

Teknik Produksi dan Formulasi Bakteri Kitinolitik untuk Pengendalian Penyakit Karat Kedelai

Tri Puji Priyatno, Chaerani, Y. Suryadi, dan M. Sudjadi

Balai Penelitian Bioteknologi Tanaman Pangan, Bogor

ABSTRAK

Teknik produksi dan formulasi tiga isolat unggulan bakteri kitinolitik (6a, 6m, dan 7) telah dipelajari untuk pengembangan biofungisida patogen karat kedelai (*Phakopsora pachyrhizi*). Di antara empat jenis media yang diuji, PDYB dengan kandungan *yeast extract* 0,75% merupakan media yang paling efisien dan efektif menghasilkan jumlah sel bakteri tertinggi. Waktu panen sel yang terbaik adalah 24 jam setelah inkubasi. Isolat 6m dan 7 memproduksi sel tertinggi pada suhu 32°C sedangkan isolat 6a pada suhu 24°C. Kecepatan agitasi optimum untuk ketiganya adalah 125 rpm. Formulasi bakteri kitinolitik dalam bentuk cair, mengandung isolat tunggal maupun kombinasi, lebih efektif menekan perkembangan penyakit karat di rumah kaca dibandingkan dengan formulasi tepung. Formulasi cair mengandung kombinasi isolat 6m dan 7 bersifat sinergistik dibandingkan dengan pengaruh formulasi masing-masing isolat dalam menekan perkembangan penyakit, yaitu sebesar 52,7%.

Kata kunci: Bakteri kitinolitik, biofungisida, *Phakopsora pachyrhizi*

ABSTRACT

Techniques for propagation and formulation of three selected chitinolytic bacteria (isolates 6a, 6m, and 7) were studied to develop biofungicides for the control of soybean rust pathogen (*Phakopsora pachyrhizi*). Among four media tested, PDYB containing 0.75% yeast extract was the most suitable medium for the cultivation of the bacteria in terms of cost production. Maximum cell densities of the bacteria peaked at 24 hr after incubation. Optimum incubation temperature for isolates 6m and 7 was 32°C whereas for isolate 6a was lower, 24°C. Cell densities of the three isolates reached the highest at 125 rpm agitation speed. Liquid formulation of the chitinolytic bacteria, either applied singly or in combination in screenhouse was more effective than the powder formulation. Liquid formulation mixture isolates of 6m and 7 gave synergistic effect on disease suppression (52.7%) compared to that when each isolate was applied singly.

Key words: Chitinolytic bacteria, biofungicide, *Phakopsora pachyrhizi*

PENDAHULUAN

Pemanfaatan mikroba kitinolitik merupakan salah satu cara pengendalian hayati yang efektif untuk jamur patogen tanaman, karena mekanisme pengendaliannya tidak tergantung pada ras patogen dan tidak merangsang timbulnya resistensi (Mazzone, 1987). Kitinase yang diproduksi mikroba dapat menghidrolisis struktur kitin, senyawa utama penyusun dinding sel tabung kecambah spora dan miselia, sehingga jamur tidak mampu

menginfeksi tanaman. Salah satu penyakit sasaran yang potensial dikendalikan dengan mikroba kitinolitik adalah penyakit karat daun kedelai yang disebabkan oleh jamur *Phakopsora pachyrhizi* Syd. Penyakit ini sukar dikendalikan dengan varietas tahan karena pergeseran ras patogen yang cepat sementara sumber ketahanan kedelai sangat terbatas (Kardin, 1989; Sumarno dan Sudjono, 1977; Quebral, 1977).

Seleksi dari 60 isolat mikroba kitinolitik yang dilakukan sejak tahun 1995 di Balai Penelitian Bioteknologi Tanaman Pangan (Balitbio) menghasilkan tiga isolat bakteri penghasil kitinase unggulan yang efektif terhadap jamur patogen karat kedelai (Sudjono dan Sutoyo, 1996; Priyatno *et al.*, 1999; Sudjono *et al.*, 1999).

Penelitian ini menyajikan teknik produksi massal dan formulasi ketiga isolat bakteri terpilih untuk dikembangkan menjadi biofungisida antipatogen karat.

