

# Biopestisida Organik Berbahan Aktif *Bacillus subtilis* dan *Pseudomonas fluorescens* untuk Mengendalikan Penyakit Layu *Fusarium* pada Anyelir

Hanudin, W. Nuryani, E. Silvia Yusuf, dan B. Marwoto

Balai Penelitian Tanaman Hias, Jl. Raya Ciharang-Pacet, Cianjur 43253

Naskah diterima tanggal 11 Januari 2011 dan disetujui untuk diterbitkan tanggal 27 Juni 2011

**ABSTRAK.** Anyelir (*Dianthus caryophyllus* L.) merupakan salah satu jenis tanaman hias yang mempunyai nilai ekonomi tinggi. Penyakit utama yang menyerang tanaman ini ialah layu *Fusarium* yang disebabkan oleh *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* dapat menurunkan kualitas dan kuantitas produksi tanaman sekitar 20-60%. Pengendalian yang selama ini dilakukan oleh petani bertumpu pada penggunaan pestisida kimia sintetik. Namun penggunaan bahan kimia tersebut tidak mampu mengeradikasi patogen secara sempurna, terutama pada lapisan tanah yang agak dalam. Salah satu cara pengendalian berwawasan lingkungan ialah menggunakan musuh alami. Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium dan Rumah Kaca Balai Penelitian Tanaman Hias (1.100 m dpl.), sejak Mei sampai Desember 2009. Penelitian bertujuan mengetahui pengaruh *Bacillus subtilis* dan *Pseudomonas fluorescens* yang diformulasi dalam bentuk biopestisida organik cair dalam pengendalian layu *Fusarium* pada tanaman anyelir. Rancangan yang digunakan ialah acak kelompok dengan 10 perlakuan, yaitu 10% ekstrak kascing + 10% molase + *B. subtilis* + *P. fluorescens* (BP) dan 10% ekstrak pupuk kandang kuda + 10% molase + BP masing-masing konsentrasi 0,1, 0,3, 0,5, dan 0,7%, dazomet 0,2%, serta kontrol (air ledeng), dengan empat ulangan. Hasil penelitian menunjukkan bahwa populasi bakteri antagonis setelah dilakukan proses fermentasi selama 3 minggu, meningkat dibandingkan sebelum fermentasi. Rerata populasi awal sebelum fermentasi bakteri antagonis  $10^7$ - $10^9$  cfu/ml meningkat menjadi  $10^{10}$ - $10^{12}$  cfu/ml pada 3 minggu setelah fermentasi. Populasi kedua agens biokontrol tersebut setelah penyimpanan selama 2 bulan cenderung stabil berkisar antara  $10^{10}$ - $10^{11}$  cfu/ml. Perlakuan *B. subtilis* dan *P. fluorescens* yang disuspensikan ke dalam ekstrak kascing + molase pada taraf konsentrasi 0,5% kemudian difermentasikan dalam biofermentor selama 3 minggu secara konsisten dapat menekan serangan *F. oxysporum* f. sp. *dianthi* pada anyelir. Implikasi hasil penelitian ini dapat meningkatkan daya saing komoditas tanaman hias melalui pemanfaatan sumber daya alam nasional secara optimal berkelanjutan untuk mendukung industri tanaman hias yang berdaya saing tinggi.

Katakunci: *Dianthus caryophyllus*; Biopestisida organik; *Bacillus subtilis*; *Pseudomonas fluorescens*; Pengendalian; *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*

**ABSTRACT.** Hanudin, W. Nuryani, E. Silvia Yusuf, and B. Marwoto. 2011. A Study of Organic Biopesticide Containing *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas fluorescens* for Controlling *Fusarium* Wilt on Carnation. Carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) is one of the most economically important cut flowers in Indonesia. The crops is commonly cultivated in the highland areas of the country. Cultivations of the crops in the production center areas have faced various problems, especially wilt disease caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* as the most important one. Based on the field observation it is known that the disease could reduce plant production and its yield quality up to 20-60%. To control the disease, farmers usually use a synthetic chemical pesticides. However the control measures are not sufficiently effective to overcome the diseases problems. Therefore, an alternative control measures which are more environmentally friendly is necessary. The use of biocontrol agents is nowadays bring popular to be recommended to control the disease. A study on the control of fusarial wilt disease on carnation was carried out in the Laboratory and Glasshouse of Indonesian Ornamental Crops Research Institute (1,100 m asl.) from May to December 2009, using *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas fluorescens* formulated in the liquid organic pesticide. The study was arranged in a randomized block design, with 10 treatments i.e. 10% vermi compost + 10% molase + BP and 10% horse manure + 10% molase + BP concentration 0.1, 0.3, 0.5, 0.7% respectively, dazomet 0.2% and control with four replications. The results showed that population of antagonistic bacterial was increased from  $10^7$ - $10^9$  to  $10^{10}$ - $10^{12}$  cfu/ml after 3 weeks fermentation in the organic carrier. The population of two antagonistic bacteria was likely stable on  $10^{10}$ - $10^{11}$  cfu/ml after storing 2 months. The treatments of *B. subtilis* and *P. fluorescens* suspended in the vermi compost extract and molases on the concentration level of 0.5% and formulated in the biofermentor for 3 weeks were consistently effective in reducing *Fusarium* wilt on carnation. The implication of research results could be increase commodity competitive ability of ornamental plants by using national nature resource on a continuity for support the ornamental plants industry with high competitiveness.

Keywords: *Dianthus caryophyllus*; Organic biopesticide, *Bacillus subtilis*; *Pseudomonas fluorescens*; Controlling; *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*

---

Anyelir (*Dianthus caryophyllus* L.) merupakan salah satu jenis tanaman hias yang mempunyai nilai ekonomis tinggi. Penyakit utama yang menyerang tanaman ini ialah layu *Fusarium*

yang disebabkan oleh *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*. Patogen ini dapat menurunkan kualitas dan kuantitas produksi tanaman sekitar 20-60% (Manulis et al. 1994).

Beberapa upaya pengendalian penyakit layu pada anyelir telah banyak dilaporkan. Pengendalian yang dilakukan oleh petani mengandalkan penggunaan pestisida kimia sintetik (Maryam dan Djatnika 1994). Di luar negeri pengendalian layu *Fusarium* dilakukan dengan fumigasi tanah menggunakan metil bromida (800 kg/ha). Namun perlakuan fumigasi tersebut tidak mampu mengeradikasi patogen penyebab layu secara sempurna, terutama pada lapisan tanah yang agak dalam (Yephet et al. 1996). Oleh karena itu cara-cara pengendalian alternatif yang lebih sesuai dengan falsafah pengendalian penyakit tanaman yang ramah lingkungan perlu diperhatikan (de Bach 1974). Salah satu cara pengendalian berwawasan lingkungan ialah melaksanakan program pertanian organik.

Pertanian organik adalah sistem manajemen produksi terpadu yang menghindari penggunaan pupuk buatan, pestisida kimia sintetik, dan hasil rekayasa genetik. Penerapan pertanian organik dimaksudkan untuk menekan pencemaran udara, tanah, air, dan lingkungan hidup (Isroi 2005). Alasan kesehatan dan kelestarian lingkungan hidup menjadikan pertanian organik sebagai salah satu alternatif pertanian modern. Pertanian organik mengandalkan penggunaan bahan-bahan alami untuk menggantikan bahan kimia sintetik. Namun, petani sering mengeluh bahwa produktivitas hasil pertanian organik yang diterapkan cenderung rendah dan lebih rentan terhadap serangan hama dan penyakit. Masalah ini dapat diatasi dengan memanfaatkan produk mikroba yang diambil dari sumber-sumber kekayaan hayati di dalam negeri.

