

Seleksi dan Karakterisasi Mikroba Antagonis

M. Machmud, M. Sudjadi, dan Yadi Suryadi

Balai Penelitian Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian

ABSTRAK

Pada tahun 2002 telah dilakukan penelitian yang bertujuan untuk koleksi, karakterisasi dan preservasi mikroba antagonis terhadap *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* dan *Rhizoctonia solani* serta menguji viabilitas koleksi isolat mikroba pengendali hama dan patogen tanaman pangan tahun 2001. Sebanyak 76 isolat mikroba antagonis yang terdiri atas 35 isolat bakteri (*Bacillus subtilis*, *B. polymixa*, dan *Pseudomonas fluorescens*), 16 isolat jamur *Trichoderma harzianum*, dan 25 isolat khamir *Saccharomyces* spp. telah dikoleksi dari beberapa daerah di Jawa Barat. Enam puluh isolat mikroba pengendali hayati dari koleksi tahun 2001 yang terdiri atas bakteri, jamur, dan khamir telah diuji viabilitasnya setelah disimpan selama satu tahun. Semua isolat yang telah disimpan selama satu tahun, baik yang disimpan dalam tabung berisi akuades steril maupun dalam ampul dalam kondisi kering beku, masih menunjukkan viabilitas yang baik berdasarkan kemampuan tumbuhnya pada medium agar dan ciri-ciri biakannya.

Kata kunci: Koleksi dan preservasi, mikroba antagonis, hama dan penyakit tanaman

ABSTRACT

In the fiscal year of 2002, research activities were done to collect and preserve microbial antagonists for the control of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* and *Rhizoctonia solani* from some areas of West Java. Seventy six antagonists including 35 bacteria (*Bacillus subtilis*, *B. polymixa*, *Pseudomonas fluorescens*), 16 fungi (*Trichoderma harzianum*), and 25 yeasts (*Saccharomyces* spp.) were collected and characterized. The bacterial isolates were preserved in ampoules under freeze-dried conditions, while the fungal and yeast isolates were preserved in sterile distilled water. Sixty biological control agents from the 2001 collections have been tested for their viability by growing on agar media. All the isolates that have been preserved under both freeze dried condition and distilled water were still viable and showed good performance after a one-year of storage.

Key words: Collection and preservation, microbial antagonists, plant pests and diseases

PENDAHULUAN

Pelestarian sumberdaya genetik pertanian mencakup pelestarian sumber-daya genetik mikroba pertanian, baik mikroba yang bermanfaat maupun mikroba patogen tanaman, yang meliputi virus, bakteri, khamir, jamur, nematoda, dan protozoa. Mikroba yang bermanfaat juga termasuk mikroba antagonis yang dapat dimanfaatkan sebagai sumber bahan aktif biopestisida untuk pengendalian hama dan penyakit tanaman. Upaya untuk melestarikan biodiversitas mikroba dapat dilakukan melalui konservasi dan

preservasi dalam bentuk koleksi biakan mikroba. Koleksi mikroba berfungsi sebagai (1) wahana penyimpan isolat mikroba, (2) pusat informasi tentang mikroorganisme dan cara penyimpanannya, (3) pusat kegiatan penelitian dan pelatihan tentang identifikasi dan sistematika mikroba (Skerman, 1973; Sly, 1983). Pembuatan koleksi mikroba memerlukan teknik isolasi, pemurnian, identifikasi mikroba, dan penyimpanan (preservasi) isolat biakan murni yang sesuai guna menjaga dan memberi jaminan agar biakan mikroba dalam koleksi tetap hidup, ciri-ciri genetiknya tetap stabil dan tidak berubah, serta hemat biaya dan tenaga (Skerman, 1973).

Indonesia yang terletak di daerah tropik juga memiliki biodiversitas mikroba yang luas, termasuk berbagai jenis hama dan patogen yang selalu menjadi kendala utama produksi tanaman pertanian di Indonesia. Bakteri *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, penyebab penyakit hawar daun bakteri padi dan jamur *Rhizoctonia solani*, penyebab hawar daun padi, hawar pelepah, dan rebah semai pada padi serta busuk pangkal batang pada berbagai jenis tanaman, merupakan dua jenis patogen utama yang tersebar luas di Indonesia, sangat merugikan, dan sulit dikendalikan. Kultivar tanaman yang tahan penyakit sulit diperoleh atau walaupun ada, tidak selalu ditanam petani. Pengendalian kimiawi secara berlebihan dan berkelanjutan berbahaya bagi manusia dan lingkungannya, sehingga komponen pengendalian yang efektif dan ramah lingkungan perlu dicari.

