

Komposisi Formula Biobakterisida Berbahan Aktif Rizobakteri untuk Pengendalian Penyakit Busuk Lunak Pada Anggrek *Phalaenopsis* (Formula Composition of Biobactericide With Active Ingredient Rhizobacteria for Controlling Bacterial Soft Rot On *Phalaenopsis* Orchids)

Hanudin¹⁾, Nawangsih, AA²⁾, Marwoto, B¹⁾, dan Tjahjono, B²⁾

¹⁾Balai Penelitian Tanaman Hias, Jl. Raya Ciherang-Pacet, Cianjur 43253

²⁾Departemen Proteksi Tanaman, Fakultas Pertanian, Institut Pertanian Bogor, Jl. Kamper, Dramaga, Bogor 16680

E-mail: hanudin_handjar09@yahoo.com

Naskah diterima tanggal 27 Mei 2013 dan disetujui untuk diterbitkan tanggal 9 September 2013

ABSTRAK. Penyakit busuk lunak (PBL) yang disebabkan oleh *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* atau *Pseudomonas viridiflava* merupakan kendala utama dalam budidaya anggrek. Serangan patogen tersebut sangat merugikan petani, mengingat biaya investasi produksi anggrek tergolong tinggi. Oleh karena itu patogen tersebut harus dikendalikan menggunakan metode pengendalian yang ramah lingkungan, yaitu dengan mengaplikasikan biobakterisida berbahan aktif rizobakteri, seperti *Bacillus subtilis* dan *Pseudomonas fluorescens*. Tujuan penelitian ini ialah (1) mendapatkan komposisi bahan aktif dan bahan pembawa biobakterisida yang efektif mengendalikan penyakit busuk lunak pada anggrek *Phalaenopsis*, (2) mengetahui perubahan reaksi kimia formula biobakterisida dan pertumbuhan populasi bahan aktif (rizobakteri *B. subtilis* dan *P. fluorescens*) pada kondisi sebelum dan setelah difermentasikan, dan (3) mengetahui kompatibilitas antara *B. subtilis*, *P. fluorescens*, dan bahan pembawa biobakterisida. Percobaan dilaksanakan mulai Bulan Mei sampai dengan Desember 2009 di Laboratorium Bakteriologi Departemen Proteksi Tanaman, Institut Pertanian Bogor, dan Laboratorium Bakteriologi serta Rumah Kaca, Balai Penelitian Tanaman Hias, di Segunung, Cianjur, Jawa Barat. Ruang lingkup penelitian meliputi pembuatan propagul rizobakteri sebagai bahan aktif biobakterisida, pembuatan formula biobakterisida, uji viabilitas bahan aktif, dan uji kemangkusan biobakterisida pada tanaman anggrek di rumah kaca. Hasil penelitian menunjukkan bahwa (1) perlakuan gabungan antara *B. subtilis* B12 dan *P. fluorescens* Pf10 yang difermentasikan dalam media ekstrak kotoran cacing (kascing) dan molase, merupakan perlakuan yang konsisten dapat menekan PBL pada anggrek *Phalaenopsis* dengan persentase penekanan sebesar 80%, (2) reaksi kimia formula biopestisida pada kondisi sebelum dan setelah fermentasi diindikasikan dengan perubahan pH basal medium yang sebelum fermentasi menunjukkan pH 3,75 dan berubah menjadi pH 3,50 setelah difermentasikan. Pertumbuhan populasi mikrob antagonis setelah fermentasi meningkat secara signifikan bila dibandingkan pada kondisi sebelum difermentasikan, dan (3) isolat bahan aktif (*B. subtilis* dan *P. fluorescens*) bersifat kompatibel dengan bahan pembawanya (ekstrak kascing dan molase).

Katakunci: *Phalaenopsis*; Biobakterisida; Rizobakteri; *Bacillus subtilis*; *Pseudomonas fluorescens*; Pengendalian; Busuk lunak; *Pseudomonas viridiflava*

ABSTRACT. Soft rot disease (SRD) caused by *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* or *Pseudomonas viridiflava* are a major constraint on production system of orchid *Phalaenopsis*. Alternative control measures that are environmentally friendly has to be applied. Biobactericide containing rhizobacteria *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas fluorescens* are the most promising one. The aims of this study were (1) to obtain the formula composition of biopesticide giving most effective to control soft rot diseases on *Phalaenopsis*, (2) to determine the chemical reaction and population growth of *B. subtilis* and *P. fluorescens* on the conditions before and after fermented, and (3) to find out the compatibility between *B. subtilis*, *P. fluorescens*, and its carrier biobactericide. The research was conducted from May to December 2009 at Laboratory of Plant Protection Department, Bogor Agricultural University, and Bacteriology Laboratory and Greenhouse of Indonesian Ornamental Crops Research Institute in Segunung, Cianjur, West Java. The scope of this research were (a) multiplication of rizobacteria propagules as an active ingredient of biobactericide, (b) making biobactericide formulation, (c) testing viability of active ingredient, and (d) effectiveness test of biobactericide on orchid plants in the greenhouse. The results showed that (1) the composition of biobactericide formulation consisted of *B. subtilis*, *P. fluorescens*, vermicompost extract, and molasses was the highest effective to control *P. viridiflava* on orchids plants, with suppressing by 80%, (2) chemical biopesticide was changed before and after fermentation indicating by changes in pH from 3.75 to 3.50. The rhizobacteria population growth after fermentation increased significantly when it was compared to pre-fermentation, and (3) the active ingredient isolates (*B. subtilis* and *P. fluorescens*) were compatible with the carrier material (vermicompost extract and molasses).

