

ISSN : 0215-0824
e-ISSN : 2527-4414

BULETIN PENELITIAN TANAMAN REMPAH DAN OBAT

Bulletin of Research on Spice and Medicinal Crops

Akreditasi KEMENRISTEKDIKTI No. 30/E/KPT/2018

Volume 30, Nomor 1, Mei 2019



Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian
Agency for Agricultural Research and Development
PUSAT PENELITIAN DAN PENGEMBANGAN PERKEBUNAN
Indonesian Center for Estate Crops Research and Development
Bogor, Indonesia

Bul. Littro	Vol. 30	No. 1	hlm. 1-58	Bogor, Mei 2019	ISSN 0215-0824 e-ISSN : 2527-4414
-------------	---------	-------	-----------	--------------------	--------------------------------------

ISSN : 0215-0824
e-ISSN : 2527-4414

BULETIN PENELITIAN
TANAMAN REMPAH DAN OBAT
Bulletin of Research on Spice and Medicinal Crops

Akreditasi KEMENRISTEKDIKTI No. 30/E/KPT/2018

Volume 30, Nomor 1, Mei 2019

Penanggung Jawab

Kepala
Pusat Penelitian dan Pengembangan Perkebunan
Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian

Dewan Redaksi

Ketua merangkap Anggota

Dr. Oti Rostiana, M.Sc (Pemuliaan dan Genetika
Tanaman)

Anggota

Prof. Dr. Supriadi (Fitopatologi)
Dr. Ir. Ireng Darwati (Fisiologi)
Dr. Ir. Dono Wahyuno (Fitopatologi)
Ir. Ekwasita Rini Pribadi (Sosial Ekonomi)
Dr. Siswanto (Entomologi)
Dr. Gusmaini, M.Si (Fisiologi)

Redaksi Pelaksana

Dra. Nur Maslahah, M.Si.
Hera Nurhayati, SP.
Eko Hamidi
Efiana, S.Mn
Tini Nurcahaya, S.Kom (IT Support)

Alamat

Jalan Tentara Pelajar No. 3 Cimanggu, Bogor 16111

Telp. (0251) 8321879 - Fax. (0251) 8327010

E-mail : buletintro@gmail.com

Website : <http://balittro.litbang.pertanian.go.id>

URL : <http://ejurnal.litbang.pertanian.go.id/index.php/bultro>

Sumber Dana

DIPA Balai Penelitian Tanaman Rempah dan Obat
TA. 2019

ISSN : 0215-0824

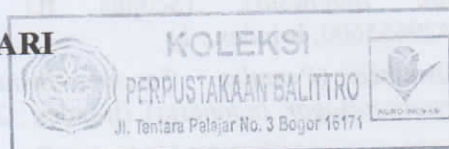
e-ISSN : 2527-4414

BULETIN PENELITIAN TANAMAN REMPAH DAN OBAT

terbit dua nomor setiap volume dalam satu tahun (Mei dan Desember) memuat karya tulis ilmiah hasil penelitian tentang tanaman rempah dan obat yang belum pernah dipublikasikan

31/12/2019

MITRA BESTARI



- Prof. Dr. Ir. Agus Kardinan, M.Sc (*Entomologi-Balai Penelitian Tanaman Rempah dan Obat, Indonesia*), (h-index : 6)
- Prof. Dr. Ir. Deciyanto Soetopo (*Entomology-Indonesia Center for Estate Crops Research and Development, Indonesia*), (h-index : 6)
- Dr. Endah Retno Palupi (*Biology Reproductive Plant-Bogor Agricultural University, Indonesian*), (ID Scopus : 6506616270)
- Dr. Ir. Eny Widajati, MS, (*Seed Technology*), (h-index: 5), *Bogor Agricultural University, Indonesia*
- Prof. Dr. Dwinardi Apriyanto (*Ilmu Hama-University Bengkulu, Indonesia*), (Scopus ID : 6507231035)
- Prof. Dr. Ir. Dyah Iswantini (*Biokimia-Institut Pertanian Bogor, Indonesia*), (ID Scopus : 6505944957)
- Dr. Edi Santoso, SP., MSi (*Ekofisiologi-Departemen Agronomi dan Hortikultura, Faperta IPB, Indonesia*)
- Prof. Dr. Ir. Elna Karmawati (*Entomologi-Center for Estate Crops Research and Development, Indonesia*, (Scopus ID : 26531334600)
- Dr. Hagus Tarno, Agr.Sc (*Entomologi-Universitas Brawijaya, Indonesia*), (Scopus ID : 36163526900; h-index : 2)
- Dr. I Ketut Ardana (*Agricultural Economy - Indonesian Center for Estate Crops Research and Development, Indonesian*), (h-index: 3)
- Dr. Ir. I Made Samudera (*Entomologi Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian*)
- Prof. Dr. Ir. I Wayan Laba (*Entomologi-Balai Penelitian Tanaman Rempah dan Obat, Indonesia*), (h-index : 6)
- Dr. Ir. Irdika Mansur, M.For.Sc. (*Silviculture-Southeast Asian Regional Centre for Tropical Biology*), (ID Scopus : 6603222376)
- Dr. Ir. Ladiyani Retno Widowati, MSc, (*Indonesian Center for Biotechnology and Genetic Resources Research and Development, Indonesia*)
- Dr. Lisnawita (*Fitopatologi-Universitas Sumatera Utara, Indonesia*), (Scopus ID: 55780066800)
- Dr. Ir. Muhamad Yunus, M.Si (*Plant Breeding-Indonesian Center for Biotechnology and Genetic Resources Research and Development, Indonesia*)
- Prof. Dr. Nanik Setyowati (*Budidaya Tanaman-Universitas Bengkulu, Indonesia*), (ID Scopus : 57189367022)
- Dr. Neni Rostini (*Pemulia Tanaman-Universitas Padjadjaran Bandung, Indonesia*), (h-index : 5)
- Dr. Ir. Nurliani Bermawie (*Pemuliaan-Balai Penelitian Tanaman Rempah dan Obat, Indonesia*), (Scopus ID ; 55993158700; h-index : 1)
- Dr. Ratu Safitri, MS (*Mikrobiologi-Universitas Padjajaran Bandung, Indonesia*), (ID Scopus : 6506729561)
- Prof. Dr. Ir. Risfaheri, M.Si (*Teknologi Pascapanen- Indonesian Center for Agricultural Postharvest Research and Development, Indonesia*)
- Dr. Rita Noveriza (*Virologi - Indonesian Spices and Medicinal Crops Research Institute, Indonesian*), (ID Scopus : 55734904600)
- Prof. Dr. Ir. Rosihan Rosman, MS (*Ekofisiologi-Balai Penelitian Tanaman Rempah dan Obat, Indonesia*)
- Dr. Ir. Siswanto, M.Phil, (*Entomologi-Pusat Penelitian dan Pengembangan Perkebunan, Indonesia, Indonesia*)
- Dr. Sri Yuliani (*Teknologi pascapanen-Indonesian Center for Agricultural Postharvest Research and Development, Indonesia*), (Scopus ID : 9844293200 / h-Index : 6)
- Prof. Ir. Totok Agung Dwi Haryanto, M.P, Ph.D (*Plant Breeding-University of Jenderal Soedirman, Indonesia*), (Scopus ID : 6506751630)
- Ir. Usman Daras, M.Agr.Sc (*Budidaya Tanaman-Balai Penelitian Tanaman Rempah dan*

Tgl. Terima	: 31-12-2019
No. Induk	: 1144
Asal Bahan Pustaka	: Beli /Tukang/Hadiah
Dari	:

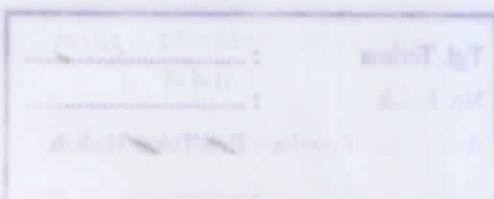
Obat, Indonesia), (Scopus ID : 56429655600; h-index : 2)

Dr. Yudiwanti (Pemulia Tanaman-Institut Pertanian Bogor, Indonesia), (h-index : 2)

Dr. Yulin Lestari (Kimia-Institut Pertanian Bogor, Indonesia), (ID Scopus : 35107494200)

Dr. Yuyu Suryasari (Biologi Molekuler-Pusat Penelitian dan Pengembangan Biologi-LIPI, Indonesia), (Scopus ID : 6503885123)

Dr. Ir. Widodo, M.S (Mikology - Bogor Agricultural University, Indonesian), (ID Scopus : 56502046800)



ISSN : 0215-0824

e-ISSN : 2527-4414

BULETIN PENELITIAN
TANAMAN REMPAH DAN OBAT
Bulletin of Research on Spice and Medicinal Crops

Akreditasi KEMENRISTEKDIKTI No. 30/E/KPT/2018

Volume 30, Nomor 1, Mei 2019

KATA PENGANTAR

Puji syukur kami panjatkan ke hadirat Tuhan Yang Maha Kuasa, Buletin Penelitian Tanaman Rempah dan Obat Volume 30, Nomor 1, tahun 2019 dapat diselesaikan. Buletin ini berisi 5 artikel yang terdiri dari berbagai bidang masalah dan disiplin ilmu pada Tanaman Rempah dan Obat. Artikel pertama Keefektifan *Piretrum*, Mimba, *Beauveria bassiana*, dan *Metarhizium anisopliae* terhadap Wereng Coklat (*Nilaparva lugens* Stal.). Artikel kedua adalah Kelayakan Finansial Produksi Biopestisida Biji Mimba (*Azadirachta indica* A. Juss) dengan Metode Pengepresan Ulir. Artikel ke tiga menyajikan Pengaruh Sinergi Azadirachtin dan Komponen Minor dalam Minyak Biji Mimba terhadap Aktivitas Antifeedant *Spodoptera litura*. Artikel keempat Isolasi dan Karakterisasi Potensi Isolat Bakteri Rizosfir untuk Mengendalikan Penyakit Budok pada Tanaman Nilam. Artikel kelima adalah Diversity of Endophytic Fungi In The Root, Leaf, Stolon and Petiole of Asiatic Pennywort (*Centella asiatica*).

Kami mengucapkan terima kasih kepada semua penulis yang sudah mengisi Buletin Penelitian Tanaman Rempah dan Obat (*Bul. Littro*) dan kepada semua pihak yang sudah membantu, sehingga *Bul. Littro* dapat diselesaikan pada waktunya. Akhir kata semoga artikel dalam *Bul. Littro* ini bermanfaat, bagi yang memerlukan.

Ketua Dewan Redaksi

Dr. Oti Rostiana, M.Sc

ISSN : 0215-0824

e-ISSN : 2527-4414

BULETIN PENELITIAN
TANAMAN REMPAH DAN OBAT

Bulletin of Research on Spice and Medicinal Crops

Akreditasi KEMENRISTEKDIKTI No. 30/E/KPT/2018

Volume 30, Nomor 1, Mei 2019

DAFTAR ISI

Keefektifan Piretrum, Mimba, *Beauveria bassiana*, dan *Metarhizium anisopliae* terhadap Wereng Coklat (*Nilaparva lugens* Stal.)

Agus Kardinan, Tri Eko Wahyono, dan Nurbetti Tarigan

1-10 ✓

Kelayakan Finansial Produksi Biopestisida Biji Mimba (*Azadirachta indica* A. Juss) dengan Metode Pengepresan Ulir

Dwi Ajias Pramasari dan A. Heru Prianto

11-26 ✓

Pengaruh Sinergi Azadirachtin dan Komponen Minor dalam Minyak Biji Mimba terhadap Aktivitas Antifeedant *Spodoptera litura*

Arief Heru Prianto, Budiawan, Yoki Yulizar, dan Partomuan Simanjuntak

27-34 ✓

Isolasi dan Karakterisasi Potensi Isolat Bakteri Rizosfir untuk Mengendalikan Penyakit Badok pada Tanaman Nilam

Sukanto, Novia Listiana, Reni Indrayanti, dan Dono Wahyuno

35-46 ✓

Diversity of Endophytic Fungi in The Root, Leaf, Stolon and Petiole of Asiatic Pennywort (*Centella asiatica*)

Dwi Ningsih Susilowati, Amelia Rakhmaniar, Nani Radiastuti, and Ika Roostika

47-58 ✓

Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian
Agency for Agricultural Research and Development
PUSAT PENELITIAN DAN PENGEMBANGAN PERKEBUNAN
Indonesian Center for Estate Crops Research and Development
Bogor, Indonesia

KEEFEKTIFAN PIRETRUM, MIMBA, *Beauveria bassiana*, DAN *Metarhizium anisopliae* TERHADAP WERENG COKLAT (*Nilaparva lugens* Stal.)

The Effectiveness of Pyrethrum, Neem, Beauveria bassiana and Metarhizium anisopliae Against Brown Plant hopper (Nilaparvata lugens Stal.)

Agus Kardinan, Tri Eko Wahyono, dan Nurbetti Tarigan

Balai Penelitian Tanaman Rempah dan Obat
Jalan Tentara Pelajar No. 3, Bogor

INFO ARTIKEL

Article history:

Diterima: 30 Januari 2019

Direvisi: 25 Maret 2019

Disetujui: 20 Juni 2019

Kata kunci:

Bioinsektisida; daya tular horizontal; mortalitas; wereng coklat

Key words:

Bio-insecticide; brown plant hopper; horizontal transmission; mortality

ABSTRAK/ABSTRACT

Wereng coklat merupakan masalah dalam budidaya tanaman padi karena sering mengakibatkan gagal panen. Pengendalian dengan insektisida sintetis berdampak negatif terhadap kesehatan manusia dan lingkungan. Penelitian bertujuan untuk mengetahui keefektifan insektisida nabati (piretrum dan mimba) dan insektisida hayati (*Beauveria bassiana* dan *Metarhizium anisopliae*) terhadap wereng coklat. Penelitian dilakukan di Rumah Kaca Entomologi Balai Penelitian Tanaman Rempah dan Obat, Bogor tahun 2017. Penelitian terdiri atas 2 kegiatan yaitu efektivitas insektisida nabati dan hayati terhadap mortalitas wereng coklat dan penularan insektisida hayati secara horizontal. Formula insektisida nabati yang diuji adalah (1) piretrum I (5 ml.l⁻¹ air), (2) piretrum II (5 ml.l⁻¹ air), (3) mimba I (20 ml.l⁻¹ air), (4) mimba II (20 ml.l⁻¹ air), (5) insektisida sintetis (karbosulfan) (2 ml.l⁻¹ air) dan (6) kontrol (air). Perlakuan insektisida hayati yang diuji adalah (1) Bb (semprot, 2,5 ml/tanaman), (2) Bb (granul, 5 g/pot), (3) Ma (semprot, 2,5 ml/tanaman), (4) Ma (granul, 5 g/pot) dan (5) kontrol. Perlakuan daya tular horizontal terdiri atas perbandingan wereng terinfeksi : sehat yaitu 1 : 10; 2 : 10; 3 : 10; 4 : 10. Insektisida nabati piretrum dan mimba dapat menekan populasi wereng coklat berturut turut 85-87 % dan 60-70 %. *B. bassiana* mampu menekan populasi wereng sekitar 18,2 %, lebih baik dari *M. anisopliae* (5,6 %). Aplikasi dengan penyemprotan lebih baik dari bentuk granul. Penggunaan insektisida hayati tidak menunjukkan daya tular horizontal pada wereng sehat. Insektisida nabati (piretrum dan mimba) lebih prospektif dalam mengendalikan wereng coklat daripada insektisida hayati (*B. bassiana* dan *M. anisopliae*).

*Brown plant hopper (Nilaparvata lugens Stal) is the main pest on rice cultivation. Synthetic insecticides application had negative impact to the human health and environment. The research objective was aimed to examine the effectiveness of botanical (pyrethrum and neem) and bio-insecticides (Beauveria bassiana/Bb and Metarhizium anisopliae/Ma) against brown plant hopper. Research was conducted at Entomology Laboratory of Indonesian Spices and Medicinal Crops Research Institute, Bogor in 2017. Trial consisted of two activities: the effectiveness of botanical and bio-insecticides to brown plant hopper mortality and horizontal transmission of bio-insecticides on brown plant hoppers. Botanical pesticide tested was (1) pyrethrum I (5 ml.l⁻¹ water), (2) pyrethrum II (5 ml.l⁻¹ water), (3) neem I (20 ml.l⁻¹ water), (4) neem II (20 ml.l⁻¹ water), (5) synthetic insecticide (2 ml.l⁻¹ water) and (6) control. Bio-insecticide treatments were (1) Bb (spraying, 2.5 ml/plant), (2) Bb (granule, 5 g/pot), (3) Ma (spraying, 2.5 ml/plant), (4) Ma (granule, 5 g/pot) and (5) control. Treatments of horizontal transmission was the ratio of infected : healthy brown plant hopper 1 : 10; 2 : 10; 3 : 10 and 4 : 10. Botanical insecticides were prospective to suppressing brown plant hopper population of 85-87 % (pyrethrum) and 60-70 % (neem). *B. bassiana* was able to*

* Alamat Korespondensi : kardinanagus@yahoo.com

suppress brown plant hopper population (18.2%), better than *M. anisopliae* (5.6 %). Biological insecticide application by contact (spraying) was better than applied in granules form. Botanical insecticide application showed no horizontal transmission from infected to healthy insect. Botanical insecticide (pyrethrum and neem) was more prospective than bio-insecticide (*B. bassiana* and *M. anisopliae*) in controlling brown plant hopper.

PENDAHULUAN

Wereng coklat (*Nilaparvata lugens* Stal.) merupakan hama utama pada padi, karena dapat mengakibatkan gagal panen/puso. Wereng coklat menyerang tanaman padi dari masa vegetatif (pertumbuhan) hingga generatif (pengisian bulir padi). Pada tahun 2012, luas serangan wereng coklat mencapai 218.060 hektar dengan kehilangan hasil sekitar 2 t.ha⁻¹, sehingga diperkirakan menyebabkan kerugian sebesar Rp. 1,74 triliun (Baehaki dan Mejaya 2014). Serangan wereng coklat menurut Direktorat Jendral Tanaman Pangan Kementerian Pertanian pada periode Januari sampai Juli 2017 adalah seluas 67.749 hektar, sementara yang puso (gagal panen) seluas 746,71 hektar (Kompas 2017). Ketergantungan petani yang sangat tinggi terhadap insektisida sintesis dalam mengendalikan wereng coklat mengancam kesehatan lingkungan dan manusia (Kardinan *et al.* 2017). Hasil penelitian Rasipin *et al.* (2012) menunjukkan bahwa penggunaan pestisida yang intensif berpengaruh terhadap peningkatan kasus pembengkakan kelenjar tiroid (gondok) pada anak-anak sekolah dasar di sentra produksi pertanian. Oleh karena itu, pengendalian wereng yang dianjurkan adalah dengan konsep Pengendalian Hama Terpadu (PHT) yang salah satu komponennya adalah penggunaan bio-insektisida (Katti 2013). Bioinsektisida secara sederhana dibagi menjadi dua kelompok, yaitu pestisida botani/nabati yang berasal dari tumbuhan dan semua turunannya (metabolit sekunder) dan pestisida zoologi yang berasal dari mikroba (jamur, bakteri, virus, nematoda, dan lainnya) dan semua turunannya (Kardinan 2016).

Beberapa jenis bioinsektisida dilaporkan efektif mengendalikan wereng coklat, diantaranya ekstrak daun kipait (*Tithonia diversifolia*) berperan sebagai penghambat daya makan (*anti-feedant*) wereng coklat (Mokodompit *et al.* 2013), ekstrak

daun suren dapat menekan populasi wereng coklat dan tidak berdampak negatif terhadap populasi musuh alami *Polyrhachis fuscipes* dan *Lycosa pseudoannulata* (Subandi *et al.* 2016), ekstrak tembakau efektif mengendalikan populasi wereng coklat (Tuti *et al.* 2014), ekstrak daun kumis kucing berpengaruh terhadap mortalitas wereng coklat dengan nilai LC₅₀ sebesar 3,5 % pada jam ke 72 setelah aplikasi (Ningsih *et al.* 2014). Bunga piretrum (*Chrysanthemum cinerariaefolium*) dengan kandungan bahan aktif utama piretrin, jasmolin dan cinerin merupakan bahan insektisida nabati yang bersifat menyerang sistem syaraf serangga, sehingga efeknya cepat terlihat (*rapid in action*) dengan gejala kejang-kejang lalu lumpuh dan akhirnya mati, namun demikian piretrum aman bagi manusia dan hewan peliharaan (Kardinan dan Karmawati 2013). Ekstrak bunga piretrum juga efektif mengendalikan hama gudang, di antaranya *Tribolium castaneum* (Shawkat *et al.* 2011). Bahan aktif piretrum, yaitu piretrin menunjukkan efek yang cepat dalam membunuh (*knock down effect*) terhadap nyamuk malaria (*Anopheles gambiae*), tetapi memiliki persistensi yang rendah di alam dan tingkat toksisitas yang rendah pula terhadap mamalia (Duchon *et al.* 2009). Mimba (*Azadirachta indica*) dengan kandungan bahan aktif utama azadirachtin dapat digunakan untuk mengendalikan beberapa jenis hama, di antaranya hama kakao di Nigeria (Asogwa *et al.* 2010), juga berperan sebagai bahan pengusir serangga (*insect repellent*), diantaranya nyamuk (Aremu *et al.* 2009). Ekstrak aseton biji mimba menyebabkan efek depresi pada perkembangan larva instar ketiga, serangga *Corcyra cephalonica* (Staint.), sedangkan pada dosis 0,16 % (a.i) v.w⁻¹ menyebabkan 100 % kematian larva sehingga dapat dikategorikan sebagai bahan yang sangat beracun untuk hama (Pathak dan Tiwari 2012). Hasil penelitian sebelumnya terhadap persistensi insektisida nabati piretrum dan mimba

menunjukkan bahwa residu insektisida nabati piretrum dan mimba yang diaplikasikan pada tanaman padi bertahan hingga hari keempat (Kartunan *et al.* 2017).

Beberapa cendawan entomopatogen yang potensial menginfeksi wereng coklat adalah *Beauveria bassiana*, *Hirsutella citriformis* dan *Metarrhizium anisopliae* (Dwiastuti *et al.* 2007). Cendawan entomopatogen, sebagai patogen serangga, dapat di isolasi secara alami dari tanah. Epifitiknya di alam sangat dipengaruhi oleh kondisi iklim, terutama membutuhkan lingkungan yang lembab dan hangat. Di beberapa negara, cendawan ini telah digunakan sebagai agens hayati pengendalian sejumlah serangga hama mulai dari tanaman pangan, hias, buah-buahan, sayuran, kacang-kacangan, hortikultura, perkebunan, kehutanan hingga tanaman gurun pasir. Sistem kerja cendawan entomopatogen adalah melalui spora yang masuk ke tubuh serangga inang melalui kulit, saluran pencernaan, spirakel dan lubang lainnya. Selain itu inokulum jamur yang menempel pada tubuh serangga inang dapat berkecambah dan berkembang membentuk tabung kecambah, kemudian masuk menembus kutikula tubuh serangga. Penembusan dilakukan secara mekanis dan atau kimiawi dengan mengeluarkan enzim atau toksin. Jamur ini selanjutnya akan mengeluarkan racun yang membuat kerusakan jaringan tubuh serangga. Dalam hitungan hari, serangga akan mati. Setelah itu, miselia jamur akan tumbuh ke seluruh bagian tubuh serangga. Serangga yang terserang jamur akan mati dengan tubuh mengeras seperti mumi dan tertutup oleh benang-benang hifa berwarna putih (Soetopo dan Indrayani 2007). Suryadi *et al.* (2018) menyatakan bahwa *B. bassiana* mampu menghasilkan tingkat mortalitas 100 % terhadap wereng coklat, sementara jamur *M. anisopliae* mampu menekan 40-45 % populasi wereng coklat (Suryadi dan Kadir 2007). Namun demikian, belum banyak informasi mengenai potensi penularan wereng terinfeksi terhadap wereng sehat secara horizontal, sehingga apabila hal ini dapat terjadi, maka akan sangat bermanfaat bagi strategi pengendalian wereng coklat di lapangan.

Penelitian bertujuan untuk mengetahui efektivitas insektisida nabati (piretrum dan mimba) dan insektisida hayati (*B. bassiana* dan

M. anisopliae) dalam menekan populasi hama wereng coklat serta daya tular jamur *B. bassiana* dan *M. anisopliae* dari wereng terinfeksi terhadap wereng sehat.

BAHAN DAN METODE

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium dan Rumah Kaca Entomologi, Balai Penelitian Tanaman Rempah dan Obat sejak Januari sampai Desember 2017. Penelitian terdiri atas dua kegiatan, yaitu efektivitas insektisida nabati dan hayati terhadap mortalitas wereng coklat, serta penularan insektisida hayati secara horizontal.

Persiapan bio-insektisida

Bahan insektisida nabati berupa ekstrak bunga piretrum (*C. cinerariaefolium*) yang bunganya berasal dari Kebun Percobaan Gunung Putri mengandung bahan aktif piretrin sebesar 0,5 %. Minyak mimba (*A. indica*) yang merupakan hasil pengepresan biji mimba yang berasal dari daerah jalur Pantura, mengandung bahan aktif azadirachtin sebesar 0,6 %. Jamur *B. bassiana* Strain ED6 dan *M. anisopliae* Strain *Oryctes rhinoceros* merupakan koleksi Laboratorium Entomologi Balitro.

Perbanyakan wereng

Serangga uji berupa wereng coklat (*N. lugens*) yang diambil dari sentra produksi padi di daerah Sukamandi. Imago ditangkap dengan jaring, kemudian dimasukkan ke dalam kurungan hama dan dipelihara di laboratorium/rumah kaca. Pemeliharaan dilakukan secara berkesinambungan agar menghasilkan generasi wereng yang seragam dengan jumlah yang cukup. Serangga uji yang digunakan pada percobaan adalah serangga stadia nimfa instar ke-4 dari generasi ke-2 atau generasi ke-3 hasil perbanyakan di rumah kaca (Gambar 1).

Persiapan tanaman padi

Tanaman uji, menggunakan tanaman padi varietas IR 26 yang peka terhadap wereng coklat berumur sekitar satu bulan. Tanaman padi yang digunakan tidak disemprot pestisida, dipelihara dan dipupuk NPK dengan dosis 8 g/rumpun. Sebanyak

tiga tanaman padi ditumbuhkan pada pot plastik (ember) berdiameter 20 cm dan tinggi 25 cm. Bagian atas pot dikurung dengan plastik milar berdiameter 20 cm dengan tinggi 50 cm. Selanjutnya bagian atas plastik milar ditutup dengan kain kasa untuk aerasi (Gambar 2).

Efektifitas insektisida nabati terhadap wereng coklat

Pembuatan formula

Formula insektisida nabati yang diuji terdiri atas :



Gambar 1. Serangga uji wereng coklat, stadia nimfa instar ke-4 dari generasi ke-2 atau ke-3, yang digunakan dalam percobaan.

Figure 1. *Brown planthopper test insects, 4th instar nymph stadia of the 2nd or 3rd generation, which were used in the experiment.*



Gambar 2. Tanaman padi varietas IR 26 yang siap diperlakukan dengan insektisida sintesis, insektisida botani dan bio-insektisida.

Figure 2. *IR 26 rice plants are ready to be treated with synthetic insecticides, botanical insecticides and bio-insecticides.*



1. Formula Piretrum I

Komposisi : Ekstrak piretrum (2 %) + Tween 80 (2 %) + minyak sawit (48 %) + chitin (48 %)

2. Formula Piretrum II

Komposisi : Ekstrak piretrum (2 %) + Tween 80 (2 %) + minyak sawit (96 %)

3. Formula Mimba I

Komposisi : Minyak mimba (60 %) + Tween 80 (2 %) + minyak sawit (38 %)

4. Formula Mimba II

Komposisi : minyak mimba (60 %) + *dimethylsulfoxyde* (DMSO) (2 %) + minyak sawit (38 %)

Insektisida nabati diaplikasikan sehari setelah nimfa wereng coklat dimasukkan ke dalam karangan yang berisi tanaman padi (setelah beradaptasi). Aplikasi hanya dilakukan sekali dengan konsentrasi 5 ml.l⁻¹ air dengan cara menyemprot sekitar 30 ekor nimfa wereng coklat antar 4 yang berada pada tanaman padi di dalam karangan plastik.

Rancangan penelitian dan analisis data

Penelitian dirancang dalam acak lengkap dengan 6 perlakuan dan 4 ulangan. Perlakuan terdiri atas formula (1) piretrum I (5 ml.l⁻¹ air), (2) piretrum II (5 ml.l⁻¹ air), (3) mimba I (20 ml.l⁻¹ air), (4) mimba II (20 ml.l⁻¹ air), (5) insektisida sintesis (karbosulfan) (2 ml.l⁻¹ air) dan (6) kontrol (air). Mortalitas wereng coklat dihitung pada jam ke 1, 3, 6, 24 dan 48 setelah aplikasi (Harnoto dan Koswanudin 2012). Setiap kurungan plastik berisi satu rumpun padi (sekitar 3 anakan), sehingga jumlah rumpun padi pada setiap ulangan ada 4 (12 anakan). Data dianalisis dengan Anova, dilanjutkan dengan uji jarak berganda Duncan pada taraf 5 % apabila terdapat perbedaan yang nyata antar perlakuan.

Efektifitas insektisida hayati terhadap mortalitas wereng coklat

Penelitian dibagi menjadi 2 sub kegiatan, yaitu daya bunuh insektisida hayati dalam formula cair dan granul terhadap wereng coklat dan daya tular serangga (wereng coklat) yang terinfeksi terhadap wereng coklat lainnya.

Persiapan insektisida hayati

Pembiakan jamur *B. bassiana* dan *M. anisopliae* dilakukan di Laboratorium Kelompok Peneliti Proteksi, Balitro, Bogor. Jamur diperbanyak pada medium *Potato Dextrose Agar* (PDA) karena medium ini dapat menjaga viabilitas konidium jamur hingga 6 minggu sebelum digunakan sebagai sumber inokulum dalam perbanyakan massal. Selanjutnya, jamur diperbanyak secara massal pada media jagung. Media jagung adalah salah satu metode untuk perbanyakan jamur *B. bassiana* dan *M. anisopliae* secara massal yaitu dengan cara menyiapkan media buatan dari jagung giling yang dicuci sampai bersih kemudian dikukus kira-kira selama 30 menit. Selanjutnya jagung yang sudah matang dimasukkan dalam kantong plastik tahan panas sebanyak 2/3 volume kantong plastik, kemudian disetrilkan di dalam autoklaf selama 20 menit dengan temperatur 120⁰ C selama 1 hari. Media jagung kemudian diinokulasi dengan isolat jamur *B. bassiana* atau *M. anisopliae* dengan menggunakan jarum ose. Media jagung yang telah diinokulasi dapat dipergunakan sebagai agensia hayati setelah 3 minggu. Media jagung adalah media yang mempunyai partikel dengan permukaan luas dan dapat mempertahankan keutuhan partikel selama proses produksi (Indrayani dan Prabowo 2010).

Formula dalam bentuk cair dibuat dengan cara mencampur 10 g media jagung yang mengandung spora *B. bassiana* atau *M. anisopliae*, kemudian dilarutkan dalam air sebanyak 1 liter dan diaduk dengan menggunakan blender sampai homogen. Setelah itu dilakukan penyaringan untuk memisahkan butiran-butiran jagung dan spora (Rosmiati *et al.* 2018). Formula bentuk granul dibuat dengan cara mencampurkan 100 g tepung beras dalam 100 ml formula cair (1 : 1), kemudian diaduk merata dengan cara diputar sehingga terbentuk butiran granular (Sukanto dan Yulianto 2006). Formulasi bentuk granul telah banyak dikembangkan oleh para peneliti berdasarkan latar belakang kepentingannya. Mengembangkan produk formula dalam bentuk granul mempunyai banyak keuntungan karena mudah larut dalam air. Beberapa bahan pembawa (*carrier*) telah diteliti untuk kesesuaian formulasi

B. bassiana dan *M. anisopliae* antara lain tepung tapioka, tepung beras dan tepung maizena. Dalam penelitian ini digunakan tepung beras sebagai bahan pembawa pada formulasi granul karena memiliki tekstur lebih mudah menggumpal sehingga lebih mudah menyatu dengan suspensi spora jamur.

Efektifitas insektisida hayati dalam formula cair dan granul terhadap wereng coklat

Penelitian dirancang dalam acak lengkap dengan 5 perlakuan dan 5 ulangan. Perlakuan terdiri atas (1) *B. bassiana* (bentuk cair dengan dosis penyemprotan 2,5 ml/tanaman), (2) *B. bassiana* (bentuk granul sebanyak 5 g ditaburkan di daerah perakaran tanaman), (3) *M. anisopliae* (bentuk cair dengan dosis penyemprotan 2,5 ml/tanaman), (4) *M. anisopliae* (bentuk tepung sebanyak 5 g diaplikasikan di daerah perakaran tanaman) dan (5) kontrol. Aplikasi perlakuan hanya diberikan satu kali. Pengamatan dilakukan terhadap mortalitas nimfa pada hari ke-3, 4, 5, 6, 7 dan 8. Aplikasi dilakukan terhadap 30 ekor nimfa wereng coklat instar 4 yang berada pada tanaman padi di dalam kurungan plastik. Setiap kurungan plastik berisi satu rumpun padi (sekitar 3 anakan), sehingga jumlah rumpun padi pada setiap ulangan adalah 5 (15 anakan).