Dalam upaya mengembangkan teknik pengendalian hama dan penyakit yang ramah lingkungan, para peneliti berusaha memanfaatkan berbagai jenis mikroba sebagai bahan aktif biopestisida. Sehubungan dengan itu, perlu dilakukan koleksi, inventarisasi, dan preservasi mikroba sebagai sumber agen pengendali hayati, baik untuk keperluan konservasi sumberdaya genetik mikroba maupun sebagai bahan kajian untuk mengembangkan biopestisida.

Sejak tahun anggaran 2001 telah dilakukan kegiatan penelitian untuk menginventarisasi, mengkoleksi, dan mengkarakterisasi mikroba antagonis patogen dan agen pengendali hama. Hasil penelitian yang telah diperoleh dan tersedia di dalam koleksi plasma nutfah mikroba Balitbiogen, Bogor, saat ini adalah virus (*Nuclear Polyhydrosis Virus*, NPV), nematoda mikroba kitinolitik (*Saccharomyces cerevisiae*), bakteri antagonis (*P. fluorescens* dan *Bacillus subtilis*), bakteri *Bacillus thuringiensis* (Bt), *Trichoderma* spp., dan jamur patogen serangga (JPS), dan nematoda patogen serangga (NPS) yang berjumlah lebih dari 250 isolat (Machmud *et al.*, 2002). Koleksi tersebut perlu dikelola melalui suatu sistem koleksi dan preservasi mikroba yang baik yang mencakup juga pemeliharaan isolat dan penyusunan informasi data (*database*) tentang berbagai aspek dari mikroba yang bersangkutan. Di samping pemeliharaan, penambahan jumlah koleksi mikroba juga perlu dilakukan secara berkelanjutan untuk memperkaya biodiversitas mikroba dalam koleksi.

Makalah ini merupakan laporan hasil penelitian lanjutan seleksi dan karakterisasi mikroba antagonis yang dilaksanakan pada TA 2002 dengan

tujuan untuk (1) mengkoleksi dan mengisolasi mikroba antagonis, (2) mengkarakterisasi dan mengidentifikasi antagonis, (3) melakukan preservasi mikroba antagonis yang di-koleksi, dan (4) menguji viabilitas koleksi mikroba antagonis tahun 2001.

BAHAN DAN METODE

Penelitian dilakukan di laboratorium dan rumah kaca Kelti Diagnostik dan Pengendalian Biologi, Balai Penelitian Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian, Bogor. Tahapan kegiatan penelitian meliputi (1) koleksi dan karakterisasi mikroba antagonis, (2) preservasi mikroba antagonis, dan (3) uji viabilitas mikroba antagonis koleksi tahun 2001. Dalam kegiatan ini, kegiatan penelitian dibatasi pada mikroba antagonis terhadap bakteri *X. oryzae* pv. *oryzae* (XOO) dan jamur *R. solani* (RhS).

Koleksi dan Karakterisasi Mikroba

Koleksi mikroba antagonis dilakukan dengan mengambil contoh tanaman, tanah, dan air dari beberapa daerah di Kabupaten Bogor, Cianjur, Bandung, dan Subang (Jawa Barat). Contoh tanaman yang diambil berupa tanaman utuh, daun atau jerami, sedangkan contoh tanah dan air diambil dari sekitar akar (rizosfir) tanaman padi yang menunjukkan gejala penyakit hawar daun bakteri atau hawar pelepah daun. Isolasi mikroba diutamakan untuk memperoleh isolat bakteri, jamur, dan khamir antagonis. Medium yang digunakan untuk isolasi bakteri dan khamir adalah Nutrient Dextrose Agar (NDA), Saboroud Agar (SA), dan King's B Agar, sedangkan untuk jamur digunakan medium Potato Dextrose Agar (PDA) (Lapage *et al.*, 1970; McGinnis *et al.*, 1974; Sly, 1983). Isolasi mikroba dilakukan dengan teknik pengenceran ekstrak tanaman, tanah atau air, atau dengan menanam langsung contoh tanah atau tanaman pada medium. Bakteri, jamur atau khamir yang tumbuh pada media dimurnikan secara terpisah pada tabung media agar miring untuk diidentifikasi ciri-cirinya.