*Bacillus subtilis* dan *Pseudomonas fluorescens* merupakan mikroba antagonis yang sangat potensial untuk dikembangkan sebagai agens pengendali patogen pada tanaman anyelir. Pada penelitian ini kedua bakteri antagonis tersebut dicampurkan dalam satu media bahan pembawa organik (ekstrak sating dan molase), dengan harapan dapat meningkatkan kemangkusannya dalam menekan *F. oxysporum* f. sp. *dianthi* pada anyelir. Kedua bakteri tersebut bersifat kompatibel satu sama lain dan diformulasi dalam bentuk

biopestisida semi-organik dengan nama dagang Prima BAPF, dievaluasi kemangkusannya, dan dipatenkan oleh Kementerian Hukum dan Hak Azasi Manusia Republik Indonesia melalui Direktorat Jenderal Hak Kekayaan Intelektual (Dirjen Haki) dengan nomor sertifikat paten ID. 0 022 384, 12 Januari 2009 (Hanudin et al. 2009).

Prima BAPF mengandung bahan aktif berupa *B. subtilis* nomor isolat BHN 4 dan *P. fluorescens* nomor isolat Pf 18, sedang bahan pembawanya ialah larutan 0,1 M  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  yang ditambah 1% monosodium glutamat dan minyak sawit yang ditambah parafin hidrokarbon dengan perbandingan antara bahan aktif dan pembawa 1:4:5 (v/v) serta kerapatan bakteri bahan aktif dalam formulasi  $10^9$  cfu/ml. Pada penelitian ini komposisi Prima BAPF tersebut disempurnakan pada penggunaan jenis bahan aktif maupun bahan pembawanya. Hal ini dilakukan karena efektivitas biopestisida Prima BAPF terhadap patogen sasaran tidak stabil, oleh karena itu perlu disempurnakan. Penyempurnaan tersebut dilakukan terhadap bahan aktif yang semula menggunakan *B. subtilis* nomor isolat BHN 4 dan *P. fluorescens* nomor isolat Pf 18, sedang pada formulasi ini menggunakan *B. subtilis* nomor isolat Bs 12 dan *P. fluorescens* nomor isolat Pf 2. Adapun bahan pembawa yang disempurnakan memodifikasi metode Suryana dan Cahyono (2008) dalam pembuatan pupuk organik cair yang diberi nama dagang Biovermi.

Penelitian bertujuan mendapatkan informasi viabilitas bahan aktif biopestisida (*B. subtilis* dan *P. fluorescens*) dalam bahan pembawa berupa ekstrak bahan organik (kascing atau pupuk kandang kotoran kuda ditambah molase). Di samping itu untuk memperoleh konsentrasi dan prototipe formulasi biopestisida organik berbahan aktif *B. subtilis* dan *P. fluorescens* yang efektif mengendalikan penyakit layu *Fusarium* pada anyelir.

Hipotesis yang diajukan pada percobaan ini ialah bahwa *B. subtilis* dan *P. fluorescens* diduga dapat hidup dalam ekstrak kascing dan kotoran kuda yang difermentasikan. Prototipe formulasi *B. subtilis* dan *P. fluorescens* yang disuspensikan ke dalam ekstrak kascing yang difermentasikan dapat mengendalikan *F. oxysporum* f. sp. *dianthi* pada tanaman anyelir.

## BAHAN DAN METODE

Penelitian dilakukan di Laboratorium dan Rumah Kaca Balai Penelitian Tanaman Hias (1.100 m dpl.) Segunung, pada bulan Mei sampai Desember 2009. Ruang lingkup penelitian ini sebagai berikut:

### Pembuatan Propagul Bahan Aktif Biopestisida Organik

Propagul bahan aktif biopestisida ini ialah biakan murni *B. subtilis* nomor isolat Bs 12 ditumbuhkan pada media nutrisi agar, sedang *P. fluorescens* nomor isolat Pf 2 ditumbuhkan pada media King's B yang mengandung 0,01 M FeCl<sub>3</sub>. Kemudian biakan murni tersebut dieramkan di dalam inkubator pada suhu 30 ± 2°C selama 24 jam. Isolat bakteri tersebut diambil 3 loop penuh dan disuspensikan ke dalam 10 ml air steril, divorteks agar homogen sehingga terbentuk suspensi dengan kerapatan 10<sup>12</sup> cfu/ml. Suspensi isolat tersebut sebanyak 1 ml dituangkan ke dalam 500 ml media *nutrient broth* (NB) di dalam erlenmeyer berkapasitas 750 ml, kemudian dimasukkan ke dalam penangas air pada suhu 30°C sambil digoyang di dalam *shaker* pada kecepatan 3 rpm selama 24 jam. Sel bakteri dipanen dengan cara mengambil tiap isolat lalu disuspensikan ke dalam akuades steril. Sebanyak 10% dari larutan propagul tersebut kemudian dimasukkan ke dalam media perbanyak massal sebagai perlakuan.

### Media Perbanyak Massal Bahan Pembawa Biopestisida Organik

Pembuatan media perbanyak massal mengikuti metode Suryana dan Cahyono (2008) yang dimodifikasi dalam pembuatan pupuk organik cair yang diberi nama dagang Biovermi. Pada pembuatan Biovermi menggunakan bahan aktif berupa mikroba yang berfungsi sebagai penambat N, pelarut fosfat, dan penghasil hormon tumbuh seperti *Azotobacter* sp., *Azospirillum* sp., dan *Aspergillus* sp. serta gula merah, dan ekstrak kascing sebagai bahan pembawa. Pada percobaan ini pembuatan pupuk organik cair dimodifikasi menggunakan *B. subtilis* dan *P. fluorescens* sebagai bahan aktif dan molase pengganti gula merah sebagai bahan pembawa. Prosedur pembuatan media perbanyak massal ialah sebagai berikut: 1 kg kascing atau pupuk kandang kuda yang matang, masukkan ke dalam 9 l air, lalu direbus pada suhu 100°C selama 30 menit. Selanjutnya

larutan disaring dengan kain kassa berukuran 200 mesh, air hasil saringan difermentasikan selama 3 minggu di dalam biofermentor sebagai media basal yang dicampur dengan molase 10%.

### Uji Viabilitas Bahan Aktif dalam Bahan Pembawa Biopestisida

Viabilitas bahan aktif dalam bahan pembawa merupakan tolok ukur masa kadaluarsa biopestisida tersebut. Apabila viabilitas bahan aktif semakin lama, maka masa kadaluarsa biopestisida tersebut semakin panjang. Adapun cara pengujian dilakukan melalui pengenceran berseri menggunakan metode Hsu *et al.* (1994) yang dimodifikasi.

Biopestisida ini disimpan pada suhu ruang (25±2°C) dan viabilitas bahan aktif diamati setiap bulan, mulai 0-2 bulan setelah penyimpanan. Percobaan menggunakan rancangan acak lengkap, yang terdiri atas empat perlakuan dengan enam ulangan. Uraian tiap perlakuan tersebut disajikan pada Tabel 1.