Daya tular horizontal wereng terinfeksi terhadap wereng sehat lainnya

Penelitian dilakukan dengan cara menempatkan wereng yang sudah terinfeksi oleh *B. bassiana* dan *M. anisopliae* bersama dengan wereng sehat pada tanaman padi berumur sekitar satu bulan di dalam kurungan. Wereng terinfeksi diperoleh dengan cara menyemprot sejumlah wereng stadia nimfa dengan larutan yang mengandung *B. bassiana* ataupun *M. anisopliae*, kemudian diamati. Penelitian dirancang dalam acak kelompok dengan 9 perlakuan dan 3 ulangan. Perlakuan terdiri atas perbandingan wereng terinfeksi *B. bassiana* dengan wereng sehat yaitu (1) 1 : 10; (2) 2 : 10; (3) 3 : 10; (4) 4 : 10 dan perbandingan wereng terinfeksi *M. anisopliae* dengan wereng sehat (5) 1 : 10; (6) 2 : 10; (7) 3 : 10; (8) 4 : 10 dan (9) kontrol (10 wereng sehat). Pengamatan dilakukan terhadap wereng tertular

hingga hari ke 8 karena proses penularan baru dapat terlihat pada hari ke 4 hingga ke 8, yaitu dengan keluarnya hifa berwarna putih untuk *B. bassiana* dan hijau untuk *M. anisopliae*. Data dianalisis dengan Anova, dilanjutkan dengan uji jarak berganda Duncan pada taraf 5 % apabila terdapat perbedaan yang nyata.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pengaruh insektisida nabati terhadap wereng coklat

Jenis insektisida berpengaruh nyata terhadap mortalitas wereng coklat (Tabel 1). Kedua formula piretrum pada konsentrasi 5 ml.l⁻¹ air yang diaplikasikan secara kontak menyebabkan mortalitas wereng coklat 85-87,5 % pada pengamatan jam pertama setelah aplikasi. Sementara itu, kedua formula mimba pada konsentrasi 20 ml.l⁻¹ air mampu menyebabkan mortalitas wereng sebesar 48,75- 60 %, mortalitas pada insektisida sintetis (kontrol positif) pada konsentrasi 2 ml.l⁻¹ air (sesuai rekomendasi) menimbulkan mortalitas sebesar 45 %, sedangkan pada kontrol negatif (air) tidak terjadi mortalitas. Selanjutnya pada pengamatan jam berikutnya tidak nampak perubahan yang signifikan, walaupun terdapat peningkatan mortalitas, khususnya pada perlakuan insektisida nabati mimba dan insektisida sintetis (Tabel 1).

Dari data di atas terlihat bahwa insektisida nabati dapat mengimbangi insektisida sintetis, bahkan insektisida nabati piretrum menunjukkan kemampuan yang lebih baik daripada insektisida sintetis. Piretrum dengan kandungan utama piretrin sudah sangat dikenal dengan sifatnya yang *rapid in action* dengan cara kerja menyerang sistem syaraf serangga, sehingga mampu disetarakan dengan insektisida sintetis. Selain itu, konsentrasi yang digunakannya pada pengujian ini 2,5 kali lipat (5 ml.l⁻¹ air) dari konsentrasi insektisida sintetis (2 ml.l⁻¹ air), sehingga hasilnya mampu melebihi insektisida sintetis. Efektifitas insektisida nabati mimba mampu menyamai insektisida sintetis, karena selain konsentrasinya yang digunakan dalam penelitian ini adalah sebesar 10 kali lipat (20 ml.l⁻¹ air) daripada insektisida sintetis (2 ml.l⁻¹

Tabel 1. Pengaruh insektisida nabati secara kontak terhadap mortalitas wereng.

Table 1. Effect of botanical insecticides by contact application on the mortality of brown planthopper.

Perlakuan	Mortalitas (%) pada jam ke-				
	1 SA	3 SA	6 SA	24 SA	48 SA
Pinetum I – 5 ml.l ⁻¹ air	85,00 a	85,00 a	85,00 a	85,00 a	87,50 a
Pinetum II – 5 ml.l ⁻¹ air	87,50 a	87,50 a	87,50 a	87,50 a	87,50 a
Mimba I – 20 ml.l ⁻¹ air	60,00 b	70,00 b	70,00 b	70,00 b	70,00 b
Mimba II – 20 ml.l ⁻¹ air	48,75 b	56,25 b	62,50 b	67,50 b	67,50 b
Insektisida sintetis – 2 ml.l ⁻¹ air	45,00 b	52,50 b	62,50 b	65,00 b	68,75 b
Air (kontrol)	0,00 c	0,00 c	0,00 c	0,00 c	0,00 c
KK (%)	18,82	15,73	22,21	19,11	20,25

Keterangan/Note : Angka yang diikuti huruf sama pada kolom yang sama, tidak berbeda nyata pada uji DMRT 5 %/Numbers followed by the same letter at the same column were not significantly different at DMRT 5 %.

SA = setelah aplikasi/after application.

air), mimba juga sudah dikenal di dunia sebagai “the most promising botanical insecticide” yang telah terbukti efektif mengendalikan beberapa jenis hama.

Pengaruh insektisida hayati terhadap wereng coklat

Pengaruh insektisida hayati *B. bassiana* baru terlihat pada hari keenam setelah aplikasi, untuk perlakuan dengan cara penyemprotan terhadap wereng coklat pada tanaman padi. Sementara itu, cara pemberian formula *B. bassiana* dalam bentuk granul yang diaplikasikan di sekitar perakaran padi tidak menunjukkan pengaruh terhadap mortalitas wereng coklat. Insektisida hayati *M. anisopliae* yang diaplikasikan secara disemprot menunjukkan efektifitas yang rendah terhadap nimfa wereng coklat, sedangkan yang diaplikasikan di sekitar perakaran padi dalam bentuk granul tidak berdampak terhadap wereng coklat pada pengamatan hari keenam setelah aplikasi (Tabel 2).

Mortalitas nimfa wereng coklat sedikit meningkat pada hari ke-7 dan 8 pada perlakuan *B. bassiana* secara disemprot, yaitu mencapai 18,2 %. Mortalitas nimfa wereng coklat sebagai akibat dari perlakuan insektisida hayati *M. anisopliae* rendah mulai dari awal hingga pengamatan hari ke-8, yaitu hanya 5,6 %. Data ini menunjukkan bahwa *B. bassiana* lebih baik daripada *M. anisopliae* dalam mengendalikan wereng coklat. Namun demikian kemampuan

B. bassiana dalam mengendalikan populasi wereng coklat hanya mencapai sekitar 18,2 %. Data di atas menunjukkan bahwa dengan mengaplikasikan formula *B. bassiana* ataupun *M. anisopliae* dalam bentuk granul ke sekitar daerah perakaran tanaman padi tidak efektif. Hal ini diduga karena aplikasi dalam bentuk granul membatasi kontak langsung antara jamur dengan nimfa wereng coklat, dibandingkan dengan penyemprotan langsung ke nimfa wereng coklat.

Daya tular horizontal

Hasil penelitian menunjukkan bahwa tidak terjadi penularan secara horizontal dari wereng coklat yang terinfeksi *B. bassiana* maupun *M. anisopliae* kepada nimfa wereng coklat yang sehat (Tabel 3). Hal ini diduga karena kurang intensifnya kontak antara nimfa terinfeksi dengan nimfa sehat, sehingga spora jamur tidak mampu menginfeksi nimfa sehat. Penularan yang paling efektif terjadi ketika adanya hubungan perkawinan (kopulasi) antara wereng coklat sehat dengan yang terinfeksi (Long *et al.* 2000). Dalam penelitian ini, wereng yang digunakan adalah stadia nimfa (belum dewasa), sehingga belum memungkinkan terjadinya proses perkawinan. Wereng yang terinfeksi, ditandai dengan adanya hifa (berwarna putih untuk *B. bassiana* dan hijau untuk *M. anisopliae*) di permukaan tubuhnya, umumnya sudah sakit dan bersifat pasif, sehingga sulit berhubungan/kontak dengan wereng sehat.

Tabel 2. Pengaruh cara aplikasi insektisida hayati Beauveria bassiana dan Metarhizium anisopliae terhadap mortalitas nimfa wereng coklat.

Table 2. Effect of bio-insecticides application of Beauveria bassiana and Metarhizium anisopliae to the mortality of brown planthopper.

Perlakuan	Persentase mortalitas pada hari ke					
	3	4	5	6	7	8
Beauveria bassiana (semprot)	0	0	6,6 a	10,0 a	18,2 a	18,2 a
Beauveria bassiana (granul)	0	0	0 a	0 b	0 b	0 b
Metarhizium anisopliae (semprot)	0	0	1,6 a	2,0 b	5,6 b	5,6 b
Metarhizium anisopliae (granul)	0	0	0 a	0 b	0 b	0 b
Kontrol	0	0	0 a	0 b	0 b	0 b
KK (%)			4,24	6,67	7,94	9,74

Keterangan/Note : Angka yang diikuti huruf sama pada kolom sama tidak berbeda nyata pada taraf DMRT 5 %/Numbers followed by the same letter at the same column were not significantly different at DMRT 5 %.

Tabel 3. Daya tular secara horizontal insektisida hayati Beauveria bassiana dan Metarhizium anisopliae pada wereng coklat.

Table 3. Horizontal transmission of Beauveria bassiana and Metarhizium anisopliae bio-insecticides on brown planthopper mortality.

Perlakuan		Mortalitas wereng (%) pada hari ke-					
Jenis mikroba	Perbandingan wereng terinfeksi : sehat	3	4	5	6	7	8
		0	0	0	0	0	0
	2 : 10	0	0	0	0	0	0
	3 : 10	0	0	0	0	0	0
	4 : 10	0	0	0	0	0	0
Metarhizium anisopliae	1 : 10	0	0	0	0	0	0
	2 : 10	0	0	0	0	0	0
	3 : 10	0	0	0	0	0	0
	4 : 10	0	0	0	0	0	0
Kontrol	10 sehat	0	0	0	0	0	0

KESIMPULAN

Insektisida nabati (piretrum dan mimba) lebih prospektif untuk digunakan dalam pengendalian hama wereng coklat dibandingkan insektisida hayati (*B. bassiana* dan *M. anisopliae*) yang hanya mampu menekan populasi wereng coklat sekitar 5-18 %. Insektisida hayati yang disemprotkan (kontak) lebih baik daripada yang diaplikasikan dalam bentuk granul di sekitar perakaran tanaman padi. Tidak terjadi penularan horizontal dari wereng coklat terinfeksi oleh *B. bassiana* atau *M. anisopliae* terhadap wereng coklat sehat.

DAFTAR PUSTAKA

Aremu, O.I., Femi-Oyewo, M.N. & Popoola, K.O.K. (2009) Repellent Action of Neem (*Azadirachta indica*) Seed Oil Cream Against *Anopheles gambiae* Mosquitoes. *African Research Review*. 3 (3), 12-22.

Asogwa, E.U., Ndubuaku, T.C.N., Ugwu, J.A. & Awe, O.O. (2010) Prospects of Botanical Pesticides from Neem, *Azadirachta indica* for Routine Protection of Cocoa Farms Against the Brown Cocoa Mirid *Sahlbergella singularis* in Nigeria. *Journal of Medicinal Plants Research*. 4 (1), 1-6. doi:10.5897/JMPR09.049.

- Bachuki, S.E. & Mejaya, M.J. (2014) Wereng cokelat sebagai hama global bernilai ekonomi tinggi dan strategi pengendaliannya. *Iptek Tanaman Pangan*. 9 (1).
- Duchon, S., Bonnet, J., Marcombe, S., Zaim, M. & Corbel, V. (2009) Pyrethrum: a Mixture of Natural Pyrethrins has Potential for Malaria Vector Control. *Journal of Medical Entomology*. 46 (3), 516-522. doi:10.1603/033.046.0316.
- Dwiastuti, M.E., Nawir, W. & Wuryantini, S. (2007) Uji Patogenisitas Cendawan Entomopatogen *Hirsutella citiformis*, *Beauveria bassiana* dan *Metarrhizium anisopliae* untuk mengendalikan *Diaphorina citri*. *Jurnal Hortikultura*. 17 (1), 75-80.
- Hamoto, W.R.A. & Koswanudin, D. (2012) Pengujian Laboratorium Insektisida Sainindo 200 EC Terhadap Hama Wereng Coklat pada Tanaman Padi. In: *Perhimpunan Entomologi Indonesia*. 23 hlm.
- Indrayani, I. & Prabowo, H. (2010) Pengaruh Komposisi Media terhadap Produksi Konidia Jamur Entomopatogen *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin. *Buletin Tanaman Tembakau, Serat & Minyak Industri*. 2 (2), 88-94. doi:10.21082/bultas.v2n2.2010.88-94.
- Kardian, A. (2016) *Sistem Pertanian Organik*. PT. Inti Media - Malang ; Kelompok Intrans Publishing.
- Kardian, A. & Karmawati, E. (2013) *Pestisida Nabati*. Bogor, Pusat Penelitian dan Pengembangan Tanaman Perkebunan.
- Kardian, A., Wahyono, T.E. & Tarigan, N. (2017) Persistensi Residu Insektisida Nabati Piretrum dan Mimba Pada Tanaman Padi. *Buletin Penelitian Tanaman Rempah dan Obat*. 28 (2), 191-198. doi:10.21082/bullittro.v28n2.2017.191-198.
- Katti, G. (2013) Biopesticides for Insect Pest Management in Rice- Present Status and Future Scope. *Journal of Rice Research*. 6 (1), 1-15.
- Kompas, 12/8/17 (2017) Gerak Cepat Tangani Serangan Wereng Batang Coklat. *Koran Kompas 12-8-2017*.
- Long, D.W., Groden, E. & Drummond, F.A. (2000) Horizontal transmission of *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. *Agricultural and Forest Entomology*. 2 (1), USDA, 11-17.
- Mokodompit, T.A., Koneri, R., Siahaan, P. & Tangapo, A.M. (2013) Uji Ekstrak Daun *Tithonia diversifolia* sebagai Penghambat Daya Makan *Nilaparvata lugens* Stal. pada *Oryza sativa* L. (Evaluation of *Tithonia diversifolia* Leaf Extract as Feeding Capacity Inhibitor of *Nilaparvata lugens* in *Oryza sativa* L.). *Jurnal Bios Logos. Universitas Samratulangi, Manado*. 3 (2), 50-56.
- Ningsih, N.F., Ratnasari, E. & Faizah, U. (2014) Pengaruh Ekstrak Daun Kumis Kucing (*Orthosiphon aristatus*) terhadap Mortalitas Hama Wereng Coklat (*Nilaparvata lugens*). *Jurnal Lentera Bio. FMIPA, Universitas Negeri Surabaya*. 5 (1), 14-19.
- Pathak, C.S. & Tiwari, S.K. (2012) Insecticidal Action of Neem Seed (*Azadirachta indica* A. Juss) Acetone Extract Against the Life-Cycle Stages of Rice-Moth, *Corcyra cephalonica* Staint. (Lepidoptera: Pyralidae). *World Journal of Agricultural Sciences*. 8 (5), 529-536. doi:10.5829/idosi.wjas.2012.8.5.1235.
- Rasipin, Suhartono, Kartini, A. & Aeny, N. (2012) *Faktor-Faktor yang Berhubungan dengan Kejadian Goiter (Gondok) pada Siswa SD di Wilayah Pertanian*. In: *Seminar Ilmiah Nasional GAKI*. pp. 146-155.
- Rosmiati, A., Hidayat, C., Firmansyah, E. & Setiati, Y. (2018) Potensi *Beauveria bassiana* sebagai Agens Hayati *Spodoptera litura* Fabr. pada Tanaman Kedelai. *Jurnal Agrikultura*. 29 (1), 43-47. doi:10.24198/agrikultura.v29i1.16925.
- Shawkat, M.S., Khazaal, A.Q. & Majeed, M.R. (2011) Extraction of Pyrethrins from *Chrysanthemum cinerariaefolium* petals and study its activity against beetle flour *Tribolium castanum*. *Iraqi J Sci*. 52 (4), 456-463.
- Soetopo, D. & Indrayani, I. (2007) Status Teknologi dan Prospek *Beauveria bassiana* untuk Pengendalian Serangga Hama Tanaman Perkebunan. *Perspektif*. 6 (1), 29-46.
- Subandi, M., Chaidir, L. & Nurjanah, U. (2016) Keefektifan Insektisida BPMC dan Ekstrak Daun Suren terhadap Hama Wereng Batang Coklat (*Nilaparvata lugens* Stal.) dan Populasi Musuh Alami pada Padi Varietas Ciharang. *Agrikultura. UIN Bandung*. 27 (3), 160-166.

- Sukanto & Yulianto, K. (2006) Pengaruh Suhu Penyimpanan Terhadap Viabilitas *Beauveria bassiana* (bals) Vuill Dalam Beberapa Pembawa. *Pelita Perkebunan*. 22 (1), 40-56.
- Suryadi, Y. & Kadir, T.S. (2007) Pengamatan Infeksi Cendawan Patogen Serangga *Metarhizium anisopliae* (Metsch. Sorokin) pada Wereng Batang Coklat. *Jurnal Berita Biologi*. 8 (6), 501-507. doi:10.14203/beritabiologi.v8i6.830.
- Suryadi, Y., Wartono, Susilowati, D.N., Lestari, P., Nirmalasari, C. & Suryani, P. (2018) Patogenisitas *Beauveria bassiana* Strain STGD 7(14)2 dan STGD 5(14)2 Terhadap Wereng Coklat (*Nilaparvata lugens* Stal.). *Jurnal Biologi, Universitas Islam Negeri Syarif Hidayatullah Jakarta*. 11 (2), 122-131. doi:10.15408/kauniyah.v11i2.6694.
- Tuti, H.K., Wijayanti, R. & Supriyadi, S. (2014) Efektifitas Limbah Tembakau Terhadap Wereng Coklat dan Pengaruhnya terhadap Laba-laba Predator. *Caraka Tani: Journal of Sustainable Agriculture*. 29 (1), 17-24.

KELAYAKAN FINANSIAL PRODUKSI BIOPESTISIDA BIJI MIMBA (*Azadirachta indica* A. Juss) DENGAN METODE PENGEPRESAN ULIR

Financial Feasibility Study of Neem (Azadirachta indica A. Juss) Seed Based-Biopesticides Production With Screw Press Method

Dwi Ajjas Pramasari dan A. Heru Prianto

Pusat Penelitian Biomaterial - Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia
Jalan Raya Bogor Km. 46, Cibinong, Bogor 16911

INFO ARTIKEL

Article history:

Received: 04 Maret 2019

Revised: 28 Mei 2019

Accepted: 16 Agustus 2019

Kata kunci:

Azadirachta indica; analisis
sensitivitas; biji; biopestisida;
kelayakan finansial

Key words:

Azadirachta indica; biopes-
tisida; financial feasibility;
seed sensitivity analysis

ABSTRAK/ABSTRACT

Biji mimba merupakan salah satu bahan baku biopestisida berprospek baik, karena mengandung minyak dengan bioaktif limnoid. Salah satu metode untuk memperoleh minyak dari biji mimba yaitu dengan metode pengepresan ulir. Tujuan penelitian adalah untuk mengetahui kelayakan finansial usaha produksi biopestisida dari biji mimba yang diaplikasikan pada skala industri dengan memperhatikan diagram alir proses produksinya. Analisa kelayakan finansial pada penelitian ini dilakukan dengan pendekatan NPV, IRR, *Payback Period* dan *Profitability Index*. Analisa kelayakan finansial menunjukkan usaha biopestisida memiliki nilai NPV Rp 3.026.193.872,00; IRR 46,90 %, *Payback Period* 2 tahun 1 bulan, dan *Profitability Index* 2,40. Berdasarkan keempat kriteria kelayakan tersebut, usaha pembuatan biopestisida berbasis minyak mimba dengan metode pengepresan ulir, layak untuk dikembangkan. Analisis sensitivitas menunjukkan bahwa perubahan harga bahan baku dari biji mimba dan harga jual produk biopestisida sangat mempengaruhi kelayakan usaha biopestisida dari biji mimba dengan metode pengepresan ulir. Analisis kelayakan usaha ini diharapkan dapat dijadikan acuan awal untuk mengembangkan potensi biji mimba sebagai biopestisida.

Neem seed is a potential material for biopesticides, due to its limnoid content in the oil-seed. One of the methods for extracting neem seed oil is using screw press. The study aimed to determine the financial feasibility of neem seed based-biopesticides production for industrial-scale using flow chart of production approach. The tools used in this research was the financial feasibility approach such as NPV, IRR, Payback Period and Profitability Index. The financial feasibility study showed that biopesticides production was obtained at NPV Rp 3,026,193,872.00, IRR 46.90 %, Payback Period at 2 years 1 month, and Profitability Index at 2.40. The result of financial feasibility indicated that the biopesticides production using a screw press method at an industrial scale was feasible to be done. Sensitivity analysis showed that fluctuation of raw material cost and price of biopesticides product, affected the feasibility of neem seed based-biopesticides production using screw press method. This feasibility study is expected to be used as an initial reference for developing the potential of neem seed as biopesticides.

PENDAHULUAN

Penggunaan pestisida dalam program pengendalian organisme pengganggu tanaman (OPG) diketahui memiliki dampak negatif bagi ekologi pertanian dan manusia (Whitten 1992). Sawahyono (2009) menyatakan penggunaan

biopestisida di negara berkembang seperti Indonesia dapat menurunkan penggunaan insektisida kimia 50-100 % tanpa kehilangan hasil panen serta dapat menurunkan biaya produksi pertanian.

Salah satu bahan alam yang dilaporkan memiliki aktivitas sebagai pestisida adalah

*Alamat Korespondensi : dwi.ajjas@gmail.com

tumbuhan dari famili Meliaceae. Saat ini, telah ditemukan sekitar 11 spesies tumbuhan dari famili Meliaceae yang mengandung metabolit sekunder berupa terpenoid dengan mekanisme kerja sebagai penolak makan (*antifeedant*) bagi serangga, *repellent*, antibakteri, dan antijamur (Nuryanti 2015). Mimba (*Azadirachta indica*, A. Juss.) merupakan salah satu tumbuhan dari famili Meliaceae yang sudah sejak lama digunakan sebagai pestisida alami untuk mengendalikan berbagai jenis hama tanaman. Debashri dan Tamal (2012) menyatakan bahwa semua bagian dari pohon mimba memiliki aktivitas sebagai insektisida, tetapi biji mimba paling efektif sebagai pestisida karena mengandung senyawa aktif dari golongan triterpene atau limnoids yaitu azadirachtin, salannin, meliantriol dan nimbin. Ekstrak biji mimba juga digunakan sebagai penghambat pertumbuhan cendawan seperti *Monilia frusticola*, *Penicillium expansum*, *Trichothesium roseim*, *Alternaria alternate* dan *Aspergillus flavus* (Krishnamurthy dan Shashikala 2006; Wang *et al.* 2010).

Teknologi proses pembuatan biopestisida dari biji mimba telah dikembangkan oleh Pusat Penelitian Biomaterial-LIPI sejak tahun 2005 mulai dari skala laboratorium sampai dengan skala lapangan. Proses pemisahan minyak dari biji mimba dalam penelitian menggunakan metode pengepresan dengan mesin pres jenis *screw press* (pengepresan ulir) telah berhasil dilakukan (Prianto *et al.* 2016a). Proses ini dianggap lebih menguntungkan karena proses lebih cepat, biaya murah, dan rendemen yang tinggi. Sejauh ini, analisa kelayakan finansial pendirian usaha yang menghasilkan produk biopestisida dari biji mimba dengan metode pengepresan ulir belum pernah dilakukan. Menurut Kusuma dan Mayasti (2014) penunjang keberhasilan pengembangan sebuah teknologi, selain analisa aspek kelayakan teknis, juga perlu dilakukan analisis kelayakan aspek finansial.

Produksi biopestisida dari biji mimba di beberapa negara telah berkembang, tetapi di Indonesia sendiri biopestisida berbahan aktif azadirachtin jumlahnya terbatas dan sulit diperoleh (Subiyakto 2009). Oleh karena itu, peningkatan skala produksi biopestisida dari biji mimba dengan metode pengepresan ulir ini cukup menjanjikan.

Teknologi proses pembuatan suatu produk biopestisida biji mimba dengan metode pengepresan ulir harus dikaji analisa kelayakan finansialnya apabila akan diaplikasikan secara komersial.

Analisis kelayakan finansial merupakan salah satu aspek penting dalam mengkaji pengembangan produk, karena dapat menentukan kelayakan suatu usaha berdasarkan manfaat dan keuntungan yang dihasilkan (Suryana *et al.* 2012). Analisis tersebut merupakan bagian dari perencanaan usaha yang tidak terpisah dari pengumpulan data yang sesuai dengan kondisi terkini. Kesalahan dalam penentuan asumsi teknologi produksi, ketersediaan bahan baku, fluktuasi harga, perkiraan tenaga kerja dapat menyebabkan kerugian usaha. Jenis usaha yang didirikan akan berpengaruh terhadap analisis kelayakan finansial, terutama pada usaha yang masih bersifat baru (Kusuma dan Mayasti 2014).

Kajian yang menjelaskan analisis kelayakan finansial produksi biopestisida lebih banyak ke arah pemanfaatan biopestisida untuk komoditas pertanian. Pribadi *et al.* (2015) mengkaji kelayakan ekonomi penggunaan biopestisida berbahan baku minyak cengkeh dan seraiwangi untuk pengendalian hama utama lada. Hasil analisisnya menunjukkan campuran pestisida nabati dan sintetik layak untuk diaplikasikan walaupun dari kajian kelayakan ekonomi (B/C rasio, NPV dan IRR) lebih rendah dibandingkan dengan penggunaan pestisida sintetik saja. Analisis finansial penggunaan biopestisida yang berasal dari campuran lengkuas, daun mimba, seraiwangi dan daun sirih yang diaplikasikan pada usaha tani jahe putih besar menunjukkan bahwa penggunaan pestisida nabati layak digunakan dan relatif tidak sensitif terhadap penurunan produktivitas dan harga (Ermianti 2018).

Penghitungan kelayakan finansial dari usaha produksi biopestisida ini diharapkan dapat menjadi acuan awal dalam pendirian usaha produksi biopestisida biji mimba dengan metode pengepresan ulir. Salah satu dasar kajian yang dilakukan adalah menentukan diagram alir proses dari produksi biopestisida tersebut sehingga memperlihatkan kebutuhan bahan, rangkaian peralatan yang terpilih, hubungan arus bahan, *flow rate* dan komposisi arus bahan serta kondisi

proses (Soetrisnanto dan Hargono 2008). Tujuan penelitian ini adalah untuk menganalisis kelayakan finansial usaha produksi biopestisida dari biji mimba dengan metode pengepresan ulir dan sensitivitasnya terhadap perubahan faktor biaya.

BAHAN DAN METODE

Tempat dan waktu penelitian

Pengumpulan data penelitian untuk analisis finansial produksi biopestisida dilakukan sejak September-November 2017 di Pusat Penelitian Biomaterial – Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia.

Jenis dan sumber data

Data primer yang digunakan pada penelitian berdasarkan penelitian sebelumnya (Pranto *et al.* 2016b). Selain itu, dilakukan metode wawancara dengan tim peneliti biopestisida dengan pengepresan ulir dari biji mimba untuk mengetahui kebutuhan bahan baku, mesin peniiran, kebutuhan listrik dan faktor-faktor lain yang berpengaruh dalam proses produksi biopestisida. Data sekunder berupa pustaka pendukung seperti data asumsi yang digunakan pada perhitungan kelayakan finansial serta standar harga yang berlaku di pasaran pada bulan September 2017. Data yang terkumpul diolah untuk memperoleh informasi terkait penerimaan dan pengeluaran usaha biopestisida yang merupakan dasar penilaian kelayakan finansial lainnya serta dasar perhitungan dalam pembuatan flow chart proses produksi biopestisida.

Analisa kelayakan finansial

Asumsi dasar yang digunakan untuk menghitung kelayakan finansial pembuatan biopestisida mimba mengacu pada kajian pustaka (Anderson 2009; Aries dan Newton 1955) ditampilkan pada Tabel 1. Penentuan kapasitas produksi biopestisida minyak mimba sebesar 100 liter setara dengan 400 kemasan botol (volume 250 ml), dan waktu operasional 24 hari kerja per bulan berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Pranto *et al.* (2016b).

Tabel 1. Asumsi kelayakan finansial.

Table 1. Assumption for feasibility study.

No	Komponen biaya	Asumsi dasar
1	Sumber dan struktur permodalan	100 % modal sendiri
2	Suku bunga	15 %
3	Biaya pemeliharaan	5 % dari nilai investasi alat
4	Biaya asuransi dari mesin dan peralatan	2 % dari nilai awal investasi mesin dan peralatan
5	Biaya penelitian di laboratorium	0,5 % dari bahan baku produksi
6	Biaya payroll overhead	5 % dari gaji pegawai
7	Biaya plant overhead	2 % dari total biaya produksi
8	Gaji	Sebanyak 13 kali (termasuk THR)
9	Umur proyek	10 tahun

Sumber/Source : Anderson 2009; Aries dan Newton 1955

Aspek kelayakan finansial skala produksi biopestisida dikaji menggunakan beberapa kriteria kelayakan yaitu NPV (*Net Present Value*), IRR (*Internal Rate of Return*), *Payback Period* dan *Profitability Index*, dengan persamaan sebagai berikut (Pasaribu 2012):

$$NPV = \sum_{t=1}^N (Bt - Ct) / (1 + i)^t \dots\dots\dots (1)$$

$$IRR = i' + NPV / (NPV' + NPV'') * (i' - i'') \dots\dots\dots (2)$$

$$Payback\ Period = (investasi\ awal) / (arus\ kas) \times 1\ tahun \dots\dots (3)$$

$$Profitability\ Index = Nilai\ Aliran\ Kas\ Masuk / Nilai\ Investasi \dots\dots (4)$$

Bt	: penerimaan kotor pada tahun ke-t/gross receipts in the t-year
Ct	: total biaya proyek pada tahun ke-t/total project cost in the t-year
i	: tingkat suku bunga/interest rates
t	: periode investasi/investment period
n	: umur proyek/project life
i'	: tingkat suku bunga yang menghasilkan NPV positif/interest rates that produce a positive NPV
i''	: tingkat suku bunga yang menghasilkan NPV negatif/interest rates that produce a negative NPV
NPV'	: NPV positif/NPV positive
NPV''	: NPV negatif/NPV negative
NPV' + NPV''	: penjumlahan mutlak/absolute sum

Apabila nilai $NPV > 0$, $IRR > Social\ Discount\ Rate$ dan $Profitability\ Index > 1$ berarti usaha produksi biopestisida dari biji mimba secara finansial menguntungkan dan layak dilaksanakan. Analisis sensitivitas dihitung untuk komponen biaya masing-masing yang akan mempengaruhi

nilai kelayakan suatu usaha dengan cara menurunkan atau menaikkan nilai komponen biaya dari nilai dasarnya. Dari perhitungan analisis sensitivitas dapat diketahui harga ekstrim masing-masing komponen biaya yang akan mempengaruhi kelayakan usaha (Alamsyah dan Supriatna 2018).

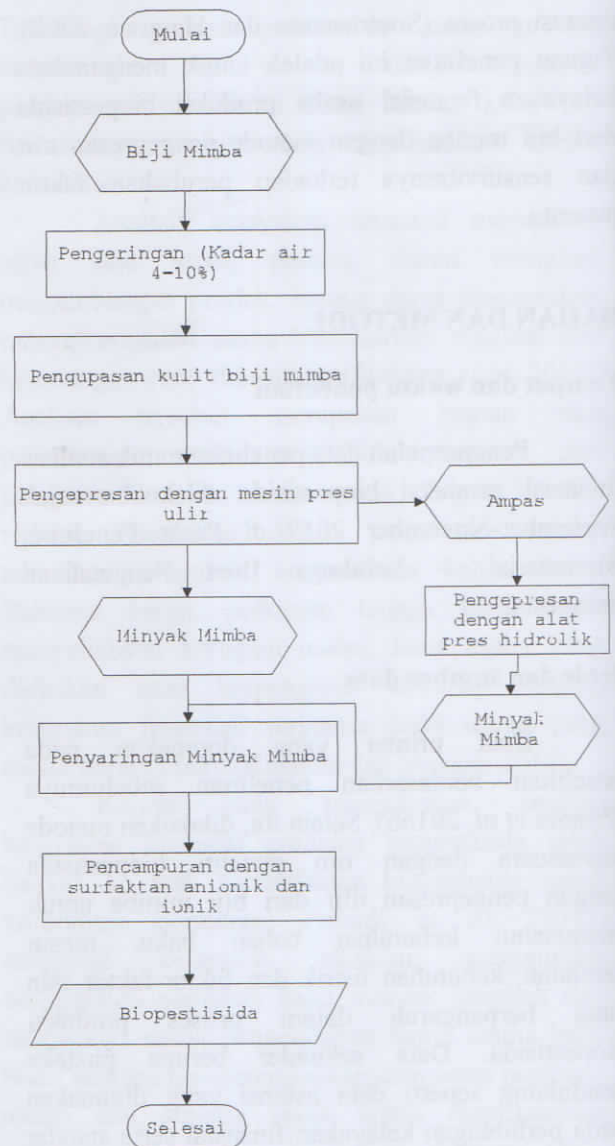
HASIL DAN PEMBAHASAN

Deskripsi alir proses dan neraca massa produksi biopestisida

Proses pembuatan biopestisida pada penelitian ini sesuai dengan paten terdaftar No. P00201608068 (Prianto *et al.* 2016b) yaitu dengan mengeringkan biji mimba sampai kadar airnya 4-10 %, kemudian dilakukan pengupasan kulit biji mimba, selanjutnya dilakukan pengepresan dengan menggunakan mesin pengepres ulir sehingga dihasilkan minyak dan ampas. Ampas hasil pengepresan dilakukan pengepresan kembali dengan menggunakan alat *press hydraulic* sehingga dihasilkan minyak. Minyak dari setiap tahap pengepresan dikumpulkan dan disaring untuk memisahkan air yang terkandung di dalam minyak. Proses selanjutnya mencampurkan minyak mimba yang dihasilkan sebesar 90-94 % dengan surfaktan anionik (2-3 %) dan surfaktan ionik (4-7 %). Penambahan surfaktan dilakukan dengan cara menambahkannya ke dalam minyak sedikit demi sedikit sambil diaduk dengan kecepatan 920 rpm (Gambar 1).