Keywords : *Phalaenopsis*; Biobactericide; Rhizobacteria; *Bacillus subtilis*; *Pseudomonas fluorescens*; Control; Soft rot; *Pseudomonas viridiflava*

Patogen busuk lunak (PBL) yang disebabkan oleh *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* (Ecc) Jones, *E. carotovora* subsp. *atroseptica* (Eca) van Hall,

dan *pectolitik Pseudomonas* seperti *Pseudomonas fluorescens*, *P. marginalis*, dan *P. viridiflava*, merupakan penyakit utama pada tanaman sukulen seperti anggrek,

kubis, wortel, dan lain-lain (Gonzales *et al.* 2003). Khusus untuk *P. fluorescens* selain bersifat patogenik terhadap tanaman, spesies mikrob ini dapat pula bersifat sebagai agens pengendali hayati pada berbagai patogen tanaman (Hanudin *et al.* 2012).

Pada saat ini nama spesies Erwinia penyebab PBL diusulkan oleh Samson *et al.* (2005) untuk diubah menjadi *Dickeya dadantii* (syn. *E. chrysanthemi*), *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (syn. *E. carotovora* subsp. *carotovora*), dan *P. carotovorum* subsp. *atrosepticum* (syn. *E. carotovora* subsp. *atroseptica*). Berdasarkan hasil identifikasi Joko *et al.* (2010), PBL pada anggrek yang berasal dari DKI Jakarta, Jawa Barat, dan DIY Yogyakarta disebabkan oleh *D. dadantii* dan *P. fluorescens*. Kedua patogen tersebut ditularkan melalui benih (biji), tanah, air irigasi, dan dapat menimbulkan kehilangan hasil tanaman anggrek berkisar antara 50–80% (Hanudin & Rahardjo 2011, Cating & Palmateer 2011). Hal ini sangat merugikan petani, mengingat investasi biaya produksi anggrek tergolong tinggi. Oleh karena itu kedua patogen tersebut harus dikendalikan menggunakan metode pengendalian yang ramah lingkungan.

Pemberlakuan ISO 14000 tentang kesehatan pangan dan lingkungan pada era perdagangan bebas serta pertanian berkelanjutan, memicu penerapan budidaya tanaman yang ramah lingkungan. Untuk menunjang program tersebut, penggunaan mikrob yang berasosiasi secara alami pada akar tanaman inang dan berkemampuan untuk memperbaiki pertumbuhan serta mengendalikan patogen tanaman atau *plant growth promoting rhizobacteria* (PGPR), sangat dianjurkan. *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus* sp., dan *Serratia* spp. merupakan rizobakteri yang hidup pada sistem perakaran tanaman inang, berpotensi sebagai agens pengendali patogen pada berbagai tanaman (Sutariati & Wahab 2010, Taufiq *et al.* 2010), dan dapat digunakan sebagai bahan aktif biopestisida (Djatnika 2012). Rizobakteri *Pseudomonas* dari kelompok *fluorescens* yang dikombinasikan dengan *B. subtilis* yang diformulasi dalam bentuk biopestisida cair, efektif mengendalikan penyakit akar bengkak (*Plasmiodiophora brassicae* Worr. dan *Ralstonia solanacearum* EF Smith) pada tanaman caisim dan tomat (Hanudin & Marwoto 2003), dan penyakit rebah kecambah (*Pythium aphanidermatum*) pada tanaman cabai (Nakkeeran *et al.* 2006).

Sebagian para ahli fitopatologi beranggapan bahwa biopestisida hanya efektif mengendalikan berbagai patogen pada percobaan dengan skala laboratorium, tetapi seringkali gagal ketika diaplikasikan di lapangan. Bahan aktif biopestisida (rizobakteri) mengalami

penurunan populasi dengan cepat apabila dihadapkan langsung pada kondisi yang tidak menguntungkan bagi kehidupannya. Oleh karena itu jenis formulasi dan komposisi formula biopestisida memegang peranan penting dalam meningkatkan keefektifannya di lapangan. Jones & Burges (1998) menyebutkan empat fungsi utama formulasi biopestisida, yaitu (1) untuk menstabilkan organisme (rizobakteri bahan aktif biopestisida) selama proses produksi, distribusi, dan penyimpanan, (2) untuk memudahkan dalam penanganan dan aplikasi produk, sehingga mudah didistribusikan pada sasaran dalam bentuk dan sifat yang terbaik, (3) untuk melindungi agens hayati dari faktor lingkungan yang membahayakan pada tempat sasaran, dalam hal ini meningkatkan persistensi, dan (4) untuk meningkatkan aktivitas mikroorganisme melalui peningkatan aktivitas, reproduksi, kontak, dan interaksi dengan hama atau organisme penyebab penyakit sasaran.

Pada tahun 2003 Balai Penelitian Tanaman Hias (Balithi) telah merakit biopestisida yang diberi nama Prima BAPF (Hanudin *et al.* 2008). Biopestisida tersebut berbahan aktif rizobakteri *B. subtilis* (nomor isolat BHN 4) dan *P. fluorescens* (nomor isolat Pf 18) dengan bahan pembawa anorganik (parafin hidrokarbon). Sehubungan dengan kebijakan pemerintah mengenai penerapan program pertanian yang berwawasan lingkungan (*green agriculture*), komposisi biopestisida tersebut harus disempurnakan. Oleh karena itu, tulisan ini menginformasikan mengenai penyempurnaan komposisi formula biopestisida tersebut. Penyempurnaan formula biopestisida dilakukan dengan mengadopsi dan memodifikasi metode Hanudin *et al.* (2009) dan Suryana & Cahyono (2008) yang telah berhasil mengkomersilkan pupuk dan biopestisida cair organik yang diberi nama dagang Biovermi. Hal tersebut dilakukan agar formula biopestisida yang dibuat lebih efektif, efisien, tahan lama disimpan, berspektrum luas, dan ramah lingkungan.