BAHAN DAN METODE

Teknik Produksi Bakteri Kitinolitik

Isolat Bakteri Penghasil Kitinolitik yang Diuji

Isolat bakteri 6a, 6m, dan 7 yang telah diketahui efektif terhadap jamur patogen karat dan mempunyai aktivitas kitinase tertinggi (Sudjono dan Sutoyo, 1996; Priyatno *et al.*, 1999) digunakan dalam percobaan ini. Inokulum ketiga bakteri diperoleh dari biakan berumur 24 jam setelah inokulasi (jsi) pada media PDYB (sari kentang 25%, *dextrose* 2%, *yeast extract* 0,5%, air 1000 ml) yang diinkubasi pada suhu kamar (32°C) dengan kecepatan agitasi 125 rpm pada *orbital shaker*. Semua media percobaan (volume 30 ml dalam gelas erlenmeyer 100 ml) diautoklaf selama 15 menit pada suhu 121°C dan tekanan uap 1,5 atm.

Pengaruh Jenis Media terhadap Produksi Sel Bakteri

Pada penelitian tahap pertama, ketiga isolat bakteri diuji pertumbuhannya pada empat macam media cair, yaitu PDYB, LB (*tryptone* 1%, *yeast extract* 0,5%, NaCl 1%, air 1000 ml), King's B (*protease peptone* 2%, gliserin 1,5%, KH_2PO_4 0,15%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,15%, air 1000 ml), dan NB (pepton 0,5%, *beef extract* 0,3%, air 1000 ml). Suspensi bakteri (0,1 ml) berumur 24 jam diinokulasi pada media uji kemudian diagitasi pada 125 rpm selama 24 jam pada suhu 32°C. Populasi bakteri diamati dengan menggunakan spektrofotometer (λ 600 nm).

Hasil pengujian pada tahap ini menunjukkan bahwa medium PDYB menghasilkan jumlah/populasi sel bakteri tertinggi dibandingkan dengan ketiga jenis media lainnya sehingga pada tahap pengujian berikutnya ketiga bakteri ditumbuhkan pada medium PDYB.

Pengaruh Kandungan *Yeast Extract* terhadap Produksi Sel Bakteri

Bakteri berumur 24 jsi (0,1 ml) dari tiap isolat yang diuji diinokulasi pada medium PDYB dengan empat macam konsentrasi *yeast extract* (0,25; 0,5; 0,75; dan 1,0%). Media diagitasi dengan kecepatan 125 rpm pada suhu 32°C. Pertumbuhan bakteri setelah 24 jam diamati dengan menggunakan spektrofotometer (λ 600 nm).

Laju Pertumbuhan Bakteri pada Media Terpilih

Untuk mengetahui waktu panen sel yang tepat, ketiga isolat bakteri diuji laju pertumbuhannya pada medium PDYB (1% *yeast extract*). Laju pertumbuhan bakteri dari tiap isolat diamati pada 2, 4, 6, 18, 24, 48, dan 72 jsi dengan menggunakan spektrofotometer (λ 600 nm).

Rancangan Percobaan

Pada tiap percobaan digunakan rancangan faktorial dalam rancangan acak lengkap dengan 3-5 ulangan.

Keefektifan Biofungisida Berbahan Aktif Bakteri Kitinolitik terhadap Patogen Karat Kedelai

Formulasi Biofungisida

Formulasi biofungisida dari tiap isolat dibuat dalam bentuk cair menggunakan akuades dan dalam bentuk tepung dapat dibasahkan (*wettable powder*) menggunakan kaolin. Pada setiap jenis formulasi mengandung gelatin 0,005% (bahan perekat), Triton X-100 0,005% (bahan penyebar), gliserin 0,01% (bahan pelembab), dan molase 0,05% (nutrisi stimulan dan pelindung dari sinar UV).

Aplikasi Biofungisida di Rumah Kasa

Biakan bakteri isolat 6a, 6m, dan 7 berumur 24 jam pada media PDYB (*yeast extract* 1%) disentrifugasi (4500 rpm, 10 menit). Pelet bakteri diresuspensi dengan akuades steril kemudian ditambahkan kedalam masing-masing formulasi, hingga diperoleh kepadatan 10^{13} sel/ml atau 10^{13} sel/g formulasi. Formulasi disemprotkan pada tanaman kedelai berumur 2 minggu setelah tanam yang telah diinokulasi sehari sebelumnya dengan 10 ml uredospora jamur karat per tanaman (10^7 spora/ml air mengandung Tween 20 0,02%). Setiap jenis formulasi mengandung perlakuan satu macam isolat saja (6a, 6m, atau 7), kombinasi dua isolat (6a + 6m, 6a + 7, atau 6m + 7), atau tiga macam isolat (6a + 6m + 7). Sebagai pembanding perlakuan adalah tanaman yang disemprot dengan formulasi saja dan tanaman yang tidak diinokulasi dengan jamur patogen karat dan tidak disemprot formulasi. Intensitas penyakit karat diamati pada 2 dan 4 minggu setelah penyemprotan menggunakan skala 0-9 dari Sinclair (1982), yaitu 0 = tidak tampak pustul karat dan 9 = 90% luas daun terkena pustul karat dan daun gugur.