Laju alir proses dan neraca massa produksi biopestisida

Diagram alir proses adalah dokumen kunci dalam proses desain, yang menunjukkan rangkaian peralatan yang terpilih, hubungan arus bahan, *flow rate* dan komposisi arus bahan serta kondisi operasi proses (Soetrisnanto dan Hargono 2008). Pada penelitian biopestisida dari biji mimba ini, perhitungan neraca massa sebagai salah satu komponen diagram alir proses menggunakan kapasitas produksi biopestisida yang dihasilkan 100 l/hari setara dengan kapasitas bahan baku 400 kg/hari dengan waktu operasional per bulan dihitung selama 24 hari kerja. Kapasitas yang digunakan termasuk dalam skala industri kecil, karena selain kapasitas produksinya yang masih



Gambar 1. Diagram alir produksi biopestisida biji mimba.

Figure 1. Flow chart of neem seed based-biopesticides production.

kecil, tenaga kerja yang digunakan pada analisa kelayakan finansial ini juga masih kurang dari 10 orang. Kapasitas produksi ini akan berpengaruh terhadap pemilihan alat yang digunakan untuk produksi biopestisida dari biji mimba. Perhitungan kapasitas produksi biopestisida per jam yang dijadikan acuan dari *flow rate* selengkapnya diuraikan sebagai berikut :

Kapasitas bahan baku	: 400 kg/hari
Waktu operasi	: 1 hari = 12 jam
Basis perhitungan	: 1 jam operasi

Kapasitas produksi biopestisida dari biji mimba per jam : $(400 \text{ kg}) / (1 \text{ hari}) \times (1 \text{ hari}) / (12 \text{ jam}) = 33,33 \text{ k/jam}$.

Kandungan awal azadirachtin dan air pada biji mimba yang digunakan didasarkan pada data persentase kandungan azadirachtin yang dilakukan oleh Elterafi dan Hassanali (2011), sedangkan kandungan air berdasarkan Hartanto dan Hutajulu (2012). Sisa zat terkandung lainnya merupakan pengurangan dari persentase azadirachtin dan kadar air (Tabel 2). Kandungan azadirachtin pada biji mimba dijadikan acuan utama dalam perhitungan diagram alir proses disebabkan kandungan zat aktif terbesar pada biopestisida, sedangkan sisanya diasumsikan sebagai air dan zat terkandung lainnya.

Menurut Debashri dan Tamal (2012), terdapat zat aktif lainnya yang terkandung pada biji mimba yang berperan secara sinergis dengan azadirachtin yaitu meliantriol, salanin dan nimbin. Azadirachtin tidak langsung mematikan serangga, tetapi melalui mekanisme menolak makanan, mengganggu pertumbuhan dan reproduksi serangga, sedangkan meliantriol bekerja sebagai penolak serangga. Sementara itu, salanin bekerja sebagai penghambat makan serangga serta nimbin sebagai antivirus (Anonim 1992; Subiyakto 2009).

Kadar air bahan baku biji mimba hasil pengeringan dari biji mimba di pasaran yang digunakan pada perhitungan neraca massa sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Prianto *et al.* (2016b) yaitu berkisar 4-10 % dan digunakan rata-ratanya yaitu 7 %. Hal ini dikarenakan biji mimba di pasaran memiliki kadar air lebih tinggi

dari 4-10 %, berkisar 14,7 % sehingga diperlukan proses pengeringan terlebih dahulu (Hartanto dan Hutajulu 2012). Hasil perhitungan laju alir proses pengeringan mengakibatkan kandungan air hilang sebesar 4,65 kg/jam.

Proses produksi yang paling penting yaitu pemisahan minyak dari biji mimba yang digunakan dalam studi kelayakan ini menggunakan metode pengepresan dengan alat press ulir. Proses ini lebih menguntungkan karena perlakuan bahan baku yang minim, proses yang cepat, biaya murah, dan rendemen yang tinggi. Selain itu, mimba mengandung asam lemak yang memiliki titik beku yang rendah sehingga proses pengepresan ulir merupakan proses yang sangat cocok untuk pemisahan minyak dari biji. Prinsip kerja dari alat pengepresan ulir, selain terdapat proses pengepresan, terjadi juga gesekan antar bahan sehingga minyak mimba dapat terekstraksi sempurna. Keunggulan ini yang tidak didapatkan dari proses pengepresan menggunakan proses pengepresan hidrolik (Prianto *et al.* 2016b).

Metode lainnya yang sering digunakan dalam memperoleh minyak mimba adalah melalui proses ekstraksi dengan menggunakan pelarut organik seperti pelarut heksan (Farida dan Christian 2015). Rendemen yang dihasilkan dengan menggunakan pelarut organik lebih tinggi dibandingkan dengan proses pengepresan. Namun, dari segi kelayakan finansial, penggunaan pelarut heksan membutuhkan biaya yang lebih tinggi dengan harga heksan teknis di pasaran sebesar Rp 125.000,00/l. Selain itu, peralatan yang digunakan dalam proses ekstraksi membutuhkan bahan khusus yang tahan terhadap pelarut heksan. Penggunaan heksan akan membuat penambahan biaya pengolahan limbah dikarenakan jumlah limbah yang diproduksi menjadi lebih banyak (Anderson 2009).

Selain menggunakan alat press ulir, juga digunakan alat pres hidrolik untuk mengambil minyak pada ampas hasil pengepresan ulir. Hal ini bertujuan agar minyak yang tersisa pada ampas dapat diekstraksi, sehingga tidak ada minyak yang terbuang. Minyak yang dihasilkan dari kedua alat pres tersebut kemudian disaring untuk menghilangkan air, sehingga minyak yang dihasilkan menjadi lebih murni. Selanjutnya, minyak murni tersebut

Tabel 2. Kandungan biji mimba.

Tabel 2. The composition of neem seeds.

No.	Parameter	Biji mimba	
		Kandungan (%)	Asumsi perhitungan (%)
1.	Kadar air (%)*	14,7	15
2.	Azadirachtin (%)**	0,17	0,2
3.	Zat terkandung lainnya (ZTL) (diff)***	83	84,8

Keterangan/Note :

* Hartanto & Hutajulu (2012).

** Elterafi & Hassanali (2011).

*** kadar azadirachtin-kadar air/azadirachtin content-water content.

dicampur dengan surfaktan anionik (2-3 %) dan surfaktan ionik (4-7 %) dengan cara menambahkan surfaktan ke dalam minyak sedikit demi sedikit sambil dilakukan pengadukan dengan kecepatan 920 rpm menggunakan mixer. Setelah itu dilakukan pengemasan biopestisida pada kemasan 250 ml.

Sesuai dengan perhitungan neraca massa laju alir, terlihat bahwa kandungan azadirachtin ($C_{35}H_{44}O_{16}$) sebesar 0,02 kg/jam dengan rendemen minyak yang dihasilkan dari perhitungan sebesar 25 %. Hal ini sesuai dengan penelitian yang telah dilakukan oleh Prianto *et al.* (2016b). Beberapa penelitian menunjukkan bahwa rendemen minyak mimba yang dihasilkan bervariasi dari 41,1-47,4 % (Elteraifi dan Hassanali 2011) atau rendemen yang didapatkan sebesar 34,6 % (Hartanto dan Hutajulu 2012). Perbedaan rendemen yang dihasilkan dikarenakan perbedaan metode ekstraksi biji mimba yang digunakan dengan heksan (Elteraifi dan Hassanali 2011) dan fermentasi menggunakan mikroba (Hartanto dan Hutajulu 2012).

Penambahan surfaktan baik surfaktan ionik maupun anionik, bertujuan agar biopestisida dapat bercampur dengan air ketika dilakukan pengenceran untuk aplikasi penggunaannya di lapangan. Peralatan dan perhitungan neraca massa yang dilakukan dalam pembuatan biopestisida berbahan baku mimba ditampilkan pada Lampiran 1.

Analisa kelayakan finansial

Kelayakan suatu usaha tidak saja dipengaruhi oleh pemakaian suatu teknologi proses, tetapi dipengaruhi oleh komponen-komponen biaya lainnya seperti harga bahan baku, harga jual produk, upah tenaga kerja, bahan bakar dan investasi. Jika dari hasil analisa menunjukkan bahwa suatu usaha tidak layak, maka solusi yang dapat diambil, diantaranya adalah mencari sumber bahan baku yang lebih murah dengan mendekatkan suatu usaha ke sumber bahan baku, atau mendekatkan ke sumber tenaga kerja yang murah (Alamsyah dan Supriatna 2018). Berikut adalah analisa kelayakan finansial usaha biopestisida biji mimba dengan metode pengepresan ulir.

Biaya produksi biopestisida biji mimba dengan pengepresan ulir

Biaya usaha biopestisida biji mimba ini meliputi semua pengeluaran yang diperlukan untuk membuat usaha biopestisida biji mimba dengan metode pengepresan ulir dengan umur proyek 10 tahun. Biaya usaha dalam penelitian ini dikategorikan menjadi dua jenis yaitu biaya investasi dan biaya operasional produksi.

Perhitungan biaya investasi

Biaya investasi adalah biaya yang dikeluarkan untuk memulai suatu usaha yang didapatkan berdasarkan variabel-variabel investasi yang perlu diperkirakan atau dihitung terlebih dahulu seperti investasi awal (peralatan dan gedung), masa investasi dan tingkat suku bunga (Wahyudhi dan Utomo 2014; Sari *et al* 2016). Kusuma dan Mayasti (2014) menyatakan bahwa biaya investasi merupakan biaya tetap yang besarnya tidak dipengaruhi oleh jumlah produk yang dihasilkan. Jumlah biaya investasi yang dikeluarkan untuk mendirikan usaha produksi biopestisida dari biji mimba sebesar Rp 2.156.897.500,00. Rincian biaya investasi yang dikeluarkan ditampilkan pada Tabel 3.

Perhitungan biaya penyusutan peralatan dan bangunan

Biaya penyusutan peralatan merupakan perhitungan dari biaya tetap alat dan bangunan investasi dengan mempertimbangkan umur ekonomisnya (Tabel 4). Asumsi umur ekonomis peralatan yang digunakan adalah 3 tahun, kecuali tanah dan bangunan diasumsikan umur ekonomisnya selama 10 tahun (Aries dan Newton 1955).

Perhitungan biaya operasional produksi

Perhitungan biaya operasional produksi ditentukan berdasarkan besarnya jumlah produk yang diproduksi. Menurut Kusuma dan Mayasti (2014) biaya produksi terdiri dari biaya tetap dan biaya variabel. Biaya tetap yang digunakan pada

Tabel 3. Biaya investasi produksi biopestisida biji mimba dengan metode pengepresan ulir.
 Table 3. Investment cost of neem seed based- biopesticides production with screw press method.

Uraian	Jumlah	Unit	Harga satuan (Rp)	Total biaya (Rp)
Alat press	2	unit	140.000.000	280.000.000
Wadah pengalir kapasitas 50 l	1	unit	25.000.000	25.000.000
Wadah pengalir botol	1	unit	10.000.000	10.000.000
Wadah pengalir	2	unit	14.000.000	28.000.000
Plano	1	unit	1.000.000	1.000.000
Botol plastik	1	paket	3.000.000	3.000.000
Tanah (200 m ²) dan bangunan (235 m ²)	1	unit	1.775.000.000	1.775.000.000
Biaya operasi	1	paket	34.897.500	34.897.500
Total investasi (Rp)				2.156.897.500

Tabel 4. Biaya penyusutan produksi biopestisida biji mimba dengan metode pengepresan ulir.
 Table 4. Depreciation cost of neem seed based- biopesticides production with screw press method.

Uraian	Biaya investasi (Rp)	Umur ekonomis (tahun))	Nilai penyusutan per tahun (Rp)
Alat press	280.000.000	3	93.333.333
Wadah pengalir kapasitas 50 l	25.000.000	3	8.333.333
Wadah pengalir botol	10.000.000	3	3.333.333
Wadah pengalir	28.000.000	3	9.333.333
Plano	1.000.000	3	333.333
Tanah (200 m ²) dan bangunan (235 m ²)	1.775.000.000	10	117.500.000
Total biaya penyusutan (Rp)			232.166.667

selain itu, biaya ini adalah biaya pemeliharaan, sewa, laboratorium, dan biaya penyusutan mesin peralatan. Sementara itu, biaya variabel meliputi biaya bahan baku, utilitas, tenaga kerja dan pengemasan, *payroll overhead*, dan *plant overhead*. Perhitungan biaya produksi seluruhnya dapat dilihat pada Tabel 5.

Perhitungan kebutuhan biji mimba setahun sebanyak 96.000 kg untuk kapasitas produksi 24.000 l biopestisida. Harga biji mimba mendominasi komponen pada biaya produksi biopestisida berkisar 80 % dari total biaya produksi. Susila *et al.* (2014) menyatakan bahwa pemasaran biji mimba dari petani ke konsumen yang menjadi tujuan utama pemasaran masih perlu dilakukan perbaikan. Harga biji mimba di petani cukup rendah berkisar antara Rp 1.000,00-Rp3.000,00/kg. Namun harga meningkat hingga mencapai Rp 40.000,00/kg setelah sampai konsumen karena panjangnya rantai tata niaga yang harus dilewati mulai dari pengepul,

transportasi dan penyimpanan. Tanaman mimba umumnya dijumpai sebagai pembatas kebun, bukan sebagai tanaman dominan, bercampur dengan tanaman penghasil kayu dan tanaman serbaguna lainnya, karena dianggap kurang menguntungkan oleh petani (Susila 2017).

Penerimaan dan pendapatan produksi biopestisida biji mimba dengan pengepresan ulir

Penentuan harga pokok penjualan dari biopestisida didapatkan dari total biaya operasional produksi Rp 3.957.456.110,00 dibagi dengan kapasitas produksi yang dihasilkan yaitu 24.000 l untuk dijadikan 96.000 botol (ukuran 250 ml) yang merupakan kapasitas produksi maksimal yang telah didapatkan pada tahun pertama produksi. Jika dihubungkan dengan perhitungan kapasitas laju alir proses, kapasitas maksimal ini sama dengan laju alir proses produk sebesar 8,36 kg/jam (Lampiran 1).

Tabel 5. Biaya operasional produksi biopestisida biji mimba dengan pengepresan ulir.

Table 5. Operational production cost of neem seed based-biopesticides with screw press method.

No	Uraian	Total biaya (Rp)		
1	Biaya tetap			
	Maintenance	5% dari biaya investasi alat		17.200.000
	Biaya asuransi	2% dari total biaya investasi		43.137.950
	Biaya laboratorium	0,5% dari bahan baku		17.279.040
	Biaya penyusutan peralatan			232.166.667
		Jumlah	Unit	Harga satuan (Rp)
2	Biaya variabel			Total biaya (Rp)
	Biji mimba	79.920	Kg	40.000
	Surfaktan ionik	960	L	62.000
	Surfaktan anionik	480	L	55.600
	Packing (botol + label)	96.000	pcs	1.800
	Air	595.200	L	1.800
	Listrik	9.600	Kwh	1.800
	Solar	2.400	L	7.500
	Tenaga kerja	4	orang	
	Payroll overhead	5% dari tenaga kerja		
	Plant overhead	2% dari total bahan baku+tenaga kerja+utilitas		
	Total biaya produksi			

Asumsi keuntungan yang digunakan sebesar 27,35 % atau setara dengan Rp11.276,00 sehingga harga jual per botol biopestisida dari mimba ini terhitung sebesar Rp52.500,00 untuk ukuran 250 ml (Tabel 6). Jika dibandingkan dengan harga biopestisida sejenis di pasaran yang berkisar Rp70.000,00-Rp90.000,00 untuk kemasan 100 ml, maka harga biopestisida tersebut termasuk kompetitif untuk dijual di pasaran.

Penerimaan produksi biopestisida ini merupakan perkalian antara banyaknya jumlah produk biopestisida yang dihasilkan (botol) dengan harga jual produk biopestisida. Sementara itu, pendapatan merupakan selisih yang dihasilkan dari besarnya penerimaan produk yang dihasilkan dikurangi dengan total biaya yang dikeluarkan dalam produksi biopestisida ini. Dalam hal usaha produksi biopestisida ini, diasumsikan tidak ada kenaikan bahan baku maupun komponen biaya operasional lainnya selama 10 tahun, sehingga penerimaan dan pendapatan yang didapatkan per tahunnya sama (Tabel 7).

Proyeksi laba/rugi

Proyeksi laba/rugi dilakukan untuk mengetahui tingkat profitabilitas dari rencana kegiatan investasi. Perhitungan laba/rugi didapat dari selisih penerimaan dan pengeluaran (Kusuma

Tabel 6. Harga jual produksi biopestisida dari biji mimba.

Table 6. Price of neem seed based-biopesticides.

No	Uraian	Jumlah (Rp)
1	Harga Pokok Penjualan	41.224
2	Margin (27,35b%)	11.275
	Total	52.499
	Harga jual	52.500

Tabel 7. Pendapatan biopestisida biji mimba dengan pengepresan ulir.

Table 7. Revenue of neem seeds based-biopesticide production with screw press method.

Tahun ke-	Biaya (Rp)	Penerimaan (Rp)	Pendapatan (Rp)
1	3.791.656.000	5.040.000.000	1.248.344.000
2	3.791.656.000	5.040.000.000	1.248.344.000
3	3.791.656.000	5.040.000.000	1.248.344.000
4	3.791.656.000	5.040.000.000	1.248.344.000
5	3.791.656.000	5.040.000.000	1.248.344.000
6	3.791.656.000	5.040.000.000	1.248.344.000
7	3.791.656.000	5.040.000.000	1.248.344.000
8	3.791.656.000	5.040.000.000	1.248.344.000
9	3.791.656.000	5.040.000.000	1.248.344.000
10	3.791.656.000	5.040.000.000	1.248.344.000

dan Mayasti 2014). Hasil perhitungan menunjukkan usaha produksi biopestisida menghasilkan laba bersih sebesar Rp 799.977.223,00 per tahun atau Rp 66.664.769,00 per bulan (Tabel 8).

Tabel 9. Proyeksi laba rugi produksi biopestisida dari biji mimba.
 Table 9. Income statement account of neem seed based-biopesticides production.

No	Uraian	Total biaya (Rp)
Biaya produksi		
1.	Bahan baku dan kemasan	3.455.808.000
2.	Ulitir	88.848.000
3.	Tenaga kerja	247.000.000
	Total biaya produksi	3.791.656.000
Penerimaan		
1.	Nilai jual biopestisida	5.040.000.000
	Laba kotor	1.248.344.000
Biaya Tidak Langsung		
1.	Maintenance	17.200.000
2.	Manajemen	43.137.950
3.	Laboratorium	17.279.040
4.	Small overhead	12.350.000
5.	Plant overhead	75.833.120
	Total biaya tidak langsung	165.800.110
1.	Laba operasional	1.082.543.890
2.	Penjualan	232.166.667
3.	Laba Sebelum bunga dan pajak	850.377.223
4.	Pajak	50.400.000
	Laba bersih	799.977.223

Aliran kas (cashflow) dan kriteria kelayakan investasi

Aliran kas terdiri dari aliran kas masuk dan keluar. Komponen aliran kas masuk terdiri dari pendapatan hasil penjualan produk, sedangkan kas keluar terdiri dari biaya investasi, biaya operasional, dan pajak penghasilan (Kusuma dan Mayasti 2014). Aliran kas pada produksi biopestisida ditampilkan pada Lampiran 2. Analisis keuangan finansial menentukan kelayakan dalam mendirikan suatu industri terutama dalam jangka panjang dengan menggunakan alat analisis keuangan finansial atau alat kriteria investasi (Gunnarika et al. 2015).

Perhitungan Net Present Value dan Profitability Index

Analisis NPV dilakukan untuk melihat nilai investasi dengan mempertimbangkan perubahan nilai mata uang sehingga terdapat perbedaan antara nilai sekarang dari keuntungan dan biaya. Selain itu, perhitungan NPV menggunakan data kas masuk berdasarkan laporan arus kas dengan asumsi bunga

yang dipakai adalah tingkat suku bunga yang bebas risiko (Juniar 2010; Kusuma dan Mayasti 2014). Diasumsikan tingkat suku bunga yang digunakan adalah 15 %. Berdasarkan kriteria kelayakan finansial pada tingkat suku bunga 15 % diperoleh nilai NPV untuk usaha pembuatan biopestisida dari biji mimba sebesar Rp 3.026.193.872,00 atau nilai tersebut lebih besar dari nol (Tabel 9). Hal ini berarti bahwa usaha pembuatan biopestisida dengan bahan baku minyak mimba menggunakan metode pengepresan ulir ini layak untuk diusahakan karena memberikan keuntungan dengan nilai sekarang (*present value*) atau dengan kata lain dapat memperoleh peningkatan nilai uang.

Perhitungan kelayakan suatu usaha yang paling utama didasarkan atas kriteria NPV dikarenakan konsep dari NPV adalah nilai bersih dari arus kas masuk dan keluar yang dihitung pada saat ini atau periode nol (Alamsyah dan Supriatna 2018). Selain itu, *profitability index* senilai 2,40 atau lebih besar dari 1 maka usulan usaha biopestisida tersebut dapat diterima dan dapat dilakukan.

Metode *profitability index* menunjukkan perbandingan *present value* kas masuk dengan *present value* kas keluar (Juniar 2010). Salah satu cara untuk mendapatkan *profitability index* yang tinggi adalah meningkatkan kas masuk dengan meningkatkan penjualan baik kuantitas maupun harga.

Perhitungan Internal Rate of Return (IRR)

Kriteria untuk menentukan sebuah industri layak atau tidak layak yaitu dengan menggunakan tingkat bunga yang berlaku pada lembaga keuangan sebagai dasar pembandingan. IRR tingkat investasi adalah tingkat suku bunga yang berlaku dan menunjukkan nilai sekarang (NPV) dengan jumlah yang sama dengan keseluruhan investasi proyek (Kusuma dan Mayasti 2014). Jika IRR lebih besar dibandingkan tingkat suku bunga bank, maka usaha dinyatakan layak. IRR yang diperoleh pada usaha pembuatan biopestisida dari biji mimba ini sebesar 46,90 %, maka dapat diartikan bahwa usaha ini menguntungkan atau layak dilaksanakan dibandingkan dengan mendepositokan modal tersebut pada bank (Tabel 9).

Tabel 9. Kelayakan finansial kelayakan produksi biopestisida dari biji mimba.

Table 9. Feasibility study of neem seed based biopesticides production.

Tahun ke-	Discount factor (15 %)	Kas masuk bersih (laba bersih + penyusutan) (Rp)	Present Value dari kas masuk bersih
1	0,87	1.032.143.890	897.516.426
2	0,76	1.032.143.890	780.449.066
3	0,66	1.032.143.890	678.651.362
4	0,57	1.032.143.890	590.131.619
5	0,50	1.032.143.890	513.157.930
6	0,43	1.032.143.890	446.224.287
7	0,38	1.032.143.890	388.021.119
8	0,33	1.032.143.890	37.409.669
9	0,28	1.032.143.890	293.399.712
10	0,25	1.032.143.890	255.130.184
Total PV dari kas masuk			5.180.091.372
Nilai investasi			2.153.897.500
Net Present Value			3.026.193.872
IRR			46,90 %
Profitability index			2,40

Perhitungan Payback Period

Hasil analisis tingkat pengembalian investasi (*payback period*) berdasarkan nilai sekarang memperlihatkan bahwa untuk memperoleh kembali nilai investasi yang telah dilakukan diperlukan waktu selama 2 tahun 1 bulan (Tabel 10). Berdasarkan hasil tersebut, usaha biopestisida ini layak untuk didirikan karena waktu pengembalian modal lebih cepat dibandingkan dengan umur proyek selama 10 tahun. Menurut Kusuma dan Mayasti (2014), *payback period* merupakan waktu minimum untuk mengembalikan investasi awal dalam bentuk aliran kas yang didasarkan atas total penerimaan. Dari keempat kriteria kelayakan di atas menunjukkan bahwa usaha pembuatan biopestisida dari minyak mimba dengan metode pengepresan ulir layak untuk dilaksanakan.

Analisis sensitivitas

Analisis kelayakan sensitivitas merupakan analisis yang dilakukan untuk mengetahui akibat dari perubahan parameter-parameter produksi terhadap perubahan kinerja sistem produksi dalam menghasilkan keuntungan. Perhitungan analisis sensitivitas dapat memprediksi akibat yang mungkin terjadi dari perubahan-perubahan tersebut, sehingga dapat diketahui dan diantisipasi

Tabel 10. *Payback period* usaha pembuatan biopestisida dari biji mimba.Table 10. *Payback period* of neem seed based biopesticides production.

Tahun ke-	Kas masuk bersih (laba bersih + penyusutan) (Rp)	Nilai investasi-kas masuk bersih (Rp)
1	1.032.143.890	1.121.753.610
2	1.032.143.890	89.609.720
3	1.032.143.890	-
4	1.032.143.890	-
5	1.032.143.890	-
6	1.032.143.890	-
7	1.032.143.890	-
8	1.032.143.890	-
9	1.032.143.890	-
10	1.032.143.890	-
Payback periode		2 tahun 1 bulan

sebelumnya. Analisis sensitivitas dihitung dengan cara menurunkan atau menaikkan nilai komponen biaya dari nilai dasarnya (Alamsyah dan Supriatna 2018). Bahan baku mimba merupakan komponen paling berpengaruh pada biaya produksi. Jika harga mimba dinaikkan menjadi Rp 46.000,00 (kenaikan sebesar 15 %), usaha biopestisida tetap layak dilakukan walaupun nilai NPV turun sebesar 16 % dari NPV dengan menggunakan harga mimba sebelumnya (Rp 40.000,00) dan *payback period* yang hampir mendekati 4 tahun. Namun, jika harga bahan baku mimba mengalami peningkatan sebesar Rp 50.000,00 (kenaikan sebesar 25 %) akan mengakibatkan usaha biopestisida menjadi tidak layak dilihat dari kriteria analisis kelayakannya (Tabel 11).

Hal ini membuktikan bahwa kebutuhan biji mimba yang merupakan bahan baku utama pada produksi biopestisida ini harus diberi perhatian lebih, karena memiliki pengaruh yang cukup besar terhadap kelangsungan produksi. Ketersediaan dan kesinambungan bahan baku merupakan kunci penting untuk keberhasilan pengusahaan yang berbahan baku mimba (Susila *et al.* 2014). Sebagai gambaran, tanaman mimba yang berumur 8-10 tahun menghasilkan biji sekitar 9 kg, umur 15-20 tahun menghasilkan biji sekitar 13 kg dan di atas 20 tahun menghasilkan biji sekitar 19 kg. Di Indonesia, tanaman mimba tumbuh liar tersebar sepanjang pantai utara Jawa dari Indramayu sampai Banyuwangi dan daerah lainnya. Namun, belum banyak dimanfaatkan kecuali sebagai kayu bakar (Subiyakto 2009).

Menurut Susila *et al.* (2014), produktivitas biji mimba selama beberapa tahun mengalami fluktuasi seperti yang terjadi di Lombok. Hal ini berkaitan kemampuan produksi alami tegakan mimba. Selain itu, produksi biji mimba pada suatu tahun sangat dipengaruhi oleh jumlah nilai hujan yang diperoleh masyarakat pengumpul. Hal karena itu, ketersediaan biji mimba harus diperhatikan oleh pelaku usaha biopestisida karena produktivitas biji mimba fluktuatif sehingga akan mempengaruhi harga beli dari biji mimba. Fluktuasi nilai sensitivitas harga bahan baku ini menunjukkan bahwa harga bahan baku yang berfluktuasi akan mempengaruhi kelanjutan usaha biopestisida.

Komponen lainnya yang sensitif terhadap perubahan yaitu komponen harga jual produk. Jika harga jual produk biopestisida mengalami penurunan menjadi Rp 49.875,00 (penurunan sebesar 5 %), akan menghasilkan analisa keuangan yang hampir sama dengan analisa keuangan sebelumnya (Tabel 11). Namun, jika harga jual produk diturunkan menjadi Rp 43.575,00 (penurunan sebesar 17 %), maka usaha biopestisida menjadi tidak layak. Dengan kata lain, apabila ingin menjual produk biopestisida dengan keuntungan kurang dari 1 %

Tabel 11. Analisis sensitivitas usaha pembuat biopestisida dari biji mimba.

Table 11. Sensitivity analysis of neem seed based biopesticides production.

Variabel investasi	Ukuran	Harga beli biji mimba per kg	
		Rp. 46.000	Rp. 50.000
NPV	Rp	559.428.943	1.085.081.010
IRR	%	21,53	-0.21%
Payback Period	Tahun	3 tahun	10 tahun
		11 bulan	1 bulan
Profitability Index		1,26	0,49
Variabel investasi	Ukuran	Harga jual biopestisida per botol	
		Rp. 49.875	Rp. 43.575
NPV	Rp	1.774.111.476	1.230.886.277
IRR	%	34,46	-2.77
Payback Period	Tahun	2 tahun	11 tahun
		9 bulan	1 bulan
Profitability Index		1,82	0,42

dari harga pokok penjualan (Tabel 6), produk produk biopestisida dari mimba ini tidak layak diusahakan.

Jika membandingkan kelayakan usaha produksi biopestisida dengan metode pengepresan ulir dan metode penggunaan mikroba dalam proses ekstraksi minyak dari biji mimba, dengan besaran kapasitas produksi yang sama, terlihat bahwa nilai dari kelayakan usahanya dan rendemannya lebih tinggi dibandingkan dengan metode ulir. Namun dari segi harga jual produk akan sangat mahal yaitu Rp625.000,00/botol dengan kemasan 250 ml. Hal ini dikarenakan harga pokok produksi dari produksi biopestisida menggunakan mikroba sangat tinggi dengan adanya penggunaan bahan tambahan (molases) untuk mengaktivitasi mikroba. Penggunaan mikroba dan bahan tambahan (molases) untuk 1 kg bahan baku biji mimba sebesar 10 l. Selain itu, waktu fermentasi selama 6 hari menjadikan proses produksi memerlukan waktu yang cukup panjang untuk membuat satu produk biopestisida (Tabel 12).

Tabel 12. Perbandingan usaha produksi biopestisida dari biji mimba dengan metode pengepresan ulir dan mikroba.

Table 12. Comparison of neem seed based-biopesticide production using screw press method and microbe application method.

Kriteria	Metode pengepresan ulir	Metode mikroba
Rendeman yang diperoleh (%)	25	34,6 ^a
NPV (Rp)	3.026.193.872,50	11.441.229.061 ^b
IRR (%)	46,90	60,81 ^b
Payback Period	2 tahun 1 bulan	Kurang dari 1 tahun ^b
Profitability Index	2,40	6,21 ^b
Harga jual produk (250 ml/botol) (Rp)	52.500	625.000 ^b

Keterangan/Note :.

^a Hartantardar, Hutaqinli; 2012

^b Perhitungan penulis/Author calculation

KESIMPULAN

Kelayakan usaha produksi biopestisida biji mimba dengan metode pengepresan ulir dengan kapasitas produksi berjalan sebesar 96.000 botol ukuran 250 ml per tahun menunjukkan usaha ini layak dilaksanakan selama proses berjalan sesuai dengan asumsi dan parameter teknis yang ditentukan. Analisis sensitivitas menunjukkan bahwa usaha ini dipengaruhi oleh harga beli dari biji mimba dan harga jual produk biopestisida. Kenaikan harga biji mimba sebesar 25 % dan harga jual produk mengalami penurunan sebesar 17 % akan mengakibatkan usaha biopestisida menggunakan metode pengepresan ulir menjadi tidak layak.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terimakasih kepada Rizqan Al Muhaimin, S.TP, Fahriya Puspita Sari, S.T dan Apriwi Zulfritri, M.Sc atas bantuan dan sarannya dalam penulisan tulisan ini. Pembiayaan penelitian ini didukung oleh Program Unggulan Kedeputan Ilmu Pegetahuan Hayati-LIPI tahun anggaran 2015 dan Program Kerja Pusat Unggulan IPTEK Lignoselulosa-Pusat Penelitian Biomaterial LIPI tahun 2017.

DAFTAR PUSTAKA

- Alamsyah, R. & Supriatna, D. (2018) Analisis Teknik dan Tekno Ekonomi Pengolahan Biomassa Limbah Tandan Kosong Kelapa Sawit (TKKS) Menjadi Pelet sebagai Bahan Bakar Terbarukan Skala Produksi Technical and Economical Analysis of Biomass Waste of Empty Fruit Bunches (EFB) Pellet as Renewa. 35 (1), 1–11.
- Anderson, J. (2009) Determining Manufacturing Costs. *Chemical Engineering Progress*. 105 (1), 27–31.
- Anonim (1992) *Neem: A Tree for Solving Global Problems*. Washington DC, National Academy Press.
- Aries, R. & Newton, R. (1955) *Chemical Engineering Cost Estimation*. New York, Mc Graw-Hill Book Company.
- Debashri, M. & Tamal, M. (2012) A Review on Efficacy of *Azadirachta indica* A. Juss Based Biopesticides: An Indian Perspective. *Research Journal of Recent Sciences Res. J. Recent Sci.* 1 (3), 94–99.
- Elteraifi, I. & Hassanali, A. (2011) Oil and Azadirachtin Contents of Neem (*Azadirachta indica* A. Juss) Seed Kernels Collected from Trees Growing in Different Habitats in Sudan. *International Journal of Biological and Chemical Sciences*. 5 (3). doi:10.4314/ijbcs.v5i3.72211.
- Ermiaati (2018) Analisis Finansial Penggunaan Pestisida Nabati pada Usahatani Jahe Putih Besar (Studi Kasus Kecamatan Tanjungkerta. *Buletin Penelitian Tanaman Rempah dan Obat*. 28 (2), 199–209.
- Farida, T. & Christian, N. (2015) Peningkatan Proses Ekstraksi Minyak Biji Mimba (Neem Seed Oil) dan Purifikasinya Extraction Process Improvement of Neem Seed Oil and Its Purification. *Journal of Agro-based Industry*. 32 (2), 62–67.
- Hartanto, E.S. & Hutajulu, T.F. (2012) Pemanfaatan Bioaktif Mimba untuk Sediaan Anti Serangga. *Warta IHP*. 29, 21–30.
- Juniar, A. (2010) Studi Kelayakan Pendirian Pabrik Air Minum dalam Kemasan PDAM Kabupaten Hulu Sungai Utara ditinjau dari Aspek Keuangan. *Jurnal Manajemen dan Akuntansi*. 11 (April), 39–45.
- Krishnamurthy, Y.L. & Shashikala, J. (2006) Inhibition of Aflatoxin B1 Production of *Aspergillus flavus*, Isolated from Soybean Seeds by Certain Natural Plant Products. *Letters in Applied Microbiology*. 43 (5), 469–474. doi:10.1111/j.1472-765X.2006.02011.x.
- Kusuma, P.T.W.W. & Mayasti, N.K.I. (2014) Analisa Kelayakan Finansial Pengembangan Usaha Produksi Komoditas Lokal: Mie Berbasis Jagung. *Agritech*. 34 (2), 194–202.
- Nuryanti, S.. (2015) Potensi Mimba sebagai Pestisida Nabati. *ditjenbun.pertanian.go.id* [Accessed: 27 December 2017].
- Pasaribu, A.M. (2012) *Perencanaan dan Evaluasi Proyek Agribisnis (Konsep dan Aplikasi)*. Yogyakarta, Andi.
- Prianto, A. Dewi, A.S., Basri, H., Yusuf, S. (2016a) Efektivitas Formulasi Minyak Mimba Hasil screw press terhadap rayap tanah (*Coptotermes gestroi*). In: *Prosiding Seminar*

Lignoselulosa 2016. pp.42–50.