### Formulasi dan Konsentrasi Biopestisida Organik terhadap Waktu Inkubasi, Penyakit Layu *Fusarium*, AUDPC, Diskolorisasi Floem, dan Persentase Penekanannya

### Formulasi dan konsentrasi biopestisida terhadap waktu inkubasi, dan intensitas serangan *F. oxysporum* f. sp. *dianthi* pada anyelir

Bibit tanaman anyelir varietas lokal Cihideung yang rentan terhadap layu *Fusarium*, yang berumur

**Tabel 1. Jumlah perlakuan uji viabilitas bahan aktif dalam bahan pembawa biopestisida (Number of treatments on viability test against active and carrier ingredient of biopesticide)**

Kode perlakuan (Treatments code)	Komposisi formulasi biopestisida (Composition of biopesticide formulations)
A	10% Kas + 10% Mol
B	10% Pkd + 10% Mol
C	10% Kas + 10% Mol + BP
D	10% Pkd + 10% Mol + BP

#### Keterangan (Remarks) :

Kas = 10% kascing (*Vermi compost*)

Pkd = 10% Ppk kandang kotoran kuda (*Horse manure*)

BP = *B. subtilis* + *P. fluorescens*

Mol = 10% molase

21 hari setelah stek pucuk (HSSP) diperoleh dari penangkar bibit di Sarongge, Pacet, Cianjur. Bibit ditanam dalam polibag berdiameter 20 cm yang berisi campuran tanah dan pupuk kandang 1:1 v/v yang disterilkan, yang sebelumnya telah diinokulasi *F. oxysporum* berdasarkan metode Straathof et al. (1993), Loffler dan Rumine (1991).

Biakan murni *F. oxysporum* f. sp. *dianthi* ditumbuhkan pada media *potato dextrose agar* (PDA), kemudian pada umur 7 hari setelah investasi, biakan *F. oxysporum* f. sp. *dianthi* dipanen. Satu cawan petri yang berisi biakan *F. oxysporum* f. sp. *dianthi* dengan konsentrasi  $10^7$  sel spora/ml diinfestasikan ke dalam media campuran oatmeal: tanah (1 : 5 v/v) yang disterilkan dengan *autoclave* (suhu  $120^\circ\text{C}$ , selama 15 menit), kemudian media diinkubasikan dalam ruangan gelap selama 3

minggu pada suhu ruangan ( $25 \pm 2^\circ\text{C}$ ). Setelah inokulum tumbuh memenuhi media, selanjutnya media dicampur tanah dengan perbandingan 1 : 100 v/v, kemudian campuran tersebut digunakan untuk media pertumbuhan tanaman anyelir. Jumlah propagul yang terdiri atas mikro, makro konidia, dan klamidiospora yang digunakan dalam campuran media tersebut ialah  $\pm 10^5$ - $1,5 \times 10^5$  propagul/g tanah yang dihitung berdasarkan pengenceran berseri mengadopsi metode Komada (1975) serta metode Loffler dan Mouris (1989).

Aplikasi biopestisida berbahan aktif *B. subtilis* dan *P. fluorescens* dilakukan sejak saat tanam, dengan interval 7 hari. Metode aplikasi ialah sebagai berikut: akar tanaman anyelir direndam dalam suspensi biopestisida selama 10 menit, kemudian diikuti dengan penyemprotan pada media tanam dan jaringan tanaman. Konsentrasi yang digunakan untuk kedua mikrobe antagonis tersebut ialah 0,1, 0,3, 0,5, dan 0,7% dengan kerapatan  $10^{10}$  cfu/ml.

Populasi tanaman yang digunakan pada percobaan ini ialah 10 tanaman/perlakuan/ulangan, sehingga total tanaman yang diperlukan 400 tanaman. Rancangan yang digunakan ialah acak kelompok dengan 10 perlakuan dan empat ulangan. Perlakuan terdiri atas empat taraf konsentrasi biopestisida 0,1, 0,3, 0,5, dan 0,7%, satu fungisida kimiawi sintetik sebagai kontrol positif (dazomet konsentrasi 0,2%), dan kontrol (air ledeng), sehingga total 10 perlakuan (Tabel 2).

Peubah yang diamati meliputi waktu inkubasi (WI) dan intensitas penyakit layu. Waktu inkubasi diamati setiap hari sampai 35 hari setelah tanam (HST). Intensitas penyakit diamati berdasarkan metode Yephet et al. (1996) setiap 14 hari sampai tanaman berbunga pertama.

### Luas Areal di bawah Kurva Perkembangan Penyakit *F. oxysporum* f. sp. *dianthi*

Luas areal di bawah kurva perkembangan penyakit (AUDPC) pada percobaan ini mencerminkan kemangkusan suatu perlakuan dalam menekan patogen. Semakin rendah angka AUDPC semakin efektif perlakuan tersebut mengendalikan patogen. AUDPC dihitung menggunakan integrasi trapezoidal dengan rumus (Jeger dan Viljanen-Rollinson 2001):

**Tabel 2. Jumlah perlakuan dalam percobaan kemangkusan biopestisida terhadap intensitas serangan *F. oxysporum* pada anyelir di rumah kaca (*Number of treatments on biopesticide effectiveness to *F. oxysporum* on carnation at glasshouse*)**

Perlakuan ( <i>Treatments</i> )	
Kode lapangan ( <i>Field code</i> )	Nama jenis ( <i>Type</i> )
A1	10% Kas + 10% Mol + BP, Kons 0,1%*
A2	10% Kas + 10% Mol + BP, Kons 0,3%
A3	10% Kas + 10% Mol + BP, Kons 0,5%
A4	10% Kas + 10% Mol + BP, Kons 0,7%
A5	10% Pkd + 10% Mol+ BP, Kons 0,1%
A6	10% Pkd + 10% Mol+ BP, Kons 0,3%
A7	10% Pkd + 10% Mol+ BP, Kons 0,5%
A8	10% Pkd + 10% Mol,+ BP, Kons 0,7%
A9	Dazomet 0,2%
A10	Kontrol (Air ledeng)

**Keterangan (*Remarks*):**

Kas = Kascing (*Vermi compost*)

Mol = Molase (*Molases*)

Pkd = Pupuk kandang kuda (*Horse manure*)

BP = *B. subtilis* + *P. fluorescens*

Konsentrasi formulasi biopestisida yang digunakan mulai 0,1 sampai dengan 0,7%

$$AUDPC = \sum_i^{n-1} \left| \frac{(Y_{i+1} + Y_i)}{2} \right| (t_{i+1} - t_i)$$

di mana:

- $Y_{i+1}$  = Data pengamatan ke- $i + 1$ ,
- $Y_i$  = Data pengamatan ke- $i$ ,
- $t_{i+1}$  = Waktu pengamatan ke- $i + 1$ ,
- $t_i$  = Waktu pengamatan ke- $i$ ,
- $n$  = Jumlah total pengamatan.

**Formulasi dan konsentrasi biopestisida terhadap kolonisasi *B. subtilis*, *P. fluorescens* pada rizosfer, diskolorisasi floem, dan persentase penekanannya**

Kolonisasi *B. subtilis* dan *P. fluorescens* pada akar atau tanah di sekitar rizosfer tanaman anyelir diamati sebelum aplikasi biopestisida dan pada saat panen (umur 120 HST) dengan mengadopsi metode Hsu *et al.* (1994). Akar tanaman sepanjang 2 cm atau 1 g tanah di sekitar rizosfer, dimasukkan ke dalam 9 ml air steril, kemudian dilakukan pengenceran berseri dan pembiakan di atas media King's B selama 48 jam dalam inkubator pada suhu 30°C. Setelah itu populasi *B. subtilis* dan *P. fluorescens* (tidak termasuk bakteri kontaminan) dihitung menggunakan *colony counter* Suntext Model CC-560, nomor seri: 930 801 828.

Serangan penyakit layu *Fusarium* pada anyelir mengakibatkan jaringan floem berwarna coklat atau diskolorisasi floem. Diskolorisasi floem diamati pada saat panen dengan cara memotong batang, yang dimulai dari leher akar sampai titik tumbuh, kemudian batang tersebut dibelah melintang lalu diamati perubahan warna coklat pada floem. Diskolorisasi floem dihitung berdasarkan rumus:

$$a/n \times 100\%$$

di mana:

- $a$  = Panjang bagian floem yang bergejala kecoklatan,
- $n$  = Panjang batang bagian floem dari leher akar sampai titik tumbuh.

