolates of Pseudomonas and Bacillus strain that is particularly in BS-58, BS-91, PF-12, PF-38 and PF-88. The combination of these isolates are expected to increase and to improve the effectivity dan adaptibility.

Keywords: *P. fluorescens* , *B. subtilis*, *Rhizoctonia*, soybean

Paket Teknologi Formulasi Biopestisida Berbahan Aktif Bakteri *Pseudomonas fluorescens* dan *Bacillus subtilis* sebagai Agens Pengendali Hayati Penyakit *Rhizoctonia* Kedelai

Peneliti : Abdul Majid¹, Paniman Ashna Miharjo¹, Usmadi¹
Mahasiswa terlibat : Musa Khadim¹ dan Agung¹
Sumber Dana :
• Sumber Dana Kerjasama : DIKTI 2013
Kontak Email : majidhpt@gmail.com
Diseminasi (jika ada) : tidak ada

¹Program Studi Agroteknologi, Fakultas Pertanian Universitas Jember

Executive Summary

Penyakit *Rhizoctonia* pada kedelai disebabkan oleh jamur *Rhizoctonia solani* (Semangun, 1991). Hingga saat ini upaya pengendalian penyakit masih mengandalkan fungisida. Namun kenyataannya belum memberikan hasil yang memuaskan. Bahkan sebaliknya menurut Margino dan Mangoendiharjo (2002) pemakaian fungisida yang tidak bijaksana telah memberikan dampak negatif terhadap pencemaran lingkungan, kesehatan manusia, resistensi patogen serta dapat menimbulkan adanya strain baru bagi patogen yang lebih ganas serta terjadinya erosi agens hayati hingga mencapai 72 %. Oleh karena itu diperlukan alternatif pengendalian penyakit yang efektif dan ramah lingkungan, dan salah satunya adalah pengendalian hayati dengan memanfaatkan bakteri antagonis *Pseudomonas fluorescens* dan *Bacillus subtilis*.

Beberapa penelitian telah membuktikan bahwa bakteri perakaran seperti *P. fluorescens* dan *B. subtilis* mampu mengendalikan patogen tumbuhan (Whippes, 2008). Diketahui bahwa strain dari *P. fluorescens* untuk menekan *Rhizoctonia solani* pada kedelai (Majid, 2006), layu fusarium pada pisang (Majid, 2001), layu fusarium pada timun (Elad *et al.*, 2005, dan layu fusarium pada lombok (Raalmakerm, 2006. Kita *et al.* (2005) melaporkan bahwa *B. subtilis* efektif untuk mengendalikan patogen busuk akar timun dan rebah kecambah pada tomat, serta patogen layu bakteri (Anuratha and Gnanamanickam, 2007).

Keunggulan bakteri *P. fluorescens* mempunyai kemampuan yang lebih baik sebagai pengkoloni akar dibandingkan dengan *Bacillus* sp., dan punya kemampuan tumbuh pada suhu tanah yang lebih rendah, namun masalahnya adalah isolat *Pseudomonas* agak spesifik terhadap inang dan atau patogen sasaran. Masalah lainnya adalah sensitif terhadap stres lingkungan, karena *pseudomonas* tidak membentuk endospora (struktur tahan dari stres) seperti *Bacillus*. Keunggulan *Bacillus* dibandingkan dengan bakteri lain adalah kemampuannya menghasilkan endospora yang tahan terhadap panas dan dingin, juga terhadap pH ekstrim, pestisida, pupuk dan waktu penyimpanan Janisiewicz dan Roitman (2008; Tjahyono, 2000). Menurut Janisiewicz dan Roitman (2008) sering kali apabila beberapa bakteri antagonis dikombinasikan ternyata dapat meningkatkan adaptabilitas terhadap kultivar, tanah, patogen dan lingkungan sehingga memiliki potensi yang lebih unggul serta dapat mengendalikan penyakit secara simultan dan sinergi.