Prianto, A.H., Kartika, T., Zulfiana, D., Zulfriti, A., Wikantoso, B., Krishanti, N.P.R.A., Lestari, A.S., Yusuf S., & Pramasari, D. A (2016b) Penemu; Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia. 25 November 2016. *Formulasi Biosida Berbahan Aktif Minyak Nimba, Penggunaan dan Proses Pembuatannya*. Indonesia. ID P00201608068 (Pendaftaran Paten).

Pribadi, E.R., I Wayan, L., Rohimatun, Kiki, Y., & Mahrita, W. (2015) Kelayakan Ekonomi Pengendalian Hama Pengisap Buah Lada (*Dasyneus piperis* China) dengan Insektisida Nabati Berbahan Aktif Minyak Seraiwangi dan Cengkeh. *Buletin Penelitian Tanaman Rempah dan Obat*. 26 (2), 156–164. doi:10.21082/bullitro.v26n2.2015.155-164.

Sari, F.P., Widya, F., Raden, P.B.L., Teguh, D., Jayadi, Euis, H. (2016) Tekno Ekonomi Produksi Perak Aqueous Polymer Isocyanate Berbasis Lateks Karet Alam. *Jurnal Ilmu Teknologi Kayu Tropis*. 14 (2), 102–113.

Sasmitaloka, K.S., Jusnita, N. & Andayani, A. (2015) Analisis Kelayakan Finansial Pendirian Industri Vanilin Dengan Bahan Baku Vanili Basah (*Vanilli* spp.). *Jurnal Sosial Ekonomi Pertanian*. 8 (3), 1–8.

Suwarnanto, D. & Hargono (2008) Buku Ajar Perancangan Pabrik Kimia. Semarang, Fakultas Teknik Universitas Diponegoro.

Subiyakto (2009) Ekstrak Biji Mimba Sebagai Pestisida Nabati: Potensi, Kendala, dan Strategi Pengembangannya. *Perspektif*. 8 (2), 108–116.

Suryana, R.N., Sarianti, T. & Feryanto (2012) Berbahan Baku Molases di Jawa Tengah. *Jurnal Manajemen & Agribisnis*. 9 (2), 127–136.

Susila, I.W.W. (2017) The Potency of Neem (*Azadirachta indica* A. Juss) Product and Factors Affecting The Neem Leaf Production in Lombok. *Jurnal Faloak*. 1 (2), 85–98.

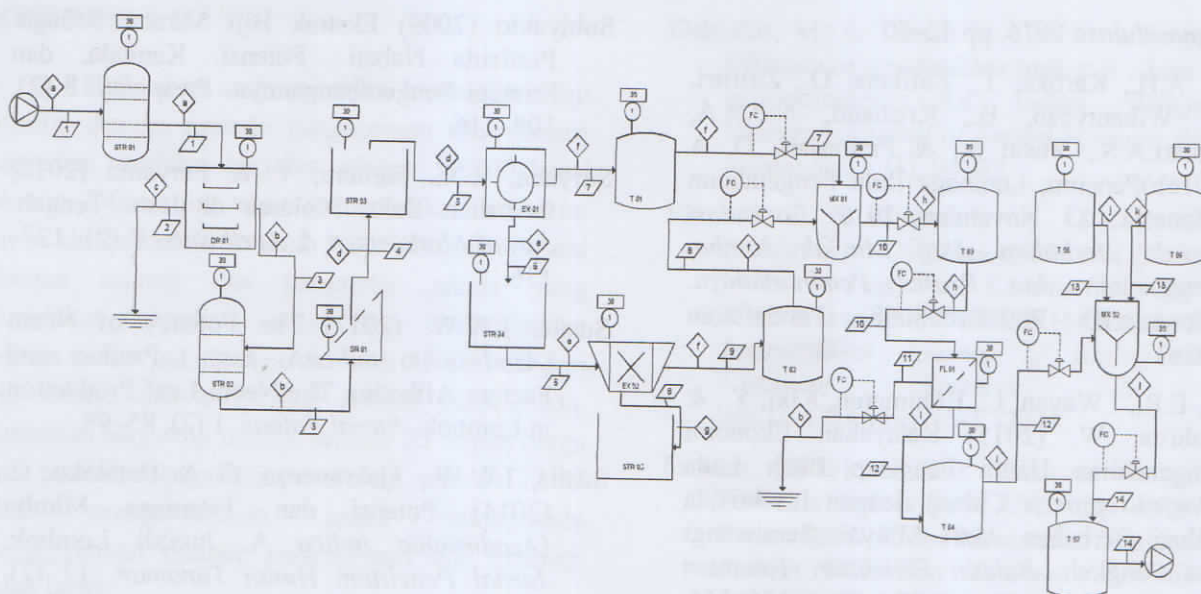
Susila, I.W.W., Tjakrawarsa, G. & Handoko, C. (2014) Potensi dan Tata Niaga Mimba (*Azadirachta indica* A. Juss) di Lombok. *Jurnal Penelitian Hutan Tanaman*. 12 (2), 127–139. doi:10.20886/jpht.2014.11.2.127-139.

Suwahyono, U. (2009) Cara Membuat dan Petunjuk Penggunaan Biopestisida. Jakarta, Swadaya.

Wahyudhi, O. & Utomo, C. (2014) Analisis Investasi pada Proyek Pembangunan Apartemen Bale Hinggil Surabaya. *Jurnal Teknik ITS*. 3 (1), 41–46.

Wang, J. Jian, L., Cao, J., & Jiang, W. (2010) Antifungal Activities of Neem (*Azadirachta indica*) Seed Kernel Extracts on Postharvest Diseases in Fruits. *African Journal of Microbiology Research*. 4 (11), 1100–1104.

Whitten, M.. (1992) Pest Management in 2000: What We Might Learn from The Twentieth Century. Wallingford, C.A.B.I.



Lampiran 1. Diagram alir peralatan proses produksi biopestisida dari biji mimba menggunakan metode ulir.
Appendix 1. Equipment process flow chart of neem seed based-biopesticides production using screw press method.

Deskripsi/Description :

- STR 01 : Penyimpanan biji mimba basah/The fresh neem seed storage.
- STR 02 : Penyimpanan biji mimba basah/The fresh neem seed storage.
- STR 03 : Penyimpanan biji mimba tanpa kulit/The storage of shelled-neem seed.
- STR 04 : Penyimpanan sisa ekstrak hasil alat pres ulir/The storage of screw press extract residue.
- STR 05 : Penyimpanan sisa ekstrak hasil alat pres hidrolik/The storage of hydrolic press extract residue.
- DR 01 : Pengering biji mimba/The neem seed dryer.
- SR 01 : Pemisah biji mimba dan kulit/The separator of neem seed and seed shell.
- EX 01 : Alat pres ulir/The screw press machine.
- EX 02 : Alat pres hidrolik/ The hydrolic press machine.
- MX 01 : Mikser minyak mimba dari alat pres ulir dan hidrolik/The mixer of screw press and hydrolic press machine for neem oil.
- MX 02 : Mikser minyak mimba + surfaktan anionik + surfaktan ionik/The mixer for oil-neem + anionic surfactant +ionic surfactant.
- FL 01 : Alat filtrasi minyak mimba dan air/The filtration tool to separate oil neem and water.
- T 01 : Tangki ekstrak minyak mimba hasil alat pres ulir/The oil neem extract tank from screw press machine.
- T 02 : Tangki ekstrak minyak mimba hasil alat presshidrolik/The oil neem extract tank from hydrolic press machine.
- T 03 : Tangki ekstrak minyak mimba hasil mikser/The tank for oil neem extract from mixing process.
- T 04 : Tangki minyak mimba tanpa air/The tank of water free-oil neem extract.
- T 05 : Tangki penyimpanan surfaktan anionik /The anionic surfactant tank.
- T 06 : Tangki penyimpanan surfaktan ionik/The ionic surfactant tank.
- T 07 : Tangki penyimpanan produk (biopestisida)/The biopesticides storage tank

Lampiran 1. Diagram alir proses produksi biopestisida dari biji mimba (Lanjutan).
Appendix 1. Equipment process flow chart of neem seed based-biopesticides production using screw press method (Continued).

No. Tahap / Step	Laju alir (Kg/jam)													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
	Capas pengeringan	Kehilangan pengeringan	Keluaran pengeringan - umpan pemisahan	Kehilangan pemisahan	Keluaran pemisahan - umpan ekstraksi 1	Kehilangan ekstraksi 1 - umpan ekstraksi 2	Kehilangan ekstraksi 1 - umpan mixer 1	Kehilangan ekstraksi 2	Keluaran ekstraksi 2 - umpan mixer 1	Keluaran mixer 1 - umpan filter	Kehilangan filter	Keluaran filter - umpan mixer 2	Umpan mixer 2	Keluaran mixer 2
1. Biji mimba basah dengan kulit / The fresh neem seed with shell.	11,57	-	0,07	0,003	0,06	0,04	0,02	0,04	0,00	0,02	-	0,02	-	-
2. Biji mimba kering dengan kulit / The dry neem seed with shell.	28,26	-	28,26	1,41	26,85	18,80	8,06	18,51	0,28	8,34	-	8,34	-	-
3. Air / water.	5,80	4,65	0,35	0,02	0,33	0,23	0,10	0,23	0,003	0,10	0,10	-	-	-
4. Biji mimba kering tanpa kulit / The dry shelled-neem seed.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	$1,7 \times 10^{-4}$	$1,7 \times 10^{-4}$
5. Kapas biji mimba dari alat pres ulir / Neem seed cake from screw press machine.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	$3,5 \times 10^{-4}$	$3,5 \times 10^{-4}$
6. Minyak mimba kasar / Crude oil neem.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	8,36

Lampiran 1a. Flow Chart :

- 1. Biji mimba basah dengan kulit / The fresh neem seed with shell.
- 2. Biji mimba kering dengan kulit / The dry neem seed with shell.
- 3. Air / water.
- 4. Biji mimba kering tanpa kulit / The dry shelled-neem seed.
- 5. Kapas biji mimba dari alat pres ulir / Neem seed cake from screw press machine.
- 6. Minyak mimba kasar / Crude oil neem.
- 7. Kapas biji mimba dari alat press hidrolik / Neem seed cake from hydrolic press machine.
- 8. Minyak mimba kasar hasil campuran dari alat pres ulir dan hidrolik / Mixed crude oil neem from screw press and hydrolic press machine.
- 9. Minyak mimba murni tanpa air / Pure oil neem (water free).
- 10. Surfaktan anionik / Anionic surfactant.
- 11. Surfaktan ionik / Ionic surfactant.
- 12. Biopestisida dari minyak mimba / Neem seed biopesticides.

Lampiran 2. Arus kas proses produksi biopestisida dari biji mimba menggunakan metode ulir.
Appendix 2. Cashflow of production biopesticides from neem seed using screw press method.

(dalam ribuan)

Deskripsi	Tahun ke-										
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Kas masuk											
Laba bersih	0	5.040.000	5.040.000	5.040.000	5.040.000	5.040.000	5.040.000	5.040.000	5.040.000	5.040.000	5.040.000
Penyusutan	0	232.167	232.167	232.167	232.167	232.167	232.167	232.167	232.167	232.167	232.167
Nilai sisa modal	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Modal sendiri	2.156.897	2.156.897	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Total kas masuk	2.156.897	7.429.064	5.272.167	5.272.167	5.272.167	5.272.167	5.272.167	5.272.167	5.272.167	5.272.167	5.272.167
Kas keluar											
Investasi	2.156.897	2.156.897	0	0	344.000	0	0	344.000	0	0	344.000
Biaya produksi	0	3.957.456	3.957.456	3.957.456	3.957.456	3.957.456	3.957.456	3.957.456	3.957.456	3.957.456	3.957.456
Biaya tenaga kerja	0	247.000	247.000	247.000	247.000	247.000	247.000	247.000	247.000	247.000	247.000
Penggantian alat	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Total kas keluar	2.156.897	6.361.353	4.204.456	4.204.456	4.548.456	4.204.456	4.204.456	4.548.456	4.204.456	4.204.456	4.548.456
Surplus/defisit	0	1.067.711	1.067.711	1.067.711	723.711	1.067.711	1.067.711	723.711	1.067.711	1.067.711	723.711
Kas awal tahun	0	0	1.067.711	2.135.421	3.203.132	3.926.842	4.994.553	6.062.263	6.785.974	7.853.685	8.921.395
Kas akhir tahun	0	1.067.711	2.135.421	3.203.132	3.926.842	4.994.553	6.062.263	6.785.974	7.853.685	8.921.395	9.645.106

PENGARUH SINERGI AZADIRACHTIN DAN KOMPONEN MINOR DALAM MINYAK Biji MIMBA TERHADAP AKTIVITAS *ANTIFEEDANT* *Spodoptera litura*

The Synergy Effect of Azadirachtin and Minor Components of Neem Seed Oil on Antifeedant Activity of *Spodoptera litura*

Arief Heru Prianto¹⁾, Budiawan¹⁾, Yoki Yulizar¹⁾, dan Partomuan Simanjuntak²⁾

¹⁾ Universitas Indonesia. Kampus UI Depok 16424

²⁾ Pusat Penelitian Bioteknologi -LIPI

Jalan Raya Bogor km.46, Cibinong, Bogor 16911

INFO ARTIKEL

Received:
March 01 May 2019
Revised: 11 August 2019
Accepted: 17 October 2019

Keywords:
antifeedant index, *Spodop-*
tera litura, neem oil, antifeedant activity

Keywords:
antifeedant index, *Spodop-*
tera litura, neem oil, antifeedant activity

ABSTRAK/ABSTRACT

Aktivitas azadirachtin sebagai *antifeedant* terhadap serangga dari minyak mimba (*Azadirachta indica* A.Juss) diduga bersinergi dengan komponen minor di dalam minyak. Penelitian bertujuan untuk mengetahui kandungan komponen minor yang memiliki kontribusi terbesar terhadap pengaruh sinergi dengan komponen utama minyak biji mimba yaitu azadirachtin dalam aktivitas *antifeedant* *Spodoptera litura*. Minyak biji mimba difraksinasi dengan n-heksan, etil asetat, dan air. Aktivitas *antifeedant* dari tiga fraksi minyak biji mimba dievaluasi terhadap larva *S. litura* instar ke-4. Bioassay dilakukan dengan menggunakan uji *choice leaf disc* dengan konsentrasi fraksi 2,5; 5; 10, dan 20 % (v/v). Konsentrasi dalam semua fraksi menunjukkan kandungan azadirachtin yang sama, sehingga aktivitas *antifeedant* menunjukkan efek komponen minor dalam fraksi. Aktivitas terbaik diperoleh pada perlakuan fraksi air (84-100%). Analisis probit aktivitas *antifeedant* dari semua fraksi menunjukkan bahwa fraksi air memiliki efektivitas penghambatan terbaik (EI_{50}) yaitu 1,0 %. Komponen minor di dalam fraksi air didominasi senyawa fenol (48,5 %) yang diduga bersinergi dengan komponen utama azadirachtin dalam meningkatkan aktivitas *antifeedant* *S. litura*. Hasil ini mengindikasikan senyawa fenol di dalam fraksi air minyak mimba berperan meningkatkan aktivitas *antifeedant* azadirachtin terhadap *S. litura*.

Azadirachtin in neem oil (Azadirachta indica A.Juss) might have potential synergism effect with a minor compound in the neem oil as an antifeedant. This study aimed to determine the content of minor components that have the most significant contribution to the effect of synergy with the main component (azadirachtin) in antifeedant activity against Spodoptera litura. Neem oil was fractionated with n-hexane, ethyl acetate, and water. The antifeedant activity of three neem oil fractions was evaluated using the 4th instar of S. litura larvae. The bioassay was conducted using the choice leaf disc test with 2.5; 5; 10; and 20 % (v/v) concentrations of each fraction. The concentration of the fractions showed equal azadirachtin content, hence the antifeedant activity represented the effect of the minor component in the fraction. The best activity was shown by water fraction (84-100 %). Probit analysis of the antifeedant activity of all fractions showed that water fraction has the best effective inhibitory (EI_{50}) at 1.0 %. The minor component in the water fraction was dominated by phenol compounds (48.5 %) which were suspected to synergize with the main component (azadirachtin) in increasing the antifeedant activity on S. litura. These results indicated the phenol compound in this fraction has the role in increasing azadirachtin antifeedant activity against S. litura.

PENDAHULUAN

Ulat grayak (*Spodoptera litura*) merupakan hama yang menyerang berbagai macam tanaman

hortikultura. Pengendalian hama ulat grayak masih mengandalkan pestisida kimia sintetis. Ulat grayak menjadi target aplikasi bagi banyak produsen

pestisida di Indonesia. Namun, penggunaan pestisida sintesis secara terus menerus dapat mengganggu kesehatan, lingkungan dan meningkatkan resistensi hama target. Pengendalian hama genus *Spodoptera* menggunakan insektisida organofosfat, karbamat, piretroid, dan benzoylurea menunjukkan adanya resistensi hama (Ayil-Gutiérrez *et al.* 2018). Strategi terbaik untuk mengurangi resistensi insektisida terhadap ulat grayak (*S. exigua*) adalah dengan menggunakan insektisida yang memiliki mode aksi beragam, resistensi rendah dan manajemen pengendalian hama terintegrasi (Ahmad *et al.* 2018). Keanekaragaman bahan kimia dari tanaman merupakan potensi yang ampuh untuk mengendalikan hama genus *Spodoptera* (Ayil-Gutiérrez *et al.* 2018). Oleh karena itu, penelitian tentang insektisida alami yang bersumber dari pemanfaatan metabolit sekunder tanaman sangat prospektif, tetapi terkendala oleh ketersediaan bahan baku.

Mimba (*Azadirachta indica* A.Juss) adalah tumbuhan asli India yang menyebar ke Indonesia, dan banyak ditemukan di wilayah Jawa, Bali, dan Lombok. Penelitian pemanfaatan tumbuhan mimba sebagai bahan insektisida telah banyak dilakukan dan menunjukkan efektivitas yang tinggi terhadap lebih dari 200 jenis serangga hama pertanian dan penyimpanan (Riyajan *et al.* 2009). Mimba memiliki spektrum pengendalian serangga yang luas dan lebih efektif diaplikasikan pada tahap awal perkembangan serangga (Mardiningsih *et al.* 2010). Bahan aktif utama pada minyak mimba adalah azadirachtin yang terutama ditemukan pada biji mimba (Schmutterer 1990; Kardinan *et al.* 2018).

Bioaktivitas *antifeedant* dan penghambatan perkembangan serangga oleh minyak mimba terkait dengan kandungan azadirachtin di dalamnya. Minyak mimba yang tidak terdeteksi mengandung azadirachtin tidak memiliki aktivitas tersebut meskipun diaplikasikan pada konsentrasi tinggi. Sebaliknya, minyak mimba yang mengandung azadirachtin menunjukkan bioaktivitas dalam mengendalikan serangga. Minyak mimba yang mengandung azadirachtin lebih dari 3.000 ppm menunjukkan efektivitas tertinggi (Isman *et al.* 1990; Bhardwaj & Kumari 2016). Mimba kurang sesuai untuk membunuh

serangga karena model aksi dari metabolit sekundernya adalah mengganggu sistem hormon *ecdysteroid* (Schmutterer 1990; Nisya *et al.* 2017).

Penggunaan ekstrak kasar mimba (minyak mimba) akan menguntungkan karena komponen aktif selain azadirachtin yang bersifat insektisida menjadi termanfaatkan. Kandungan azadirachtin dan komponen lain berpeluang meningkatkan stabilitas azadirachtin dan aktivitasnya, sehingga pengembangan minyak mimba sebagai insektisida botani yang diperkaya azadirachtin dan turunannya berpeluang untuk dikembangkan (Isman *et al.* 1990). Komponen minor dalam ampas biji mimba diduga bersinergi dengan azadirachtin dalam meningkatkan aktivitas larvasida (Balamurugan *et al.* 2016). Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui kandungan komponen minor yang memiliki kontribusi terbesar terhadap pengaruh sinergi dengan azadirachtin dalam aktivitas *antifeedant* terhadap *S. Litura*.

BAHAN DAN METODE

Kegiatan penelitian dilakukan sejak Januari sampai April 2019 di Laboratorium Pengendalian Serangga Hama dan Biodeteriorasi, Pusat Penelitian Biomaterial, LIPI, Cibinong.

Ekstraksi minyak biji mimba

Biji mimba yang digunakan adalah biji utuh dengan *endocarp* yang masih melekat, diperoleh dari daerah Situbondo, Jawa Timur. Biji mimba sebanyak 50 kg dibersihkan dan dipres menggunakan *screw press* dengan putaran 120 rpm. Minyak biji mimba yang diperoleh didiamkan sampai bagian minyak dan padatan yang terbawa menjadi terpisah, kemudian disaring dengan kain saring 80 mesh untuk mendapatkan minyak yang jernih. Minyak mimba 90 ml dicampur air bidestilata dengan perbandingan 1:1, kemudian ditambahkan 180 ml n-heksan, dikocok dalam corong pemisah, dan didiamkan sampai terbentuk dua fasa (Prianto *et al.* 2012). Selanjutnya, fraksi n-heksan dipisahkan. Penambahan n-heksan pada campuran minyak mimba dan air dilakukan 4 kali. Prosedur serupa diulangi menggunakan pelarut etil asetat dengan perbandingan minyak dan etil asetat 1:1. Selanjutnya, fraksi n-heksan dan etil asetat dipekatkan dengan *vacuum rotary evaporator* pada suhu 60° C, sedangkan fraksi air dikeringkan

dengan *freeze-dryer*. Kandungan azadirachtin dalam tiap fraksi diamati menggunakan HPLC dengan azadirachtin murni (Sigma Aldrich) sebagai pembanding, sehingga diperoleh kandungan azadirachtin tiap fraksi. Fraksi *n*-heksan, etil asetat, dan air diencerkan sehingga diperoleh larutan dengan kandungan azadirachtin yang setara pada setiap fraksi. Ketiga fraksi yang diperoleh (*n*-heksan, etil asetat, dan air) diuji aktivitasnya sebagai *antifeedant* terhadap larva ulat grayak. Rumus pengenceran yang digunakan sebagai berikut:

$$V_1 \cdot X_1 = V_2 \cdot X_2$$

Keterangan/Note :

- V_1 = Volume fraksi ke 1/Fraction volume to 1
- X_1 = Konsentrasi azadirachtin fraksi ke 1/The concentration of azadirachtin fraction 1
- V_2 = Volume fraksi ke 2/2nd fraction volume
- X_2 = Konsentrasi azadirachtin fraksi ke 2/Concentration of azadirachtin fraction 2

Aktivitas *antifeedant*

Koloni larva ulat grayak (*S. litura*) diperoleh dari Departemen Proteksi Tanaman, Fakultas Pertanian, Institut Pertanian Bogor. Larva dipelihara pada ruang pemeliharaan pada suhu $22 \pm 1^\circ\text{C}$ dan kelembaban relatif $>70\%$. Larva diberi pakan campuran daun kangkung, daun kedelai, dan daun talas (Balfas dan Willis 2009). Pemeliharaan ulat grayak dilakukan hingga diperoleh keturunan keempat (F4) untuk pengujian aktivitas *antifeedant*.

Uji aktivitas *antifeedant* ketiga fraksi minyak mimba dilakukan menggunakan potongan daun (*choice feeding test*) selama 24 jam (Mekaputra *et al.* 1995). Daun talas dipotong berukuran $1,5\text{ cm} \times 2\text{ cm}$. Selanjutnya, potongan daun talas dicelupkan ke dalam setiap fraksi minyak mimba selama ± 5 detik dan dikeringkan. Potongan daun talas yang dicelupkan dalam air yang mengandung surfaktan kalsium dodecylbenzen sulfonat dan etoksilat alkil fenol dengan konsentrasi yang setara dengan perlakuan sebagai kontrol. Potongan daun dan larva ulat grayak instar keempat dimasukkan ke setiap cawan plastik (diameter 7 cm) yang berisi satu kontrol dan satu perlakuan. Bioassay dilakukan menggunakan satu larva per cawan plastik dan ulat 5 ulangan per perlakuan. Pengamatan

dilakukan setelah 24 jam pengujian dengan mencatat tingkat konsumsi daun dan penghambatan makan setiap ulangan. Aktivitas makan dihitung menggunakan metode kertas grafik, dan data yang diperoleh digunakan untuk menghitung aktivitas *antifeedant* dengan rumus sebagai berikut (Isman *et al.* 1990) :

$$\text{Aktivitas antifeedant} = \frac{\text{Luas daun yang dikonsumsi (kontrol - perlakuan)}}{\text{Luas daun yang dikonsumsi (kontrol + perlakuan)}}$$

Aktivitas *antifeedant* yang diperoleh dari setiap fraksi pada masing-masing konsentrasi digunakan untuk menghitung *Effective Inhibitor* (EI_{50}) menggunakan analisis probit (Haji *et al.* 2012).

Analisis kandungan kimia

Kandungan asam lemak dalam minyak biji mimba dianalisis menggunakan GC-MS. Sebanyak 0,5 ml minyak mimba ditambahkan 1,5 ml larutan natrium metanolik dan dipanaskan pada suhu 60°C selama 10 menit sambil dikocok, kemudian didinginkan dan ditambahkan 2 ml boron trifluoride metanoat, kemudian dipanaskan pada suhu 60°C selama 10 menit dan didinginkan. Selanjutnya, larutan diekstrak dengan 1 ml heptan dan 1 ml NaCl jenuh. Lapisan atas dipisahkan menggunakan mikropipet (Eppendorf). Analisis GC dilakukan dengan menginjeksikan $1\text{ }\mu\text{l}$ sampel ke dalam GC Shimadzu 2010 dengan detektor FID, pada suhu 260°C , menggunakan metode methylester 37 New 3032017 Kal, gcm, pada kolom HP-88 dan panjang 100 m.

Komponen dalam fraksi-fraksi minyak mimba dianalisis menggunakan GC-MS dengan metode yang mengacu pada Fitriady *et al.* (2017). Analisis GC-MS dilakukan menggunakan Helium sebagai gas pembawa dengan laju aliran 40 ml/menit dan tekanan 8,8085 psi. Sampel dipanaskan pada suhu $70\text{--}250^\circ\text{C}$. Laju pemanasan $10^\circ\text{C}/\text{menit}$. Suhu injektor dan detektor adalah 250°C . Sampel diinjeksikan sebanyak $1\text{ }\mu\text{l}$ pada Agilent 15977 A dengan detektor Agilent 5977A.

Analisis HPLC

Pengukuran kandungan azadirachtin dilakukan dalam fraksi *n*-heksan, etil asetat, dan air. Analisis dilakukan menggunakan HPLC-PDA. Luas kurva standar azadirachtin yang digunakan

dalam perhitungan kuantitatif adalah standar azadirachtin pada konsentrasi 500 $\mu\text{g.ml}^{-1}$. Metode analisis HPLC-PDA dilakukan mengacu pada metode pengukuran azadirachtin dengan modifikasi (Paula *et al.* 2015). Evaluasi kandungan azadirachtin dilakukan menggunakan standar azadirachtin 500 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ dalam metanol. Fase gerak yang digunakan asetonitril/air (40:60), panjang gelombang deteksi 214 nm dan kecepatan aliran 1 ml/menit dengan suhu kolom 30° C. Volume injeksi adalah 10 μl .

Analisis data

Hasil uji *choice feeding test* digunakan untuk menghitung aktivitas *antifeedant* tiap konsentrasi. Data aktivitas *antifeedant* tiap fraksi merupakan rata-rata dari 5 kali pengulangan. Data kemudian dianalisis dengan analisis keragaman satu arah (ANOVA) menggunakan perangkat lunak statistik komersial. Rata-rata aktivitas *antifeedant* tiap fraksi pada keempat konsentrasi (2,5; 5; 10; dan 20 %) tersebut kemudian dilakukan analisis probit menggunakan program excel dan tabel probit sehingga diperoleh *Effective Inhibitor* (EI_{50}).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Ekstraksi minyak mimba

Pengepresan biji mimba dilakukan dengan *cold press* menggunakan mesin *screw press*. Biji yang digunakan adalah biji utuh dengan *endocarp* yang masih melekat. Menurut Esparza-Díaz *et al.* (2010) pengepresan dengan *cold press* menggunakan tambahan metanol lebih efisien karena jumlah ekstrak dan konsentrasi azadirachtin lebih tinggi. Hasil pengepresan biji mimba pada penelitian ini menghasilkan rendemen sebesar 11,08 %. Hasil pengepresan ini tidak jauh berbeda dengan penelitian Nisya *et al.* (2017) yang menghasilkan rendemen 12,30 % dengan dua kali pengepresan yaitu dengan *screw* dan *hydraulic press*.

Kandungan kimia minyak mimba

Hasil analisis GC-MS terhadap asam lemak dari minyak biji mimba menunjukkan bahwa jenis asam lemak terbanyak adalah jenis Cis-9-metil oleat ester sebesar 36,68 %, metil

palmitat 17,84 % dan metil oktadekanoat sebesar 17,78 % (Tabel 1). Aktivitas asam lemak jenis Cis-9-metil oleat ester terhadap serangga belum banyak dilaporkan, tetapi asam oleat telah dilaporkan memiliki aktivitas antijamur dan antibakteri (Ali *et al.* 2017). Menurut Bhargava & Madhav (2018) kandungan asam lemak pada ekstrak kasar (minyak mimba) berbeda dengan fraksi kloroform dan fraksi metanolnya. Fraksi kloroform dilaporkan dapat menarik asam lemak lebih banyak dari fraksi metanol dengan 14 jenis asam lemak, sedangkan dalam penelitian ini hanya terdapat 13 jenis asam lemak (Tabel 1).

Minyak biji mimba dalam fraksi n-heksan, etil asetat dan air memiliki kandungan azadirachtin yang tinggi. Analisis kuantitatif dengan HPLC (Gambar 1) menunjukkan bahwa fraksi etil asetat merupakan fraksi yang memiliki kandungan azadirachtin paling tinggi (59.813 ppm), kemudian diikuti fraksi air (7.968 ppm), dan fraksi n-heksan (271 ppm). Hal ini menunjukkan bahwa pelarut etil asetat mampu menarik azadirachtin lebih baik dari pelarut lainnya. Kandungan azadirachtin dalam minyak mimba bervariasi dan berhubungan dengan bioaktivitasnya terhadap spesies serangga uji, sehingga kandungan azadirachtin dapat menjadi

Tabel 1. Kandungan asam lemak minyak biji mimba asal Situbondo, Jawa Timur.

Table 1. Fatty acid content of neem seed oil originated from Situbondo, East Java.