Karakterisasi isolat bakteri dilakukan melalui pengujian ciri-ciri morfologi sel dan koloni, serta reaksi fisiologi dan biokimianya menggunakan teknik baku yang telah digunakan untuk masing-masing mikroba (Lapage *et al.*, 1970; McGinnis *et al.*, 1974; Sly, 1983). Karakterisasi jamur dilakukan terutama berdasarkan ciri-ciri morfologi hifa, miselia, spora, dan konidia menggunakan binokuler dan mikroskop. Selanjutnya, mikroba tersebut diidentifikasi dengan mencocokkan ciri-ciri tersebut dengan pustaka acuan. Pustaka acuan yang digunakan untuk identifikasi bakteri adalah Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (Krieg dan Holt, 1984), sedangkan untuk jamur adalah menurut Barnett (1960) dan Alexopoulos (1962). Potensi antagonisme mikroba terhadap XOO dan RHS berdasarkan uji zona hambatan pertumbuhan (Klement *et al.*, 1990).

Preservasi mikroba

Isolat yang telah diidentifikasi dan dikarakterisasi ciri-cirinya disimpan untuk jangka menengah dan jangka panjang. Penyimpanan jangka menengah untuk sebagian bakteri dilakukan menggunakan teknik penyimpanan dalam minyak mineral (Sly, 1983). Isolat jamur dan khamir disimpan dalam akuades steril (McGinnis *et al.*, 1974). Penyimpanan jangka panjang baik untuk jamur maupun bakteri antagonis dilakukan dalam ampul menggunakan teknik kering beku (*freeze drying*) (Sly, 1983; Klement *et al.*, 1970). Isolat yang disimpan untuk jangka menengah ditempatkan pada suhu ruang, sedangkan untuk jangka panjang disimpan dalam *freezer* dengan suhu -20°C.

Uji Viabilitas Mikroba

Uji viabilitas mikroba dilakukan terhadap isolat-isolat koleksi tahun 2001 dengan cara menumbuhkan baik isolat mikroba yang disimpan dalam ampul maupun dalam akuades steril pada medium agar yang sesuai. Isolat mikroba antagonis yang diuji sebanyak 64 isolat yang terdiri dari *B. subtilis* (2 isolat), *B. thuringiensis* (40 isolat), *P. fluorescens* (12 isolat), *T. harzzianum* (5 isolat), dan *S. cereviciae* (5 isolat). Pada isolat yang disimpan kering beku dalam ampul, mula-mula ampul dikeluarkan dari kulkas dan dipotong ujungnya. Isi ampul disuspensikan dengan menambahkan 0,5 ml akuades steril atau medium cair ke dalam ampul dan digoyang agar larut. Selanjutnya dengan jarum ose steril diambil suspensi mikroba dari ampul dan digoreskan pada medium agar yang sesuai dalam cawan petri dan diinkubasikan pada suhu ruang. Pertumbuhan mikroba diamati setiap hari hingga tiga hari setelah inkubasi.

Pada isolat yang disimpan dalam tabung dengan air steril, tabung digoyang agar suspensi mikroba merata, kemudian dengan jarum ose steril sebagian suspensi diambil dan digoreskan pada medium agar yang sesuai pada cawan petri. Biakan diinkubasi pada suhu ruang selama 72 jam dan pertumbuhan mikroba diamati setiap hari.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Koleksi dan Karakterisasi Mikroba

Selama tahun 2002 telah dikoleksi sejumlah 350 contoh tanah, air, dan tanaman dari berbagai daerah di Jawa Barat. Setelah diuji kemampuan antagonis-menya terhadap bakteri XOO dan jamur RhS, ternyata hanya 66 isolat yang potensial sebagai mikroba antagonis. Mikroba ini terdiri atas 13 isolat bakteri *Bacillus subtilis*, lima isolat bakteri *B. polymixa*, tujuh isolat bakteri *Pseudomonas fluorescens*, 25 isolat khamir *Saccharomyces* spp., 16 isolat jamur *Trichoderma* spp. (Tabel 1). Sebagian isolat telah disimpan dalam ampul menggunakan teknik kering beku (*freeze drying*), sedangkan sebagian lainnya masih dalam tabung reaksi. Daftar lengkap dari mikroba antagonis yang diperoleh disajikan pada Tabel 2, 3, 4, dan 5.