Rancangan Percobaan

Setiap percobaan menggunakan rancangan faktorial dalam rancangan acak lengkap dengan 5 ulangan.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Teknik Produksi Bakteri Kitinolitik

Setiap isolat bakteri kitinolitik membutuhkan jenis media yang berbeda untuk pertumbuhannya (Tabel 1). Isolat 6a dan 6m memproduksi sel paling rendah pada media King's B, sedangkan pada media NB, LB, dan PDYB, produksi selnya tinggi dengan tingkat yang tidak berbeda nyata antarmedia. Kedua isolat ini diduga tidak mampu memanfaatkan gliserin sebagai sumber karbon. Isolat 7 mampu memanfaatkan semua jenis nutrisi yang ada dalam keempat jenis media. Secara umum media yang efisien untuk produksi sel ketiga bakteri adalah PDYB.

Kandungan *yeast extract* dalam PDYB berpengaruh nyata terhadap produksi sel ketiga isolat bakteri kitinolitik (Tabel 2). Hubungan antara keduanya bersifat linier (Gambar 1). Kandungan *yeast extract* 0,75% sudah cukup efisien untuk produksi sel karena pengaruhnya tidak berbeda nyata dengan kandungan 1%.

Tabel 1. Produksi sel tiga isolat bakteri kitinolitik pada empat jenis media

Media	Nilai rapat optik		
	Isolat 6a	Isolat 6m	Isolat 7
King's B	0,192 y ^b	0,220 y ^b	0,543 x ^a
NB	0,560 x ^a	0,557 x ^a	0,482 x ^a
LB	0,535 x ^a	0,506 x ^a	0,545 x ^a
PDYB	0,579 x ^a	0,560 x ^a	0,560 x ^a

Angka-angka dalam satu lajur yang diikuti oleh huruf sama tidak berbeda pada taraf nyata 5% berdasarkan uji BNT; ns = tidak nyata, rata-rata dari 5 ulangan

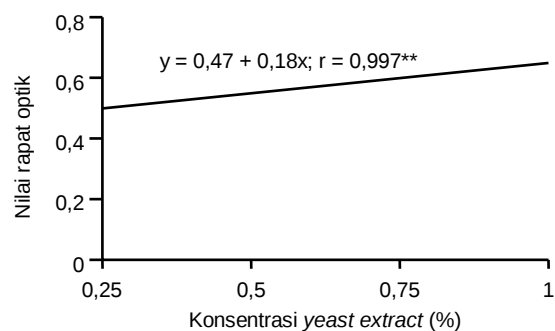
Tabel 2. Produksi sel tiga isolat bakteri kitinolitik pada media PDYB dengan empat tingkat konsentrasi *yeast extract*

Kandungan <i>yeast extract</i> (%)	Nilai rapat optik			Total
	Isolat 6a	Isolat 6m	Isolat 7	
1,00	0,639 ^{ns}	0,634 ^{ns}	0,685 ^{ns}	0,635 ^a
0,75	0,642 ^{ns}	0,630 ^{ns}	0,609 ^{ns}	0,613 ^{ab}
0,50	0,558 ^{ns}	0,609 ^{ns}	0,552 ^{ns}	0,570 ^{bc}
0,25	0,542 ^{ns}	0,558 ^{ns}	0,558 ^{ns}	0,516 ^c

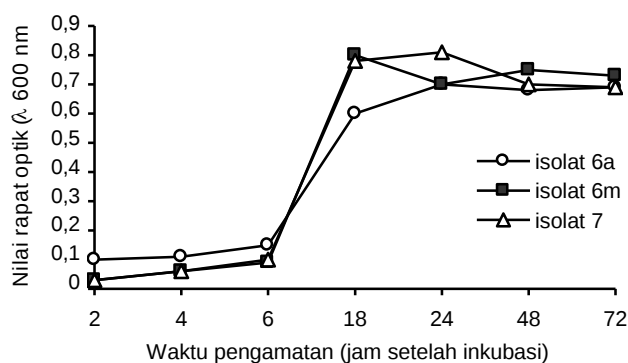
Angka-angka dalam satu lajur yang diikuti oleh huruf sama tidak berbeda pada taraf nyata 5% berdasarkan uji BNT; ns = tidak nyata, rata-rata dari 5 ulangan

Fase log pertumbuhan bakteri ketiga isolat terjadi pada 6-18 jsi (Gambar 2). Waktu pemanenan bakteri pada media PDYB yang paling tepat adalah 24 jsi pada saat pertumbuhan mencapai puncaknya dan viabilitas sel masih tinggi.