Selain parameter pengamatan tersebut dihitung juga persentase penekanan intensitas penyakit dibandingkan dengan perlakuan kontrol. Persentase

penekanan sebagai bahan pertimbangan kriteria efikasi dihitung berdasarkan rumus:

$$PP = (K-T/K) \times 100\%$$

di mana:

- PP = Persentase penekanan,
- K = Kontrol,
- T = Perlakuan.

**HASIL DAN PEMBAHASAN**

**Uji Viabilitas Bahan Aktif dalam Bahan Pembawa Biopestisida**

Pengamatan terhadap viabilitas bahan aktif biopestisida dalam bahan pembawa dan pengukuran pH media dilaksanakan sebanyak tiga kali menggunakan pH meter digital EUTECH nomor seri : 280297, yaitu sebelum fermentasi, 1, dan 2 bulan setelah fermentasi berakhir. Bakteri berkembang dengan baik pada pH normal atau sedikit basa. Dalam penelitian ini pH media setelah dicampur dengan dua spesies bakteri antagonis (sebelum difermentasi) menunjukkan pH 6,7 menjadi 3,4 setelah difermentasi selama 3 minggu. Hal tersebut diduga disebabkan oleh bakteri antagonis pada masa pertumbuhan dan perkembangannya mensekresikan suatu metabolit yang menyebabkan penurunan pH media dari netral (6,7) menjadi pH asam (pH 3,4). Hasil penghitungan populasi agens biokontrol dan pH dalam formulasi disajikan dalam Tabel 3.

Pada Tabel 3 diketahui bahwa populasi bahan aktif (bakteri antagonis) setelah dilakukan proses fermentasi selama 3 minggu, meningkat dibandingkan sebelum fermentasi. Populasi awal bakteri antagonis sebelum fermentasi rerata  $10^7$ - $10^9$  menjadi  $10^{10}$ - $10^{12}$  cfu/ml pada 3 minggu setelah fermentasi. Populasi kedua agens biokontrol tersebut setelah 2 bulan disimpan cenderung stabil yaitu  $10^{10}$ - $10^{11}$  cfu/ml. Hal ini menandakan bahwa bahan pembawa berupa hasil fermentasi bahan organik berupa ekstrak kascing dan molase tidak berpengaruh terhadap bakteri antagonis dari spesies *B. subtilis* dan *P. fluorescens*. Selain itu, pH media juga tidak berpengaruh terhadap dinamika populasi bakteri tersebut. Hal ini mengindikasikan bahwa antara bahan aktif dan bahan pembawa bersifat kompatibel pada kondisi pH 3,4 atau 6,7.

**Tabel 3. Dinamika populasi agens biokontrol dalam berbagai formulasi biopestisida pada 0, 1, dan 2 bulan setelah fermentasi (*Population dynamics of biocontrol agents on biopesticide formulations at 0, 1, and 2 months after fermentation*)**

Jenis formulasi biopestisida sebelum difermentasi ( <i>Type of biopesticide formulations before fermentation</i> )	Dinamika populasi bakteri antagonis pada ... bulan setelah fermentasi ( <i>Population dynamics of bacterial antagonists at ... month before fermentations</i> ), cfu/ml					
	0		1		2	
<b>PH 6,7:</b>						
10% Kas + 10% Mol	B: -	P: -	B: -	P: -	B: -	P: -
10% Pkd + 10% Mol	B: -	P: -	B: -	P: -	B: -	P: -
10% Kas + 10% Mol + BP	B:(7±3)10 <sup>9</sup>	P:(4±1)10 <sup>9</sup>	B:(9±3)10 <sup>8</sup>	P:(2±1)10 <sup>10</sup>	B:(8±3)10 <sup>7</sup>	P:(3±2)10 <sup>9</sup>
10% Pkd + 10% Mol + BP	B:(3±1)10 <sup>7</sup>	P:(9±5)10 <sup>9</sup>	B:(6±2)10 <sup>7</sup>	P:(7±2)10 <sup>10</sup>	B:(7±5)10 <sup>7</sup>	P:(6±3)10 <sup>8</sup>
<b>PH 3,4:</b>						
10% Kas + 10% Mol	B: -	P: -	B: -	P: -	B: -	P: -
10% Pkd + 10% Mol	B: -	P: -	B: -	P: -	B: -	P: -
10% Kas + 10% Mol + BP	B:(9±5)10 <sup>12</sup>	P:(7±2)10 <sup>12</sup>	B:(7±3)10 <sup>12</sup>	P:(7±3)10 <sup>12</sup>	B:(9±6)10 <sup>11</sup>	P:(7±4)10 <sup>11</sup>
10% Pkd + 10% Mol + BP	B:(9±5)10 <sup>10</sup>	P:(9±4)10 <sup>11</sup>	B:(7±2)10 <sup>10</sup>	P:(7±5)10 <sup>11</sup>	B:(6±5)10 <sup>10</sup>	P:(9±5)10 <sup>10</sup>

B = *B. subtilis*      P = *P. fluorescens*

Pembuatan formulasi biopestisida ini menggunakan molase dan ekstrak kascing. Molase dapat berperan sebagai bahan pembawa, pelindung dari sinar matahari, dan sebagai sumber nutrisi. Kandungan utama molase ialah senyawa gula terutama sukrose (Burgess dan Jones 1998). Bahan lain yang dapat digunakan sebagai sumber makanan bagi agens biokontrol selain molase, ialah tepung gandum dan jagung, dedak gandum, kecambah gandum, tepung kedelai, dan gluten jagung (Paau 1998).

Selanjutnya Burgess dan Jones (1998) menyebutkan bahwa molase merupakan salah satu bahan aditif yang paling bermanfaat dan salah satu dari sedikit bahan yang hampir selalu memberikan manfaat positif baik di laboratorium maupun di lapangan. Hal ini kemungkinan disebabkan oleh sifatnya yang multifungsi, yaitu sebagai pelindung matahari, pengental, *fagostimulant*, dan sebagai penutup faktor perlawanan dari daun. Selain itu molase juga dapat berperan sebagai pengawet (preservatif) selama penyimpanan.

Kascing ialah kotoran cacing yang berperan sebagai pupuk organik hasil sekresi cacing *Lumbricus rubellus*. Sebagian besar bahan organik yang dicerna oleh cacing tersebut dikembalikan ke dalam tanah dalam bentuk nutrisi yang mudah dimanfaatkan oleh tanaman dan mikroba. Kascing merupakan bahan yang telah terseleksi

dan mengalami pengayaan selama proses dalam usus cacing tanah, sehingga memiliki keunggulan tersendiri dibanding dengan bahan aslinya (Nusantara et al. 2007).

### Formulasi dan Konsentrasi Biopestisida Organik terhadap Waktu Inkubasi, Intensitas Serangan Layu *Fusarium*, AUDPC, Diskolorisasi Floem, dan Persentase Penekanannya

#### Formulasi biopestisida terhadap waktu inkubasi dan intensitas serangan *F. oxysporum* f. sp. *dianthi* pada anyelir

Serangan *F. oxysporum* f. sp. *dianthi* pada tanaman anyelir menunjukkan gejala luar berupa layu pada sejumlah daun. Hal ini diduga karena terganggunya jaringan xilem ke seluruh bagian tanaman sebagai akibat terjadinya kerusakan jaringan tersebut (Djatnika et al. 2003). Menurut Davis (1969) kelayuan tanaman yang terinfeksi *Fusarium* disebabkan oleh toksin asam fusarat yang diekskresikan oleh patogen tersebut selama proses infeksi. Toksin ini dapat menghambat fungsi mitokondria, dan menekan enzim katalase, serta mengganggu membran sel yang dapat mengakibatkan kebocoran ion.