Ciri-ciri morfologi serta reaksi fisiologi dan biokimia dari isolat mikroba yang diperoleh adalah sebagai berikut:

Bacillus subtilis

Isolat *B. subtilis* yang diperoleh mempunyai ciri-ciri sel berbentuk batang pendek (*rods*), sendiri-sendiri, jarang membentuk rantai, motil dengan flagela peritrich, membentuk endospora berukuran 0,8 x 1,5-1,8 µm; permukaan spora terwarnai pucat. Pada spora yang berkecambah, dinding spora pecah secara melintang. Koloni bakteri pada medium agar berbentuk bundar, tepi tidak teratur, permukaan tidak mengkilap, menjadi tebal dan keruh (*opaque*); kadang-kadang mengerut dan berwarna krem atau kecoklatan. Bentuk koloni agak bervariasi pada media yang berbeda. Koloni meluas pesat pada medium yang berpermukaan lembab. Biakan bakteri dari medium padat tidak mudah larut dalam air. Pertumbuhan pada medium cair (*broth*) keruh, berkerut, dengan pelikel yang koheren, tidak keruh atau hanya agak keruh. Secara anaerob, dalam medium kompleks yang mengandung glukose, pertumbuhan dan fermentasi berlangsung lambat atau lemah; tetapi dengan menambahkan O₂ tumbuh cepat serta menghasilkan 2,3-butanediol, aseton, dan CO₂. Bakteri ini mendekomposisi pektin dan polisakarida dari jaringan tanaman, dan beberapa strain membusukkan umbi kentang. Bakteri ini memproduksi senyawa levan dari sukrose dan rafinose secara ekstraseluler yang bervariasi, tergantung pada strain isolatnya. Pada medium agar, bakteri membentuk pigmen pulcherimin atau melanin di dalam atau di tepi koloni, tergantung pada komposisi medium. Kebanyakan strain membentuk pigmen berwarna coklat atau merah, sedangkan sebagian lainnya membentuk pigmen oranye atau hitam. *B. subtilis* mencairkan gelatin, mereduksi susu litmus, menghidrolisis kasein, tidak membentuk arginin dehidrolase atau lesitinase, dan membentuk antibiotik poli-peptid. Beberapa strain membentuk lebih dari satu jenis antibiotik. Mikroba ini juga membebaskan enzim yang bersifat litik (melarutkan) terhadap sel bakteri hidup. Medium minimal untuk pertumbuhan vegetatif bakteri tidak mengandung vitamin, tetapi mengandung glukose, sitrat, dan garam amonium sebagai sumber utama karbon dan nitrogen. Ciri-ciri tersebut disesuaikan dengan acuan Krieg dan Holt (1984).

Tabel 2. Daftar koleksi isolat *Bacillus subtilis* dan *Pseudomonas fluorescens* tahun 2002. Bogor, 2003

Nomor isolat	Oryzae pv. oryzae (XOO) dan Rhizoctonia solani (RhS) tahun 2002, Bogor, 2004					Jumlah isolat	Kurator
	Asal isolat		Tanggal	Kolektor	Teknik simpan		
	Lokasi	Jenis dan Nama mikroba					
<i>B. subtilis</i>							
BS 2002-01	Bogor	Bakteri: Tanah	22-5-2002	Machmud	Kering beku	5	Endang W.
BS 2002-02	Bogor	<i>Bacillus subtilis</i> Tanah	22-5-2002	Machmud	Kering beku	5	Endang W.
BS 2002-03	Bogor	<i>B. polymixa</i> Tanah	22-5-2002	Machmud	Kering beku	5	Endang W.
BS 2002-04	Bogor	<i>Pseudomonas fluorescens</i> Tanah	22-5-2002	Machmud	Kering beku	5	Endang W.
BS 2002-05	Sukamandi	Jamur: Tanah	18-6-2002	Endang W.	Kering beku	5	Endang W.
BS 2002-06	Sukamandi	<i>Trichoderma harzianum</i> Tanah	18-6-2002	Endang W.	Kering beku	5	Endang W.
BS 2002-07	Sukamandi	Khamir: Jerami	18-6-2002	Endang W.	Kering beku	5	Endang W.
BS 2002-08	Sukamandi	Jerami	18-6-2002	Endang W.	Kering beku	5	Endang W.
BS 2002-09	Kalijati	<i>Saccharomyces</i> sp. Tanah	18-6-2002	Endang W.	Kering beku	5	Endang W.
BS 2002-10	Kalijati	Total Tanah	18-6-2002	Endang W.	Kering beku	5	Endang W.
BS 2002-11	Kalijati	Jerami	18-6-2002	Endang W.	Kering beku	5	Endang W.
BS 2002-12	Cianjur	Tanah	21-7-2002	Machmud	Kering beku	5	Endang W.
BS 2002-13	Cianjur	Tanah	21-7-2002	Machmud	Kering beku	5	Endang W.
<i>B. polymixa</i>							
BP 2002-01	Bogor	Tanah	22-5-2002	Machmud	Kering beku	5	Endang W.
BP 2002-02	Bogor	Tanah	22-5-2002	Machmud	Kering beku	5	Endang W.
BP 2002-03	Sukamandi	Tanah	18-6-2002	Endang W.	Kering beku	5	Endang W.
BP 2002-04	Sukamandi	Jerami	18-6-2002	Endang W.	Kering beku	5	Endang W.
BP 2002-05	Sukamandi	Jerami	18-6-2002	Endang W.	Kering beku	5	Endang W.
<i>P. fluorescens</i>							
PF 2002-01	Bogor	Tanah	22-5-2002	Machmud	Kering beku	5	Endang W.
PF 2002-02	Bogor	Tanah	22-5-2002	Machmud	Kering beku	5	Endang W.
PF 2002-03	Sukamandi	Tanah	18-6-2002	Endang W.	Kering beku	5	Endang W.
PF 2002-04	Sukamandi	Jerami	18-6-2002	Endang W.	Kering beku	5	Endang W.
PF 2002-05	Sukamandi	Jerami	18-6-2002	Endang W.	Kering beku	5	Endang W.
PF 2002-06	Cianjur	Tanah	18-6-2002	Endang W.	Kering beku	5	Endang W.
PF 2002-07	Cianjur	Tanah	18-6-2002	Endang W.	Kering beku	5	Endang W.