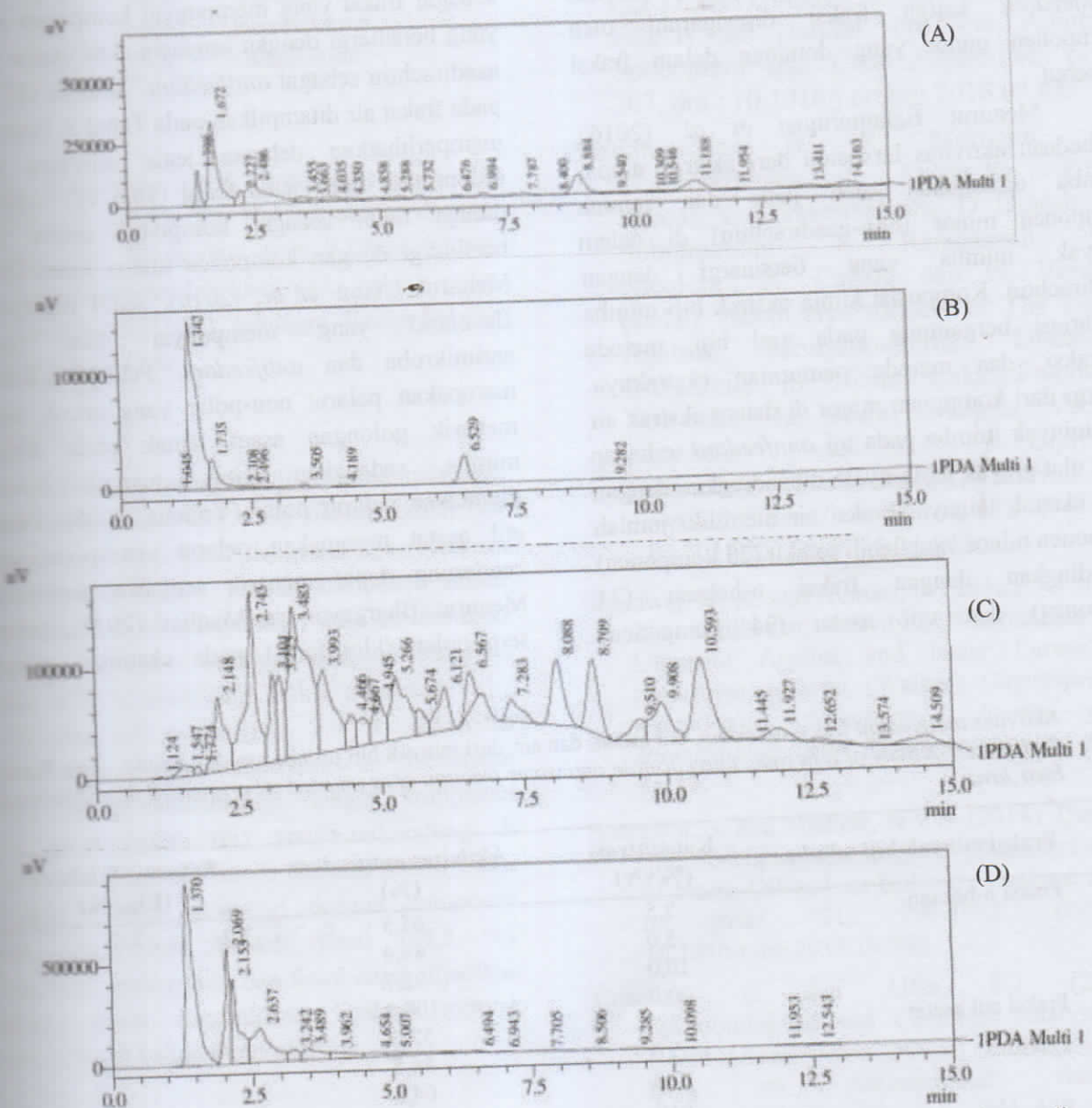
No.	Jenis asam lemak	Rata-rata konsentrasi (% relatif)
1	Metil Butirat	7,65 $\pm$ 0,09
2	Metil Palmitat	17,84 $\pm$ 0,04
3	Metil Heptadekanoat	0,13 $\pm$ 0,01
4	Metil Oktadekanoat	17,78 $\pm$ 0,01
5	Trans-9- asam elaiat Metil ester	0,31 $\pm$ 0,04
6	Cis-9-metil oleat ester	36,68 $\pm$ 0,11
7	Asam Linolelaiat Metil Ester	0,39 $\pm$ 0,06
8	Metil Linoleat	17,04 $\pm$ 0,01
9	Metil Arachidat	1,19 $\pm$ 0,02
10	Metil cis-11-eikosenoat	0,40 $\pm$ 0,01
11	Metil Dokosanoat	0,21 $\pm$ 0,01
12	Metil Cis-5,8,11,14-Eikosatetraenoat	0,27 $\pm$ 0,01
13	Metil Cis-5,8,11,14,17-Eikosapentaenoat	0,12 $\pm$ 0,01

kontrol terhadap kualitas minyak biji mimba sebagai bioinsektisida (Isman *et al.* 1990). Mengingat aktivitas azadirachtin bersifat sinergi dengan komponen lain, maka pengaruh komponen minor menjadi penting sebagai penentu efektivitas formulasi berbahan minyak mimba. Azadirachtin merupakan senyawa yang berperan aktif dalam aktivitas *antifeedant* dan insektisida (Isman *et al.*, 1990).

Hasil uji aktivitas *antifeedant*

Hasil uji aktivitas *antifeedant* menunjukkan fraksi n-heksan, etil asetat, dan air

mempunyai aktivitas *antifeedant* tinggi (Tabel 2). Berdasarkan analisis keragaman (ANOVA), perlakuan fraksi n-heksan, etil asetat, dan air berbeda nyata pada taraf 5 % ($p < 0,05$). Fraksi air menunjukkan aktivitas *antifeedant* terbesar pada setiap konsentrasi yang diujikan. Tingkat aktivitas *antifeedant* meningkat dengan bertambahnya konsentrasi. Fraksi air pada konsentrasi 2,5 % menunjukkan aktivitas *antifeedant* terbesar yaitu 84,7 %, sedangkan fraksi n-heksan dan etil asetat memberikan aktivitas *antifeedant* yang lebih rendah yaitu berturut-turut sebesar 65,5 % dan



Gambar 1. Kromatogram HPLC fraksi minyak biji mimba asal Situbondo, Jawa Timur: (A) standar azadirachtin, (B) fraksi n-heksan, (C) fraksi etil asetat, dan (D) fraksi air.
 Figure 1. HPLC chromatogram of neem oil seed fraction originated from Situbondo, East Java : (A) azadirachtin standard, (B) n-hexane fraction, (C) ethyl acetate fraction and (D) water fraction.

50,0 %. Aktivitas *antifeedant* tertinggi sebesar 100 % terjadi pada ketiga fraksi pada konsentrasi 20 %.

Aktivitas *antifeedant* tertinggi pada setiap konsentrasi diperoleh pada perlakuan fraksi air, diikuti fraksi n-heksan, dan etil asetat (Tabel 2). Menurut Coventry & Allan (2001) ekstrak air biji mimba mengandung azadirachtin, nimbin dan salanin. Pengenceran fraksi n-heksan, etil asetat dan air dilakukan sehingga setiap fraksi mengandung konsentrasi azadirachtin yang setara sebelum diujikan pada ulat grayak. Oleh karena itu, aktivitas *antifeedant* yang diperoleh merupakan pengaruh sinergi azadirachtin dan komponen minor yang terdapat pada fraksi tersebut. Aktivitas *antifeedant* ketiga fraksi dipengaruhi oleh komponen minor yang dominan dalam fraksi tersebut.

Menurut Balamurugan *et al.* (2016), perbedaan aktivitas larvasida dari ekstrak ampas mimba disebabkan oleh jenis dan jumlah komponen minor (non-azadirachtin) di dalam minyak mimba yang bersinergi dengan azadirachtin. Komposisi kimia ekstrak biji mimba bervariasi bergantung pada asal biji, metode ekstraksi, dan metode pemurnian ekstraknya. Sinergi dari komponen minor di dalam ekstrak air dari minyak mimba pada uji *antifeedant* terhadap larva ulat grayak lebih nyata dibandingkan dengan jenis ekstrak lainnya. Fraksi air memiliki jumlah komponen minor yang lebih sedikit (23 komponen) dibandingkan dengan fraksi n-heksan (34 komponen) dan etil asetat (34 komponen)

(Gambar 1). Namun, memiliki pengaruh sinergi yang lebih besar (EI_{50} 0,9 %) dibanding fraksi n-heksan (EI_{50} 2,0 %) dan etil asetat (EI_{50} 3,6 %) (Tabel 2). Hal ini sesuai dengan hasil penelitian Koul *et al.* (2003) yang menyatakan bahwa limonoid non-azadirachtin pada minyak mimba yang mempunyai kesamaan struktural dan mode aksi yang sama tidak memberikan efek sinergi yang signifikan. Dengan demikian, banyaknya jumlah komponen minor yang terkandung tidak menentukan tingkat aktivitas *antifeedant* dari suatu fraksi, jika komponen-komponen tersebut memiliki mode aksi yang sama. Fraksi air dapat diduga sebagai fraksi yang mempunyai komponen minor yang bersinergi dengan senyawa aktif utama yaitu azadirachtin sebagai *antifeedant*. Analisis GC-MS pada fraksi air ditampilkan pada Tabel 3. Fraksi air memperlihatkan delapan jenis senyawa yang didominasi oleh jenis fenol (48,5 %), sehingga diduga fenol sebagai komponen minor yang bersinergi dengan komponen utama azadirachtin. Menurut Utami *et al.* (2010), fenol merupakan flavonoid yang mempunyai sifat racun, antimikroba dan *antifeedant*. Pelarut n-heksan merupakan pelarut non-polar yang cocok untuk menarik golongan asam lemak pada minyak mimba, sedangkan untuk menarik bioaktif digunakan pelarut polar (Yuliana, 2008). Pelarut etil asetat merupakan pelarut semi-polar yang cenderung dapat menarik senyawa semi-polar. Menurut Bhargava dan Madhav (2018), pelarut semi-polar (kloroform) pada ekstraksi minyak

Tabel 2. Aktivitas *antifeedant* fraksi n-heksan, etil asetat, dan air, dari minyak biji mimba asal Situbondo, Jawa Timur.
Table 2. *Antifeedant activity of n-hexane, ethyl acetate and water fraction of neem seed oil originated from Situbondo, East Java.*

No.	Fraksi minyak biji mimba	Konsentrasi (% v/v)	Aktivitas <i>antifeedant</i> (%)	Effective Inhibitor (EI_{50} ; %)
1	Fraksi n-heksan	2,5	65,5	2,0
		5,0	89,4	
		10,0	92,7	
		20,0	100,0	
2	Fraksi etil asetat	2,5	52,0	3,6
		5,0	54,5	
		10,0	64,5	
		20,0	100,0	
3	Fraksi air	2,5	86,6	0,9
		5,0	92,1	
		10,0	98,3	
		20,0	100,0	

Table 3. Hasil analisis senyawa dalam fraksi air minyak biji mimba asal Situbondo, Jawa Timur menggunakan GC-MS.

Table 3. The compound contained in water fraction of neem seed oil originated from Situbondo, East Java analysed by GC-MS.

No.	Waktu Retensi (menit)	Area (%)	Jenis senyawa
1	5,83	1,73	Tetrahidrogeranil butirat
2	18,39	1,30	Asam Heksadekanoat
3	20,07	1,22	Asam 9-Oktadekenoat
4	20,29	1,71	Metil stearat
5	20,84	48,50	Fenol
6	26,22	6,24	Oktasiloksan
7	26,32	3,82	Heptasiloksan
8	27,05	11,87	Oktasiloksan

senyawa didominasi oleh senyawa asam 9-Oktadekenoat (49,21 %). Hal ini sesuai dengan hasil penelitian ini dimana asam 9-Oktadekenoat ditemukan dalam jumlah kecil pada pelarut polar yaitu fraksi air (1,22 %), sehingga diduga terlarut pada fraksi etil asetat.

KESIMPULAN

Fraksi air minyak biji mimba memiliki jumlah komponen minor yang paling sedikit (23 komponen) dibandingkan dengan fraksi *n*-heksan dan etil asetat dengan jumlah komponen minor yang sama yaitu 34 komponen. Fraksi air memiliki aktivitas antifeedant tertinggi dengan nilai EI_{50} sebesar 1,9 % dibanding fraksi *n*-heksan (EI_{50} 2,8 %) dan etil asetat (EI_{50} 3,6 %). Aktivitas antifeedant yang tinggi dalam fraksi air disebabkan adanya senyawa azadirachtin dengan komponen minor (non-azadirachtin) yang terkandung di dalamnya. Komponen minor terbesar dalam fraksi air yang diduga bersinergi dengan komponen utama azadirachtin adalah fenol (48,5 %). Kombinasi azadirachtin dan fenol dapat dijadikan indikator untuk menentukan kualitas minyak mimba sebagai bahan bioinsektisida.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terimakasih disampaikan kepada Universitas Jember yang telah mendanai penelitian ini melalui Beasiswa Saintek tahun 2018/2019.

DAFTAR PUSTAKA

- Haji, A.G., Zainal, A.M. dan Gustan, P. (2012). Identifikasi Senyawa Bioaktif Antifeedant dari Asap Cair Hasil Pirolisis Sampah Organik Perkotaan. *Jurnal Lingkungan Hidup*, 12(1), 1-8.
- Ahmad, M., Farid, A. and Saeed, M. (2018). Resistance to New Insecticides and Their Synergism in *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae) from Pakistan. *Crop Protection*. pp. 79-86. doi : 10.1016/j.cropro.2017.12.028
- A.Ayil-Gutierrez B., Lorenzo F.S.T., Felipe V.F., Miriam M.G., Yahaira T.O., Maria C.T.O. dan Gildardo R. (2018). Biological Effects of Natural Products Against *Spodoptera* spp. *Crop Protection*. 195-207. doi : 10.1016/j.cropro.2018.08.032.
- Chandramohan B., K. Murugan., P. Madhiyazhagan., K. Kovendan., P.M. Kumar., C. Panneerselvam., D. Dinesh., J. Subramaniam., R. Rajaganesh., M. Nicoletti., A. Canale dan G. Benelli (2016). Neem By-Products in The Fight Against Mosquito-Borne Diseases: Biototoxicity of Neem Cake Fractions Towards The Rural Malaria Vector *Anopheles culicifacies* (Diptera: Culicidae). *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 6 (6), 472-476. doi : 10.1016/j.apjtb.2015.11.013
- Bhardwaj, D. K. and Kumari, S. (2016). To Study The Antifeedant Activity of Nimbecidine and Ultineem Against and Instar Larvae of *Spilosoma obliqua* (Walker) (Lepidoptera: Arctiidae). *European Journal of Biotechnology and Bioscience Online*. 4(9), 35-37.
- Bhargava, S. and Madhav, N.V.S. (2018). Data on Spectroscopic, Rheological Characterization of Neem Oil and its Isolated Fractions. *Data in Brief*. 21, 996-1003. doi : 10.1016/j.dib.2018.10.049
- Coventry, E. dan Allan, E.J. (2001). Microbiological and Chemical Analysis of Neem (*Azadirachta indica*) Extracts: New Data on Antimicrobial Activity. *Phytoparasitica*, 29 (5), 441-450. doi: 10.1007/BF02981863.
- Esparza-Diaz G., Villanueva-Jimenez J. A., Lopez-Collado J., Rodriguez-Lagunes,

- D.A. (2010). Azadirachtin Extraction Using Cold Press and Soxhlet Methods. *Biopesticides International*, 6 (1), 45-51.
- Fitriady M.A., Anny S., Egi A., Salahuddin., Deska P.F.A. (2017). Steam Distillation Extraction of Ginger Essential Oil: Study of The Effect of Steam Flow Rate and Time Process. *AIP Conference Proceedings*, 1803. doi : 10.1063/1.4973159
- Isman, M.B., Opende, K., Anna, L., Land, J.K. (1990a). Insecticidal and Antifeedant Bioactivities of Neem Oils and Their Relationship to Azadirachtin Content. *Agriculture Food Chemical*. 38; 1406-1411.
- Isman, M.B., Opende, K., Anna, L., Land, J.K. (1990b). Insecticidal and Antifeedant Bioactivities of Neem Oils and Their Relationship to Azadirachtin Content (1981). pp. 1406-1411.
- Kardianan, A., Eko, T. dan Tarigan, N. (2017). Persistensi Residu Insektisida Nabati Piretrum dan Mimba pada Tanaman Padi. *Bul. Littro*. 28 (2), 191-198. doi : 10.21082/bullittro.v28n2.2017.191-198
- Koul O., Jatinder S.M, Gurmeet S, Wlodzimierz M D, and S. B. (2003). 6 -Hydroxygedunin from *Azadirachta indica*. Its Potentiation Effects with Some Non-azadirachtin Limonoids in Neem Against Lepidopteran Larvae. *Journal Agriculture Food Chemical*, 51 (2003), 2937-2942.
- Mardiningsih, T.L., C. Sukmana, N. Tarigan, S. Suriati. (2010). Efektivitas Insektisida Nabati Berbahan Aktif Azadirachtin dan Saponin terhadap Mortalitas dan Intensitas Serangan *Aphis gossypii* Glover. *Bul Littro*. 21(2), 171-183.
- Mohapatra S., S.K. Sawarkar., H.P. Patnaik dan B. Senapati (1995). Antifeedant Activity of Solvent Extracts of Neem Seed Kernel Against *Spodoptera Litura* F. and Their Persistency Against Sunlight Through Encapsulation. *International Journal of Pest Management*, 41(3), 154-156. doi : 10.1080/09670879509371941
- Nisya, F. N., Prijono, D. and Nurkania, A. (2017). Application of Diethanolamide Surfactant Derived from Palm Oil to Improve The Performance of Biopesticide from Neem Oil. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 65 (1). doi 10.1088/1755 1315/65/1/012005
- E. Osman M. A., N.A. Shakil., V.S. Rana D.J. Sarkar., S. Majumder., P. Kaushik B. B. Singh dan J. Kumar (2017). Antifungal Activity of Nano Emulsions of Neem and Citronella Oils Against Phytopathogenic Fungi, *Rhizoctonia solani* and *Sclerotium rolfsii*. *Industrial Crops & Products*. 379-387. doi 10.1016/j.indcrop.2017.06.061
- Paula, J.A.M., L.F. Brito., K.L.F.N. Caetano M.C.M. Rodrigues., L.L. Borges dan E.C. Conceicao (2015). Ultrasound-assisted Extraction Of Azadirachtin From Dried Entire Fruits of *Azadirachta indica* A. Juss. (*Meliaceae*) and its Determination by a validated HPLC-PDA method. *Talanta*.doi:10.1016/j.talanta.2015.11.005
- Riyajan S. dan J.T. Sakdapipanich (2009). Development of A Controlled Release Neem Capsule with A Sodium Alginate Matrix, Crosslinked By Glutaraldehyde and Coated With Natural Rubber. *Polym Bull*. 63:609-622. doi : 10.1007/s00288-009 0126 z
- Schmutterer, H. (1990). Properties and Potential of Natural Pesticides from the Neem Tree *Azadirachta indica*. *Annual Review of Entomology*, 35(1), 271-297. doi 10.1146/annurev.en.35.010190.001415
- Utami, S., Syaufina, L. dan Haneda, N. F. (2010). Daya Racun Ekstrak Kasar Daun Bintang (*Cerbera odollam* Gaertn.) terhadap Larva *Spodoptera litura* Fabricius. *Jurnal Ilmiah Pertanian Indonesia*, 15(2), 96-100.
- Willis, B. dan M. (2009). Pengaruh Ekstrak Tanaman Obat terhadap Mortalitas dan Kelangsungan Hidup *Spodoptera Litura* F. (*Lepidoptera, Noctuidae*). *Bul. Littro*. 20 (2), 148-156.
- Yuliana, M. (2008). Extraction of Neem oil (*Azadirachta indica* A. Juss) Using N-hexane and Ethanol: Studies of Oil Quality, Kinetic and Thermodynamic. *Journal of Engineering and Applied Sciences*, 3(3), 49-54.

ISOLASI DAN KARAKTERISASI POTENSI ISOLAT BAKTERI RIZOSFER UNTUK MENGENDALIKAN PENYAKIT BUDOK PADA TANAMAN NILAM

Isolation and Characterization of Potential Isolates of Rhizosphere Bacteria to Control Budok Disease in Patchouli Plant

Sukanto¹⁾, Novia Listiana²⁾, Reni Indrayanti²⁾, dan Dono Wahyuno¹⁾

¹⁾ Balai Penelitian Tanaman Rempah dan Obat
Jalan Tentara Pelajar No. 3 Bogor 16111

²⁾ Universitas Negeri Jakarta (UNJ)
Jalan Pemuda No. 10 Rawamangun, Jakarta Timur

ABSTRAK

ABSTRAK/ABSTRACT

History:

11 April 2019
25 September 2019
17 Oktober 2019

Keywords:

cablin; agents
Synchytrium pogostemonis
Enterobacter

Keywords:

cablin,
Synchytrium
pogostemonis, biocontrol

Synchytrium pogostemonis, patogen penyebab penyakit budok, merupakan salah satu faktor pembatas utama dalam produksi tanaman nilam di Indonesia. Petani nilam biasanya mengendalikan penyakit budok dengan fungisida kimia yang dapat berdampak buruk karena mencemari lingkungan dan menimbulkan gangguan pada ekosistem pertanian. Oleh karena itu, perlu dicari cara pengendalian yang ramah lingkungan. Tujuan dari penelitian ini adalah mengisolasi dan mengevaluasi isolat rizobakteri dari akar tanaman nilam dan lada, serta pengaruhnya terhadap jamur model (*Fusarium oxysporum* f.sp. *vanillae*, *F. solani*, *Sclerotium rolfsii*). Beberapa isolat rizobakteri yang potensial diuji untuk mengendalikan penyakit budok pada skala pot. Selanjutnya, isolat paling potensial diidentifikasi secara molekuler. Selain itu, jenis senyawa yang bersifat antijamur dianalisis dengan metode GC-MS. Hasil pengujian menunjukkan bahwa 26 dari 100 isolat rizobakteri yang diperoleh dapat menghambat pertumbuhan *F. oxysporum*, *F. solani*, dan *S. rolfsii*. Empat isolat rizobakteri (RL13-A, RL31-A, RL35-A, RL32-B) menunjukkan penghambatan yang kuat (>40 %) terhadap tiga jamur patogen yang diuji. Hasil pada percobaan dalam polibag menunjukkan bahwa isolat rizobakteri RL35-A, PS9, RL13-A, RL32-B, RL31-A dapat menekan secara nyata penyakit budok sebesar 84,01; 76,00; 65,99; 43,99; dan 21,98%. Isolat RL35-A memiliki daya antagonis yang paling kuat dibandingkan dengan isolat lainnya. Berdasarkan analisis molekuler 16S rDNA, isolat RL35-A berkerabat dekat dengan *Enterobacter* sp. (99 %). Senyawa antibiotik yang diekstraksi dari kultur RL35-A teridentifikasi sebagai fenol, 2,6-dimetoksi (Canola) berdasarkan analisis GC-MS. Hal ini menunjukkan bahwa bakteri *Enterobacter* sp. dapat dikembangkan sebagai agens hayati untuk pengendalian penyakit budok pada tanaman nilam.

Synchytrium pogostemonis, the causal agent of budok disease, is one of the major limiting factors in patchouli production in Indonesia. Patchouli farmers usually control budok disease with chemical fungicides. Chemical control pollutes environment and disrupts agricultural ecosystem. Therefore, an environmentally friendly pest control should be conducted to control the disease. The objective of the study was to isolate and evaluate some rhizobacteria from the rhizosphere of patchouli and black pepper plants against *Fusarium oxysporum* f.sp. *vanillae*, *F. solani*, *Sclerotium rolfsii*. Potential rhizobacterial isolates were tested to control budok disease on a pot scale. The results showed that 26 rhizobacterial isolates from 100 tested were antagonistic to *F. oxysporum*, *F. solani* and *S. rolfsii*. Four rhizobacteria isolates (RL13-A, RL31-A, RL35-A, RL32-A) showed strong inhibition (>40 %) against the 3 pathogens. In polibag experiment, RL35-A, PS9, RL13-A,

RL32-B, RL31-A isolates were able to suppress budok disease significantly 84.01; 76.00; 65.99; 43.99; and 21.98 % respectively. These results indicated that RL35-A isolates have strong antagonistic effect compared to other isolates. Based on 16S rDNA analysis, RL35-A isolates possessed close relationship (99 %) with a species of *Enterobacter* sp. The antibiotic compound extracted from RL35-A culture broth using GC-MS analysis was identified as phenol, 2,6-dimethoxy-(canol). These results suggested that *Enterobacter* sp. was potential to be developed as biological agent for controlling budok disease in patchouli plants.

PENDAHULUAN

Nilam (*Pogostemon cablin* Benth) merupakan salah satu tanaman penghasil minyak atsiri yang cukup penting peranannya dalam menghasilkan devisa. Permintaan minyak nilam dunia sekitar 1.600 ton/tahun, dan Indonesia dapat memenuhi sekitar 1.200-1.500 ton (90 %) kebutuhan dunia (Chakrapani *et al.* 2013). Minyak nilam mempunyai prospek yang cukup baik sebagai komoditas ekspor karena permintaan minyak nilam terus meningkat untuk bahan baku industri parfum, farmasi, kosmetik, sabun, insektisida, fungisida, dan bakterisida (Paul *et al.* 2010; Gang-sheng *et al.* 2012; Swamy dan Sinniah 2015; Adhavan *et al.* 2017). Sentra pengembangan nilam di Indonesia saat ini adalah di Sulawesi (70-75 %), Sumatera (20 %), dan Jawa (5 %) (Gouin 2016).

Dua masalah utama pada pengembangan nilam adalah adanya senyawa autotoksin yang berefek negatif pada pertumbuhan tanaman (Xu *et al.* 2015) dan penyakit, termasuk budok (Sukanto 2013). Penyakit budok disebabkan oleh jamur *Synchytrium pogostemonis*. Saat ini, penyakit budok merupakan masalah serius yang selalu ditemukan di beberapa sentra pengembangan nilam. Gejala penyakit budok pada awalnya adalah adanya kutil pada daun yang baru terbentuk dari tunas-tunas yang keluar dari permukaan tanah atau batang paling bawah. Gejala berat pada daun bagian atas ditandai dengan daun menjadi kerdil, berkerut, tebal, dan berwarna kemerahan (Wahyuno 2010). *S. pogostemon* merupakan jamur parasit obligat artinya hanya dapat tumbuh pada jaringan tanaman yang hidup, sedangkan pada jaringan yang mati sifatnya tidak aktif dan tetap hidup membentuk spora istirahat (*resting spore*) yang berdinding tebal (Wahyuno 2010). Bentuk spora istirahat jamur

S. endobioticum yang menyerang kentang dapat bertahan di dalam tanah lebih dari 43 tahun. Spora akan aktif menginfeksi tanaman ketika ada inang dan lingkungan yang mendukung untuk perkembangannya (Przetakiewicz 2015).

Teknologi pengendalian penyakit budok di lapangan masih sangat terbatas. Sampai saat ini belum ditemukan varietas nilam tahan terhadap penyakit budok. Pengendalian secara kimia dengan menggunakan fungisida berbahan aktif benomil dapat menurunkan serangan penyakit budok di lapangan (Christanti *et al.* 2013). Ramya *et al.* (2013) melaporkan bahwa *Synchytrium* sp. pada tanaman nilam dapat dikendalikan dengan fungisida berbahan aktif ridomil. Penggunaan fungisida yang terus menerus untuk mengendalikan penyakit budok pada nilam dikhawatirkan dapat merusak agroekosistem, bahkan dapat menimbulkan patogen penyebab penyakit lebih tahan dan virulen. Oleh karena itu, diperlukan pengendalian yang ramah lingkungan, seperti pemanfaatan agen hayati. Agens hayati telah banyak diteliti dan dikembangkan untuk pengendalian beberapa penyakit yang disebabkan oleh patogen tular tanah. Beberapa spesies rizobakteri, seperti *Bacillus* sp. dan *Pseudomonas* sp., memiliki spektrum yang luas dan efektif untuk mengendalikan beberapa patogen tular tanah. *Bacillus* sp. dapat mengendalikan *Fusarium oxysporum* f.sp. ciceri pada tanaman buncis (Karthick *et al.* 2017). *F. graminearum* Schabe pada gandum (Baffoni *et al.* 2015), *F. solani* pada tanaman tomat (Ajilogba *et al.* 2013), *F. oxysporum* f.sp. cubense pada tanaman pisang (Gang *et al.* 2013), dan *Botrytisphaeria dothidea* pada buah peach (Li *et al.* 2016). Selain itu, *Bacillus* sp. dilaporkan dapat mengendalikan nematoda pada tanaman anggur (Aballay *et al.* 2013). Sementara itu, *Pseudomonas* sp. dilaporkan dapat mengendalikan *F. oxysporum* f.sp. cubense pada tanaman pisang (Pushpavathi

dan (Dah 2017), *Sclerotium rolfsii* Sacc pada bawang tanah (Rakh *et al.* 2017), dan *F. circinatum* pada tanaman pinus (Iturritxa *et al.* 2017). Selain itu, *Pseudomonas* sp., juga dilaporkan dapat mengendalikn *Ralstonia solanacearum* yang menyerang tanaman kentang dan terung (Alameddhi dan Harighi 2015; Ramesh dan Bhat 2017).

Aktivitas rizobakteria dalam mengendalikan patogen penyebab penyakit dapat secara langsung sebagai antagonis atau secara tidak langsung dengan menginduksi ketahanan tanaman (Shahjapour *et al.* 2018). Mekanisme pengenalan patogen secara langsung oleh rizobakteri dapat dengan menghasilkan metabolit sekunder, seperti antibiotik, siderofor, enzim hidrolisis, senyawa amida, dan senyawa volatil (Mihajlović *et al.* 2017). Setiap spesies rizobakteri akan menghasilkan senyawa metabolit sekunder yang berbeda satu sama lainnya sehingga kemampuan mengendalikan patogen akan berbeda-beda. Oleh karena itu, skrining rizobakteri sebagai agens hayati merupakan hal yang sangat penting dalam penelitian pengendalian penyakit tanaman. Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi dan menguji keefektifan agens hayati secara *in vitro* dan skala pot, serta meng-identifikasi secara molekuler isolat rizobakteri yang potensial untuk mengendalikan penyakit budok pada tanaman nilam.

BAHAN DAN METODE

Penelitian dilakukan di laboratorium dan rumah kaca Kelompok Peneliti Proteksi Tanaman, Balai Penelitian Tanaman Rempah dan Obat. Penelitian dilakukan sejak Februari sampai Desember 2017.

Isolasi Bakteri rizosfir

Sampel perakaran nilam diambil dari Kebun Percobaan Cicurug, Sukabumi, sedangkan sampel lada diambil dari Kebun Percobaan Sukamaja, Sukabumi. Sepuluh gram akar nilam dan lada yang masih menempel dipotong

kecil-kecil kemudian dimasukkan ke dalam erlenmeyer berisi 90 ml akuades steril. Sampel diaduk menggunakan *rotary shaker* berkecepatan 150 rpm selama 20 menit, kemudian sampel larutan tanah diambil dan diencerkan dengan tingkat pengenceran 10^{-3} . Selanjutnya, 50 μ l larutan diambil dan dimasukkan ke dalam cawan petri berisi medium tumbuh rizobakteri terdiri atas sodium kaseinat, asparagin ($C_4H_8N_2O_3$), sodium propionat ($C_3H_5NaO_2$), magnesium sulfat ($MgSO_4$) ferrous sulfat ($FeSO_4$) dan agar 20 g per 1000 ml akuades (Difco Actinomycetes Isolation Agar, Ref. 212168). Larutan diinkubasi selama 48 jam, kemudian setiap koloni rizobakteri yang tumbuh diuji antagonismenya terhadap *F. oxysporum* f.sp. *vanillae* asal vanili, *F. solani* asal jambu mete, dan *S. rolfsii* asal nilam. Pengujian dilakukan pada media Agar Kentang Dekrosa (AKD) yang mengandung 200 g kentang, 20 g sukrosa, 20 g agar, dan 1000 air distilat. Isolat-isolat rizobakter yang menunjukkan penghambatan terhadap jamur uji selanjutnya ditumbuhkan pada medium Pepton Sukrosa Agar (PSA) yang terdiri dari 5 g pepton, 20 sukrosa, 0,5 g K_2HPO_4 , dan 0,25 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 1.000 ml air distilat untuk pemurnian dan pengujian lanjutan.

Pengujian *in vitro* aktivitas anti jamur

Mengingat penyakit budok disebabkan oleh jamur obligat *S. pogostemon*, maka pengujian awal antijamur dari isolat bakteri rizosfir dilakukan terhadap beberapa jamur patogen lain sebagai model, yaitu *F. oxysporum*, *P. capsici*, dan *S. rolfsii*. Pengujian isolat-isolat rizobakteri sebagai agens hayati pada jamur patogen dilakukan dengan metode *dual culture* (Karthick *et al.* 2017). Isolat rizobakteri ditumbuhkan pada cawan petri yang berisi media AKD kemudian secara berhadapan ditumbuhkan jamur patogen pada jarak 3 cm. Jamur dan agens hayati diinkubasi pada suhu kamar selama 7 hari. Pengaruh antagonis dari rizobakteri terhadap jamur patogen diukur berdasarkan pengamatan zona hambatan. Persentase penghambatan dihitung dengan rumus mengikuti Thampi dan Bhai (2017) sebagai berikut:

$$\text{Persentase Penghambatan} = \frac{C - R}{C} \times 100 \%$$

C = Pertumbuhan jamur patogen tanpa perlakuan rizobakteri (kontrol)/*Growth of pathogenic fungi without rizobacterial treatment (control)*.

R = Pertumbuhan jamur patogen yang diuji dengan rizobakteri/*Growth of pathogenic fungi that are tested with rizobacteria*.

Pengujian pada tanaman nilam

Penyiapan tanaman nilam

Tanaman nilam yang digunakan adalah varietas Patchoulina 2 yang diperoleh dari Unit Pengelola Benih Sumber, Balitro. Setek nilam ditanam pada polibag berukuran 60 cm x 60 cm berisi campuran tanah (10 kg) dan pupuk kandang (2 kg). Tanaman nilam dipupuk pada umur 1,5 dan 3 bulan setelah tanam dengan dosis 10 g pupuk NPK (16:16:16) per tanaman.

Penyiapan inokulum budok dan rizobakteri antagonis

Sumber inokulum penyakit budok berasal dari ekstrak daun dan batang nilam yang menunjukkan gejala penyakit budok. Sampel tanaman nilam sakit diambil dari kebun nilam di Ciomas Bogor. Daun dan batang nilam dengan gejala budok dipotong kecil-kecil, dimasukkan ke dalam blender berisi 100 ml air per 1 kg sampel. Isolat rizobakteri antagonis (RL13-A, RL35-A, RL32-B, RL31-A dan PS9 (*Bacillus* sp. asal nilam)) diperbanyak di dalam media 200 ml Sukrosa Pepton Broth (20 g sukrosa; pepton 5 g; 0,5 g K_2HPO_4 ; 0,25 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$) pada suhu ruang selama 3 hari dengan menggunakan *rotary shaker* berkecepatan 150 rpm. Kultur rizobakteri diencerkan sampai konsentrasi 10^6 spora/ml.

Inokulasi dan perlakuan rizobakteri antagonis

Masing-masing rizobakteri antagonis dicampur dengan sumber inokulum penyakit budok dengan perbandingan 1:1 kemudian dikocok dengan alat pengocok pada kecepatan 150 rpm selama 24 jam. Selanjutnya, tanaman nilam berumur 2 bulan disiram dengan 100 ml campuran rizobakteri antagonis dan inokulum penyakit budok pada daerah sekitar perakaran nilam. Sementara untuk perlakuan kontrol negatif,

tanaman nilam disiram dengan air sedangkan untuk kontrol positif disiram dengan inokulum *Ralstonia solanacearum*. Masing-masing perlakuan terdiri dari 10 tanaman diulang empat kali.

Pengamatan kejadian penyakit

Pengamatan dilakukan setiap 2 minggu dengan cara mengamati dan mencatat jumlah tunas serta daun nilam yang terserang maupun tidak terserang. Pengamatan intensitas penyakit dilakukan dengan cara skoring pada setiap tanaman mengikuti metode Christanti *et al.* (2013) sebagai berikut:

0 = tanaman sehat (tidak bergejala)

1 = bergejala 0-25%

2 = bergejala >25%-50%

3 = bergejala >50%-75%

4 = bergejala >75%

Intensitas penyakit dihitung dengan rumus sebagai berikut :

$$IP = \frac{\sum (n \times v)}{N \times V} \times 100 \%$$

Keterangan/Note :

IP = Intensitas penyakit (IP)/Intensity of disease (IP).

v = nilai skoring (v)/scoring value (v).

n = jumlah nilai skor yang sama/the same number of scores.