Hingga saat ini walaupun agens hayati memiliki beberapa keunggulan, namun pemanfaatannya masih menggunakan suspensi sel bakteri dan terbatas pada skala percobaan dan belum dilakukan pada skala lapangan. Salah satu kendalanya adalah terbatasnya produk formulasi agens hayati isolat lokal yang dapat diaplikasikan dalam skala luas. Produksi bioformulasi agens hayati *P. fluorescens* dan *B.subtilis* sangat diperlukan untuk membantu memecahkan masalah aplikasi secara luas dilapangan

Pembuatan formulasi agensia hayati harus memperhatikan beberapa hal yaitu dapat memelihara kelangsungan hidup mikrobia antagonis selama stabilisasi, pengeringan dan rehidrasi (Jo Handelsman dan Stabb, 2006), dapat menjaga kestabilan mikrobia antagonis selama aplikasi dan daya rekatnya pada target, serta dapat meningkatkan daya tahan hidup dan efektifitasnya setelah diaplikasikan (Schisler *et al.*, 2008)

Berdasarkan hal - hal tersebut perlu dilakukan penelitian untuk memperbaiki kemampuan antagonistik dan daya tahan agens hayati kombinasi Bakteri *P. fluorescens* dan *B. subtilis* dengan melalui penambahan sumber karbon, sumber mineral maupun bahan bahan tertentu pada berbagai komposisi dan kondisi formulasinya.

Tujuan khusus dari penelitian ini adalah sebagai berikut: (1) Seleksi untuk mendapatkan agens hayati *P. fluorescens* dan *B. subtilis* yang potensial dan kompatibel (dari 336 isolat yang telah di koleksi) dalam menekan penyakit Rhizoctonia. (2)Membuat formulasi biopestisida berbahan aktif bakteri *P. fluorescens* dan *B. Subtilis* yang terpilih sehingga memudahkan dalam aplikasinya dilapangan. (3)Mengetahui efektivitas produk formulasi dalam fungsinya sebagai biocontrol, biostimulan dan biofertilizer bagi tanaman kedelai. Dengan demikian jangka panjang akan dapat Mengurangi ketergantungan penggunaan pestisida untuk pengendalian penyakit tanaman dan dapat Meningkatkan kelestarian lingkungan dan mendukung pembangunan pertanian berkelanjutan.

Hasil penelitian akan menjadi daya ungkit (leverage) terhadap percepatan industri dibidang produk pestisida hayati, mempercepat realisasi dari pelaksanaan UU No 12 tahun 1992 tentang pelaksanaan pengendalian hama secara terpadu, serta Keamanan lingkungan. Terlepas dari kebutuhan dunia, produksi agens hayati di Indonesia sangat layak dikembangkan sebab Indonesia sangat kaya akan keanekaragaman hayati.

Prospek pemanfaatan teknologi hasil penelitian formulasi agens hayati sangat dibutuhkan terutama dalam menghadapi pasar global dimana persyaratan produk pertanian ramah lingkungan akan menjadi primadona. Pengendalian hayati memegang peran penting di dalam memajukan pertanian organik. Pengendalian hama dan penyakit tanaman secara hayati akan mengamankan produk ekspor hasil pertanian.

Peneliti telah melakukan penelitian eksplorasi, identifikasi dan karakterisasi bakteri dari berbagai lokasi, dan telah mengoleksi isolat murni sebanyak 336 strain (155 Isolat *P. fluorescens* dan 145 isolat *B.subtillis* Setiap strain dari isolat bakteri memiliki potensi yang berbeda, oleh karena itu diperlukan seleksi potensi sebagai antagonis baik secara *in vitro* maupun *in vivo* di rumah kaca (sebagaimana usulan penelitian berikut ini)

Seleksi isolat bakteri unggul sebagai agens pengendali hayati dilakukan dengan beberapa tahapan yaitu diseleksi di laboratorium secara *in vitro* dan seleksi secara *in vivo* di rumah kaca.

Seleksi Secara *In Vitro* di Laboratorium

a. Uji Penghambatan *In vitro*

Untuk memperoleh isolat unggul, dari 336 isolat yang telah dikoleksi dilakukan seleksi kemampuan penghambatan secara *in vitro* di laboratorium. Pengujian dilakukan melalui pengujian isolat antagonis secara tunggal maupun secara kombinasi. Uji kemampuan antagonis dilakukan dengan menggunakan medium King's B dan YDA. dan metode *Dual cultures* (Montealegre *et al.*, 2003). Satu cakram kultur murni *R. solani* (diameter 10 mm) diletakkan di tengah-tengah media uji dalam petridis. Sebanyak satu ose suspensi bakteri antagonis uji (kerapatan 5×10^9 CFU/ml) digoreskan membentuk lingkaran dengan diameter 6 cm mengelilingi cakram *R. solani* (Gambar 1). Petridis diinkubasikan selama 72 jam pada suhu 22°C kemudian diukur diameter koloni *R. solani* dan dibandingkan dengan kontrolnya (suspensi bakteri diganti dengan air steril). Masing-masing perlakuan diulang sebanyak empat kali.

b. Uji Kompetibilitas Antar Spesies Bakteri Antagonis

Pengujian kompetibilitas antar spesies bakteri antagonis (*Pseudomonas fluorescens* terhadap *Bacillus subtilis* atau sebaliknya) dilakukan untuk mengetahui kompetibilitasnya sebagai proses produksi massal kombinasi isolat agens hayati unggul (Arwiyanto *et al.*, 1999).