Ciri-ciri isolat disesuaikan berdasarkan acuan Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (Krieg dan Holt, 1984)

Bacillus polymixa

Ciri-ciri *B. polymixa*, pada medium agar membentuk koloni yang tipis, ber-bentuk amoeboid. Pada medium yang mengandung glukose, koloni berlendir (mukoid) mengkilap dan melekat pada media agar. Sel bakteri berbentuk batang, 0,6-0,8 x 2-5 µm, motil suhu maksimum 35-45°C dan minimum 5-10°C, meng-hidrolisis casein, mereduksi nitrat menjadi nitrit, tidak toleran terhadap NaCl 5-7%, menghasilkan gas dari arabinose, xylose, dan mannitol, tumbuh anaerobik pada medium Sabouraud. Bakteri memfermentasi glukose, menghasilkan 2,3-butanediol, dan etanol; memproduksi levan. Bakteri memproduksi banyak spora tersusun ran-tai patralel. Ciri-ciri ini disesuaikan dengan pustaka acuan (Krieg dan Holt, 1984).

Pseudomonas fluorescens

Bakteri *P. fluorescens* berbentuk batang, 0,7-0,8 x 2,3 µm kadang-kadang tidak motil. Biakan bakteri memproduksi pigmen floresen, terutama pada medium yang defisien besi. Koloni pada medium yang mengandung sukrose 2-4% berlendir karena menghasilkan levan. Reaksi oksidase negatif, hidrolisis gelatin positif, hidro-lisis pati negatif, sumber karbon L arabinose, glukose, sukrose, sakarat, propinonat, sorbitol, adonitol, meso inositol, dan DL arginin. Lipolitik, tidak memerlukan zat tumbuh, kebutuhan nutrisi sangat variabel, Reaksi terhadap kuning telur positif. Aerob obligat, tetapi dapat tumbuh anaerobik pada medium nitrat. Kisaran suhu pertumbuhan optimal 25-30°C dengan suhu pertumbuhan minimum 4°C dan maksimum 41°C. Ciri-ciri ini juga disesuaikan dengan pustaka acuan (Krieg dan Holt, 1984).