V = nilai skor tertinggi/highest score value.

N = jumlah sampel/number of samples.

Data hasil pengamatan dianalisis secara statistik menggunakan uji ANOVA pada taraf 5 %. Pengujian dilanjutkan dengan Uji Duncan (DMRT) pada $\alpha = 0,05$ untuk melihat besarnya beda nyata pada masing-masing perlakuan.

PCR DNA pengkode 16S rDNA

Identifikasi isolat rizobakteri secara molekuler hanya dilakukan pada isolat yang paling potensial untuk mengendalikan penyakit budok yaitu RL35-A. Analisis molekuler berdasarkan fragmen 16S rDNA menggunakan metode PCR (Packeiser *et al.* 2013). Sel dari koloni tunggal isolat RL35-A yang tumbuh pada permukaan media padat diambil menggunakan tusuk gigi steril kemudian disuspensikan ke dalam 50 μ l air bebas nuklease. Selanjutnya, sel-sel bakteri dihancurkan

tanaman dengan cara dikocok (*vortex*) selama 10 menit dan diinkubasi pada suhu 98° C selama 10 menit. Larutan selanjutnya disentrifugasi untuk memisahkan supernatan dan material sisa (*debris*) dari sel. Supernatan diambil dan digunakan sebagai template DNA pada amplifikasi PCR.

Amplifikasi fragmen 16S rDNA dilakukan menggunakan GoTaq (Promega) dengan primer 5'-GT-ACAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' dan 3'-GGT-TACCTTGTACGACTT-3' (Managan *et al.* 2010). Urutan basa nitrogen hasil sekuens menggunakan *automated DNA sequencer* (ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer) (Applied Biosystem). Hasil sekuens kemudian dibandingkan dengan data GenBank menggunakan program Blast-N dari situs NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) melalui <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>. Sementara itu, filogenetik dibuat dengan menggunakan software *Molecular Evolutionary Genetics Analysis* (MEGA) version 7.

Identifikasi metabolit sekunder

Metabolit sekunder yang dihasilkan oleh jamur terpilih, yaitu RL35-A, dianalisis menggunakan pelarut etil asetat mengikuti metode Janda *et al.* (2007). Isolat rizobakteri ditanam pada medium Sukrosa Peptone Agar dengan 20 g pepton 5 g; K₂HPO₄ 0,5 g; MgSO₄·7H₂O 0,25 g; agar 20 g, 1000 ml air destilasi selama 3 hari pada suhu 28° C. Selanjutnya, bakteri diperbanyak di dalam 300 ml media sukrosa pepton cair (tanpa agar). Kultur bakteri diinkubasi dengan cara dikocok selama 1 hari dengan menggunakan alat pengocok mekanis berkecepatan 150 rpm.

Kultur bakteri rizosfir disentrifugasi menggunakan Himac CR21F (Hitachi) dengan kecepatan 10.000 x g pada suhu 4° C selama 10 menit. Supernatan disaring menggunakan filter selulosa (0,45 µm) kemudian diekstrak kembali dengan larutan etil asetat dengan perbandingan supernatan dan pelarut 1:1 sehingga terjadi ekstraksi antara fraksi etil asetat dan fraksi air. Fraksi air yang terlarut dalam medium dari media rizosferi dievaporasi menggunakan alat evaporator (EYELA, Tokyo Ltd.) pada suhu 30° C hingga konsentrasi berkurang 10 % dari

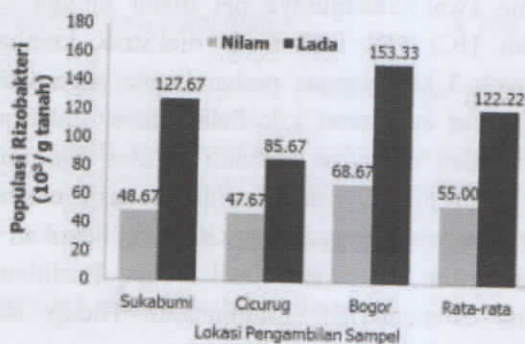
volume awal. Selanjutnya pH diatur hingga 3,6 dengan HCl 1N. Fraksi air diekstrak kembali sebanyak 3 kali dengan perbandingan supernatan dan pelarut etil asetat 1:1. Selanjutnya, fraksi air diambil dan diuapkan kembali di atas *hot plate* pada suhu 50° C sampai didapat hasil ekstrak kasar. Analisis menggunakan GC-MS dilakukan di Laboratorium Pengujian Hasil Hutan, Puslitbang Hutan, Kementerian Lingkungan Hidup dan Kehutanan, Bogor.

Sampel dimasukkan ke dalam ruang kuarsa dalam unit pirolisis yang kemudian dipanaskan dalam lingkungan bebas oksigen pada suhu yang sudah ditentukan sebelumnya. Campuran senyawa hasil ekstraksi kemudian dimasukkan dalam kolom GC-MS Shimadzu Type GCMS-QP2010 dengan kondisi GC-MS untuk analisis sebagai berikut: Gas: Helium; *Detector*: FID; *Column*: *Capiler type phase Rtx-5MS* (60 m; 0,25 mm); *ID Column temperature* 50° C; *Inlet press* (kPa) 100; *Column flow* (mL min⁻¹) 0,85; *Split ratio* 112,3; *SPL temperature* 280° C; *MS Interface* 280° C. Spektrometer massa dioperasikan dalam mode ionisasi elektron pada 70 eV dengan suhu 200° C. Hasil spektrum massa kemudian dibandingkan dengan basis data *Mass Spectrometry*.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Isolasi dan pengujian rizobakteri sebagai antagonis

Hasil isolasi dari lima sampel tanah yang melekat pada perakaran (rizosfer) nilam dan lada diperoleh populasi rizobakteri yang beragam. Populasi bakteri pada rizosfer tanaman lada lebih banyak dibandingkan dari tanaman nilam. Populasi rizobakteri pada tanaman lada adalah 90,67 x 10⁻³ per g akar, sedangkan pada tanaman nilam 50,80 x 10⁻³ per g akar. Hal ini sejalan dengan pernyataan Haichar *et al.* (2014) bahwa mikroba pada setiap rizosfir tanaman bervariasi karena komponen atau senyawa dari eksudat yang dikeluarkan oleh akar tanaman, seperti asam amino, asam organik, gula, senyawa fenol, dan metabolit sekunder lainnya juga berbeda. Wu *et al.* (2017) melaporkan bahwa *Bacillus amyloliquefaciens* sebagai bakteri antagonis terhadap patogen layu bakteri pada tanaman tomat, populasinya meningkat ketika



Gambar 1. Populasi rizobakteri pada nilam dan lada dari beberapa lokasi.

Figure 1. *Rhizobacteria* population of patchouli and black pepper from several locations.

diberikan asam organik. Sementara itu, perlakuan dengan pembenah asam fenol (asam p-kumarat dan asam benzoat) menurunkan populasi mikroba yang menguntungkan (mikoriza, PGPR/*Plant Growth Regulator Rhizobacteria*, dan antagonis) sehingga berpengaruh negatif terhadap pertumbuhan kacang tanah (Li *et al.* 2014). Adanya autotoksik pada tanaman nilam juga dilaporkan dapat menurunkan pertumbuhan tanaman nilam (Djazuli 2011; Wu *et al.* 2017; Swamy dan Sinniah 2016). Autotoksik pada pertanaman nilam diduga menyebabkan rendahnya populasi rizobakteri dibandingkan dengan tanaman lada.

Dari 100 isolat rizobakteri yang berasal dari nilam dan lada diperoleh 26 isolat yang mempunyai aktivitas antijamur, dicirikan dengan kemampuannya dalam menghambat pertumbuhan isolat jamur *S. rolfii*, *F. oxysporum* f.sp *vanillae* dan *F. oxysporum* dari jambu mete. Hasil pengujian daya hambat rizobakteri terhadap *F. oxysporum* f. *vanillae* diperoleh 11 isolat yang menunjukkan penghambatan yang kuat (>40 %), yaitu RL13-A, RL14-A, RL15-A, RL11-A, RL11-A-1, RL31-A, RL32-A, RL35-A, RL32-A; RL33-A, dan RL34-A. Dua isolat rizobakteri yang menunjukkan antagonis yang kuat terhadap *F. solani* yaitu RL31-A dan RL32-A, serta 2 isolat antagonis (RL35-A, RL32-B) terhadap *S. rolfii*. Sifat antagonis rizobakteri tersebut terlihat dengan adanya zona hambatan di antara pertumbuhan cendawan patogen dengan rizobakteri.

Rizobakteri yang berpotensi sebagai agens hayati dapat memproduksi senyawa antibiotik,

enzim hidrolisis, dan atau metabolit sekunder lainnya (Raza *et al.* 2016). Hasil pengujian kitinase pada media kitin dan protease pada *skim milk* diperoleh 2 isolat (RL35-A dan PS9) menunjukkan pertumbuhan dan membentuk bening di sekitar koloni. Hal ini menunjukkan bahwa kedua isolat tersebut mampu mendegradasi kitin dan protein sebagai sumber karbon. Enzim protease bersama enzim kitinase akan membantu mendegradasi dinding sel jamur patogen yang mengandung protein dan kitin. *Synchytrium* merupakan salah satu jamur dari Chytridiomycota yang dinding selnya tersusun dari polimer kitin dan glukonase (Jadhav *et al.* 2010). Dengan demikian, diharapkan isolat rizobakteri antagonis penghasil kitin dapat mengendalikan *S. pogostemonis*.

Empat dari 26 isolat rizobakteri, yaitu RL13-A, RL31-A, RL35-A, dan RL32-A menunjukkan rata-rata persentase penghambatan tertinggi (>40 %) terhadap 4 cendawan tular tanah yang diuji (Tabel 1). Keempat isolat rizobakteri tersebut digunakan untuk pengujian pada tanaman nilam skala pot.

Pengujian skala pot

Pengujian isolat rizobakteri antagonis terpilih terhadap patogen penyebab penyakit budok dilakukan dalam skala pot. Gejala penyakit budok berupa bintik-bintik putih ditemukan 4 minggu setelah inokulasi pada kontrol positif dengan intensitas penyakit 9,38 %. Gejala yang sama juga ditemukan pada perlakuan dengan isolat RL32-A dan RL31-A dengan intensitas penyakit masing-masing 1,04 % dan 2,08 %. Namun, perlakuan dengan isolat RL13-A, RL35-A, dan PS9 tidak terlihat adanya serangan penyakit budok yang menunjukkan adanya penghambatan siklus penyakit budok oleh rizobakteri antagonis. Hal ini mungkin disebabkan zoospora yang keluar dari kantung spora (sporangia) terhambat pergerakannya dengan adanya bakteri antagonis.

Gejala penyakit budok berawal dari cabangnya dekat permukaan tanah dan menyebar menuju ke daun. Enam minggu setelah inokulasi, semua tanaman nilam yang diperlakukan dengan isolat rizobakteri antagonis sudah mulai terserang penyakit budok dengan intensitas penyakit yang

Tabel 1. Persentasi penghambatan pertumbuhan jamur oleh rizobakteria antagonis.
 Table 1. Percentage of fungal growth inhibition by antagonistic rhizobacteria isolates.

No.	Isolat	Penghambatan pertumbuhan jamur (%)			Rataan
		<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>vanilla</i>	<i>Fusarium solani</i>	<i>Sclerotium rolfsii</i>	
1	RL11-A	33,33 bcde	32,35 fghi	0,00 a	21,89 bcdef
2	RL12-A	31,11 bc	23,53 cd	19,44 abcde	24,69 cdefg
3	RL13-A	67,78 g	29,41 defgh	28,89 defg	42,03 j
4	RL14-A	75,00 g	28,23 defg	12,22 abcd	38,48 j
5	RL15-A	47,22 f	35,29 ghij	25,00 cdefg	35,84 hij
6	RL16-A	31,66 bcd	28,23 defg	18,33 abcde	26,08 cdefg
7	RL17-A	34,44 bcde	24,12 cde	16,66 abcde	25,07 cdefg
8	RL11-A	67,78 g	0,00 a	0,00 a	22,59 cdef
9	RL11-A1	44,44 ef	38,82 ijk	5,55 abc	29,61 fgh
10	RL31-A	43,33 def	40,00 jk	38,55 efg	40,37 j
11	RL32-A	41,65 cdef	23,53 cd	17,78 abcde	29,62 fgh
12	RL33-A	32,22 bcd	29,41 defgh	19,44 abcde	25,06 cdefg
13	RL34-A	33,33 bcde	24,12 cde	31,66 defg	29,70 fgh
14	RL35-A	46,66 f	34,70 ghij	44,44 g	41,94 j
15	RL31-B	36,11 bcdef	23,53 cd	0,00 a	19,88 bc
16	RL32-B	41,66 cdef	42,94 k	41,66 fg	42,09 j
17	RL33-B	41,66 cdef	35,88 hij	33,33 efg	36,96 ij
18	RL34-B	41,66 cdef	35,29 ghij	33,33 efg	36,76 ij
19	RL41-A	38,89 bcdef	29,41 defgh	25,00 cdefg	31,10 ghi
20	RL41-B	33,33 bcde	32,35 fghi	19,44 abcde	28,37 efg
21	RL41-B1	38,89 bcdef	17,64 bc	5,55 abc	20,70 bcd
22	RL51-A	32,22 bcd	27,06 def	0,00 a	19,76 bc
23	RL52-A	27,77 b	31,17 bc	22,22 bcdef	27,06 defg
24	RL53-A	38,88 bcdef	26,47 def	19,44 abdef	28,27 efg
25	RL51-B	36,11 bcdef	22,35 cd	2,78 ab	20,41 bcd
26	RN21-A	33,88 bcde	12,94 b	0,00 a	15,61 b

Keterangan/Note :

Angka yang diikuti oleh huruf yang sama pada kolom yang sama tidak memiliki perbedaan yang signifikan pada DMRT 5 %/Numbers followed by the same letters in the same column were not significantly different at 5 % DMRT.

terhadap. Sepuluh minggu setelah inokulasi, perlakuan rizobakteria isolat RL35-A menunjukkan intensitas penyakit yang lebih rendah (33,33 %) dibandingkan perlakuan lainnya. Apabila dibandingkan dengan kontrol, maka penekanan penyakit budok dari perlakuan isolat RL35-A paling tinggi (84,01 %), kemudian diikuti isolat RL15-A (76 %), RL13-A (65,99 %), dan RL31-A (Tabel 2). Secara umum, beberapa isolat rizobakteria dapat menekan perkembangan penyakit, tetapi efektifitasnya belum mencapai 100 % dalam melindungi tanaman dari serangan penyakit. Mihajlović *et al.* (2017) menyatakan bahwa kesuksesan introduksi agens hayati juga bergantung dari ekosistem sekitar perakaran seperti struktur tanah, pH dan kelembaban tanah. Identifikasi rizobakteria antagonis terhadap

serangan penyakit budok perlu dijaga dengan melakukan pengkajian aplikasi kembali setelah 4 minggu atau penambahan bahan-bahan organik yang mendukung perkembangan populasi rizobakteria antagonis. Singh *et al.* (2012) melaporkan bahwa kematian tanaman jinten (*Cuminum cyminum*) oleh *F. oxysporum* f.sp. *cumini* sekitar 3-4 % pada perlakuan *Bacillus firmus* dan sekam. Sementara itu, pada perlakuan *B. firmus* tanpa sekam terjadi serangan lebih berat antara 13,8-20,5 %.

Identifikasi bakteri secara molekuler

Isolat RL35-A memiliki 1.367 bp berdasarkan 16S rDNA. Hasil perbandingan sekuen 16S rDNA dengan bakteri lain yang terdapat dalam database *Gene Bank* melalui

Tabel 2. Intensitas penyakit budok pada tanaman nilam yang diinokulasi dengan rizobakteria antagonis.
Table 2. The intensity of budok disease in patchouli plant inoculated with antagonistic rhizobacteria

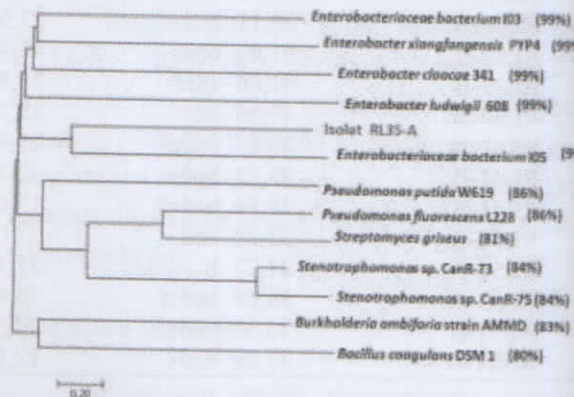
Isolat	Intensitas Penyakit (%)				Penekanan penyakit (%)
	4 MSI	6 MSI	8 MSI	10 MSI	
RL13-A	0,00a	0,00a	9,38ab	17,71bc	65,99
RL35-A	0,00a	3,13a	4,17ab	8,33ab	84,01
RL32-B	1,04a	2,08a	12,50b	29,17cd	43,99
RL31-A	2,08a	12,50b	27,08c	40,63de	21,98
PS9	0,00a	2,08a	5,21ab	12,50ab	76,00
Kontrol +	9,38b	21,88c	37,50d	52,08e	-
Kontrol -	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a	-

Keterangan/Note :

MSI/WAT : Minggu Setelah Aplikasi/Weeks After Treatments

Angka yang diikuti oleh huruf yang sama pada kolom yang sama tidak memiliki perbedaan signifikan pada uji DMRT taraf 5%/Numbers followed by the same letters in the same column not significantly different at 5% DMRT test

analisis BLASTN menunjukkan bahwa rizobakteria isolat RL35-A mempunyai tingkat kesamaan 99 % dengan semua spesies dari *Enterobacter* sp., yaitu *Enterobacteriaceae bacterium* strain I03, *E. bacterium* strain I05, *E. xiangfangensis* strain PYP4, *E. xiangfangensis* strain BAE23, *E. xiangfangensis*, *E. hormaechei* strain C4, *E. hormaechei* strain Z204, *E. hormaechei* strain RPK2, *E. hormaechei*, *E. cloacae* strain SKUAST3, *E. cloacae* strain XC3-3, *E. cloacae* strain RCB473, *E. cloacae* strain UKME01, *E. cloacae* strain SPLN3, *E. cloacae* strain ATCC 13047, *E. sp.* B19, *Enterobacter* sp. dc6, *Enterobacter* sp. LU1, *Enterobacter* sp. CIFRI D-TSB-9-ZMA, *Enterobacter* sp. P6-11-8. Sebaliknya dengan bakteri dari spesies lainnya, seperti *Pseudomonas putida*, *P. fluorescen*, *Streptomyces grissus*, *Stenotrophomonas* sp., *Burkholderia ambifaria* dan *Bacillus coagulans* menunjukkan kesamaan sekuen yang rendah (80-86 %). Hal tersebut juga terlihat pada analisis filogenetik dengan menggunakan software MEGA 7 bahwa isolat RL35-A memiliki kekerabatan yang dekat dengan semua spesies *Enterobacter* sp. (Gambar 2). Hal tersebut menunjukkan dugaan kuat bahwa isolat RL35-A adalah *Enterobacter* sp. Rizobakteria ini bersifat gram negatif, fakultatif anaerobik, berbentuk batang, dan berflagela (bergerak). *E. cloacae* dapat menyebabkan penyakit layu pada tanaman jahe (*Zingiber officinale* Roscoe) (Nishijima *et al.* 2004) dan cabai (*Capsicum annum* L) (García-



Gambar 2. Dendrogram kekerabatan isolat RL35-A dengan beberapa bakteri lain berdasarkan sekuen 16S rDNA.

Figure 2. Dendrogram of the phylogenetic relationship of RL35-A isolate with other species of antagonistic bacteria based on 16S rDNA sequence.

gonzález *et al.* 2018). Oleh karena itu, dilakukan uji potensi sebagai patogen (hipersensitifitas) pada daun tembakau dan pengujian potensi sebagai patogen pada hewan/manusia (hemolisis) pada agar darah (*blood agar*). Hasil pengujian hemolisis dan hipersensitif pada tanaman tembakau menunjukkan bahwa 26 isolat rizosfir, termasuk isolat RL35-A (*Enterobacter* sp.), adalah negatif. Hal ini berarti isolat RL35-A aman untuk tanaman dan hewan/manusia. Oleh karena itu, isolat RL35-A dapat dikembangkan sebagai agens hayati. Beberapa spesies *Enterobacter*, seperti *E. aerogenes*, *E. cowani*, *E. agglomerans*

telah digunakan sebagai agens hayati untuk mengendalikan *Phytophthora cactorum* pada tomat (Brewster *et al.* 1997), *Botrytis cinerea* dan *Phoma* sp. pada tanaman tomat (Shi dan Sun 2017), serta *Rhizoctonia solani* pada tanaman nilam (Chernin *et al.* 1995).

Analisis metabolit sekunder

Hasil analisis dengan GC-MS, *Enterobacter* sp. (isolat RL35-A) menghasilkan 11 metabolit sekunder, dan 6 di antaranya diduga sebagai antimikroba yaitu 2-decyn-1-ol, phenol, 4-methoxy-(guaiacol), phenol, 4-methyl-(creosol), phenol, 2,6-dimethoxy-(canolol), 1,2,4-trimethoxybenzene (methylsyringol), 2,4-hexadienedioic acid, 3,4-diethyl-, dimethyl ester (E,Z)- dan hexadecanoic acid, methyl ester (methyl palmitate). Senyawa-senyawa yang tergolong besar termasuk dalam golongan fenol diduga merupakan metabolit sekunder dari *Enterobacter* sp. Oleh karena itu, isolat RL35-A diduga bersifat antimikroba (antijamur). Kumar *et al.* (2014) melaporkan 2,4-bis (1,1-dimethylethyl) phenol merupakan metabolit sekunder dari *Ascomycetes* yang dapat menghambat pertumbuhan *Staphylococcus epidermidis* dan *Malassezia dermatitis*. Methyl palmitate bersifat antijamur terhadap *Paracoccidioides brasiliensis* dan *P. lutzii* (Shi *et al.* 2017), guaiacol terhadap *Staphylococcus aureus* (Cooper 2013), dan toluen terhadap *E. coli* (Bansal *et al.* 2012).

Selain itu, mekanisme *Enterobacter* sp. diduga mengendalikan patogen penyebab penyakit nilam karena menghasilkan enzim kitinase

dan protease (Chernin *et al.* 1995; Mohapatra *et al.* 2003) serta senyawa pemacu pertumbuhan (PGPR). *E. lignolyticus* dapat meningkatkan berat akar 4,3 kali, berat tunas 3,1 kali, panjang akar 2,2 kali dan panjang tunas 1,6 kali pada tanaman teh (Dutta *et al.* 2015), sedangkan *E. asburiae* dapat merangsang pertumbuhan akar pada tanaman jagung, padi, dan ketela pohon (Ogbo dan Okonkwo 2012; Jetiyanon 2015). Isolat RL35-A yang diidentifikasi sebagai *Enterobacter* sp., dan bersifat sebagai antagonis terhadap beberapa cendawan tular tanah, juga diduga berpotensi sebagai PGPR. Qin *et al.* (2017) melaporkan bahwa *Pseudochrobactrum kiredjianiae* strain A4 (GenBank accession KT203923) yang bersifat antagonis terhadap *Rhizoctonia cerealis*, *F. graminearum*, *Magnaporthe grisea*, *F. oxysporum* dan *Botrytis cinerea* juga dapat memacu pertumbuhan pada tanaman sorgum. Rizobakteria *Enterobacter* sp. RL35-A yang dapat menghasilkan antibiotik, enzim kitinase dan protease, memiliki potensi untuk dikembangkan sebagai agens hayati untuk penyakit budok dan PGPR pada tanaman nilam. Namun, penelitian lapangan diperlukan untuk mengkonfirmasi hal tersebut.

KESIMPULAN

Empat isolat rizobakteria bersifat antagonis terhadap *Fusarium oxysporum* f.sp. *vanillae*, *Fusarium solani*, dan *Sclerotium rolfsii* pada pengujian *in vitro*, dan menghambat perkembangan penyakit budok pada tanaman nilam. Isolat RL35-

Tabel 1. Metabolit sekunder dari isolat RL35-A menggunakan GC-MS.
Tabel 1. Secondary metabolites of RL35-A isolates with GC-MS.

No.	Waktu retensi	Nama komponen	Rumus molekul	Luas area (%)
1	12,97	2-Decyn-1-ol	C ₁₀ H ₁₈ O	7,61
2	14,82	Carbamic acid, phenyl ester (Phenyl carbamat)	C ₇ H ₇ NO ₂	18,44
3	15,43	Phenol, 4-methoxy-(Guaiacol)	C ₇ H ₈ O ₂	6,19
4	15,84	Phenol, 4-methyl-(Cresol)	C ₇ H ₈ O	5,93
5	18,40	Phenol, 2,6-dimethoxy-(Canola)	C ₈ H ₁₀ O ₃	26,78
6	18,61	1,2,4-Trimethoxybenzene (Methylsyringol)	C ₉ H ₁₂ O ₃	6,25
7	18,70	2,4-Hexadienedioic acid, 3,4-diethyl-, dimethyl ester, (E,Z)- (Toluene, 3,4,5-trimethoxy-)	C ₁₀ H ₁₄ O ₃	4,82
8	22,43	Hexadecanoic acid, methyl ester (methyl palmitate)	C ₁₇ H ₃₄ O ₂	2,90

A yang diidentifikasi sebagai spesies *Enterobacter* sp. berpotensi untuk dikembangkan sebagai agens hayati pada tanaman nilam karena telah lolos uji hipersensitivitas dan hemolisis.

DAFTAR PUSTAKA

- Aballay, E., Ordenes, P., Martensson, A. & Persson, P. (2013) Effects of Rhizobacteria on Parasitism by *Meloidogyne ethiopica* on grapevines. *Eur J Plant Pathol.* 135, 137-145. doi:10.1007/s10658-012-0073-7.
- Adhavan, P., Kaur, G., Princy, A. & Murugan, R. (2017) Essential Oil Nanoemulsions of Wild Patchouli Attenuate Multi-drug Resistant gram-positive, gram-negative and *Candida albicans*. *Industrial Crops & Products.* 100, Elsevier B.V., 106-116. doi:10.1016/j.indcrop.2017.02.015.
- Ajilogba, C.F., Babalola, O.O. & Ahmad, F. (2013) Antagonistic Effects of *Bacillus* Species in Biocontrol of Tomato Fusarium Wilt Antagonistic Effects of *Bacillus* Species in Biocontrol of Tomato Fusarium Wilt. *Ethno Med.* 7 (3), 205-216. doi:10.1080/09735070.2013.11886462.
- Baffoni, L., Gaggia, F., Dalanaj, N., Prodi, A., Nipoti, P., Pisi, A., Biavati, B. & Gioia, D. Di (2015) Microbial Inoculants for the Biocontrol of *Fusarium* spp. in Durum Wheat. *BMC Microbiology.* 15 (242), 8-10. doi:10.1186/s12866-015-0573-7.
- Brewster, D.T., Spiers, A.G. & Hopcroft, D.H. (1997) Biocontrol of *Phytophthora cactorum* In vitro With *Enterobacter aerogenes*. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science.* 25 (1), 9-18. doi:10.1080/01140671.1997.9513982.
- Carvalho, D.D.C., Oliveira, D.F., Correa, R.S.B., Campos, V.P., Guimaraes, R.M., Coimbra, J.L., Quimica, D. De, Lavras, U.F. De & Agricultura, D. De (2007) Rhizobacteria able to Produce Phytotoxic Metabolites. *Brazilian Journal of Microbiology.* 38, 759-765.
- Chakrapani, P., Venkatesh, K., Chandra Sekhar Singh, B., Arun Jyothi, B., Prem Kumar, Amareshwari, P., A.R.R. (2013) Phytochemical, Pharmacological Importance of Patchouli (*Pogostemon cablin* (Blanco) Benth) an Aromatic Medicinal Plant. *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res.* 21 (2), 7-15. doi:10.1016/j.indcrop.2017.02.015.
- Chernin, L., Ismailov, Z., Haran, S., Chet Chernin, L., Ismailov, Z. & Haran, S. (1998) Chitinolytic *Enterobacter agglomerans* Antagonistic to Fungal Plant Pathogens. These Include: Chitinolytic *Enterobacter agglomerans* Antagonistic to Fungal Plant Pathogens. 61 (5), 1720-1726.
- Christanti Sumardiyono, Sedyo Hartono, Nasir S. (2013) Pengendalian Penyakit Budidaya dengan Fungisida dan Deteksi Residu pada Daun Nilam Pengendalian Penyakit Budidaya dengan Fungisida Control of Budok Disease with Fungicides and Detection of Residue on Patchouli Leaves. *Jurnal Fitopatologi Indonesia.* 9 (3), 89-93. doi:10.14692/jfi.9.3.89.
- Cooper, R.A. (2013) Inhibition of Biofilms by Glucose Oxidase, Lactoperoxidase and Guaiacol: The Active Antibacterial Component in an Enzyme Alginate Dressing. *International Wound Journal.* 10, 630-636. doi:10.1111/iwj.12083.
- Dinesh Bansal, Pragya Bhasin, Anita Punia, A.R.S. (2012) Evaluation of Antimicrobial Activity and Phytochemical Screening of Extracts of *Tinospora cordifolia* Against Some Pathogenic Microbes. *Journal of Pharmacy Research.* 5 (1), 127-129.
- Djazuli, M. (2011) Alelopati pada Beberapa Tanaman Perkebunan dan Teknik Pengendalian serta Prospek Pemanfaatannya. *Perspektif.* 10 (1), 44-50.
- Gang, G., Bizun, W., Weihong, M., Xiaofen, Xiaolin, Y. & Chaohua, Z. (2013) Biocontrol of Fusarium Wilt of Banana: Key Influencing Factors and Strategies. *African Journal of Microbiology Research.* 7 (41), 4835-4844. doi:10.5897/AJMR2012.2392.
- Garcia-gonzalez, T., Saenz-hidalgo, H.K., Silveira, H.V., Morales-nieto, C., Vancheva, T., Koebnik, R. & Avila-quezada, G.D. (2011) *Enterobacter cloacae*, an Emerging Plant Pathogenic Bacterium Affecting Chili Pepper Seedlings. *Plant Pathol. J.* 34 (1), 1-10.
- Ghorbanpour, M., Omidvari, M., Abbaszadehahaji, P. & Omidvar, R. (2018) Mechanisms Underlying the Protective Effects of Beneficial Fungi Against Plant Diseases: Mechanisms Underlying the Protective Effects of Beneficial Fungi Against Plant Diseases. *Biological Control.* 117, 147-155. doi:10.1016/j.biocontrol.2017.11.006.

- Wang, E.B. and R. (2016) NRSC Field Mission : Patchouli Supply Chain and Sustainability Overview . *Survey Report*. (September), 1-22.
- Wardner, Z., Santaella, C. & Heulin, T. (2014) Soil Biology & Biochemistry Root Exudates Mediated Interactions Belowground. *Soil Biology and Biochemistry*. 77, 69-80. doi:10.1016/j.soilbio.2014.06.017.
- Wentz, E., Trask, T., Mesanza, N., Raposo, R., Troncoso, M. & Patten, C.L. (2017) Biocontrol of *Fusarium circinatum* Infection of Young *Pinus radiata* Trees. *Forests*. 8 (32), 1-12. doi:10.3390/f8020032.
- Widada, H.P., Shaikh, S.S. & Sayyed, R.Z. (2017) Role Of Hydrolytic Enzymes Of Rhizoflora In Biocontrol Of Fungal Phytopathogens: An Overview. Springer Nature Singapore Pte. Ltd S. Mehnaz (ed.). In: *Rhizotrophs: Plant Growth Promoting to Bioremediation, Microorganisms for Sustainability 2*. 183-203.
- Widada, K. (2015) Multiple Mechanisms of *Enterobacter Asburiae* Strain RS83 for Plant Growth Enhancement. *Songklanakarin J. Sci. Technol*. 37 (1), 29-36.
- Wong, Datta, P.H. and D. (2015) Assessment of Culturable Tea Rhizobacteria Isolated from Tea Estates of Assam , India for Growth Promotion in Commercial Tea Cultivars. *Frontiers in Microbiology*. 6 (11), 1-13. doi:10.3389/fmicb.2015.01252.
- Yadav, M., Gopalakrishnan, C., Rajeswari, E. & Pandey, V.K. (2017) In Vitro Efficacy of *Bacillus* spp . Against *Fusarium oxysporum* F. *sp. lycopersi*, the Causal Agent of Fusarium wilt of Chickpea. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci*. 6(10), 2751-2756.
- Yilmaz, Z. & Harighi, B. (2015) Evaluation of Bacterial Antagonists of *Ralstonia solanacearum*, Causal Agent of Bacterial Wilt of Potato. *Biological Control*. 86, 14-19. doi: 10.1016/j.biocontrol.2015.03.007.
- Yong, P.S., Duraipandian, V. & Ignacimuthu, S. (2014) Science Direct Isolation, Screening and Partial Purification of Antimicrobial Antibiotics from Soil Streptomyces. *Bankang Journal of Medical Sciences*. 30, 435-446. doi: 10.1016/j.kjms.2014.05.006.
- Zhang, C., Hua, K., Zhang, T., Zhang, Y. & Zhao, L. (2014) Soil Sickness of Peanuts is Attributable to Modifications in Soil Microbes Induced by Peanut Root Exudates Rather than to Direct Allelopathy. *Soil Biology and Biochemistry*. 78, 149-159. doi:10.1016/j.soilbio.2014.07.019.
- Li, X., Zhang, Y., Wei, Z., Guan, Z. & Cai, Y. (2016) Antifungal Activity of Isolated *Bacillus amyloliquefaciens* SYBC H47 for the Biocontrol of Peach Gummosis. 1-22. doi:10.1371/journal.pone.0162125.
- Mihajlovic, M., Rekanovic, E., Hrustic, J. & Grahovac, M. (2017) Methods for Management of Soilborne Plant Pathogens. *Pestic. Phytomed. (Belgrade)*. 32 (1), 9-24.
- Mohapatra, B. R., Bapuji, M., Sree, A. (2003) Production of Industrial Enzymes (Amylase, Carboxymethylcellulase and Protease) by Bacteria Isolated from Marine Sedentary Organisms. 23, 75-84.
- Nishijima, K.A., Basin, P., Box, P.O., Alvarez, A.M., Hepperly, P.R., Shintaku, M.H., Agriculture, C., Management, N.R., Keith, L.M., Sato, D.M., Bushe, B.C., Service, C.E., Armstrong, J.W. & Zee, F.T. (2004) Association of *Enterobacter cloacae* with Rhizome Rot of Edible Ginger in Hawaii. *Plant Disease*. 88 (12), 1318-1327.
- Ogbo, F. & Okonkwo, J. (2012) Some Characteristics of a Plant Growth Promoting *Enterobacter* sp . Isolated from the Roots of Maize. *Advances in Microbiology*,. 2012 (September), 368-374.
- Packeiser, H., Lim, C., Balagurunathan, B., Wu, J. & Zhao, H. (2013) An Extremely Simple and Effective Colony PCR Procedure for Bacteria, Yeasts, and Microalgae. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 169 (2), 695-700. doi:10.1007/s12010-012-0043-8.
- Palaniappan, P., Chauhan, P.S., Saravanan, V.S., Anandham, R., Sa, T., Korea, C., Nadu, T., Universitymaduraiindia, A. & Paper, O. (2010) Keywords. *Biology and Fertility of Soils*. 46 (8).
- Paul, A., Thapa, G., Basu, A., Mazumdar, P., Chandra, M. & Sahoo, L. (2010) Rapid Plant Regeneration , Analysis of Genetic Fidelity and Essential Aromatic Oil Content of Micropropagated Plants of Patchouli , *Pogostemon cablin* (Blanco) Benth-An Industrially Important Aromatic Plant. *Industrial Crops & Products*. 32 (3), 366-374. doi:10.1016/j.indcrop.2010.05.020.
- Pinto, M.E.A., Araujo, S.G., Morais, M.I., Sa, N.P. & Caroline, M. (2017) Antifungal and Antioxidant Activity of Fatty Acid Methyl Esters from Vegetable Oils. *Annals of the Brazilian Academy of Sciences*. 89, 1671-

1681.