Pada Tabel 4 tampak bahwa intensitas serangan *F. oxysporum* f. sp. *dianthi* pada tanaman anyelir bervariasi bergantung pada kemangkusan masing-masing perlakuan. Intensitas serangan

**Tabel 4. Waktu inkubasi, intensitas serangan layu *Fusarium*, dan persentase penekan pada anyelir yang mendapat perlakuan beberapa formulasi biopestisida yang berbeda (*Incubation times, disease intensity, and its suppressing on carnation which have had different biopesticide formulation*)**

Perlakuan (Treatments)	W I (Hari)	Intensitas serangan <i>Fusarium</i> pada hari ke ... setelah tanam ( <i>Disease intensity of Fusarium at ... after planting</i> ), %					Penekanan dibanding ( <i>Suppressing</i> ), %	
		36	50	64	78	92	Kon-trol	Da-zomet 0,2%
10% Kas + 10% Mol + BP, kons 0,1%	7	5,00 a*	10,00 a	10,00 a	11,67 b	11,67 b	61,10	-
10% Kas + 10% Mol + BP, kons 0,3%	7	6,67 a	8,33 a	11,67 a	15,00 b	16,67 b	44,43	-
10% Kas + 10% Mol + BP, kons 0,5%	35	0 a	1,67 a	1,67 a	1,67 c	1,67 c	94,43	85,69
10% Kas + 10% Mol + BP, kons 0,7%	7	1,67 a	1,67 a	1,67 a	1,67 c	1,67 c	94,43	85,69
10% Pkd + 10% Mol + BP, kons 0,1%	35	0 a	3,33 a	5,00 a	5,00 c	8,33 bc	72,23	28,62
10% Pkd + 10% Mol + BP, kons 0,3%	7	1,67 a	1,67 a	3,33 a	5,00 c	5,00 c	83,33	57,16
10% Kkd + 10% Mol + BP, kons 0,5%	7	1,67 a	1,67 a	1,67 a	3,33 c	3,33 c	88,90	71,47
10% Kkd + 10% Mol + BP, kons 0,7%	7	3,33 a	3,33 a	3,33 a	3,33 c	3,33 c	88,90	71,47
Dazomet 0,2%	7	3,33 a	5,00 a	10,00 a	10,00 b	11,67 b	61,10	-
Kontrol (Air ledeng)	7	26,67 b	28,33 b	28,33 b	28,33 a	30,00 a	-	-
KK (CV), %		15,07	17,25	15,75	18,95	15,75		

\* Angka rerata yang diikuti huruf yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata menurut Uji Jarak Berganda Duncan pada taraf nyata 5% (*Mean followed by the same letters are not significantly different at 5% level according to Duncan Multiple Range Test*)

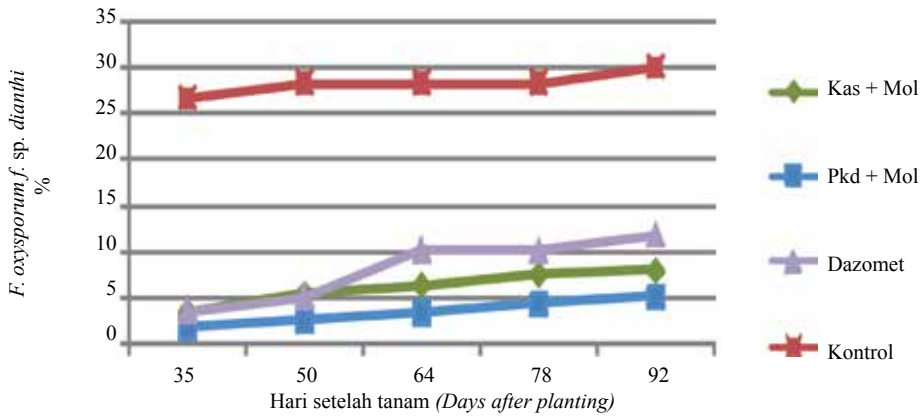
tersebut bergeser antara 0 dan 30%, dengan waktu inkubasi berkisar antara 7 dan 35 HST. Perlakuan *B. subtilis* dan *P. fluorescens* (BaPf) yang disuspensikan masing-masing dengan kascing + molase pada taraf konsentrasi 0,5%, dan pupuk kandang kotoran kuda + molase taraf konsentrasi 0,1%, menunjukkan waktu inkubasi yang paling lama, yaitu 35 hari. Waktu inkubasi terlama kedua ditunjukkan oleh perlakuan lainnya termasuk perlakuan kontrol dan dazomet, yaitu 7 hari.

Pada umur 36-64 HST pengaruh perlakuan BaPf yang disuspensikan ke dalam ekstrak kascing + molase pada konsentrasi 0,5 dan 0,7% dan pupuk kandang kotoran kuda + molase pada konsentrasi 0,5%, secara nyata lebih efektif dibandingkan dengan perlakuan lainnya. Hal ini ditunjukkan oleh rendahnya intensitas serangan pada perlakuan tersebut, berkisar antara 0-1,67%.

Pada umur 78-92 HST, perlakuan BaPf yang disuspensikan dengan kascing + molase pada konsentrasi 0,5 dan 0,7% masing-masing menunjukkan intensitas serangan yang paling rendah, yaitu 1,67% dengan persentase penekanan penyakit dibanding perlakuan kontrol dan dazomet masing-masing sebesar 94,43, 85, dan

69%. Hal ini berarti bahwa kemangkusan kedua perlakuan tersebut lebih stabil bila dibanding dengan perlakuan lainnya.

Dari lima kali pengamatan dapat dilihat bahwa perlakuan BaPf yang disuspensikan ke dalam ekstrak kascing + molase, kemudian difermentasikan dalam biofermentor selama 3 minggu dapat menekan serangan *F. oxysporum* f. sp. *dianthi* pada anyelir. Hal ini disebabkan antibiotik atau toksin yang diproduksi oleh kedua mikroba antagonis (*B. subtilis* dan *P. fluorescens*). Sejalan dengan pendapat tersebut, Hartman *et al.* (1993), Leisinger dan Margraff (1979) melaporkan bahwa bakteri *Pseudomonas* merupakan kelompok terbesar bakteri yang memproduksi antibiotik yang digunakan sebagai agens pengendali hayati patogen pada beberapa patogen tanaman. Misalnya *P. fluorescens* dapat mengendalikan *P. syringae* pv. *phaseolicola* pada buncis (Teliz dan Burkholder 1960) dan *Gaeumannomyces tritici* pada gandum (Thomashow dan Weller 1988), *Ralstonia solanacearum* pada tomat (Mulya 1997), dan *Plasmidiophora brassicae* pada caisin (Hanudin dan Marwoto 2003). *Pseudomonas fluorescens* dapat menurunkan pertumbuhan penyakit busuk pangkal batang yang disebabkan oleh *Pythium* spp. (Gurusidaiah *et al.* 1986).