Tabel 3. Daftar koleksi isolat *Saccharomyces* spp. tahun 2002. Bogor, 2003

Nomor isolat	Asal isolat		Koleksi		Teknik simpan	Jumlah isolat	Kurator
	Lokasi	Inang	Tanggal	Kolektor			
Y 2002-01	Bogor	Tanah	22-5-2002	Sudjadi	Kering beku	5	Endang W.
Y 2002-02	Bogor	Tanah	22-5-2002	Sudjadi	Kering beku	5	Endang W.
Y 2002-03	Bogor	Tanah	22-5-2002	Sudjadi	Kering beku	5	Endang W.
Y 2002-04	Bogor	Tanah	22-5-2002	Sudjadi	Kering beku	5	Endang W.
Y 2002-05	Sukamandi	Tanah	18-6-2002	Sudjadi	Kering beku	5	Endang W.
Y 2002-06	Sukamandi	Jerami	18-6-2002	Sudjadi	Kering beku	5	Endang W.
Y 2002-07	Sukamandi	Jerami	18-6-2002	Sudjadi	Kering beku	5	Endang W.
Y 2002-08	Cianjur	Tanah	18-6-2002	Sudjadi	Kering beku	5	Endang W.
Y 2002-09	Cianjur	Tanah	18-6-2002	Sudjadi	Kering beku	5	Endang W.
Y 2002-10	Cianjur	Tanah	18-6-2002	Sudjadi	Kering beku	5	Endang W.
Y 2002-11	Kalijati	Tanah	18-6-2002	Endang W.	Kering beku	5	Endang W.
Y 2002-12	Kalijati	Tanah	18-6-2002	Endang W.	Kering beku	5	Endang W.
Y 2002-13	Kalijati	Jerami	18-6-2002	Endang W.	Kering beku	5	Endang W.
Y 2002-14	Cianjur	Tanah	21-7-2002	Machmud	Kering beku	5	Endang W.
Y 2002-15	Cianjur	Tanah	21-7-2002	Machmud	Kering beku	5	Endang W.
Y 2002-16	Lembang	Jagung	22-8-2002	Sudjadi	Kering beku	5	Endang W.
Y 2002-17	Lembang	Jagung	22-8-2002	Sudjadi	Kering beku	5	Endang W.
Y 2002-18	Lembang	Jagung	22-8-2002	Sudjadi	Kering beku	5	Endang W.
Y 2002-19	Lembang	Jagung	22-8-2002	Sudjadi	Kering beku	5	Endang W.
Y 2002-20	Cipanas	Tanah	14-9-2002	Machmud	Kering beku	5	Endang W.
Y 2002-21	Cipanas	Tanah	14-9-2002	Machmud	Kering beku	5	Endang W.
Y 2002-22	Cipanas	Tanah	14-9-2002	Machmud	Kering beku	5	Endang W.
Y 2002-23	Citayam	Jerami	19-10-2002	Machmud	Kering beku	5	Endang W.
Y 2002-24	Citayam	Jerami	19-10-2002	Machmud	Kering beku	5	Endang W.
Y 2002-25	Citayam	Jerami	19-10-2002	Machmud	Kering beku	5	Endang W.

Tabel 4. Daftar koleksi isolat *Trichoderma harzianum* tahun 2002. Bogor, 2002

Nomor isolat	Asal isolat		Koleksi		Teknik simpan	Jumlah isolat	Kurator
	Lokasi	Inang	Tanggal	Kolektor			
T 2002-01	Bogor	Tanah	22-8-2002	Sudjadi	Minyak mineral	5	Endang W.
T 2002-02	Bogor	Tanah	22-8-2002	Sudjadi	Minyak mineral	5	Endang W.
T 2002-03	Bogor	Tanah	22-8-2002	Sudjadi	Minyak mineral	5	Endang W.
T 2002-04	Bogor	Tanah	22-8-2002	Sudjadi	Minyak mineral	5	Endang W.
T 2002-05	Sukamandi	Jerami	19-10-2002	Machmud	Minyak mineral	5	Endang W.
T 2002-06	Sukamandi	Jerami	19-10-2002	Machmud	Minyak mineral	5	Endang W.
T 2002-07	Sukamandi	Jerami	19-10-2002	Machmud	Minyak mineral	5	Endang W.
T 2002-08	Sukamandi	Jerami	19-10-2002	Machmud	Minyak mineral	5	Endang W.
T 2002-09	Sukamandi	Tanah	19-10-2002	Machmud	Minyak mineral	5	Endang W.
T 2002-10	Sukamandi	Tanah	19-10-2002	Machmud	Minyak mineral	5	Endang W.
T 2002-11	Sukamandi	Tanah	19-10-2002	Machmud	Minyak mineral	5	Endang W.
T 2002-12	Sukamandi	Tanah	19-10-2002	Machmud	Minyak mineral	5	Endang W.
T 2002-13	Bogor	Tanah	18-6-2002	Endang W.	Minyak mineral	5	Endang W.
T 2002-14	Bogor	Jerami	18-6-2002	Endang W.	Minyak mineral	5	Endang W.
T 2002-15	Bogor	Jerami	18-6-2002	Endang W.	Minyak mineral	5	Endang W.
T 2002-16	Bogor	Jerami	18-6-2002	Endang W.	Minyak mineral	5	Endang W.