Tujuan penelitian ini ialah (1) mendapatkan komposisi bahan aktif dan bahan pembawa biopestisida yang efektif mengendalikan penyakit busuk lunak pada anggrek *Phalaenopsis*, (2) mengetahui perubahan reaksi kimiawi formula biopestisida dan pertumbuhan populasi bahan aktif (rizobakteri *B. subtilis* dan *P. fluorescens*) pada kondisi sebelum dan setelah difermentasikan, dan (3) mengetahui kompatibilitas dan viabilitas antara *B. subtilis*, *P. fluorescens*, dan bahan pembawa biopestisida.

Hipotesis yang diajukan pada penelitian ini ialah (1) komposisi isolat *B. subtilis*, *P. fluorescens*, dan ekstrak kascing yang ditambah molase efektif mengendalikan

penyakit busuk lunak pada anggrek *Phalaenopsis*, (2) terjadi perubahan sifat kimiawi formula biopestisida dan populasi rizobakteri pada kondisi setelah difermentasikan, dan (3) isolat *B. subtilis*, *P. fluorescens*, dan bahan pembawa biopestisida yang digunakan dalam penelitian ini bersifat kompatibel.

BAHAN DAN METODE

Penelitian dilakukan di Laboratorium Bakteriologi, Departemen Hama dan Penyakit Institut Pertanian Bogor (Lab HPT - IPB) dan Laboratorium serta Rumah Kaca Balai Penelitian Tanaman Hias, di Segunung (1.100 m dpl), dari Bulan Mei sampai dengan Desember 2009. Bahan-bahan penelitian yang digunakan antara lain ialah isolat rizobakteri, isolat *P. viridiflava*, bahan pembawa biopestisida berupa ekstrak kascing, molase, dan lain-lain. Ruang lingkup penelitian ini meliputi: pembuatan propagul rizobakteri sebagai bahan aktif biobakterisida, perbanyakan massal, dan komposisi bahan pembawa biopestisida, uji viabilitas, serta kompatibilitas biobakterisida berbahan aktif rizobakteri serta uji kemangkusan biobakterisida terhadap PBL pada anggrek *Phalaenopsis*.

Pembuatan Propagul Rizobakteri Sebagai Bahan Aktif Biobakterisida

Propagul rizobakteri disiapkan dengan cara sebagai berikut. Biakan murni *B. subtilis* nomor isolat Bs 12, yang diperoleh dari koleksi Lab. HPT – IPB ditumbuhkan pada media nutrisi agar. *Pseudomonas fluorescens* nomor isolat Pf10 yang diperoleh dari koleksi Laboratorium Bakteriologi Balithi ditumbuhkan pada media King's B (KB = komposisi per liter terdiri atas 20 g protease pepton # 3 (difco), 10 g gliserol, 1,5 g K_2HPO_4 , 1,5 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 15,0

g bacto agar dan 1 l air steril) yang mengandung 0,01 M $FeCl_3$, kemudian diinkubasikan dalam inkubator bersuhu $30 \pm 2^\circ C$ selama 24 jam. Setelah itu biakan diambil sebanyak tiga loop penuh lalu disuspensikan ke dalam 10 ml air steril, dikocok menggunakan vorteks supaya homogen, sehingga terbentuk suspensi dengan kerapatan 10^{12} cfu/ml. Satu ml suspensi isolat tersebut dituangkan ke dalam 500 ml media *nutrien broth* (NB) di dalam erlenmeyer berkapasitas 750 ml, kemudian dimasukkan ke dalam penangas air bersuhu $30^\circ C$ sambil digoyang pada kecepatan 3 rpm selama 24 jam. Koloni rizobakteri kemudian dipanen dengan sentrifugasi dan disuspensikan ke dalam akuades steril. Selanjutnya 10% dari larutan propagul tadi dimasukkan ke dalam media perbanyakan massal (Hanudin *et al.* 2009).

Perbanyakan Massal dan Komposisi Formulasi Bahan Pembawa Biopestisida

Perbanyakan massal bahan pembawa biopestisida dilakukan menggunakan bahan organik. Hal ini dilakukan dengan memodifikasi metode Suryana & Cahyono (2008) dalam pembuatan pupuk organik cair yang diberi nama dagang Biovermi. Komposisi bahan pembawa biopestisida tersebut terdiri atas kotoran cacing (kascing), molase, isolat rizobakteri, dan air ledeng. Kascing direndam di dalam air steril selama 3 hari, kemudian disaring, lalu air hasil saringan dicampur dengan 10% molase dan produk ini disebut basal medium. Selanjutnya basal medium biopestisida organik cair, disterilkan menggunakan *autoclave* pada suhu $115^\circ C$ pada tekanan 1,5 psi selama 15 menit. Setelah basal medium selesai dibuat kemudian 10% suspensi rizobakteri kerapatan 10^9 cfu/ml dituangkan secara aseptis ke dalam basal medium sesuai perlakuan, selanjutnya difermentasikan



Gambar 1. Biofermentor sederhana yang digunakan untuk fermentasi biopestisida organik cair (*Simple biofermentor was used for biopesticide fermentation*)

menggunakan biofermentor sederhana, dengan mesin penggerak aerator merek Resun LP-40 (Gambar 1) selama 15 hari. Prinsip kerja alat ini (aerator merek Resun LP-40) ialah memberikan udara (melalui aerator) ke dalam tabung yang berisi larutan kalium permanganat (sebagai sterilan), kemudian udara yang keluar disaring kembali dalam corong saringan yang berisi *rock wool* steril. Hasil akhir proses ini ialah udara steril yang disalurkan ke dalam jerigen plastik yang berisi biopestisida hasil invensi.