(a). *Pseudomonas fluorescens* terhadap *Bacillus subtilis*.

Pengujian dilakukan dengan cara menumbuhkan bakteri *Pseudomonas fluorescens* pada medium YPA dalam petridis, masing-masing petridis 6 titik biakan, kemudian menginkubasikan pada suhu kamar selama 24 jam. Setelah inkubasi petridis dibalik dan pada tutupnya dituangi dengan 1 ml kloroform dan dibiarkan selama 2 jam hingga semua kloroform menguap kemudian petridis dibalik seperti keadaan semula. Sebanyak 0,2 ml suspensi *Bacillus subtilis*. yang berumur 48 jam dicampur dengan 4 ml agar air 0,6 % suhu 50 °C, dan dituang dalam biakan *Pseudomonas fluorescens*. Hasilnya kemudian diinkubasikan pada suhu kamar selama 24 jam. Pengamatan didasarkan pada luas zona penghambatan yang terbentuk.

(b). *Bacillus spp* terhadap *Pseudomonas fluorescens*.

Pengujian dilakukan dengan cara menumbuhkan bakteri *Bacillus subtilis* pada medium *YPA* dalam petridis, masing-masing petridis 6 titik biakan, kemudian menginkubasikan pada suhu kamar selama 24 jam. Setelah inkubasi petridis dibalik dan pada tutupnya dituangi dengan 1 ml kloroform dan dibiarkan selama 2 jam hingga semua kloroform menguap kemudian petridis dibalik seperti keadaan semula. Sebanyak 0,2 ml suspensi *Pseudomonas fluorescens* yang berumur 48 jam dicampur dengan 4 ml agar air 0,6 % suhu 50^o C, dan dituang dalam biakan *Pseudomonas fluorescens*. Hasilnya kemudian diinkubasikan pada suhu kamar selama 24 jam. Pengamatan didasarkan pada luas zona penghambatan yang terbentuk.

Pengujian Secara In Vivo di Rumah Kaca

Pengujian penghambatan perkembangan penyakit rizoctonia pada kedelai oleh agens hayati isolat unggul dari hasil pengujian di laboratorium dilakukan untuk mendapatkan isolat unggul di rumah kaca. Hasil dari pengujian ini diharapkan dapat memperoleh isolat unggul yang mampu menghambat perkembangan patogen rizoctonia baik di laboratorium maupun di rumah kaca, yang selanjutnya akan digunakan untuk produksi massal/ bioformulasi.

a. Uji Penekanan Penyakit Rhizoctonia di Rumah Kaca

Pengujian ini untuk mengetahui seberapa besar kemampuan isolat unggul dari hasil seleksi laboratorium dalam menekan penyakit rizoctonia di rumah kaca. Pengujian dilakukan mengikuti Saravanan, *et al.* (2004). Masing-masing isolat antagonis unggul dibiakkan dalam 250 mL medium air pepton 0,6% selama 48 jam sambil digojok. Setelah itu kultur dipanen dengan menambahkan H₂O steril hingga konsentrasi bakteri antagonis masing-masing 2 x 10⁸ CFU/ml. Selanjutnya masing-masing sebanyak 50 ml suspensi isolat antagonis unggul tersebut di siramkan pada daerah perakaran tanaman kedelai dan dinkubasikan selama 60 hari. Pengamatan dilakukan berdasarkan keparahan penyakit yang diukur dengan menggunakan indeks keparahan penyakit sebagai berikut :

$$IP = \sum_{i=1}^k \frac{k \cdot nk}{Z \cdot N}$$

0 = tidak ada gejala; 1 = < 25 % daun layu; 2 = 25 < x < 75 % daun layu; 3 = semua daun layu, dimana : nk = jumlah tanaman yang terserang; penyakit dengan skala n (n= 0,1,2,3); N = jumlah tanaman yang diinokulasi; Z = skala penyakit tertinggi (= 3)

Hasil eksplorasi terbaru dan identifikasi, didapatkan bakteri antagonis sejumlah 155 isolat, yang terdiri dari bakteri *P.fluorescens* 148 isolat (dengan kode isolat Pf. 01 samapai Pf. 155) dan *Bacillus* 148 isolat dengan kode isolat (Bs. 01 samapi Bs. 145). Dan semua tidak menunjukkan sifat patogenik.