Ciri-ciri khamir *Saccharomyces* spp. disesuaikan dengan mengacu Pelczar dan Reid (1965), sedangkan ciri-ciri jamur *Trichoderma harzianum* disesuaikan dengan mengacu pada Barnett (1960) dan Alexopoulos (1962).

Preservasi Isolat Mikroba

Sebagian isolat mikroba antagonis yang telah dikarakterisasi disimpan untuk jangka menengah menggunakan teknik penyimpanan dalam minyak mineral (Elliot, 1975; Sly, 1983). Isolat khamir dan jamur disimpan dalam akuades steril menurut teknik McGinnis *et al.* (1974). Penyimpanan jangka panjang dalam ampul menggunakan teknik kering beku (*freeze drying*) (Sly, 1983; Klement *et al.*, 1970). Bakteri *Bacillus subtilis*, *B. polymixa*, *B. thuringiensis*, dan *Pseudomonas fluorescens* disimpan dalam ampul. Setiap kemasan isolat disimpan rangkap lima. Isolat yang disimpan untuk jangka menengah ditempatkan pada suhu ruang, sedangkan untuk jangka panjang disimpan dalam *freezer* dengan suhu -20°C.

Uji Viabilitas Mikroba

Pada tahap ini belum semua koleksi isolat mikroba antagonis yang telah di-koleksi pada tahun 2001 dapat diuji viabilitasnya, karena jumlahnya yang cukup banyak, sehingga perlu dilakukan secara rutin dan bertahap, sebagai upaya pemeliharaan. Jumlah mikroba yang telah diuji viabilitasnya sebanyak 61 isolat yang terdiri atas dua isolat *B. subtilis*, 40 isolat *B. thuringiensis*, 12 isolat *P. fluorescens*, lima isolat *T. harzianum*, dan dua isolat *S. cerevisiae* (Tabel 5 dan 6). Seluruh isolat yang telah disimpan selama satu tahun, viabilitasnya masih baik. Koloni mikroba masih hidup dan tumbuh dengan baik pada medium agar yang digunakan untuk penumbuhan. Ciri-ciri fisiologi dan biokimianya yang disesuaikan dengan pustaka acuan juga tidak berubah. Hal ini menunjukkan bahwa teknik penyimpanan yang digunakan sudah cukup memadai.

Tabel 5. Rangkuman hasil uji viabilitas mikroba antagonis dari koleksi tahun 2001. Bogor, 2004

Jenis dan nama mikroba	Jumlah isolat
Bakteri:	
<i>Bacillus subtilis</i>	2
<i>B. thuringiensis</i>	40
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	12
Jamur:	
<i>Trichoderma harzianum</i>	5
Khamir:	
<i>Saccharomyces</i> spp.	2
Total	61

Tabel 6. Daftar koleksi isolat *Bacillus thuringiensis*, *B. subtilis*, *Pseudomonas fluorescens*, *Trichoderma harzianum*, dan *Saccharomyces cerevisiae* tahun 2001 yang telah diuji viabilitasnya. Bogor, 2003

Kode isolat	Viabilitas	Kode isolat	Viabilitas
<i>B. thuringiensis</i>		Bt 01-134	Baik
Bt 01-001	Baik	Bt 01-136	Baik
Bt 01-002	Baik	Bt 01-137	Baik
Bt 01-004	Baik	Bt 01-143	Baik
Bt 01-006	Baik	Bt 01-150	Baik
Bt 01-008	Baik	Bt 01-155	Baik
Bt 01-015	Baik	Bt 01-179	Baik
Bt 01-017	Baik	<i>Bacillus subtilis</i>	
Bt 01-020	Baik	Bs 2001-01	Baik
Bt 01-021	Baik	Bs 2001-02	Baik
Bt 01-026	Baik	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	
Bt 01-030	Baik	Pf 2001-01	Baik
Bt 01-034	Baik	Pf 2001-02	Baik
Bt 01-035	Baik	Pf 2001-03	Baik
Bt 01-036	Baik	Pf 2001-04	Baik
Bt 01-037	Baik	Pf 2001-05	Baik
Bt 01-041	Baik	Pf 2001-06	Baik
Bt 01-049	Baik	Pf 2001-07	Baik
Bt 01-050	Baik	Pf 2001-08	Baik
Bt 01-058	Baik	Pf 2001-09	Baik
Bt 01-065	Baik	Pf 2001-10	Baik
Bt 01-066	Baik	Pf 2001-11	Baik
Bt 01-072	Baik	Pf 2001-12	Baik
Bt 01-082	Baik	<i>Trichoderma harzianum</i>	
Bt 01-083	Baik	T 2001-01	Baik
Bt 01-084	Baik	T 2001-02	Baik
Bt 01-086	Baik	T 2001-03	Baik
Bt 01-088	Baik	T 2001-04	Baik
Bt 01-090	Baik	T 2001-05	Baik
Bt 01-099	Baik	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	
Bt 01-106	Baik	Y 2001-01	Baik
Bt 01-110	Baik	Y 2001-02	Baik
Bt 01-129	Baik		
Bt 01-130	Baik		