**Gambar 1.** Perkembangan intensitas serangan *F. oxysporum* f. sp. *dianthi* dengan perlakuan ekstrak kascing, pupuk kandang ditambah isolat *B. subtilis* dan *P. fluorescens*, dazomet, dan kontrol (*Development of *F. oxysporum* f.sp. *dianthi* disease intensity with vermi compost extract, horse manure by added with *B. subtilis* and *P. fluorescens* isolates, dazomet, and control*)

*Bacillus subtilis* dilaporkan dapat menekan serangan *F. oxysporum* f. sp. *dianthi* pada tanaman anyelir sampai dengan 40% (Yuen et al. 1985), penyakit karat pada buncis (Baker et al. 1985), penyakit layu *Verticillium* pada maple (Hall et al. 1986, Hall dan Davis 1990), dan penyakit busuk coklat yang disebabkan oleh *Monilinia fructicola* Wint. pada tanaman peach (Pusey et al. 1986). Sementara *B. subtilis* isolat krisan dapat menekan serangan *damping off* yang disebabkan oleh *Rhizoctonia solani* (Hanudin et al. 2004a), sedang gabungan antara *B. subtilis* dan *P. fluorescens* efektif dapat mengendalikan penyakit layu *Fusarium* pada anyelir sebesar 63,63% (Hanudin et al. 2004b).

Penelitian terhadap tanah-tanah bera bekas tambang di Ohio, Amerika Serikat menunjukkan bahwa penggunaan kascing dapat meningkatkan kadar P dan K tersedia bagi tanaman masing-masing sebesar 16,5 dan 19% (Khairuman dan Amri 2009). Selain itu, kascing mengandung hormon auksin, sitokinin, dan giberelin, serta memiliki kapasitas tukar kation, mampu menyimpan air, dan mengandung populasi jasad hidup yang tinggi (Aira et al. 2006). Dengan adanya unsur-unsur tersebut, tanaman menjadi sehat sehingga dapat menangkal serangan dari organisme pengganggu tumbuhan (OPT) termasuk di dalamnya *F. oxysporum* f. sp. *dianthi* pada anyelir. Serangan *F. oxysporum* f. sp. *dianthi*

**Tabel 5.** Luas areal di bawah kurva perkembangan penyakit *F. oxysporum* f. sp. *dianthi* pada 10 perlakuan jenis komposisi dan konsentrasi biopestisida (*Area under diseases progress curve of *F. oxysporum* f.sp. *dianthi* for the mean of 10 composition and concentration of biopesticides formulations*)

Jenis formulasi ( <i>Kind of formulations</i> )	AUDPC
10% Kas + 10% Mol + BP, kons 0,1%	560,07 c
10% Kas + 10% Mol + BP, kons 0,3%	618,38 c
10% Kas + 10% Mol + BP, kons 0,5%	81,83 a
10% Kas + 10% Mol + BP, kons 0,7%	93,52 a
10% Pkd + 10% Mol + BP, kons 0,1%	244,93 b
10% Pkd + 10% Mol + BP, kons 0,3%	186,69 b
10% Kkd + 10% Mol + BP, kons 0,5%	128,38 ab
10% Kkd + 10% Mol + BP, kons 0,7%	186,48 b
Dazomet 0,2%	455,00 c
Kontrol (Air ledeng)	1.586,55 d*
KK (CV), %	17,69

pada tanaman yang mendapat perlakuan tersebut cenderung lebih rendah bila dibandingkan dengan perlakuan lainnya.

**Luas areal di bawah kurva perkembangan penyakit *F. oxysporum* f. sp. *dianthi***

Pada percobaan ini perlakuan yang menunjukkan *slope* yang paling rendah, tidak selalu menunjukkan angka AUDPC yang paling rendah pula. Perlakuan ekstrak pupuk kandang kotoran kuda ditambah dengan molase dan isolat *B. subtilis*, dan *P. fluorescens* menunjukkan *slope* paling rendah (Gambar 1). Namun nilai AUDPC yang terendah (81,83) ditunjukkan oleh perlakuan ekstrak kascing yang ditambah dengan molase dan isolat *B. subtilis*, *P. fluorescens*, pada taraf konsentrasi 0,5%. AUDPC terendah kedua ditunjukkan oleh perlakuan ekstrak kascing ditambah dengan molase, isolat *B. subtilis*, dan *P. fluorescens* pada taraf konsentrasi 0,7% dengan AUDPC ialah 93,52 (Tabel 5).

**Formulasi dan konsentrasi biopestisida terhadap kolonisasi bakteri antagonis, diskolorisasi floem, dan persentase penekanannya**

Kemangkusan formulasi biopestisida organik berbahan aktif *P. fluorescens* terhadap intensitas

serangan *F. oxysporum* f. sp. *dianthi* pada tanaman anyelir tampaknya dipengaruhi oleh derajat kolonisasi (DK) bakteri antagonis pada rizosfer anyelir. Pada Tabel 6 tampak bahwa perlakuan ekstrak kascing atau pupuk kandang kuda + molase keduanya pada taraf konsentrasi 0,7% menunjukkan DK pada saat panen yang paling tinggi (*B. subtilis*:  $6 \times 10^4$ , *P. fluorescens*:  $7 \times 10^6$  cfu/mg akar untuk ekstrak kascing dan *B. subtilis*:  $7 \times 10^4$ , *P. fluorescens*:  $5 \times 10^6$  cfu/mg akar untuk ekstrak pupuk kandang kuda).

Mekanisme kolonisasi terjadi karena asam amino, asam organik, vitamin, alkaloid, substansi fenolat, serta unsur anorganik seperti kalium, kalsium, magnesium, dan mangan dalam tanaman dimanfaatkan untuk pertumbuhan dan perkembangannya, sehingga kesempatan propagul patogen memanfaatkan senyawa tersebut menjadi berkurang (Tukey 1979 dalam Cook dan Baker 1983). Sejalan dengan pendapat tersebut Hsu *et al.* (1994) melaporkan bahwa *P. fluorescens* dapat mengkolonisasi rizosfer tomat dan menekan serangan *R. solanacearum* hingga 50%. Namun hal tersebut tidak berlaku bagi perlakuan ekstrak kascing + molase pada taraf konsentrasi 0,5%.

**Tabel 6. Kolonisasi *B. subtilis* dan *P. fluorescens* pada rizosfer anyelir sebelum perlakuan dan pada saat panen, diskolorisasi floem, dan persentase penekanannya umur 120 HST (*B. subtilis* and *P. fluorescens* colonization at carnation rhizosphere, phloem discoloration, and its suppression at 120 DAT)**