Biopestisida hasil invensi disimpan pada suhu ruang ($25 \pm 2^\circ\text{C}$), kemudian dari tiap perlakuan diambil 100 ml untuk diuji viabilitas dan kompatibilitasnya.

Uji Viabilitas dan Kompatibilitas Biobakterisida Berbahan Aktif Rizobakteri

Viabilitas ialah kemampuan suatu mikroba untuk tumbuh dan berkembang dalam suatu media pada kondisi tertentu, sedangkan kompatibilitas merupakan sifat dari mikroba untuk hidup bersama pada satu tempat yang tidak merugikan bagi kehidupan mikroba lainnya. Pengujian viabilitas dilakukan melalui pengenceran berseri berdasarkan metode Hsu *et al.* (1994) yang dimodifikasi, sedangkan kompatibilitas dihitung berdasarkan viabilitas bahan aktif dalam bahan pembawa pada kurun waktu yang ditentukan. Pengamatan viabilitas bahan aktif dilaksanakan sebanyak tiga kali, yaitu sebelum fermentasi, sesaat setelah fermentasi berakhir (1 hari setelah fermentasi), dan 1 bulan setelah fermentasi.

Percobaan dirancang menggunakan rancangan acak lengkap dengan 12 perlakuan, dua ulangan (duplo). Perlakuan-perlakuan tersebut disajikan pada Tabel 1. Kriteria kompatibilitas bahan aktif terhadap bahan pembawa didasarkan pada kemampuan dua spesies rizobakteri (*B. subtilis* dan *P. fluorescens*)

untuk bertahan hidup di dalam satu media formula biobakterisida pada kondisi tertentu tanpa menekan salah satu spesies lainnya (*B. subtilis* atau *P. fluorescens*) dan efektif mengendalikan PBL pada *Phalaenopsis*. Populasi rizobakteri (tidak termasuk bakteri kontaminan) dihitung menggunakan *colony counter* Suntex Model CC-560 dengan nomor seri : 930 801 828.

Isolat PBL yang Digunakan

Isolat PBL yang digunakan ialah *P. viridiflava* nomor isolat Ph - 7 yang dikoleksi oleh Laboratorium Bakteriologi Balithi di Segunung (Hanudin & Rahardjo 2011). Isolat tersebut digoreskan pada media King's B (KB) menggunakan jarum ose, kemudian inkubasikan ke dalam inkubator pada suhu $32 \pm 2^\circ\text{C}$ selama 24 jam. Isolat *P. viridiflava* pada media KB menunjukkan warna koloni hijau berpendar (*fluorescent*) bila disinari lampu ultra violet (Leliot & Stead 1987). Isolat *P. viridiflava* dipanen dengan cara mengambil tiga loop penuh koloni bakteri, kemudian disuspensikan ke dalam 10 ml air steril, dikocok menggunakan vorteks supaya homogen, sehingga terbentuk suspensi dengan kerapatan 10^{12} cfu/ml. Suspensi bakteri patogen selanjutnya digunakan untuk menginokulasi daun anggrek pada uji kemangkusan biobakterisida.

Uji Kemangkusan Biobakterisida Terhadap PBL Pada Anggrek *Phalaenopsis*

Uji kemangkusan biopestisida dilakukan di Rumah Kaca Bakteriologi Balai Penelitian Tanaman Hias di Segunung, dengan unit percobaan yang digunakan ialah tanaman anggrek. Varietas anggrek *Phalaenopsis* maryclone KHM 246 Q yang berbunga putih diperoleh dari PT. Eka Karya Graha Flora di Sukabumi. Anggrek ditanam di dalam pot plastik, berdiameter 20 cm yang berisi campuran spagnum, pakis, dan arang. Setiap pot

Tabel 1. Jenis perlakuan medium pembawa yang digunakan untuk uji viabilitas dan kompatibilitas bahan aktif dalam bahan pembawa (Type of treatment used medium carrier to test the viability and compatibility of the active ingredient in the material carrier)

Perlakuan (Treatments)	Keterangan (Remarks)
Basal medium (Ekstrak kascing)	
Basal medium + Bs	
Basal medium + Pf	
Basal medium + Bs + Pf	
Molase 10%	
Molase 10% + Bs	
Molase 10% + Pf	
Molase 10% + Bs + Pf	
Basal medium + Molase 10%	
Basal medium + Molase 10% + Bs	
Basal medium + Molase 10% + Pf	
Basal medium + Molase 10% + Bs + Pf	

Satu perlakuan ditempatkan dalam satu petridish. Setiap perlakuan dilakukan secara duplo.
Bs = *Bacillus subtilis*
Pf = *Pseudomonas fluorescens*



Gambar 2. Cara inokulasi patogen dan aplikasi biopestisida, pelukaan daun dengan *syringe* (kiri atas), pelukaan dilakukan serempak (kanan atas), penyemprotan patogen dan biopestisida (kiri bawah), dan penomoran daun contoh sesuai perlakuan (*Method of pathogen inoculation and application of biopesticide, wounding leaves with a syringe (top left), wounding by simultaneous (top right), spraying the pathogen and biopesticide (bottom left), and the numbering of the leaf samples according to treatment (bottom right)*)

terdiri atas satu individu tanaman anggrek, dan setiap perlakuan terdiri atas tiga tanaman, sehingga total tanaman yang digunakan sebanyak 168 individual pot. Dari setiap tanaman diambil dua daun contoh (yaitu daun kedua dan ketiga dari atas), sehingga jumlah daun contoh yang digunakan pada percobaan ini sebanyak 336 helai daun.

Daun anggrek diinokulasi PBL dengan cara *pin pricking* (Hanudin & Rahardjo 2011), yaitu setiap daun contoh ditusuk dengan *hypodermic syringe* (jarum suntik) berdiameter 10 mm secara diagonal sebanyak lima tusukan, kemudian disemprot dengan suspensi *P. viridiflava* (kepadatan inokulum 10^8 – 10^9 cfu/ml). Setelah 15 menit, biobakterisida berbahan aktif rizobakteri diaplikasikan dengan cara disemprotkan secara merata pada daun anggrek sesuai dengan perlakuan (Gambar 2).