KESIMPULAN DAN SARAN

Koleksi dan preservasi mikroba antagonis patogen tanaman pangan pada tahun 2002 memperoleh 66 isolat mikroba yang terdiri atas 25 isolat bakteri (*B. subtilis*, *B. polymixa*, dan *P. flurescens*), 16 isolat jamur *T. harzianum*, dan 25 isolat khamir *Saccharomyces* spp. Isolat antagonis yang diperoleh dipreservasi menggunakan teknik kering beku dalam ampul atau dalam tabung reaksi dengan minyak mineral serta disimpan di kulkas atau freezer. Viabilitas 61 isolat mikroba antagonis koleksi tahun 2001 yang telah disimpan setahun dengan menggunakan teknik kering beku masih tetap baik dan tidak mengalami perubahan ciri-cirinya.

Koleksi dan preservasi plasma nutfah mikroba pengendali hama dan patogen tanaman pertanian perlu dilanjutkan dalam upaya melestarikan biodiversitas mikroba agen pengendali hayati hama dan patogen tanaman, memperkaya koleksi sumberdaya genetik mikroba, dan menyediakan sumber mikroba bagi pengembangan teknik pengendalian hama dan penyakit tanaman pertanian yang efektif, efisien, dan ramah lingkungan.

DAFTAR PUSTAKA

- Alexopoulous, C.J. 1962.** Introductory to Mycology, 2nd ed. J. Wiley & Sons, New York, 613 p.
- Barnett, H.L. 1960.** Illustrated Genera of Imperfect Fungi. Burgess Publishing, Minneapolis. 225 p.
- Elliot, R.F. 1975.** Methods for preserving mini-cultures of fungi under mineral oil. Lab. Practice 24:751.
- Klement, Z., K. Rudolph, and D.C. Sands. 1990.** Methods in Phytobacteriology. Vol I. Akademiai Kiado, Budapest.
- Krieg, N.R. dan J.G. Holt. 1984.** Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. MacMillan, Baltimore. 765 p.
- Lapage, S.P., J.E. Shelton, T.G. Mitchell, and A.R. Mackenzie. 1970.** Culture collections and preservation of bacteria. *In* J.R. Norris and D.W. Ribbons (*Eds.*). Methods in Microbiology. Vol. 3A. Academic Press, London. p. 135-227.
- Machmud, M., Jumanto, I. Manzila, M.A. Suhendar, dan M. Sudjadi. 2002.** Koleksi dan karakterisasi mikroba antagonis. Laporan Kegiatan Penelitian Tahun 2002, Balai Penelitian Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian, Bogor. 13 hlm.
- McGinnis, M.R., A.A. Padhye, and L. Ajello. 1974.** Storage of stock culture of filamentous fungi, yeast and some aerobic actinomycetes in sterile distilled water. Applied Microbiology 28:218-222.
- Pelczar, Jr. M.J. and R.D. Reid. 1965.** Microbiology. McGraw Hill Book, New York. 662 p.
- Skerman, V.B.D. 1973.** The organization of a small general culture collection. *In* A.F. Pestana de Castro, E.J. Da Silva, V.B.D. Skerman, and W.W. Leveritt (*Eds.*). Proc. 2nd Internat'l. Conf. Culture Coll'n. Unesco/UNEP/ICRO/WFCC/World Data Center for Microorganisms, Brisbane.

Sly, L.I. 1983. Preservation of microbial culture. *In* P.C. Fahy and G.J. Persley (Eds.). Plant Bacterial Diseases: A Diagnostic Guide. Academic Press, Sidney. p. 275-298.