Hasil penelitian secara invitro menunjukkan bahwa semua isolat bakteri antagonis yang telah terpilih memiliki kemampuan dalam menghambat jamur R solani dengan besar daya penghambatan adalah 66 % sampai 77.6 %. Dan daya hambat terbesar adalah pada isolat BS 05, dan sekaligus memiliki konsistensi yang baik, baik pada isolat RS.1 sebesar (77,3 %) maupun pada isolat RS.2 yaitu sebesar (77,6 %).

Hasil penelitian juga dapat dilihat bahwa bakteri BS 80, PF 06, dan BS 58 memiliki konsistensi yang baik dalam menghambat jamur R solani baik pada strain R1.1 maupun Strain R2.2. hanya saja besar daya hambatannya lebih kecil. Dengan demikian sangat memungkinkan dalam aplikasi pengujian di rumah kaca maupun aplikasi dilapangan untuk dilakukan kombinasi antar isolat *Pseudomonas* dan *Bacillus* yaitu khususnya pada strain BS-58, BS-91, PF-12, Pf-38 dan PF-88. Kombinasi isolat ini diharapkan mampu meningkatkan adaptibilitasnya dan dapat meningkatkan efektifitasnya.

Berdasarkan hasil penelitian dapat diambil beberapa kesimpulan bahwa telah didapat dan diidentifikasi secara biokomia Bakteri antagonis *P. fluorescens* dan *B. subtilis* sejumlah (155 PF) dan (145 BS), dan semua tidak bersifat patogenik pada pengujian hipersensitif. Semua isolat bakteri antagonis yang telah terpilih memiliki kemampuan dalam menghambat jamur R. solani dengan besar daya penghambatan adalah 66 % sampai 77.6 %. Dan daya hambat terbesar adalah pada isolat BS 05, dan sekaligus memiliki konsistensi yang baik, baik pada isolat RS.1 sebesar (77,3 %) maupun pada isolat RS.2 yaitu sebesar (77,6 %). Memungkinkan dalam aplikasi pengujian di rumah kaca maupun aplikasi dilapangan untuk dilakukan kombinasi antar isolat *Pseudomonas* dan *Bacillus* yaitu khususnya pada strain BS-58, BS-91,

PF-12, Pf-38 dan PF-88. Kombinasi isolat ini diharapkan mampu meningkatkan adaptabilitasnya dan dapat meningkatkan efektifitasnya.

DAFTAR PUSTAKA

- Arwiyanto, T; Sudarmadi dan I. Hartana. 1996. Deteksi Strain *Pseudomonas solanacearum* Penghasil Bakteriosin. *Jurnal Perlindungan Tanaman Indonesia*. 2 (2): 60 - 65.
- Elad, Y. Dan R. Baker. 2005. Influence of Trece Amaouts of Cations and Siderophore Producing Pseudomonads on Chlamyospore Germination of *Fusarium oxysporum*. *Phytopath.* Vol 75. No. 9 : 1047.
- Janisiewicz, W.J. and J. Roitman, 2008. Biological Control of Blue Mold and Gray Mold on Apple and Pear with *Pseudomonas capacia*. *Phytopathology* 78 : (12). 1697-1700pp
- Jo Handelsman dan E.V. Stabb, 2003. Biocontrol of soilborne plant pathogens. *The Plant Cell* 8:1855-1869.
- Kita, N., T. Ohya, H. Uekusa, K. Nomura, M. Manago and M. Shoda. 2005. biological control of damping-off of tomato seedlings and cucumber phomopsis root rot by *Bacillus subtilis* RB 14-c. *JARQ* 39:109 – 114
- Majid, A. 2006. Pengendalian Hayati Penyakit Layu Fusarium Pada Pisang dengan Psedomonas flourescents *Agri Journal*, 8
- Schisler, D. A., Slininger, P. J., Behle, R. W., and Jackson, M. A. 2008. Formulation of *Bacillus* spp. for biological control of plant diseases. *Phytopathology* 94:1267-1271.
- Semangun, H. 1991. *Penyakit-Penyakit Tanaman Hortikultura di Indonesia*. Gadjah Mada University Press. Yogyakarta
- Tjahjono, B. 2000. Bakteri untuk pengendalian hayati penyakit tanaman. *Dalam Makalah Seminar Sehari Perhimpunan Fitopatologi Indonesia*. Malang. 03p.
- Whippes, J.M. 2008. Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. *Journal of Experimental Botany* 52:487-511.