Percobaan menggunakan rancangan acak kelompok dengan empat ulangan. Perlakuan yang diuji meliputi komposisi formulasi seperti tercantum pada Tabel 1, ditambah dengan masing-masing satu perlakuan pembanding (streptomisin sulfat) dan kontrol (air steril), sehingga jumlah seluruhnya 14 perlakuan.

Pengamatan dilakukan setiap hari dengan peubah meliputi (1) peluang terjadinya penyakit (jumlah titik yang menunjukkan gejala dibagi dengan jumlah titik

inokulasi) dan (2) perkembangan gejala penyakit (diameter gejala). Data yang diperoleh dianalisis secara statistik dengan ANOVA menggunakan SPSS 15. Untuk mengetahui perbedaan di antara perlakuan, dilakukan uji jarak berganda Duncan pada taraf nyata 95%.

Selain parameter pengamatan tersebut, dihitung juga luas areal di bawah kurva perkembangan penyakit (AUDPC) dan persentase penekanan intensitas penyakit dibandingkan dengan perlakuan kontrol. Persentase penekanan sebagai bahan pertimbangan kriteria efikasi dihitung berdasarkan rumus:

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

dimana:

PP = Persentase penekanan,

K = Kontrol,

T = Perlakuan.

Luas Areal di Bawah Kurva Perkembangan Penyakit Busuk Lunak

Area under disease progress curve (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 & Viljanen-Rollinson (2001), yaitu:

Y_{i+1} = Data pengamatan ke $i + 1$,

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

Y_i = Data pengamatan ke i ,

t_{i+1} = Waktu pengamatan ke $i + 1$,

t_i = Waktu pengamatan ke i ,

n = Jumlah total pengamatan.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Reaksi Kimiawi Formula Biobakterisida dan Populasi Rizobakteri Sebelum dan Setelah Difermentasikan

Fermentasi merupakan perombakan senyawa kompleks menjadi senyawa lebih sederhana yang dilakukan oleh enzim dalam suasana terkendali (Shofyan 2010). Enzim dapat berasal dari tubuh makhluk hidup seperti ikan atau mikroba (bakteri, cendawan, dan ragi). Senyawa kompleks terdiri atas karbohidrat, protein, dan lemak. Karbohidrat diubah oleh enzim menjadi glukosa, protein diubah menjadi asam amino, dan lemak diubah menjadi asam lemak dan gliserol. Di samping itu, jumlah populasi mikroba antagonis sebelum dan sesudah fermentasi dapat berubah pula.

Pada penelitian ini sumber senyawa kompleks berupa karbohidrat berasal dari bahan organik berupa molase (gula tetes tebu atau sukrosa) dan ekstrak kotoran cacing (kascing), sedangkan sumber enzim diperoleh dari rizobakteri (*B. subtilis* dan *P. fluorescens*). Terjadinya reaksi kimiawi formula biopestisida diindikasikan oleh perubahan pH pada kondisi sebelum dan setelah pencampuran rizobakteri dengan bahan pembawa biobakterisida. Hal itu menunjukkan terjadinya proses fermentasi bahan organik oleh enzim rizobakteri. Basal media berupa ekstrak kascing dan molase setelah dicampur dengan dua spesies rizobakteri (sebelum difermentasi) menunjukkan pH 3,75 dan berubah menjadi pH 3,50 setelah difermentasi selama 15 hari. Penurunan pH terjadi karena pada proses fermentasi dihasilkan etanol yang bersifat asam. Sehubungan dengan hal tersebut Wikipedia (2010) melaporkan bahwa reaksi kimiawi dalam proses fermentasi berbeda-beda bergantung pada jenis gula yang digunakan dan produk yang dihasilkan. Secara singkat, glukosa ($C_6H_{12}O_6$) yang merupakan gula paling sederhana, melalui fermentasi akan menghasilkan etanol ($2C_2H_5OH$). Reaksi fermentasi ini dilakukan oleh mikroba dan digunakan pada

produksi makanan. Persamaan reaksi kimianya ialah $C_6H_{12}O_6 \rightarrow 2C_2H_5OH + 2CO_2 + 2ATP$ (energi yang dilepaskan 118 kJ per mol). Dijabarkan sebagai gula (glukosa, fruktosa, atau sukrosa) \rightarrow alkohol (etanol) + karbon dioksida + energi (ATP). Di samping itu pertumbuhan populasi rizobakteri setelah fermentasi meningkat secara signifikan bila dibandingkan pada kondisi sebelum difermentasikan. Populasi rizobakteri sebelum fermentasi berkisar antara $10^5 - 10^6$ cfu/ml, dan setelah difermentasikan meningkat menjadi $10^7 - 10^{12}$ cfu/ml (Tabel 2). Kejadian tersebut terjadi diduga karena rizobakteri *B. subtilis* dan *P. fluorescens* mendapatkan energi dari hasil proses fermentasi. Hal ini berarti bahwa penurunan pH media bahan pembawa biobakterisida, berpengaruh positif bagi pertumbuhan dan perkembangan rizobakteri tersebut.