- Przetakiewicz, J. (2015) The Viability of Winter Sporangia of *Synchytrium endobioticum* (Schilb) Perc. from Poland. 704-708. doi:10.1007/s12230-015-9480-6.
- Pushpavathi, Y. & Dash, S.N. (2017) Use of Biocontrol Agents : A Potential Alternative to Fungicides for Fusarium Wilt Management of Banana. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci.* 6 (7), 651-655.
- Rakh, R.R., Raut, L.S., Dalvi, S.M. & Manwar, A. V (2017) Use of Biocontrol Agents: A Potential Alternative to Fungicides for Fusarium Wilt Management of Banana. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci.* 6 (7), 651-655.
- Ramesh, R. & Savita, G. (2012) Rhizosphere and Endophytic Bacteria for the Suppression of Eggplant Wilt Caused by *Ralstonia solanacearum*. *Crop Protection.* 37, 35-41. doi:10.1016/j.cropro.2012.02.008.
- Ramya, H.G., Palanimuthu, V. & Rachna, S. (2013) An Introduction to Patchouli (*Pogostemon cablin* Benth.) – A Medicinal and Aromatic Plant: It's Importance to Mankind. *Agric Eng Int: CIGR Journal.* 15 (2), 243-250.
- Raza, W., Yousaf, S. & Rajers, F. (2016) Plant Growth Promoting Activity of Volatile Organic Compounds Produced by Biocontrol Strains. *Science Letters.* 4 (1), 40-43.
- Shi, J. & Sun, C. (2017) Isolation, Identification, and Biocontrol of Antagonistic Bacterium Against Botrytis Cinerea After. *Brazilian Journal of Mikrobiologi.* 48, 706-714.
- Sukanto, D.W. (2013) Identifikasi dan Karakterisasi *Sclerotium rolfsii* Sacc. Penyebab Penyakit Busuk Batang Nilam (*Pogostemon cablin* Benth). *Bul. Littro.* 22 (1), 35-41.
- Swamy, M.K. & Sinniah, U.R. (2015) A Comprehensive Review on the Phytochemical Constituents and Pharmacological Activities of *Pogostemon cablin* Benth.: an Aromatic Medicinal Plant of Industrial Importance. *Molecules.* 20 (5), 8521-8547.
- Swamy, M.K. & Sinniah, U.R. (2016) Patchouli (*Pogostemon cablin* Benth.): Botany, Agrotechnology and Biotechnology Aspects. *Industrial Crops and Products.* 161-176.
- Thampi, A. & Bhai, R.S. (2017) Rhizosphere Actinobacteria for Combating *Phytophthora capsici* and *Sclerotium rolfsii*, The Major Borne Pathogens of Black Pepper (*Piper nigrum* L.). *Biological Control.* 109, 1-10. doi:10.1016/j.biocontrol.2017.03.006.
- Vijeta SINGH, R.M. and S.L. (2012) Combined Effects of Biocontrol Agents and Soil Amendments on Soil Microbial Population, Plant Growth and Incidence of Charcoal Rot of Cowpea and Wilt of Cumin. *Phytopathologia Mediterranea.* 51 (2), 316-316.
- Wahyuno, D. (2010) Pengelolaan Perbenihan Nilam untuk Mencegah Penyebaran Penyakit Busuk (*Synchytrium pogostemonis*). 9 (1), 11-11.
- Wang Gang-sheng, Deng Jie-hua, Ma Yao-hui, Min, L.B. (2012) Mechanisms, Clinical Curative Effects, and Antifungal Activities of Cinnamon Oil and Pogostemon Oil Compounds Against Three Species of Candida. *Traditional Chinese Medicine.* 32 (1), 1-1. doi:10.1016/S0254-6272(12)60026-0.
- Wu, K., Su, L., Fang, Z., Yuan, S., Wang, Shen, B. & Shen, Q. (2017) Scientific Horticulture Competitive use of Rhizosphere Exudates by *Bacillus amyloliquefaciens* to Reduce *Ralstonia solanacearum* Decreases Pathogenic Population Density and Effectively Controls Tomato Bacterial Wilt. *Scientia Horticulturae.* 218, 132-138.
- Xu, Y., Wu, Y., Chen, Y., Zhang, J., Song, Zhu, G. & Hu, X. (2015) Autotoxicity of *Pogostemon cablin* and Its Volatile Allelochemicals. *Revista Brasileira Farmacognosia.* 25 (2), 117-117. doi:10.1016/j.bjp.2015.02.003.
- Youcai Qin, Yuming Fu, Wenli Kang, Hongyi Li, H.L. (2017) Isolation and Identification of a Cold-adapted Bacterium and Its Characterization for Biocontrol and Plant Growth-promoting Activity. *Ecological Engineering.* 105 (August), 2017.

DIVERSITY OF ENDOPHYTIC FUNGI IN THE ROOT, LEAF, STOLON AND PETIOLE OF ASIATIC PENNYWORT (*Centella asiatica*)

Keragaman Cendawan Endofit pada Akar, Daun, Stolon dan Tangkai Daun Pegagan (*Centella asiatica*)

Dwi Ningsih Susilowati¹⁾, Amelia Rakhmaniar²⁾, Nani Radiastuti²⁾ dan Ika Roostika¹⁾

¹⁾ Indonesian Center for Agricultural Biotechnology and Genetic Resources Research and Development
Jalan Tentara Pelajar 3A, Bogor 16111, West Java

²⁾ Syarif Hidayatullah Islamic University Jakarta, Ciputat 15412, Banten

ABSTRAK

ABSTRAK/ABSTRACT

History:

Received: 11 April 2019

Accepted: 12 September 2019

Published: 28 Oktober 2019

Keywords:

Centella asiatica; community structure; microorganism; endophyte

Subject:

Centella asiatica; community structure; microorganism; endophyte

Endophytic fungi live in healthy tissues of many plants, including in medicinal plant such as Asiatic pennywort (*Centella asiatica*). These fungi exist in different parts of the plant as symbionts. The study aimed to isolate endophytic fungi from various parts of Asiatic pennywort of Malaysia accession and characterize their nature. Three individual plants of Asiatic pennywort (3 months-old) were obtained from the Sringanis Medicinal Garden in Bogor. The endophytes were isolated on Malt Extract Agar. The community structures of the endophytes were analyzed based on their diversity, colonization, dominance index, and relative frequency of occurrence of the isolated endophytic fungi. A total of 78 isolates have been obtained from three individual plants and clustered into 22 morphotypes consisted of 18 morphotypes of Ascomycota and 4 morphotypes of Basidiomycota divisions. The stolons harbored more endophytes (22.9 %) followed by leaf (16.7 %), root (11.8 %), and petiole (7.6 %). The diversity index was classified as medium category with the highest result (1.91) was found in the root, followed by leaf (1.79), stolon (1.75), and petiole (1.29). The most dominant endophytes were identified as *Ceratobasidium* sp., *Colletotrichum* sp., and *Fusarium* sp. *Ceratobasidium* sp. has the highest dominance index (0.02). UPGMA cluster analysis grouped the endophytic fungi into distinct clusters based on the plant parts origin. This study implied that stolon was the the most suitable part of Asiatic pennywort for isolating endophytic fungi. Further study is required to examine the role of the endophytic fungi to produce secondary metabolites in Asiatic pennywort.

Cendawan endofit hidup di dalam jaringan tanaman yang sehat, termasuk tanaman obat seperti pegagan (*Centella asiatica*). Cendawan ini hidup di berbagai bagian tanaman sebagai simbiosis. Penelitian bertujuan untuk mengisolasi cendawan endofit dari berbagai organ (akar, daun, stolon dan tangkai daun) pegagan aksesori Malaysia dan mengkarakterisasi tingkat kolonisasi, indeks keanekaragaman, dominansi, dan frekuensi kehadiran relatif. Tiga individu tanaman pegagan berumur 3 bulan diperoleh dari Kebun Obat Sringanis Bogor. Cendawan endofit diisolasi pada media Malt Ekstrak Agar. Struktur komunitas endofit dianalisis melalui indeks keanekaragaman, kolonisasi, dominansi, dan frekuensi kehadiran cendawan endofit terisolasi. Sebanyak 78 isolat cendawan endofit telah diisolasi dari tiga individu tanaman dan dikelompokkan dalam 22 morfotipe, terdiri atas 18 morfotipe divisi Ascomycota dan 4 morfotipe divisi Basidiomycota. Bagian stolon diinfeksi lebih banyak oleh cendawan endofit (22,9 %) diikuti daun (16,7 %), akar (11,8 %), dan tangkai daun (7,6 %). Indeks keanekaragaman menunjukkan kategori sedang dengan nilai tertinggi (1,91) ditemukan pada akar, diikuti daun (1,79), stolon (1,75) dan tangkai daun (1,29). Cendawan endofit yang mendominasi diidentifikasi sebagai *Ceratobasidium* sp., *Colletotrichum* sp., dan *Fusarium* sp. Indeks dominansi

Korespondensi : d_ningsusi@yahoo.com

<https://doi.org/10.21082/bullitro.v30n1.2019.47-58>

© 2019 Buletin Penelitian Tanaman Rempah dan Obat

Open access article under the CC BY-NC-SA license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/3.0/>)

ISSN Number : 778/Akred/P2MI-LIPI/08/2017

memunjukkan *Ceratobasidium* sp. memiliki nilai tertinggi (0,02). Analisis kluster dengan metode UPGMA mengelompokkan endofit ke dalam grup yang berbeda berdasarkan asal organ tanaman. Penelitian ini memberikan implikasi bahwa bagian stolon merupakan organ yang paling baik untuk isolasi cendawan endofit pada pegagan. Studi lebih lanjut diperlukan untuk mengetahui peran cendawan endofit dalam menghasilkan metabolit sekunder pada pegagan.

INTRODUCTION

The endophytic fungi are microorganisms that live in plant tissues without causing negative effects and even have symbiotic mutualism (Jia *et al.* 2016). The endophytic fungi play various roles in the host plants, such as enhancing plant growth as well as improving host plant resistance to biotic and abiotic stresses (Jia *et al.* 2016). In medicinal plants, several types of endophytic fungi are associated with bioactive compounds produced by the host plants (Devi *et al.* 2012; Jia *et al.* 2016).

Asiatic pennywort (*Centella asiatica*) is extensively used in traditional medicines. Many studies have been performed on the phytochemicals and the clinical properties of the plant (Devi *et al.* 2012; Joshi dan Chaturvedi 2013; Devi dan Prabakaran 2014). It contains bioactive compounds with therapeutic effects, such as wound healing activities, memory enhancement, neuroprotective, immune system regulator, anti-depressant, autoimmune prevention, anti-cancer, anti-diabetic, working enhancement of heart, blood vessels, and liver (Joshi dan Chaturvedi 2013).

As a medicinal plant, Asiatic pennywort is also known to be associated with various endophytic fungi. However, the studies on the endophytic fungi associated with Asiatic pennywort are still limited. For example, Malaysian accession has a high asiaticoside content (0.80 %) (Clay dan Holah 1999), however it differs from local accessions based on their morphological characters (Dahono 2014). These differences may accommodate different microbial diversity, including endophytic fungi. Nalini *et al.* (2014) stated several isolated endophytic fungi were associated with the roots, flower stalks, and stolon of the Indian Asiatic pennywort. Rakotoniriana (2012) have also isolated several endophytic fungi from the leaf of Madagascar Asiatic pennywort and *Colletotrichum* sp. was identified as the most dominant species.

Current studies revealed that microorganisms, including endophytic fungi, may contribute to the production of secondary metabolites in medicinal plants (Stierle *et al.* 1993; Venugopalan dan Srivastava 2015). Taxol and taxane were the first metabolites produced by *Taxomyces andreanae*, an endophytic fungus of Pacific yew (*Taxus brevifolia*) (Stierle *et al.* 1993). Since then, studies on the potential roles of endophytic fungi in *in vitro* production of plant secondary metabolites have become more feasible (Venugopalan dan Srivastava 2015).

The study on the fungal diversity and distribution associated with Asiatic pennywort of Malaysian accession is limited. Therefore, the present study aimed to isolate endophytic fungi from various parts (root, leaf, stolon, and petiole) of Asiatic pennywort of Malaysian accession and characterize their nature. The study was expected to support the development of effective methods to produce asiaticoside from the non-host plant.

MATERIALS AND METHODS

Plant materials

The 3 months old of three individual healthy plants of Asiatic pennywort of Malaysian accession were obtained from the Sringani Medicinal Garden in Bogor, West Java (6°38'13.7"S 106°48'57.2"E). The experiments were conducted at the Indonesian Center for Agricultural Biotechnology and Genetic Resources Research and Development (ICABIOGRAD) and the Center for Integrated Laboratory of Syarif Hidayatullah Islamic University Jakarta.

Isolation and identification of endophytic fungi

All plants were uprooted and cleaned from debris. A total of 36 samples of plant parts (3 replications from each organ) were taken from the three individual plants. Each plant part was then

into 4 segments with 1 cm x 0.5 cm in size, hence there were 144 segments.

The samples were then immediately processed for endophytic fungi isolation. The endophytic fungi were isolated following (Hidayat *et al.* 2016) method. The leaves, petioles, stolons, and roots were washed in the running tap water for 10 minutes, surface-sterilized using 70 % ethanol for 1 minute. The samples were then soaked in 3 % sodium hypochlorite for 2 minutes and in 70 % ethanol for 20 seconds, rinsed three times in sterile distilled water and dried on the sterile paper for at least 4 hours. The final rinse of the samples (100 µl) was poured onto the agar medium as a quality control of sterilization process, if there were no fungi grown on the medium, meant the surface-sterilization process was successful.

Each sterile plant sample was cut approximately into 1 cm x 0.5 cm in size and cultured in Malt Extract Agar (MEA) (Difco, USA). The cultures were incubated at a room temperature for 30 days. The endophytic fungi grown on the MEA medium were observed every day until 30 days after the incubation. The endophytic fungi grew on the 1st day until the 14th day were classified into the fast-growing fungi, whereas the ones that grew after 14 days were classified into the slow-growing fungi (Bosshard 2011). The fungal cultures were kept in the Biogen Culture Collection, ICABIOGRAD.

The morphological characters of the endophytic fungi isolates were classified based on color, shape, and diameter of growth. The isolates with similar characteristics were grouped into the same morphotype (Putra *et al.* 2015; Radiastuti 2015).

Following the initial morphological characterization, the endophytic fungal isolates were examined macroscopically and microscopically. The macroscopic observations were the morphological shape, color of the top and bottom side of the colonies, colony diameter, colony elevation, colony surface texture, mycelium type, colony edge, colony density, colony zoning, the presence of exudates, and the presence of concentric radial lines on the surface of the colony. The microscopic observations, using a light microscope at 400x and 1000x magnification, were

the hyphae (septation), shape and size of spores/conidia, conidiophore, conidio cells, and the presence of rhizoid. The morphotypes of endophytic fungi were identified following the standard identification books (Barnett dan Hunter 1998; Crous *et al.* 2009; Radiastuti 2015).

Data analysis

The community structures of the endophytic fungi were analyzed based on diversity, colonization, dominance index, and frequency of occurrence of endophytic fungi isolated from each plant parts. One colony represented an individual endophytic cell.

Colonization

The colonization was calculated based on (Petrini dan Fisher 1988) formula as follows :

$$\text{Colonization (\%)} = \frac{\text{Total number of segments colonized by endophytic fungi}}{\text{Total number of segments observed}} \times 100\%$$

Frequency Relative of Occurrence

The frequency relative of occurrence of endophytic fungi species was calculated to obtain the distribution value of endophytic fungi species from various organs, using the formula as follows (Radiastuti 2015):

$$\text{Frequency relative of occurrence } f(\text{FR}) = \frac{\text{Numbers of strain in species-i}}{\text{Total number of strain found}} \times 100\%$$

Diversity Index

The Shannon-Wiener diversity index (H') presents the levels of diversity (high, medium, and low) and compares the diversity of endophytic fungi amongst various organ of Asiatic pennywort. The H index is calculated based on the formula as follows (Tao *et al.* 2012):

$$H' = - \sum_{i=1}^k p_i \times \ln p_i$$

H'	=	Shannon-Wiener diversity index/ Indeks keanekaragaman Shannon-Wiener.
$P_i = \frac{n_i}{N}$	=	Proportion of total number of individual for each species/Proporsi jumlah total individu untuk setiap spesies.
$\sum n_i$	=	Number of total individuals for each species/Jumlah total individu untuk setiap spesies.
N	=	Number of all individuals/Jumlah semua individu.

The Criteria of Shannon-Wiener diversity index/ *Kriteria indeks keanekaragaman Shannon-Wiener*:

- $H' < 1$: low level of diversity/tingkat keanekaragaman yang rendah,
 $1 < H' < 3$: medium level of diversity/tingkat keanekaragaman sedang.
 $H' > 3$: high level of diversity/tingkat keanekaragaman yang tinggi.

Dominance index

The Simpson Dominance Index was used to analyze the presence of endophytic fungi species that dominate the community of Asiatic pennywort of Malaysian accession. The formula used to assess the Dominance Index was as follows (Odum 1996):

$$C = \sum (P_i)^2$$

- C = Shannon-Wiener Diversity Index/*Indeks Keragaman Shannon-Wiener*.
 $P_i = \frac{n_i}{N}$ = Proportion of total number of individual for each species/*Proporsi jumlah total individu untuk setiap spesies*.
 n_i = Number of total individual for each species/*Jumlah total individu untuk setiap spesies*.
 N = Number of all individuals/*Jumlah semua individu*.

The Criteria of Dominance Index/*Kriteria Indeks Dominasi* :

- $0,01 < C < 0,30$: low level of dominance/*dominasi tingkat rendah*.
 $0,31 < C < 0,60$: medium level of dominance/*dominasi tingkat menengah*.
 $0,61 < C < 1,00$: high level of dominance/*dominasi tingkat tinggi*.

UPGMA Analysis

The cluster analysis and the relative frequency of the endophytic fungi presence was performed using the UPGMA method (Unweighted Pair Group Method Using Arithmetic Mean). The similarity index was determined using Jaccard's Coefficient on MVSP computer program version 3.22 (Hilarino *et al.* 2011). Index values ranged between 0-1, if the value close to 1 indicated the higher level of species similarity (Ludwig dan Reynold 1988). The dendrogram represented the relationship between the endophytic fungi community structure and the plant organs, determined by the similarity index in the distance matrix.

RESULTS AND DISCUSSION

Endophytic fungi distribution

Eighty five fungal endophytes were isolated from the samples of Asiatic pennywort of Malaysian accession. The fungi consisted of 17 isolates from the leaves, 17 isolates from the roots, 11 isolates from the petioles, and 33 isolates from the stolons (Table 1). The endophytic fungi were further grouped into 23 morphotypes (Table 2). The distribution of endophytic fungi from different parts of the plant was varied. The number of endophytic fungi colonized the stolon were higher than the roots, leaves, and petioles.

The distribution of endophytic fungi in the host plants can be associated with several factors such as the origin of the colonized endophytes and the presence of particular substances in the plant organ tissues. It might be related to the ability of each endophytic fungal species to utilize particular substrates or plant tissues. Jia *et al.* (2016) stated that endophytic fungi colonization was significantly determined by plant tissues that produce a variety of substances. Furthermore, the different endophytic fungi composition in different host organs can occur due to its histological differences and nutrients availability in the plant organ in which endophytic fungi colonized (Arnold dan Lutzoni 2007). Further, Arnold *et al.* (2001) suggested that different leaves in the same tree might have distinct endophytic colonies.

Colonization rate

Amongst 144 segments of Asiatic pennywort, the colonization rate of endophytic fungi in the stolons, leaves, petioles, and roots was 59 %. This implied that almost half of the plant segments (59 %) were colonized by endophytic fungi. The stolon segments harbored more fungal endophytes (22.9 %), followed by the leaves (16.7 %), roots (11.8 %), and petioles (7.6 %) (Table 1). The richness of the stolon segments colonized by the endophytic fungi might be associated with its higher biomass content that allowed more niches to be colonized than other organs. Most of the isolated endophytic fungi were categorized as fast- and slow-growing fungi.

Previously, Rakotoniriana *et al.* (2008) that 78 % of leaves of Asiatic pennywort of scar were colonized by endophytic fungi. Colonization percentage of endophytic fungi in pennywort was apparently associated with conditions as reported by (Gupta dan Reddy 2017). They revealed that in the rainy season more endophytic fungi was isolated (36.37 %) than in the summer (26.37 %) and

Colonization rate of endophytic fungi in various segments of Asiatic pennywort of Malaysian accession.

Segmen terkolonisasi dan tingkat kolonisasi cendawan endofit pada berbagai organ pegagan aksesi Malaysia.

Number of samples	Number of colonized samples	Colonization rate (%)
36	24	16.7
36	17	11.8
36	11	7.6
36	33	22.9
144	85	59.0

winter (15.40 %). However, Gong dan Guo (2009) showed that a higher colonization rate of fungi was found in the stems than in the leaves of *Dracaena cambodiana* and *Aquilaria sinensis*. The distribution of endophytic fungi in various plant organs can be influenced by several factors such as by the plant environment. Wu *et al.* (2013) mentioned that environmental conditions was an important factor in determining the type and number of secondary metabolites of the host plants and also affected the structure of endophytic fungal population of the host plant. The ability of endophytic fungi to colonize plant parts of Asiatic pennywort indicated that plant was suitable to support endophytic fungi infestation. Some endophytic fungi also promoted secondary metabolites of the host plants (Shwab dan Keller 2008).

Diversity index

The results showed that the H' index amongst the organs was not different. The H' value of root was 1.91, leaf (H'=1.79), stolon (H'=1.75) and petiole (H'=1.29) and were classified as medium diversity (Figure 1). The diversity index

Morphotypes of endophytic fungi isolated from different parts of Asiatic pennywort of Malaysian accession. *Jumlah dan jenis isolat cendawan endofit yang ditemukan pada berbagai organ pegagan aksesi Malaysia.*

Morphotype -	Species	Class	Segment of Asiatic pennywort				Plant - (1/2/3)*
			Leaf (L)	Root (R)	Petiole (P)	Stolon (S)	
M 8	<i>Phialemoniopsis</i> sp.	Sordariomycetes	-	4	-	-	R(3)
M 13	<i>Aspergillus</i> sp.	Eurotiomycetes	-	2	-	-	R(3)
M 1	<i>Ceratobasidium</i> sp.	Agaricomycetes	-	3	-	9	R (3), S (1,2)
M 19	<i>Chaetomium globosum</i>	Sordariomycetes	-	1	-	-	R (2)
M 18	<i>Colletotrichum tabaci</i> 1	Sordariomycetes	1	-	-	-	L (2)
M 23	<i>Colletotrichum tabaci</i> 2	Sordariomycetes	-	4	3	-	R (3), P (1)
M 14	<i>Colletotrichum gigasporium</i>	Sordariomycetes	1	-	-	-	L (2)
M 9	<i>Colletotrichum siamense</i>	Sordariomycetes	3	-	-	-	L (2)
M 2	<i>Colletotrichum karstii</i>	Sordariomycetes	10	-	-	-	L (1)
M 3	<i>Fusarium solani</i> 1	Sordariomycetes	1	-	-	6	L (2), S (1)
M 4	<i>Fusarium</i> sp.1	Sordariomycetes	-	-	-	6	S (1,2)
M 17	<i>Fusarium solani</i> 2	Sordariomycetes	-	-	-	7	S (1)
M 22	<i>Fusarium</i> sp.2	Sordariomycetes	-	-	-	2	S (1,3)
M 20	<i>Fusarium striatum</i>	Sordariomycetes	-	-	-	1	S (3)
M 5	<i>Eutypella</i> sp.	Sordariomycetes	-	1	-	-	R (3)
M 6	<i>Trametes</i> sp.	Agaricomycetes	-	-	3	-	P (2)
M 10	<i>Peroneutypa scoparia</i>	Sordariomycetes	-	1	-	-	R (3)
M 15	<i>Penicillium capsulatum</i>	Eurotiomycetes	2	-	-	-	L (2,3)
M 21	<i>Perenniporia corticola</i>	Agaricomycetes	4	-	-	-	L (2)
M 12	<i>Phanerochaete</i> sp.	Agaricomycetes	1	1	-	-	L (1), R (3)
M 11	<i>Phomopsis asparagi</i>	Sordariomycetes	1	-	1	-	L(2), P(2)
M 7	<i>Phyllosticta</i> sp.	Dothideomycetes	-	-	4	-	P(2)
M 16	<i>Talaromyces</i> sp.	Eurotiomycetes	-	-	-	2	S(2)
			24	17	11	33	

eterangan : *) 1,2,3 = 1st, 2nd, and 3rd individual plants/individu tanaman.

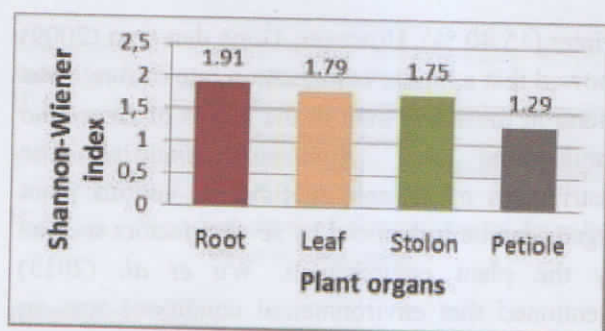


Figure 1. The Shannon-Wiener Diversity Index (H') of endophytic fungi in the various organs of Asiatic pennywort of Malaysian accession.

Gambar 1. Indeks keanekaragaman Shannon-Wiener (H') cendawan endofit pada berbagai organ pegangan aksesi Malaysia.

of root and leaf were higher than the stolon and petiole. This indicated that the number of endophytic fungi species obtained from the root (8 species) and the leaf (9 species) was higher than from the stolon (7 species) and petiole (4 species).

The root has the highest index diversity compared to the other parts of Asiatic pennywort of Malaysian accession which lead to a high diversity of endophytic fungi. Root has the most widespread surface, hence its possesses more possibility to be in contact with the environment. The plant could produce root exudates, which play an important role in modifying the complexity and dynamic of the environment (Xiao *et al.* 2014). The roots were also inhabited by various microorganisms and became a medium for spores and microorganisms to spread across the plant organs (Arnold 2007). The fungal endophytes obtained from the root were more diverse than leaves with H' value at 1.71 (Haddadshahi 2015).

The leaves showed the second highest H' index value (1.79), and have the same level of diversity index (medium level) as reported in other study ($H'=1.97$) (Gupta dan Chaturvedi 2017). Similar results were also reported on the endophytic fungi isolated from *Piper nigrum* in which the root had higher H' value ($H'=1.33$) than leaf ($H'=0.69$) and petiole ($H'=0.69$) (Uzma *et al.* 2016).

Dominance index

The dominance index (D) of *Ceratobasidium* sp. endophyte was the highest ($D = 0.020$) (Table 3). A total 12 out of 78 fungal endophytes was identified as *Ceratobasidium* sp. isolated from stolon and root, followed by *Colletotrichum karstii* ($D = 0.014$), *C. tabaci* ($D = 0.007$), and *F. solani* 1 ($D = 0.007$) (Table 3). *Ceratobasidium* sp. was a common endophytic fungi and known to be associated with roots of various plants (Matsumoto 2005; Irwin *et al.* 2007). However, *Colletotrichum* and *Fusarium* have a better adaptation to the environmental conditions. Therefore, it is easy to find these fungi in various host plants. Other studies reported that *Colletotrichum* and *Fusarium* were the most common endophyte found in various medicinal plants, such as *Polygonum acuminatum* and *Aeschynomene fluminensis* (Souza *et al.* 2017).

Table 3. Dominance index (D) of endophytic fungi in the various organs of Asiatic pennywort of Malaysian accession.

Tabel 3. Indeks Dominansi (D) cendawan endofit pada berbagai organ pegangan aksesi Malaysia.

Endophytic fungi	Dominance Index
<i>Ceratobasidium</i> sp.	0.020
<i>Colletotrichum karstii</i>	0.014
<i>Colletotrichum tabaci</i> 2	0.007
<i>Fusarium solani</i> 1	0.007
<i>Fusarium solani</i> 2	0.007
<i>Fusarium</i> sp. 1	0.005
<i>Phialemoniopsis</i> sp.	0.002
<i>Phyllosticta</i> sp.	0.002
<i>Perenniporia corticola</i>	0.002
<i>Colletotrichum siamense</i>	0.001
<i>Trametes</i> sp.	0.001
<i>Aspergillus</i> sp.	0.001
<i>Fusarium</i> sp. 2	0.001
<i>Penicillium capsulatum</i>	0.001
<i>Phanerochaete</i> sp.	0.001
<i>Phomopsis asparagi</i>	0.001
<i>Talaromyces</i> sp.	0.001
<i>Chaetomium globosum</i>	0.000
<i>Colletotrichum tabaci</i> 1	0.000
<i>Colletotrichum gigasporum</i>	0.000
<i>Eutypella</i> sp.	0.000
<i>Peroneutypa scoparia</i>	0.000
<i>Fusarium striatum</i>	0.000

Echinacea purpurea (Rosa *et al.* 2012). Species of endophytic fungi found in Asiatic pennywort of Malaysian accession were *Phialemoniopsis capitalensis*, *Acremonium* sp., *Phialemoniopsis asparagi*, *Aspergillus flavus*, *Fusarium capsulatum*, *Talaromyces* sp. and *Acremonium globosum* (Syed *et al.* 2009; Vinale *et al.* 2013; Wikee *et al.* 2013; Nair dan Padmavathy 2016; Russo *et al.* 2016; Supriya dan Audipudi 2016).

Relative frequency

The highest level of relative frequency of endophytic fungi was presence in the stolon (35.29 %), followed by leaf (28.25 %), root (12.77 %), and petiole (12.77 %) (Figure 2). The stolon was colonized by 33 isolates (consisted of 10 genera and 5 species); followed by the leaf with 28 isolates (6 genera and 9 species), root with 17 isolates (8 genera and 8 species), and the lowest was the petiole with 11 isolates (over 4 genera species).

The stolon organs were dominated by *Ceratobasidium* sp. (10.59 %) which was also found in the root (3.53 %) (Figure 2). Endophytic fungi obtained from the stolon, such as *Ceratobasidium* sp., *Fusarium solani*, *Talaromyces* sp., and *Fusarium* sp. have never been reported. *Ceratobasidium* sp. is a telomorphic form of *Rhizoctonia* sp., endophytic fungal known to be associated with the plant roots. Some of the *Ceratobasidium* species, such as *C. cornigeum*, *C. gramineum*, and *C. oryzae-sativa* are known to be associated with *Rhizoctonia* sp. in the plant roots (Matsumoto 2005). *Ceratobasidium* was also reported to be associated with the root of *Pterostylis nutans* (Irwin *et al.* 2014).

Colletotrichum kartsii in the leaf has the highest relative frequency (11.76 %), followed by *Phialemoniopsis corticola* (4.71 %), and *C. siamense* (4.71 %) (Figure 2). *Colletotrichum* sp., *C. kartsii*, *Fusarium solani*, *Penicillium capsulatum*, *Phialemoniopsis asparagi*, *Phaerochaete* sp. and *Phialemoniopsis* sp., retrieved from the leaves have never been reported to be existed in the leaf of Asiatic pennywort of Malaysian accession. A previous study revealed the dominance of

Colletotrichum in the stem and leaf of medicinal plants. However, the domination of *Xylariaceae* sp. and *Colletotrichum higginsianum* was found in the leaves of Asiatic pennywort from Madagascar (Rakotoniriana 2012). Similar study also revealed the highest level of relative frequency of occurrence from the leaves and the stems of the medicinal plants in China (31.3 %) and from the leaves of *Taxus x media* (58.6 %) (Huang *et al.* 2008; Xiong *et al.* 2013).