Suhu dan kecepatan agitasi berpengaruh nyata terhadap pertumbuhan bakteri kitinolitik. Setiap isolat membutuhkan suhu optimum yang berbeda untuk pertumbuhan maksimum. Isolat 6m dan 7 memproduksi sel tertinggi pada suhu 32°C sedangkan isolat 6a pada suhu 24°C. Kecepatan agitasi optimum untuk ketiga isolat adalah 125 rpm (Tabel 3). Peningkatan kecepatan agitasi akan menaikkan difusi oksigen ke dalam media sehingga mendorong peningkatan absorpsi oksigen oleh bakteri.



Gambar 1. Hubungan antara konsentrasi *yeast extract* dengan produksi sel bakteri kitinolitik 6a, 6m, dan 7 pada media PDYB



Gambar 2. Laju pertumbuhan tiga isolat bakteri kitinolitik pada media PDYB

Tabel 3. Pengaruh suhu inkubasi dan agitasi terhadap produksi sel tiga isolat bakteri kitinolitik

Suhu inkubasi (°C)	Agitasi (rpm)	Nilai rapat optik		
		Isolat 6a	Isolat 6m	Isolat 7
24	75	0,569 x ^a	0,603 x ^a	0,604 x ^a
	100	0,544 y ^b	0,636 x ^a	0,613 y ^a
	125	0,695 x ^a	0,647 x ^a	0,687 x ^a
28	75	0,547 x ^a	0,568 y ^a	0,551 y ^a
	100	0,607 x ^a	0,622 y ^a	0,605 y ^a
	125	0,613 x ^b	0,706 x ^a	0,697 x ^a
32	75	0,604 x ^a	0,589 y ^a	0,612 y ^a
	100	0,658 x ^b	0,764 x ^a	0,639 y ^b
	125	0,640 x ^b	0,733 x ^a	0,742 x ^a

Angka-angka dalam satu lajur yang diikuti oleh huruf sama tidak berbeda pada taraf nyata 5% berdasarkan uji BNT; ns = tidak nyata, rata-rata dari 3 ulangan

Keefektifan Formulasi Biofungisida

Tabel 4. Pengaruh aplikasi formulasi biofungisida bakteri terhadap intensitas serangan patogen karat kedelai

Formulasi	Isolat	Intensitas penyakit karat (%)	
		2 msa	4 msa
Cair	6a	27,5 ^a	78,6 ^a
	6m	19,6 ^{cde}	47,8 ^d
	7	6,5 ⁱ	38,1 ^c
	6a + 6m	21,7 ^{bd}	68,1 ^b
	6a + 7	8,6 ^{ghi}	47,4 ^d
	6m + 7	8,2 ^{ghi}	28,9 ^f
	6a + 6m + 7	12,5 ^{gh}	49,1 ^d
Tepung	6a	16,0 ^{ef}	58,1 ^c
	6m	24,2 ^{abc}	81,6 ^a
	7	25,4 ^{ab}	80,4 ^a
	6a + 6m	24,0 ^{abc}	80,9 ^a
	6a + 7	25,6 ^{ab}	76,6 ^a
	6m + 7	21,8 ^{bcd}	78,7 ^a
	6a + 6m + 7	18,0 ^{de}	53,1 ^{cd}
Kontrol (formulasi cair tanpa bakteri kitinolitik)		16,4 ^{ef}	56,6 ^c
Kontrol (air saja dan tanaman tidak diinokulasi jamur patogen karat)		7,7 ^{hi}	39,5 ^e

Angka-angka dalam satu lajur yang diikuti oleh huruf sama tidak berbeda pada taraf nyata 5% berdasarkan uji BNT: ns = tidak nyata, rata-rata dari 5 ulangan, msa = minggu setelah aplikasi

Formulasi cair bakteri kitinolitik pada umumnya lebih efektif dalam menekan perkembangan pustul karat dibandingkan dengan formulasi tepung. Efek pe-nekanan terhadap perkembangan gejala penyakit ini terlihat lebih nyata pada 4 minggu setelah aplikasi (Tabel 4). Kaolin, bahan dasar formulasi tepung, diduga menurunkan viabilitas bakteri kitinolitik setelah diaplikasi ke tanaman karena sifat-nya yang higroskopik.