Uji Viabilitas dan Kompatibilitas Biobakterisida Berbahan Aktif Rizobakteri

Tolok ukur pengujian viabilitas bahan aktif biobakterisida didasarkan pada pertumbuhan populasi rizobakteri di dalam media bahan pembawa, sedangkan penilaian kompatibilitas didasarkan pada reaksi yang tidak merugikan dari kedua atau lebih material yang ditempatkan di dalam satu wadah. Data hasil penghitungan populasi bahan aktif biopestisida dalam formulasi menunjukkan bahwa populasi rizobakteri setelah dilakukan proses fermentasi selama 15 hari cenderung meningkat dibandingkan sebelum fermentasi (Tabel 2). Pertumbuhan populasi *P. fluorescens* yang difermentasikan secara tunggal dalam ekstrak kascing ($1 \pm 0,4$) $\times 10^6$ cfu/ml atau molase ($1 \pm 0,4$) $\times 10^6$ cfu/ml, meningkat lebih cepat dibandingkan dengan *B. subtilis* yang difermentasikan pada perlakuan yang sama.

Populasi *B. subtilis* yang difermentasikan pada ekstrak kascing dan molase masing-masing sebesar ($1 \pm 0,2$) $\times 10^{10}$ cfu/ml. Namun, perlakuan gabungan antara *B. subtilis* Bs12 dan *P. fluorescens* Pf10 yang difermentasikan pada media gabungan dalam ekstrak kascing dan molase, populasinya sama yaitu 10^{12} cfu/ml (Tabel 2).

Hal ini berarti bahwa antara rizobakteri (bahan aktif biopestisida) dan gabungan antara ekstrak kascing dan molase (bahan pembawa biopestisida) bersifat kompatibel. Menurut Suryana & Cahyono (2008) apabila dua atau lebih spesies mikroba ditempatkan dalam suatu wadah dan mikroba tersebut tidak saling menghambat, maka mikroba tersebut bersifat kompatibel.

Uji Kemangkusan Biopestisida Terhadap PBL Pada Anggrek *Phalaenopsis*

Gejala PBL dapat muncul pada seluruh bagian tanaman, tetapi umumnya terjadi pada daun. Pada

Tabel 2. Perubahan reaksi kimia (pH) basal medium dan populasi rizobakteri pada kondisi sebelum dan setelah difermentasikan (*Chemical reaction alteration on basal medium (pH) and rhizobacteria population before and after fermented condition*)

pH dan komposisi formulasi biopestisida (pH and composition of biopesticide formulations)	Populasi awal rizobakteri dan pH formulasi biobakterisida sebelum, 0, dan 1 bulan setelah pembuatan atau fermentasi (<i>Early population of rhizobacteria and pH biobactericide formulation before 0 and 1 month after made or fermentation</i>), cfu/ml		
	Populasi awal (1 hari setelah pembuatan formulasi biobakterisida) (<i>Early population (1 day after made biobactericide formulation)</i>)	Populasi pada 0 bulan (1 hari setelah fermentasi) (<i>Population at 0 month (1 day after biobactericide fermentation)</i>)	Populasi pada 1 bulan setelah fermentasi (<i>Population at 1 month after biobactericide fermentation</i>)
Reaksi kimia (pH)	3,75	3,5	3,5
Ksc	B: 0 P: 0	B: 0 P: 0	B: 0 P: 0
Ksc + Bs	B: $(1 \pm 0,2) \times 10^6$ P: 0	B: $(1 \pm 0,2) \times 10^{10}$ P: 0	B: $(9 \pm 5) \times 10^{10}$ P: 0
Ksc + Pf	B: 0 P: $(1 \pm 0,4) \times 10^6$	B: 0 P: $(1 \pm 0,4) \times 10^7$	B: 0 P: $(1 \pm 0,3) \times 10^7$
Ksc +Bs+ Pf	B: $(5 \pm 3) \times 10^5$ P: 9×10^5	B: $(5 \pm 3) \times 10^{11}$ P: 9×10^{11}	B: $(4 \pm 2,7) \times 10^{11}$ P: $(5 \pm 3,4) \times 10^{11}$
Mol 10%	B: 0 P: 0	B: 0 P: 0	B: 0 P: 0
Mol 10% + Bs	B: $(1 \pm 0,3) \times 10^6$ P: 0	B: $(1 \pm 0,2) \times 10^{10}$ P: 0	B: $(9 \pm 5) \times 10^{10}$ P: 0
Mol 10% + Pf	B: 0 P: $(1 \pm 0,4) \times 10^6$	B: 0 P: $(1 \pm 0,4) \times 10^7$	B: 0 P: $(1 \pm 0,3) \times 10^7$
Mol 10% + Bs + Pf	B: $(5 \pm 2) \times 10^5$ P: $(5 \pm 3,4) \times 10^5$	B: $(5 \pm 3) \times 10^9$ P: 9×10^9	B: $(4 \pm 1,7) \times 10^9$ P: $(5 \pm 3,4) \times 10^9$
Ksc + Mol 10%	B: 0 P: 0	B: 0 P: 0	B: 0 P: 0
Ksc + Mol 10%+ Bs	B: $(1 \pm 0,2) \times 10^6$ P: 0	B: $(1 \pm 0,2) \times 10^{12}$ P: 0	B: $(9 \pm 5) \times 10^{12}$ P: 0
Ksc + Mol 10%+ Pf	B: 0 P: $(1 \pm 0,4) \times 10^6$	B: 0 P: $(1 \pm 0,4) \times 10^{11}$	B: 0 P: $(1 \pm 0,3) \times 10^{11}$
Ksc + Mol 10% + Bs + Pf	B: $(5 \pm 3) \times 10^5$ P: 9×10^5	B: $(5 \pm 3) \times 10^{12}$ P: $(5 \pm 3,9) \times 10^{12}$	B: $(2 \pm 0,7) \times 10^{12}$ P: $(1 \pm 0,4) \times 10^{11}$