Perlakuan (Treatments)	Populasi <i>B. subtilis</i> dan <i>P. fluorescens</i> pada rizosfer anyelir (cfu/mg akar) (Population of <i>B. subtilis</i> and <i>P. fluorescens</i> on carnation rhizosphere, cfu/mg roots)				Diskolorisasi floem (Phloem discolorations) %	Penekanan (Suppression) %
	Sebelum perlakuan (Before treatment)		Saat panen (Harvest times)			
10% Kas + 10% Mol + BP, kons 0,1%	B: -	P:(3±2)10 <sup>2</sup>	B:(5±2)10 <sup>3</sup>	P:(7±3)10 <sup>3</sup>	38,61	Ns
10% Kas + 10% Mol + BP, kons 0,3%	B:(2±1)10 <sup>2</sup>	P:(5±2)10 <sup>2</sup>	B:(5±2)10 <sup>3</sup>	P:(6±3)10 <sup>4</sup>	21,66	16,44
10% Kas + 10% Mol + BP, kons 0,5%	B:(7±2)10 <sup>2</sup>	P:(5±3)10 <sup>2</sup>	B:(9±5)10 <sup>3</sup>	P:(2±1)10 <sup>5</sup>	19,08	26,39
10% Kas + 10% Mol + BP, kons 0,7%	B:(3±2)10	P:(5±2)10 <sup>2</sup>	B:(6±3)10 <sup>4</sup>	P:(7±2)10 <sup>6</sup>	17,70	31,71
10% Pkd + 10% Mol + BP, kons 0,1%	B:(7±2)10 <sup>2</sup>	P:(5±3)10 <sup>2</sup>	B:(8±3)10 <sup>3</sup>	P:(7±5)10 <sup>3</sup>	26,31	Ns
10% Pkd + 10% Mol + BP, kons 0,3%	B:(9±7)10 <sup>2</sup>	P:(5±2)10 <sup>2</sup>	B:(7±4)10 <sup>4</sup>	P:(9±5)10 <sup>4</sup>	22,97	11,38
10% Kkd + 10% Mol + BP, kons 0,5%	B:(3±2)10	P:(5±2)10 <sup>2</sup>	B:(2±1)10 <sup>3</sup>	P:(5±2)10 <sup>5</sup>	20,85	19,56
10% Kkd + 10% Mol + BP, kons 0,7%	B:(2±1)10	P:(5±2)10 <sup>2</sup>	B:(7±3)10 <sup>4</sup>	P:(5 ±3)10 <sup>6</sup>	18,87	27,20
Dazomet 0,2%	B:(2±1)10	P(5±2)10 <sup>2</sup>	B:(2 ±1)10	P:(3±2)10 <sup>2</sup>	24,81	4,28
Kontrol (Air ledeng)	B:(2±1)10	P:(4±2)10	B:(2 ±1)10 <sup>2</sup>	P:(3 ±2)10 <sup>2</sup>	25,92	Ns

Ns = Tidak dapat menekan diskolorisasi floem (No suppressing phloem discolorations)

Derajat kolonisasi pada saat panen perlakuan ini rendah bila dibandingkan dengan kedua perlakuan tersebut di atas (*B. subtilis*:  $9 \times 10^3$  dan *P. fluorescens*:  $2 \times 10^5$  cfu/mg akar), tetapi menunjukkan angka AUDPC dan efisiensi yang paling rendah (81,83). Sumardiyono et al. (2001) melaporkan bahwa *P. fluorescens* dapat menekan serangan patogen dengan cara mengimbas gen ketahanan, dengan membentuk senyawa fitoaleksin yang komposisinya terdiri atas asam salisilat. Hal ini sesuai dengan pendapat Kosack dan Jones (1996) yang menyatakan bahwa asam salisilat memberikan sinyal penting dalam mekanisme ketahanan dan menghambat mikroorganisme dalam tubuh tanaman. Diduga adanya akumulasi sinyal asam salisilat terjadi lignifikasi dalam jaringan tanaman anyelir, sehingga tanaman lebih tahan terhadap serangan penyakit layu *Fusarium*.

*Fusarium* dapat menghasilkan enzim pektinmetilesterase, poligalakturonase, dan enzim penghancur lainnya. Enzim-enzim tersebut menyebabkan kerusakan pada dinding sel, sehingga terlihat diskolorisasi pada jaringan yang terinfeksi dan gangguan pertumbuhan, yang mengakibatkan tanaman mati (Waggoner dan Dimond 1985). Perlakuan ekstrak kascing + molase pada taraf konsentrasi 0,7 dan 0,5% masing-masing menunjukkan diskolorisasi floem terendah pertama dan kedua (17,70 dan 19,08%), dengan persentase penekanan masing-masing sebesar 31,71 dan 26,39%.

Apabila dihubungkan antara Tabel 4, 5, dan 6, maka perlakuan ekstrak kascing + molase yang ditambah dengan isolat *B. subtilis* dan *P. fluorescens* pada taraf konsentrasi 0,5% cenderung konsisten dapat menekan *F. oxysporum* f. sp *dianthi* pada anyelir sebanyak 26,39%.

## KESIMPULAN

1. Viabilitas *B. subtilis*, dan *P. fluorescens* setelah dilakukan proses fermentasi selama 3 minggu, meningkat dibandingkan sebelum fermentasi. Populasi kedua agens biokontrol tersebut setelah 2 bulan disimpan cenderung stabil, populasinya berkisar antara  $10^{10}$ - $10^{11}$  cfu/ml.

2. Perlakuan ekstrak kascing + molase yang ditambah dengan isolat *B. subtilis*, dan *P. fluorescens* pada taraf konsentrasi 0,5% cenderung konsisten dapat menekan *F. oxysporum* f.sp *dianthi* pada anyelir.

## UCAPAN TERIMAKASIH

Penulis mengucapkan terima kasih dan penghargaan yang setinggi-tingginya kepada Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian, melalui Puslitbang Hortikultura, dan Balai Penelitian Tanaman Hias yang telah membiayai, memberikan saran, kritik dalam perencanaan dan pelaksanaan penelitian. Penulis mengucapkan terima kasih juga kepada Sdr. Endang Sutarya, Dede Surachman, Muhidin, Dadang Kusnandar, Ade Sulaeman, Iskandar Sanusie, dan semua pihak yang telah membantu terlaksananya penelitian dan pelaporan ini.

## PUSTAKA

1. Aira, M., F. Monroy, and J. Dominguez. 2006. Changes in Microbial Biomass and Microbial Activity of Pig Slurry after the Transit Through the Gut of the Earthworm *Eudrilus eugeniae*. *Biol. Fertil Soil*. 42:371-376.
2. Baker, C. J., R. J. Stavely, and N. Mock. 1985. Biocontrol of Bean Rust by *Bacillus subtilis* under Field Conditions. *Plant. Dis.* 69:770-772.
3. Burges, H.D. and K.A. Jones. 1998. Introduction. In Burges, H.D.(Ed.). *Formulation of Microbial Biopesticides: Beneficial Microorganisms, Nematodes, and Seed Treatments*. Kluwer Academic Publisher, Dordrecht, Netherlands. 127 pp.
4. Cook, R. J. and K. F. Baker. 1983. *The Nature and Practice of Biological Control of Plant Pathogens*. The American Phytopathol. Soc. USA. 539 p.
5. Davis, D. 1969. Fusaric Acid in Selective Pathogenicity of *Fusarium oxysporum*. *Phytopathol.* 59:1391-1395.
6. Djatnika, I., I. Sukmayadi, dan Eliza. 2003. Seleksi Dini Ambon Hijau terhadap Layu *Fusarium* dengan Menggunakan Toksin Asam Fusarat. *Dalam* Suhardi, T., Suganda, dan A.S. Duriat (Eds.) *Proseeding Kongres Nasional PFI XVII, Bandung*. Hlm. 181-184.
7. De Bach, P. A. 1974. *Biological Control by Natural Enemies*. Cambridge University Press. London. 157 pp.
8. Gurusidaiah, S., D. M. Weller, A. Sarkar, and R. J. Cook. 1986. Characterization of Antibiotic Produced by Strain of *Pseudomonas fluorescens* Inhibitory to *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* and *Pythium* spp. *Antimicrob. Agent and Chemoter.* 29:488-495.