The *Colletotrichum* sp. are found in all plant organs, meaning that they were non organ-specific fungi. They commonly found as symbiont in host plants, *i.e.* mutualism, antagonists and pathogens. The *Colletotrichum* is recognized by its ability to alter their mechanisms of life style, not only as endophytes, but also possessed necrotrophic mechanisms (damaging host tissue), biotrophs (getting nutrients without damaging the host) or passively live in the host plants. These changes occur due to alteration of conditions in plant physiology, environment, and plants genotypes (Silvia *et al.* 2017).

The highest level of relative frequency of occurrence in the root was indicated by *Phialemoniopsis* sp. and *Colletotrichum tabaci* 2, at 4.71 %, followed by *Ceratobasidium* sp. (3.53 %) (Figure 2). In previous study, some unreported endophytic fungi such as *Colletotrichum* sp., *P. capsulatum*, *Eutypella* sp., and *Ceratobasidium* sp. were isolated from the roots of Asiatic pennywort of Malaysian accession. Nalini *et al.* (2014) isolated *Acremonium* sp. from the root and stolon of Asiatic pennywort from India. *Acremonium* and *Ceratobasidium* are known as root-endophyte (Matsumoto 2005; Irwin *et al.* 2007; Stocker dan Alten 2016). Specific endophytic fungi *A. oryzae* was also obtained from the root. In the previous study, *Aspergillus* was also found in the root of Asiatic pennywort (Nath *et al.* 2014) and maize (Russo *et al.* 2016).

Four species of endophytic fungi were obtained from the petiole in which *Phylosticta capitalensis* indicated as the highest percentage of relative frequency of occurrence (4.71 %) (Figure 2). *P. capitalensis* is a common endophyte which colonized a number of plants (Wikee *et al.* 2013). The other fungi species which colonized the

petiole were *Tremetes* sp. (3.53 %), *Colletotrichum tabaci* 2 (3.35 %) and *Phomopsis asparagi* (1.18 %). All the fungi species mentioned above have never been reported to be colonized in the petioles of Asiatic pennywort, especially of Malaysian accession.

Almost of the endophytic fungi were found as organ-specific, except *Ceratobasidium* sp. which was found in the stolon and root. The relative frequency of occurrence of *Ceratobasidium* sp was higher in stolon (10.59 %) than root (3.53 %) (Figure 2).

Cluster Analysis of endophytic fungi communities in Asiatic pennywort organs of Malaysian accession

The similarity index describes the level of similarity in the structure and species composition of endophytic fungi in various Asiatic pennywort plant organs of Malaysian accession. Based on the UPGMA analysis, the endophytic fungi of Asiatic pennywort of Malaysia accession was divided into three clusters with similarity index value <9.1 % (0.091) as a whole plant organs (Figure 3).

The similarity index value <10 % (0.100) indicated that the endophytic fungi community amongst various parts of Asiatic pennywort of Malaysian accession was different. For instance, *Colletotrichum gigasporum*, *C. karstii*, *C. siamense*, *C. tabaci*, *Penicillium capsulatum*, and *Perenniporia corticola* were only found in the leaf (Figure 2).

Each endophytic fungus species occupies a suitable habitation for its existence. The plant organs provide microhabitat suitable for the life of endophytic fungi. Microhabitat development was affected by chemical components (Xiao *et al.* 2014). The endophytic fungi community in the petiole was closer to the root than to other organs, and was grouped as the first cluster with similarity index (IS) 10% (0.100). The community found on the stolon has a level of similarity with the leaf (the second cluster), with IS at 6.7% (0.067). Based on the endophytic fungi community, petioles and root (node 1) and stolon and leaf (node 2) had IS of 3.3% (0.033) (Figure 3).

The present study suggested that Asiatic pennywort was rich in endophytic fungi and the

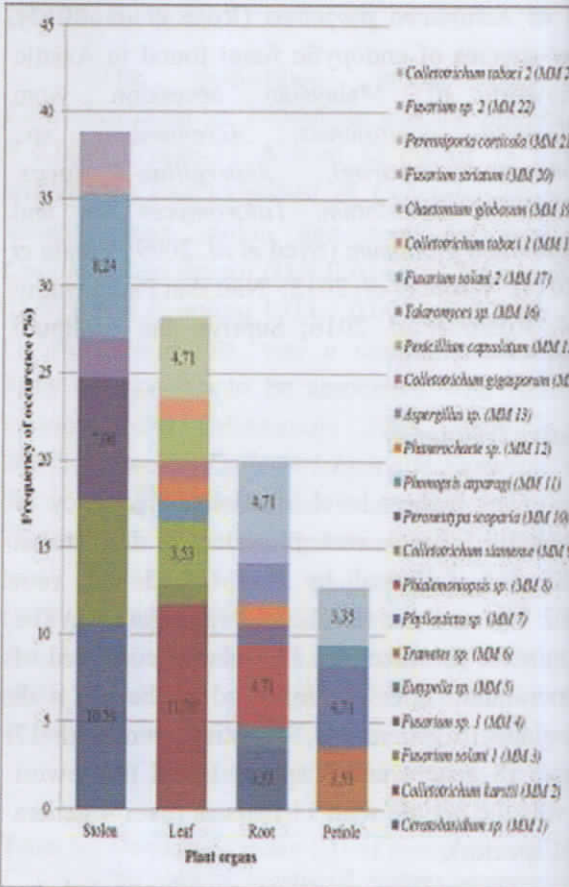


Figure 2. Relative frequency of occurrence endophytic fungi in various plant organ of Asiatic pennywort of Malaysia accession.

Gambar 2. Frekuensi kehadiran relatif cendawan endofit pada berbagai organ pegagan aksesori Malaysia

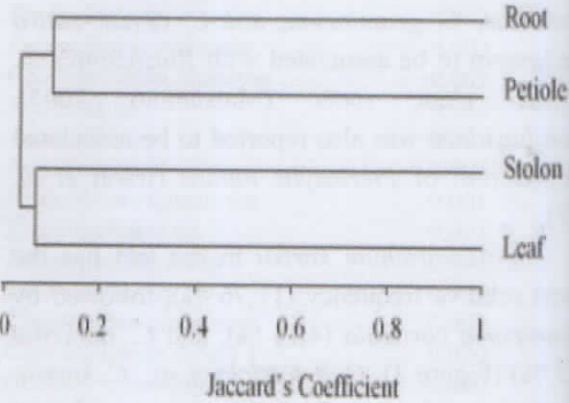


Figure 3. Dendrogram of endophytic fungi community in various organs of Asiatic pennywort of Malaysian accession

Gambar 3. Dendrogram komunitas cendawan endofit pada berbagai organ pegagan aksesori Malaysia

harbored the most richness endophytic fungi
nity. Four endophytic fungi identified from
on were *Fusarium solani* 2, *F. solani* 3, *F.*
and *Talaromyces* sp. Further study are
d to investigate the secondary metabolites
d by the fungi as well as the role of the
ytic fungi to improve secondary metabolites
ic pennywort.

CONCLUSION

Various endophytic fungi were colonized
ferent parts of Asiatic pennywort. The
y of the endophytic fungi was classified as
um diversity. The highest diversity of the
ytic fungi was obtained from the roots,
d by the leaf, stolon, and petiole.
Aspidium sp., *Colletotrichum* sp.,
Cructivum, and *Fusarium solani* were the
minant endophytic fungi in plant organs of
pennywort of Malaysian accession.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to acknowledge
Syarif Hidayatullah Islamic University
for the financial support, and Laboratory
of Syarif Hidayatullah Islamic University
and Indonesian Center for Agricultural
nology and Genetic Resources Research
velopment (ICABIOGRAD) for facilitating
arch.

REFERENCES

A.E. (2007) Understanding The Diversity
of Foliar Endophytic Fungi: Progress,
allenges and Frontiers. *Fungal Biology*
views. 21 (2-3), 51-66.
doi:10.1016/j.fbr.2007.05.003.

A.E. & Lutzoni, F. (2007) Diversity and
ost Range of Foliar Fungal Endophytes:
re Tropical Leaves Biodiversity Hotspots.
ecology. 88 (3), 541-549. doi:10.1890/05-
459.

Arnold, A.E., Maynard, Z. & Gilbert, G.S. (2001)
Fungal Endophytes in Dicotyledonous
Neotropical Tree: Patterns of Abundance
and Diversity. *The British Mycological*
Society. 105 (12), 1502-1507.
doi:10.1017/S0953756201004956.

Barnett, H.L. & Hunter, B.B. (1998) Illustrated
Genera of Imperfect Fungi. *APS Press. St.*
Paul, Minnesota: USA. Minneapolis,
Burgess Publishing Company.

Bosshard, P.P. (2011) Incubation of Fungal
Cultures: How Long is Long Enough?
Mycoses. 54 (5), 539-545.
doi:10.1111/j.1439-0507.2010.01977.x.

Clay, K. & Holah, J. (1999) Fungal Endophyte
Symbiosis and Plant Diversity in
Successional Fields. *Science*. 285 (5434),
1742-1744.
doi:10.1126/science.285.5434.1742.

Crous, P.W., Verkley, G.J.M., Groenewald, J.Z. &
Samson, R.A. (2009) Fungal Diversity.
CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre.
Netherlands.

Dahono, D. (2014) Benefits of Centella.
<http://kepri.litbang.pertanian.go.id/new/index.php/infotek/763-manfaat-pegagan>. 2014

Devi, N.N. & Prabakaran, J.J. (2014) Bioactive
Metabolites from an Endophytic Fungus
Penicillium sp. Isolated from *Centella*
asiatica. *Current Research in Environmental*
& Applied Mycology. 4 (1), 34-43.

Devi, N.N., Prabakaran, J.J. & Wahab, F. (2012)
Phytochemical Analysis dan Enzyme
Analysis of Endophytic Fungi from *Centella*
asiatica. *Asian Pacific Journal of Tropical*
Biomedicine. 2 (3), 1280-1284.
doi:10.1016/S2221-1691(12)60400-6.

Gong, L.J. & Guo, S.X. (2009) Endophytic Fungi
from *Dracaena cambodiana* and *Aquilaria*
sinensis and Their Antimicrobial Activity.
African Journal of Biotechnology. 8 (5),
731-736.

Gupta, S. & Chaturvedi, P. (2017) Foliar
Endophytic Diversity of *Centella asiatica*
(L.) Urban in Relation to Different Seasons
and Leaf Age. *International Journal of*
Current Microbiology and Applied Sciences.
6 (6), 468-477.

- Haddadadrafshi, N. (2015) Diversity and Antagonistic Activity of Endophytic Fungi from Sweet Cherry and Pepper. *Thesis of PhD Dissertation*. University of Budapest. Budapest.
- Hidayat, I., Radiastuti, N., Rahayu, G., Achmadi, S. & Okane, I. (2016) Three Quinine and Cinchonidine Producing *Fusarium* species from Indonesia. *Current Research in Environmental and Applied Mycology*. 6 (1), 20–34.
- Hilarino, M.P.A., Oki, Y., Rodrigues, L., Santos, J.C., Correa Junior, A., Fernandes, G.W. & Rosa, C.A. (2011) Distribution of the Endophytic Fungi Community in Leaves of *Bauhinia brevipes* (Fabaceae). *Acta Botanica Brasilica*. 25 (4), 815–821. doi:10.1590/S0102-33062011000400008.
- Huang, W.Y., Cai, Y.Z., Hyde, K.D., Corke, H. & Sun, M. (2008) Biodiversity of Endophytic Fungi Associated with 29 Traditional Chinese Medical Plants. *Fungal Biodiversity*. 33, 61–75.
- Irwin, M.J., Dearnaley, J.D.W. & Bougoure, J.J. (2007) *Pterostylis nutans* (Orchidaceae) has a Specific Association with two *Ceratobasidium* Root-Associated Fungi Across its Range in Eastern Australia. *Mycoscience*. 48 (4), 231–239. doi:10.1007/S10267-007-0360-X.
- Jia, M., Chen, L., Xin, H.L., Zheng, C.J., Rahman, K., Han, T. & Qin, L.P. (2016) A Friendly Relationship Between Endophytic Fungi and Medicinal Plants: a Systematic Review. *Frontiers in microbiology*. 7 (906), 1–14. doi:10.3389/fmicb.2016.00906.
- Joshi, K. & Chaturvedi, P. (2013) Therapeutic Efficiency of *Centella asiatica* (L.) Urb. an Underutilized Green Leafy Vegetable: an Overview. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*. 4 (1), 135–149.
- Ludwig, J.A. & Reynold, J.F. (1988) Statistical Ecology a Primer on Methods and Computing. In: *A Wiley-Interscience Publication*. Canada.
- Matsumoto, M. (2005) Analysis of Whole Cellular Fatty Acids and Anastomosis Relationships of *Binucleate rhizoctonia* spp. Associated with *Ceratobasidium cornigerum*. *Mycoscience*. 46 (5), 319–324. doi:10.1007/S10267-005-0253-9.
- Nair, D.N. & Padmavathy, S. (2014) Impact Endophytic Microorganisms on Plant Environment and Humans. *The Scientific World Journal*. 2014, 1–10. doi:10.1155/2014/250693.
- Nalini, M.S., Sunayana, N. & Prakash, H.S. (2014) Endophytic Fungal Diversity in Medicinal Plants of Western Ghats, India. *International Journal of Biodiversity*. 2014, 1–10. doi:10.1155/2014/494213.
- Nath, A., Pathak, J. & Joshi, S.R. (2014) Bioactivity Assessment of Endophytic Fungi Associated with *Centella asiatica* and *Murraya koengii*. *Journal of Applied Biology & Biotechnology*. 2 (5), 6–11.
- Odum, E.P. (1996) The link Between The Natural and The Social Sciences. In: *Library of Theoretical Biology Congress Cataloging in Publication Data*. New York.
- Petrini, O. & Fisher, P.J. (1988) A Comparative Study of Fungal Endophytes in Xylem and Whole Stem of *Pinus sylvestris* and *Fagus sylvatica*. *Transactions of the British Mycological Society*. 91 (2), 233–239. doi:10.1016/S0007-1536(88)80210-9.
- Putra, I.P., Rahayu, G. & Hidayat, I. (2015) Impact of Domestication on The Endophytic Fungal Diversity Associated with *Zingiberaceae* at Mount Halimun Salak National Park. *Hayati Journal of Biosciences*. 22 (4), 157–160. doi:10.1016/j.hjb.2015.10.005.
- Radiastuti, N. (2015) Diversity of Culturable Endophytic Fungi in *Cinchona calisaya* Wedd: Molecular Phylogeny and Alkaloid Profile. *Thesis*. IPB: Bogor.
- Rakotoniriana, E.F. (2012) Biodiversity and Antifungal Properties of Endophytes from The Madagascar Medicinal Plants *Centella asiatica* (L.) Urb. and *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. *Disertasi*. Universite Catholique de Louvain. Louvain.
- Rakotoniriana, E.F., Munaut, F., Decock, C., Randriamampionona, D., Andriambololoniaina, M., Rakotomalala, T., Rakotonirina, E.J., Rabemanantsoa, C., Cheuk, K. & Ratsimamanga, S.U. (2008) Endophytic Fungi from Leaves of *Centella asiatica*: Occurrence and Potential

Interactions Within Leaves. *Antonie van Leeuwenhoek*. 93 (1), 27–36. doi:10.1007/s10482-007-9176-0.

H., Tabanca, N., Tehen, N., Wedge, D.E., an, Z., Bernier, U.R., Becnel, J.J., gramonte, N.M., Walker, L.A. & Moraes, M. (2012) Diversity and Biological Activities of Endophytic Fungi Associated with Micropropagated Medicinal Plant *Pinellia chinensis* (L.) Moench. *American Journal of Plant Sciences*. 3 (8), 1105–1114. doi:10.4236/ajps.2012.38133.

M.L., Pelizza, S.A., Cabello, M.N., englein, S.A., Vianna, M.F. & Scorsetti, C. (2016) Endophytic Fungi from Selected Varieties of Soybean (*Glycine max* Merr.) and Corn (*Zea mays* L.) Grown in a Agricultural Area of Argentina. *Revista Argentina de Microbiologia*. 48 (2), 154–160. doi:10.1016/j.ram.2015.11.006.

E.K. & Keller, N.P. (2008) Regulation of Secondary Metabolite Production in Filamentous Ascomycetes. *Mycological Research*. 112 (2), 225–230. doi:10.1016/j.mycres.2007.08.021.

D., Crous, P.W., Ades, P.K., Hyde, K.D., Taylor, P.W.J. (2017) Life Styles of Colletotrichum Species and Implications for Plant Biosecurity. *Fungal Biology Reviews*. 1 (3), 155–168. doi:10.1016/j.fbr.2017.05.001.

W.P., Mello, I.S., Vendrusculo, S.J., Da Silva, G.F., Da Cunha, C.N., White, J.F. & Soares, M.A. (2017) Endophytic Fungal Communities of *Polygonum acuminatum* and *Aeschynomene fluminensis* are Influenced by Soil Mercury Contamination. *Public Library of Science one*. 12 (7), 1–24. doi:10.1371/journal.pone.0182017.

A., Strobel, G. & Stierle, D. (1993) Taxol and Taxane Production by *Taxomyces andreanae*, an Endophytic Fungus of Pacific Yew. *Science*. 260 (5105), 214–216. doi:10.1126/science.8097061.

G.G. & Alten, H. (2016) Is the Root-colonizing Endophyte Acremonium strictum an Ericoid Mycorrhizal Fungus? *Mycorrhiza*. 26 (5), 429–440. doi:10.1007/s00572-016-0682-7.

Supriya, G.N.R. & Audipudi, A.V. (2015) Screening for Antimicrobial Activities of Endophytic Fungi Isolated from Ripened Fruit of *Capsicum frutescens* L. *World Journal of Pharmaceutical Sciences*. 3 (2), 258–262.

Syed, N.A., Midgley, D.J., Pearl, K.C., Saleeba, J.A. & McGee, P.A. (2009) Do Plant Endophytic and Free-Living Chaetomium species Differ? *Australasian Mycologist*. 28, 51–55.

Tao, G., Liu, Z., Sun, B., Zhu, Y., Cai, L. & Liu, X. (2012) Occurance and Diversity of Endophytic Fungi in *Betula ochracea* (Orchidaceae). *African Journal of Microbiology Research*. 6 (12), 2859–2868.

Uzma, F., Konappa, N.M. & Chowdappa, S. (2016) Diversity and Extracellular Enzyme Activities of Fungal Endophytes Isolated from Medicinal Plants of Western Ghats, Karnataka. *Egyptian Journal of Basic and Applied Sciences*. 3 (4), 335–342. doi:10.1016/j.ejbas.2016.08.007.

Venugopalan, A. & Srivastava, S. (2015) Endophytes as in Vitro Production Platforms of High Value Plant Secondary Metabolites. *Biotechnology Advances*. 33 (6), 873–887. doi:10.1016/j.biotechadv.2015.07.004.

Vinale, F., Nicoletti, R., Lacatena, F., Marra, R., Sacco, A., Lombardi, N., D'Errico, G., Digilio, M.C., Lorito, M. & Woo, S.L. (2017) Secondary Metabolites from the Endophytic Fungus *Talaromyces pinophilus*. *Natural Product Research*. 31 (15), 1778–1785. doi:10.1080/14786419.2017.1290624.

Wikee, S., Lombard, L., Crous, P.W., Nakashima, C., Motohashi, K., Chukeatirote, E., Alias, S.A., McKenzie, E.H.C. & Hyde, K.D. (2013) *Phyllosticta capitalensis*, a Widespread Endophyte of Plants. *Fungal Diversity*. 60 (1), 91–105.

Wu, L., Han, T., Li, W., Jia, M., Xue, L., Rahman, K. & Qin, L. (2013) Geographic and Tissue Influences on Endophytic Fungal Communities of *Taxus chinensis* var. *mairei* in China. *Current Microbiology*. 66 (1), 40–48. doi:10.1007/s00284-012-0235-z.

- Xiao, Y., Dai, C.C., Wang, X., Liu, F.Y., Wang, H.W. & Li, X.G. (2014) Effect of The Endophyte *Ceratobasidium stevensii* on 4-HBA Degradation and Watermelon Seed Germination. *African Journal of Microbiology Research*. 8 (14), 1535–1543.
- Xiong, Z.Q., Yang, Y.Y., Zhao, N. & Wang (2013) Diversity of Endophytic Fungi Screening of Fungal Paclitaxel Prod from Anglojap Yew, *Taxus x m*. *BioMed Central Microbiology*. 13 (1), 80. doi:10.1186/1471-2180-13-71.

PEDOMAN PENULISAN NASKAH BULETIN PENELITIAN TANAMAN REMPAH DAN OBAT

BULETIN PENELITIAN TANAMAN REMPAH DAN OBAT adalah publikasi ilmiah primer yang diterbitkan oleh Pusat Penelitian dan Pengembangan Perkebunan. Jurnal ini memuat hasil penelitian primer terkait komoditas rempah, obat dan aromatik yang belum pernah diterbitkan pada media apapun.

Pengajuan Naskah

Naskah yang diajukan belum pernah diterbitkan atau **tidak sedang dalam proses evaluasi** pada media lain; telah mendapat persetujuan tim penulis (dilampirkan *ethical statement*), sebagai pihak yang bertanggung jawab terhadap naskah. Penerbit tidak bertanggung jawab terhadap klaim atau permintaan kompensasi terhadap hal-hal yang berkaitan dengan isi naskah.

Naskah dikirim berupa *softcopy* atau file elektronik melalui aplikasi e-jurnal dengan terlebih dahulu Registrasi pada URL <http://ejurnal.litbang.pertanian.go.id/index.php/bultro> dan melampirkan surat pengantar dari kepala unit kerja penulis kepada Kepala Balai Penelitian Tanaman Rempah dan Obat sebagai *Supplementary File*. Tembusan surat dialamatkan kepada Redaksi Pelaksana Buletin LITTRO, Balai Penelitian Tanaman Rempah dan Obat, Jalan Tentara Pelajar No. 3, Bogor 16111, Telp. (0251) 8321879, Fax. (0251) 8327010, E-mail: buletintro@gmail.com

Setiap naskah yang diajukan wajib mengikuti format dalam pedoman penulisan dan *template for author*. Naskah yang formatnya tidak sesuai dengan pedoman tidak akan diproses dan akan dikembalikan kepada penulis untuk disesuaikan dengan format. Setiap naskah yang diajukan diketik pada kertas HVS A4 pada satu permukaan halaman, batas margin 2 cm di semua sisi kertas, bentuk huruf Times New Roman, ukuran font 11, dua spasi, sedangkan tabel dan gambar berukuran font 9, satu spasi. Setiap halaman diberi nomor secara berurutan, pada sisi kanan bawah, jumlah halaman maksimal 17 lembar (termasuk tabel dan gambar). Penulis wajib mengikuti kaidah penulisan bahasa Indonesia yang baik dan benar serta sesuai dengan Pedoman Pusat Pembinaan dan Pengembangan Bahasa.

Penyiapan Naskah

Buletin LITTRO memuat artikel dalam bahasa Indonesia maupun Inggris. Pemakaian istilah agar mengikuti Pedoman Pusat Pembinaan dan Pengembangan Bahasa. Naskah dalam bahasa Inggris mengikuti English (U.S).

Naskah disusun dengan urutan: Judul, Penulis dan Institusi penulis, Abstrak, Kata kunci, Abstract, Key words, Pendahuluan, Bahan dan Metode, Hasil dan Pembahasan, Kesimpulan, Ucapan Terima Kasih (apabila diperlukan), Daftar Pustaka dan Lampiran bila diperlukan.

Judul:

Singkat, jelas, menggambarkan isi naskah, dan informatif (tidak lebih dari 15 kata), ditulis dalam bahasa Indonesia (seluruhnya huruf kapital) dan bahasa Inggris (huruf kapital hanya awal kalimat, miring). Nama latin tanaman/ hewan yang sudah dikenal luas tidak menjadi bagian kata dalam judul.

- **Penulis dan Institusi penulis:** Nama ditulis lengkap, tidak disingkat, tanpa gelar, ditulis kapital untuk seluruh permulaan kata dan nama penulis pertama merupakan penulis utama. Penulis korespondensi atau penulis utamabawah mencantumkan alamat email pribadi (corresponding author). Nama penulis untuk korespondensi diberi garis bawah. Nama dan alamat institusi dilengkapi dengan nama jalan, kode pos dan nama kota. Apabila penulis lebih dari satu dan alamatnya berbeda, maka alamat seluruh penulis dicantumkan. Keterangan alamat penulis dengan angka bentuk superscript bila penulis lebih dari satu institusi.

Abstrak: Merupakan inti sari dari seluruh tulisan, meliputi latar belakang, tujuan, metode (dilengkapi tempat dan waktu), hasil penelitian, kesimpulan, implikasi, saran, dan tindak lanjut (optional). Abstrak disajikan dalam Bahasa Indonesia dan Inggris maksimal 250 kata (Jenis Times New Roman, ukuran font 11, satu spasi). Abstract Bahasa Inggris memenuhi kaidah standar dan sudah dicek dengan Grammarly atau sistem lainnya.

Kata kunci: Dipilih kata yang mudah ditelusuri (maksimal 5 kata kunci terdiri atas kata atau kata gabungan yang menunjukkan inti dari naskah). Diurutkan berdasarkan abjad, nama latin ditulis di awal (tanpa author) dan tidak ada dalam judul serta ditulis dengan huruf kecil kecuali nama genus kapital. Disajikan dalam Bahasa Indonesia dan Inggris.

Pendahuluan: Memuat latar belakang, perumusan masalah yang akan dipecahkan, sitasi pustaka yang relevan, dan tujuan. Pernyataan tujuan ditulis jelas pada paragraf terakhir. Menggunakan program Mendeley (<http://www.mendeley.com>) dengan Style University of Worcester-Harvard.

Bahan dan Metode: Meliputi tempat dan waktu, rancangan percobaan, cara pelaksanaan dan metode analisis secara jelas (dibuat sub bab), sehingga peneliti lain dapat mengulangi penelitian tersebut. Penulisan judul sub bab dengan Huruf Kapital pada awal kalimat dengan font tebal. Peneliti lapangan dilengkapi dengan data agroekologi misalnya ketinggian tempat, jenis tanah, curah dan hari hujan, tipe iklim dan analisis tanah (untuk penelitian pemupukan), Aspek perolehan benih/mikroba/hewan uji dll disebutkan, parameter pengamatan diuraikan berikut analisis statistik.

Hasil dan Pembahasan: Hasil dikemukakan secara jelas, perlu dengan tabel, grafik, diagram, foto, lukisan/ gambar, dan ilustrasi. Dibuat beberapa sub bab sesuai topik informasi. Penulisan judul sub bab dengan huruf kapital pada awal kalimat dengan font tebal. Pembahasan mengulas data dan

kan kaitannya dengan tujuan dan hipotesis serta saran terhadap masalah yang dikemukakan. Hasil analisis terlebih dahulu kemudian dibahas, disusun ke bab.

Tabel singkat, jelas dan mandiri ditulis dalam bahasa Indonesia dan Inggris. Tabel diberi nomor urut sesuai dengan keterangan di dalam teks. Keterangan tabel diletakkan di bawah tabel. Tabel yang merupakan hasil sitasi harus disebutkan sumbernya. Tabel yang berisi data hasil analisis statistik harus menyertakan tingkat kepercayaan dan dilengkapi KK, notasi beda nyata dalam huruf kecil.

Gambar dan grafik singkat, jelas dan mandiri ditulis dalam bahasa Indonesia dan Inggris. Penulisan judul gambar dengan huruf Kapital pada awal kalimat. Gambar diberi nomor urut sesuai dengan keterangan di dalam teks sesuai penjelasannya. Data grafik agar rapihkan dan dibuat dengan menggunakan *Micro-soft Excel*. Gambar berupa foto hitam putih atau berwarna dengan kontras apabila diperlukan. Gambar yang merupakan hasil sitasi harus disebutkan sumbernya. Gambar yang berupa fungsi hasil analisis statistik cantumkan nilai r^2 / R^2 dan tingkat kepercayaan. Sumbu fungsi grafik harus lengkap (aksis x dan y). Dalam penulisan desimal menggunakan koma (,) bukan titik (.), maksimal dua angka di belakang koma. Jumlah halaman tabel dan gambar tidak melebihi 30% jumlah halaman artikel.

Simpulan: Merupakan sintesis dari hasil dan pembahasan yang singkat namun jelas dan menjawab tujuan, hipotesis dan pertanyaan lain selama penelitian. Ditulis dalam bentuk satu paragraf. Dilengkapi implikasi, saran, atau tindakan dari hasil penelitian.

Terima Kasih: Ditujukan kepada mereka yang telah membantu penulis dalam menyelesaikan kegiatan dan penelitian. Ditulis nama orang [dengan gelar] dan atau nama instansi serta jenis kontribusinya.

Pustaka: Disusun secara alfabetis dan memuat nama penulis, tahun, judul tulisan, judul terbitan atau majalah, nomor seri serta halaman dan kota terbit. Pustaka yang diunduh dari website harus dirilis oleh institusi resmi (akademik atau komunitas), dicantumkan alamat website yang diunduh. Pustaka minimal 11 buah, jumlah referensi $\geq 80\%$, terkini (10 tahun terakhir). Manajemen referensi pustaka menggunakan Mendeley dengan Style APA of Worcester-Harvard.

Penulisan Sumber (ambil contoh dari Mendeley) :

T.L., Richards, J.H., Smart, D.R. & Eissenstat, D.M. Importance of Internal Hydraulic Redistribution for Longevity of the Lifespan of Roots in Dry Soil. *Plant, Cell and Environment*. 31 (2), 177–186. doi:10.1111/j.1365-3030.2012.01749.x.

Idris, H dan Nurmansyah (2015) Efektivitas Ekstrak Etanol beberapa Tanaman Obat sebagai Bahan Baku Fungisida Nabati untuk Mengendalikan *Colletotrichum gloeosporioides*. *Bull Littro* 26(2): 117-124. doi:10.21082/bullittro.v26n2.2015.117-124

Buku:

Ilyas, S. (2012) *Ilmu dan Teknologi Benih*. Bogor, IPB Press.

Amelia, F. (2009) Analisis Daya Saing Jahe Indonesia di Pasar Internasional. Dept. Ilmu Ekonomi, Fak. Ekonomi dan Manajemen, IPB. 116 hlm.

Artikel dalam Buku:

Upreti, K.K. & Sharma, M. (2016) Role of Plant Growth Regulators in Abiotic Stress Tolerance. In: Rao, N.S. et al. (eds.) *Abiotic Stress Physiology of Horticultural Crops*. India, pp.19–46. doi:10.1007/978-81-322-2725-0.

Weiss, R. (1984) Experimental Biology and Assay of RNA Tumor Viruses. Dalam : Weiss R., Teich N. Varmus H., Coffin J.(ed). RNA Tumor Viruses. Vol. 1, New York : Cold Spring Harbor Laboratory. p. 209-260

Prosiding:

Lebaudy, A., Vavasseur, A., Hosy, E., Dreyer, I., Leonhardt, N., Thibaut, J.-B., Véry, A.-A., Simonneau, T. & Sentenac, H. (2008) *Plant Adaptation to Fluctuating Environment and Biomass Production Are Strongly Dependent on Guard Cell Potassium Channels*. In: Chrispeels, M. (ed.) *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 105 (13), The National Academy of Sciences, pp.5271–5276. doi:10.1073/pnas.0709732105.

Riajaya, P.D. dan F.T. Kadarwati (2010) Keragaan Produksi Biji Jarak Pagar IP-1 Umur Tiga Tahun pada berbagai Ketersediaan Air Tanah. Prosiding Lokakarya Nasional V. Inovasi Teknologi dan Cluster Pioneer Menuju DME Berbasis Jarak Pagar. Tunggal Mandiri Publ. Malang. hlm.151-157.

Kutipan Paten :

Nama Penemu paten, kata “penemu”; Lembaga pemegang paten. Tanggal publikasi paten (tanggal, bulan, tahun). Nama barang atau proses yang dipatenkan. Nomor paten.

Muchtadi, T.R., penemu; Institut Pertanian Bogor. 9 Maret 1993. Suatu Proses mencegah Penurunan Beta Karoten pada Minyak Sawit. ID 0 002 569.

Penulisan Nama Penulis :

Jika nama penulis pertama lebih dari satu kata maka penulissannya dibalik:

J.C. Smith

ditulis Smith, J.C.

F.W. Day Jr.

ditulis Day, F.W. Jr.

A.B. Toll III

ditulis Toll, A.B., III

E.C. Bate-Smith	ditulis Bate-Smith, E.C.
Richard C. De Long	ditulis De Long, R.C.
A.J. de Lorenzo	ditulis de Lorenzo, A.J.
James M. van der Veen	ditulis van der Veen, J.M.

Nama penulis dari China, untuk publikasi ilmiah China ditulis tanpa dibalik:

Chan Tai-Chen	ditulis Chan, T-C.
Lin Ke-Sheng	ditulis Lin, K-S.

Dalam publikasi ilmiah Amerika dan Inggris, nama China tetap ditulis dibalik:

L. Ying Chang	ditulis Chang, Y.L
His Fam Fu	ditulis Fu, H.F.

Contoh Naskah Siap Cetak (*Proof draft*)

Contoh naskah siap cetak akan dikirim melalui email kepada penulis korespondensi untuk ditelaah secara seksama. Koreksian dari penulis harus dikembalikan kepada Redaksi Pelaksana Buletin Litro dua hari setelah e-mail diterima.

Contoh Penulisan dalam Teks

BUKAN SATUAN INTERNATIONAL

Angka satu digit

tiga ulangan
empat varietas
lima bulan
satu tahun

Angka dua digit

10 perlakuan

10 polibag

12 bulan

12 bulan

SATUAN INTERNATIONAL

Angka satu digit

1 ml
2 m
2 kg atau ... (ton)
5 menit
5 detik
5 °C
1 atm
5 ha atau ... m²
6 %

Angka dua digit

12 l
10 m
12 kg
10 detik
15 °C
25 ha
10 %

Penulisan dua jenis satuan dalam satu kata

kg per ha ditulis kg.ha⁻¹
kg per m² ditulis kg.m⁻²
10 tanaman per ha ditulis 10 tanaman/ha
10 g per tanaman ditulis 10 g/tanaman