Bs = *B. subtilis*, Pf = *P. fluorescens*, Ksc = Ekstrak kascing, Mol = Molase

awalnya tampak daerah berwarna hijau pucat yang kemudian berkembang menjadi bercak yang berair berwarna hijau tua dan akhirnya seluruh daun membusuk (Gambar 3). Penyakit selanjutnya berkembang ke arah batang. Daun dan batang yang terserang menimbulkan bau busuk. Hal ini disebabkan bakteri PBL mensekresikan satu set enzim maupun isoenzim dalam jumlah besar, sehingga mampu mendegradasi kompleksitas polimer dinding sel tanaman (Collmer & Keen 1985). Enzim pektinase yang merupakan faktor utama patogenisitas bakteri PBL, digunakan untuk mendegradasi pektin di dalam lamela tengah dan dinding sel tanaman, sehingga menyebabkan kematian jaringan tanaman dan kerusakan sel (Barras *et al.* 1994). Bakteri PBL dilaporkan mampu mensekresikan lima isoenzim utama (Pel-A, Pel-B, Pel-C, Pel-D, dan Pel-E) dan empat isoenzim sekunder (Pel-I, Pel-L, Pel-Z, dan Pel-X) pektat liase (Hugouvieux *et al.* 1996).

Dari percobaan ini diperoleh data tentang peluang terjadinya penyakit (keberhasilan inokulasi) dari masing-masing dua daun yang diberi perlakuan. Data hasil penghitungan peluang kejadian penyakit

ditampilkan pada Tabel 3. Kejadian penyakit pada perlakuan kontrol, ekstrak kascing, dan molase hanya mencapai 50%, sedangkan kejadian penyakit beberapa formulasi lainnya berkisar antara 10 dan 45% hingga pengamatan minggu ke-4 setelah aplikasi. Perlakuan formulasi yang menunjukkan kejadian penyakitnya 10% terdapat dua perlakuan, yaitu basal medium (Ksc) + molase 10% + *B. subtilis* + *P. fluorescens* dan perlakuan perbandingan (bakterisida kimiawi sintetik streptomisin sulfat 15%).

Kedua formulasi tersebut juga memberikan pengaruh yang konsisten terhadap laju perkembangan penyakit, yaitu 0 (nol). Hal tersebut berarti bahwa kedua perlakuan lebih mangkus dapat mengendalikan PBL pada anggrek bila dibanding dengan perlakuan lainnya.

Dalam pembuatan formulasi biobakterisida ini digunakan molase dan ekstrak kascing. Molase berperan sebagai bahan pembawa, pelindung dari sinar matahari, dan sebagai sumber nutrisi. Kandungan utama molase ialah senyawa gula, terutama sukrosa (Jones & Burges 1998). Bahan lain yang dapat digunakan sebagai sumber makanan bagi agens biokontrol selain molase



Gambar 3. Gejala penyakit busuk lunak hasil inokulasi dengan metode *pin prik*, gejala positif (tanda panah kanan), gejala negatif (tanda panah kiri) (*Soft rot disease symptoms as the result of inoculation with the pin prik method, positive symptoms (right arrow), negative symptoms (left arrow)*)

Tabel 3. Pengaruh aplikasi formulasi biopestisida terhadap kejadian penyakit dan laju perkembangan PBL pada daun anggrek (*Effect of biopesticide formulations application on the incidence of disease and rate of SRD development on orchids leaves*)

Komposisi formulasi biopestisida (Composition of biopesticide formulations)	Kejadian penyakit (Kpt) dan pertambahan diameter bercak (Pdb) pada minggu pertama sampai dengan keempat (<i>Disease incidence of (DI) and accretion spot diameter (ASD) in the first week until the fourth</i>)							
	Minggu ke-1		Minggu ke-2		Minggu ke-3		Minggu ke-4	
	Kpt (%)	Pdb (cm)	Kpt (%)	Pdb (cm)	Kpt (%)	Pdb (cm)	Kpt (%)	Pdb (cm)
Ksc	45,0 a	1,4 a	45,0 a	0,7 b	50,0 a	0 b	50,0 a	0 b
Ksc + Bs	20,0 b	0,5 b	20,0 b	0 b	40,0 a	0 b	40,0 a	0 b
Ksc + Pf	25,0 ab	0,9 a	35,0 b	0 b	45,0 a	0 b	45,0 a	0 b
Ksc +Bs+ Pf	30,0 a	1,1 a	30,0 b	1,5 a	35,0 a	0 b	35,0 a	0 b
Mol 10%	30,0 a	0,8 a	30,0 b	0 b	50,0 a	0 b	50,0 a	0 b
Mol 10% + Bs	10,0 b	0,2 b	10,0 a	0 b	15,0 b	0 b	15,0 b	0 b
Mol 10% + Pf	20,0 b	0,4 b	20,0 a	0 b	25,0 b	0 b	25,0 b	0 b
Mol 10% + Bs + Pf	5,0 b	0,1 b	5,0 a	0 b	15,0 b	0 b	15,0 b	0 b
Ksc + Mol 10%	15,0 b	0,2 b	15,0 a	0 b	20,0 b	0 b	20,0 b	0 b
Ksc + Mol 10%+ Bs	25,0 ab	0,7 ab	30,0 a	0 b	35,0 a	0 b	35,0 a	0 b
Ksc + Mol 10%+ Pf	15,0 b	0,6 b	15,0 b	0 b	20,0 b	0 b	20,0 b	0 b
Ksc + Mol 10% + Bs + Pf	5,0 b	0,2 b	5,0 b	0 b	10,0 b	0 b	10,0 b	0 b
Streptomisin sulfat	5,0 b	0,1 b	5,0 b	0,1 b	10,0 b	0 b	10,0 b	0 b
Kontrol (air ledeng)	40,0 a	1,4 a	45,0 a	1,5 a	50,0 a	1,5 a	50,0 a	1,6 a
KK (CV), %	13,57	15,07	13,89	16,17	12,57	18,27	13,77	17,27

* 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*)

ialah tepung gandum dan jagung, dedak gandum, kecambah gandum, tepung kedelai dan gluten jagung (Paau 1998). Selanjutnya Jones & Burges (1998) menyebutkan bahwa molase merupakan salah satu bahan aditif yang paling bermanfaat dan salah satu dari sedikit bahan yang hampir selalu memberikan manfaat positif 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 merupakan 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 terseleksi dan mengalami pengayaan selama proses dalam usus cacing tanah, sehingga memiliki keunggulan tersendiri dibanding dengan bahan aslinya (Nusantara *et al.* 2007).