9. Hanudin dan B. Marwoto. 2003. Pengendalian Penyakit Layu Bakteri dan Akar Gada pada Tomat dan Caisim Menggunakan *Pseudomonas fluorescens*. *J. Hort.* 13 (1):58-66.
10. \_\_\_\_\_, E. Silvia, B. Marwoto, Suhardi, dan W. Handayati. 2004a. Skrining Antagonistik Beberapa Strain *Bacillus* spp. terhadap *Rhizoctonia solani* Isolat Krisan. *Agrin.* 8(1):1-5.
11. \_\_\_\_\_, B. Marwoto, A. Saefullah, K. Mulya, dan M. Machmud. 2004b. Formula Cair *Pseudomonas fluorescens* untuk Pengendalian Penyakit Layu *Fusarium* pada Anyelir. *J. Hort.* 14 (Eds. *Khusus*):403-409.
12. \_\_\_\_\_, W. Nuryani, dan K. Budiarto. 2008. Effectiveness of *Bacillus subtilis* dan *Pseudomonas fluorescens* in Liquid Formulation to Control Important Diseases on *Chrysanthemum* and Chinese Cabbage. *Agrivita.* 30(3):255-262.
13. \_\_\_\_\_, B. Marwoto, B. Tjahjono, M. Machmud, dan K. Mulya. 2009. Komposisi Biopestisida Cair Berbahan Aktif *Bacillus subtilis* dan *Pseudomonas fluorescens* untuk Pengendalian Penyakit Tanaman Hias dan Tanaman Lainnya. *Sertifikat Paten No. I. D. 0 022 384. Departemen Hukum dan Hak Asasi Manusia, Dirjen Haki.* Jakarta, 12 Januari 2009. 19 Hlm.
14. Hall, T. J., Schreiber, R. L., and Leben, C. 1986. Effect of Xylem-Colonizing *Bacillus* spp. on *Verticillium* Wilt in Maples. *Plant Dis.* 70:521-524.
15. \_\_\_\_\_ and W. E. E. Davis. 1990. Survival of *Bacillus subtilis* in Silver and Sugar Maple Seedlings Over a Two Year Period. *Plant Dis.* 74:608-609.
16. Hartman G. L., W. F. Hong, Hanudin, and A. C. Hayward. 1993. Potential of Biological and Chemical Control of Bacterial Wilt. In Hartman, G. L. and A.C. Hayward. (Eds.). *Bacterial Wilt. Proceeding of an International Conference. ACIAR Procc.* 45:322-326.
17. Hsu, S. T., C. C. Chen, H. Y. Liu, and K. C. Tzeng. 1994. Colonization of Roots and Control of Bacterial Wilt of Tomato by *Pseudomonas fluorescens*. Hartman, G. L., and A. C. Hayward. (Eds.). *Bacterial Wilt. Proceeding of an International Conference. ACIAR Procc.* 45:305-311.
18. Isroi. 2005. Bioteknologi Mikroba untuk Pertanian Organik. Lembaga Riset Perkebunan Indonesia. <http://www.agromeia.net>. [27 Agustus 2010].
19. Jeger, M. J. and S. L. H. Viljanen-Rollinson. 2001. The Use of the Area Under Disease-Progress Curve (AUDPC) to Assess Quantitative Disease Resistance in Crop Cultivars. *Theor Appl Genet.* 102:32- 40.
20. Khairuman dan K. Amri. 2009. Mengeruk Untung dari Beternak Cacing. <http://www.agromedia.net>. [27 Agustus 2010].
21. Komada, H. 1975. Development of a Selective Medium for Quantitative Isolation of *Fusarium oxysporum* from Natural Soils. *Rev. Plant. Prot. Res.* 8:114-125.
22. Kosack, H. K. E. and J. D. Jones. 1996. Resistance Gene-Dependent Plant Defence Response. *Plant Cell.* 7(2):1773 -1786.
23. Leisinger, T. and R. Margraff. 1979. Secondary Metabolites of the Fluorescens *Pseudomonas*. *Microbiol. Rev.* 43:422-442.
24. Loffler, H.J.M., and J.R. Mouris. 1989. Screening for *Fusarium* Resistance in Lily. *Med. Fac. Landbouww. Rijksuniv. Gent.* 54/2b:525-530.
25. \_\_\_\_\_, and P. Rumine. 1991. Virulence and Vegetative Compatibility of Dutch and Italian Isolates *Fusarium oxysporum* f. sp. *lilii*. *J. Phytopathol.* 132:12-20.
26. Manulis, S., A. Kogan, M. Reuven, and Y. B. Yephet. 1994. Use of RAPD Technique for Identification of *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* from Carnation. *Phytopathol.* 84: 98-101.
27. Maryam A. B. N. dan I Djatnika, 1994. Penelitian Pengendalian Hama dan Penyakit Penting pada Tanaman Anyelir Selama Pelita V. Pusat Penelitian dan Pengembangan Hortikultura. Hlm. 57-67.
28. Mulya, K. 1997. Penekanan Perkembangan Penyakit Layu Bakteri Tomat oleh *Pseudomonas fluorescens*. *J. Hort.* 7(2):685-691.
29. Nusantara, A. D., I. Mansyur, C. Kusmana, L.K. Darusman, dan Soedarmadi. 2007. Peran Substrat Alami, Kadar Air, dan Sterilisasi dalam Produksi Spora Melalui Simbiosis *Pueraria javanica* dan *Glomus etunicatum*. *J. Akta Agrosia. Edisi Khusus* (2):204-212.
30. Paau, A. S. 1998. Formulation of Beneficial Organisms Applied to Soil. In Burges, H.D. (Ed.). *Formulation of Microbial Biopesticides: Beneficial Microorganisms, Nematodes, and Seed Treatments.* Kluwer Academic Publishes, Dordrecht, Netherlands. p. 235-254.
31. Pusey, P.L., C.L. Wilson, M.W. Hotchkiss, and J.D. Franklin. 1986. Compatibility of *Bacillus subtilis* for Postharvest Control of Peach Brown Rot with Commercial Fruit Waxes, Dicloran, and Cold-Storage Conditions. *Plant Dis.* 70:587-590.
32. Sumardiyono, C., S.M. Widyastuti, dan Y. Assi. 2001. Pengimbasan Ketahanan Pisang terhadap Penyakit Layu Fusarium dengan *Pseudomonas fluorescens*. Dalam Purwantara, A. (Ed.) *Prosiding Kongres Nasional XVI dan Seminar Ilmiah Perhimpunan Fitopatologi Indonesia.* Bogor, 22-24 Agustus 2001. Hlm. 257-259.
33. Suryana, A dan D. Cahyono. 2008. Teknologi Pembuatan Pupuk dan Biopestisida Organik. *Diklat Peningkatan Kompetensi Pegawai dan Guru Bidang Keahlian Pertanian Organik.* Departemen Bioteknologi dan Lingkungan. Departemen Pendidikan Nasional. 21 – 29 Juli 2008. 37 Hlm.
34. Straathof, T.P., Jansen, J., and H.J.M. Loffler. 1993. Determination of Resistance to *Fusarium oxysporum* in Liliun. *Phytopathol.* 83:568-572.
35. Teliz, O. M. and W. H. Brukholder. 1960. A Strain of *Pseudomonas fluorescens* Antagonistics to *Pseudomonas phaseolicola* and Other Bacterial Plant Pathogen. *Phytopathol.* 50:119-123.
36. Thomashow, L.S. and D.M. Weller. 1988. Role of Penazine Antibiotic from *Pseudomonas fluorescens* in Biological Control of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*. *J. Bacteriol.* 170:3499-3508.
37. Waggoner, P.E. and A.E. Dimond. 1985. Production and Role of Extracellular Dectic Enzyme of *Fusarium oxysporum*. *Phytopathol.* 45:79-87.

38. Yephet, B. Y., M. Reuven, A. Zviebil, and D. Shinberg. 1996. Effect of Initial Inoculum and Cultivar Resistance on Incidence of *Fusarium* Wilt and Population Densities of *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* on Carnations and in Soil. *Phytopathol.* 86: 751-756.
39. Yuen, G. Y., M. N. Schroth, and McCain, A. H. 1985. Reduction of *Fusarium* Wilt of Carnation with Suppressivesoils and Antagonistic Bacteria. *Plant Disease.* 69:1071-1075.