Formulasi cair mengandung kombinasi isolat 6m + 7 berpengaruh sinergis dalam menekan perkembangan serangan patogen karat hingga 4 minggu setelah aplikasi dibandingkan dengan formulasi cair mengandung masing-masing isolat (Tabel 4). Dibandingkan dengan intensitas penyakit karat yang tertinggi, formulasi cair dari kombinasi isolat 6m + 7 dapat menekan intensitas penyakit hingga 52,7%. Isolat 6a merupakan bakteri kitinolitik yang paling rendah efektivitasnya. Efektivi-tasnya dapat diperbaiki dengan mengkombinasikannya dengan isolat lainnya, na-mun hal ini akan menurunkan efektivitas kedua isolat lainnya.

KESIMPULAN DAN SARAN

Teknik produksi bakteri kitinolitik dalam skala laboratorium telah diperoleh namun masih perlu disesuaikan kembali bila produksi bakteri akan digandakan pada skala fermentor. Secara umum bakteri kitinolitik dapat diproduksi pada me-dia PDYB mengandung *yeast extract* 0,75% pada suhu

32°C (untuk isolat 6m dan 7) atau 24°C (untuk isolat 6a) dan kecepatan agitasi 125 rpm selama 24 jam.

Biofungisida formulasi cair berbahan aktif bakteri kitinolitik efektif menekan perkembangan jamur patogen karat kedelai di rumah kaca hingga 4 minggu setelah aplikasi. Isolat unggulan yang disarankan untuk diformulasi adalah kombinasi isolat 6m + 7 karena bersifat sinergis dalam menghambat perkembangan penyakit karat. Formulasi ini masih perlu dikaji lebih di lapang di mana faktor lingkungan terutama curah hujan sangat mempengaruhi efektivitas pengendalian.

DAFTAR PUSTAKA

- Kardin, M.K. 1989.** Virulensi beberapa isolat *Phakopsora pachyrhizi* dari Jawa Barat. *Dalam* Subandi, Sumarno, dan Adi Widjono (*Eds.*). Prosiding Penelitian dan Studi Khusus. Pusat Penelitian dan Pengembangan Tanaman Pangan. hlm. 373-382.
- Mazzone, H.M. 1987.** Control of invertebrate pests through the chitin pathway. *In* Maramorosch, K. (*Ed.*). Biotechnology in Invertebrate Pathology and Cell Culture. Acad. Press. London. p. 439-450.
- Priyatno, T.P., M.S. Sudjono, dan Chaerani. 1999.** Aktivitas kitinase mikroba antagonistik penyebab lisis miselia *Phakopsora pachyrhizi* Syd. Prosiding Kongres Nasional XIV dan Seminar Ilmiah PFI. Palembang, 27-29 Oktober 1997.
- Quebral, F.C. 1997.** Chemical control of soybean rust in the Philippines. *In* Ford, R.E. and J.B. Sinclair (*Eds.*). Rust of Soybean: Problem and Research Needs. Coll. of Agric. Univ. of Illinois, Urbana. p. 81-84.
- Sinclair, J.B. 1982.** Compendium of soybean diseases. The American Phytopathological Society. St. Paul. Minnesota. 104 p.
- Sudjono, M.S. dan Sutoyo. 1996.** Pemanfaatan mikroba filoplane untuk pengendalian karat *Puccinia* sp. dan *Phakopsora pachyrhizi* Syd. *Dalam* Brotonegoro, S. (*Ed.*). Laporan Hasil Penelitian Pemanfaatan Mikroorganisme untuk Pengembangan Pestisida Mikroba. Balitbio, Bogor.
- Sudjono, M.S., T.P. Priyatno, dan Chaerani. 1999.** Efektivitas mikroba penyebab lisis dalam mengendalikan patogen karat (*Phakopsora pachyrhizi* Syd.). Prosi-ding Kongres Nasional XIV dan Seminar Ilmiah PFI. Palembang, 27-29 Oktober 1997.
- Sumarno, S. and M.S. Sudjono. 1997.** Breeding soybean rust resistance in Indo-nesia. *In* Ford, R.E. and J.B. Sinclair (*Eds.*). Rust of Soybean: Problem and Research Needs. Coll. of Agric. Univ. of Illinois, Urbana. p. 66-70.