Pemanfaatan rizobakteri untuk pengendalian berbagai macam penyakit yang disebabkan oleh bakteri dan cendawan (Raupach *et al.* 1996) maupun virus pada berbagai tanaman (Taufiq *et al.* 2005) telah banyak dilaporkan. Pemanfaatan *Burcholderia cepacia* dan *P. aeruginosa* yang diisolasi dari jaringan akar tanaman kelapa sawit dilaporkan dapat menekan penyakit busuk batang yang disebabkan oleh jamur *Ganoderma* sampai 76% (Sapak & Ahmad 2008). Penggunaan *B. subtilis* dan *P. fluorescens* yang diformulasi dalam bentuk biopestisida cair efektif mengendalikan berbagai patogen tular tanah seperti penyakit layu bakteri pada tanaman keluarga terung-terungan (Hanudin *et al.* 2008), sedangkan penggunaan *Bacillus* spp. efektif mengendalikan penyakit layu *Fusarium* pada tanaman anggrek *Phalaenopsis* (Djatnika 2012), busuk buah cabai yang disebabkan oleh *Phytophthora capsici* (Lee *et al.* 2008), dan virus pada cabai (Damayanti & Katerina 2008).

Rizo-endobakteri (*Bacillus* spp. dan *P. fluorescens*) dilaporkan dapat berperan sebagai agens hayati dan juga sebagai bakteri pemacu pertumbuhan (PGPR), yang dapat menginduksi ketahanan tanaman (Reiter *et al.* 2002, Kuta *et al.* 2009). Metabolit sekunder

yang dihasilkan oleh bakteri perakaran pada tanaman inangnya dapat memengaruhi perkembangan fisiologi tanaman dan memberikan imunitas terhadap penyakit (Shimizu *et al.* 2006). Selanjutnya Murphy *et al.* (2000) melaporkan bahwa aplikasi rizo-endobakteri dapat menginduksi ketahanan tanaman melalui mekanisme *systemic acquired resistance* (SAR). Selain itu, mekanisme penekanan rizobakteri terhadap patogen dapat juga terjadi melalui efek antibiosis (Taufiq *et al.* 2010). Isolat *Bacillus* spp. telah dideteksi menghasilkan senyawa antibiotik antara lain mikosubtilins, basilomisin, fengimisin, mikobasilin, mikoserein, dan xanthobacidin (Velho *et al.* 2011), sedangkan *P. fluorescens* menghasilkan senyawa antimikrob seperti *phenazine-1-carboxylic acid*, *pyoluteorin*, *fenazines*, dan *fusrisidin* (Beatty & Susan 2002), *pyrrolnitrin* dan *viscocinamide* (Gurusidaiah *et al.* 1986). Rizo-endobakteri dapat berperan pula sebagai pengikat hara dari atmosfer (Sturz *et al.* 2000, Lodewyckx *et al.* 2002, Strobel *et al.* 2004), dan penghasil hormon pertumbuhan tanaman seperti *indole-3-acetic acid* (IAA), *gibberellic acid*, dan *cytokinin* (Lee *et al.* 2005).

Daya tekan rizobakteri terhadap patogen sasaran dapat bekerja dengan baik dan lebih praktis diaplikasikan, apabila mikroba tersebut diformulasikan dalam bahan organik seperti ekstrak kascing. Penggunaan kascing dalam budidaya tanaman dapat meningkatkan kadar P dan K tersedia bagi tanaman masing-masing sebesar 16,5 dan 19%. Selain itu, kascing mengandung hormon auksin, sitokinin, dan

Tabel 4. Luas areal di bawah kurva perkembangan PBL pada 14 perlakuan jenis komposisi biopestisida (Area under diseases progress curve of soft rot on 14 composition of biopesticides formulations)

Komposisi formulasi biopestisida (Composition of biopesticide formulations)	Kejadian penyakit pada minggu ke-4 (Disease incidence in the fourth weeks)	Nilai AUDPC kejadian penyakit dan persentase penekanan setiap perlakuan terhadap kontrol	
		AUDPC	% penekanan dibanding kontrol
Ksc	50,0 a	945,0 a*	Tdm
Ksc + Bs	40,0 a	490,0 ab	20,0
Ksc + Pf	45,0 a	700,0 a	10,0
Ksc +Bs+ Pf	35,0 a	630,0 a	30,0
Mol 10%	50,0 a	840,0 a	Tdm
Mol 10% + Bs	15,0 b	315,0 b	70,0
Mol 10% + Pf	25,0 b	420,0 b	50,0
Mol 10% + Bs + Pf	15,0 b	210,0 b	70,0
Ksc + Mol 10%	20,0 b	315,0 b	60,0
Ksc + Mol 10%+ Bs	35,0 a	612,5 a	30,0
Ksc + Mol 10%+ Pf	20,0 b	315,0 b	60,0
Ksc + Mol 10% + Bs + Pf	10,0 b	105,0 b	80,0
Streptomisin sulfat	10,0 b	105,0 b	80,0
Kontrol (air ledeng)	50,0 a	840,0 a	Tdh
KK (CV), %	17,15	13,77	Tdh

Tdm = Tidak dapat menekan PBL (No suppressing to soft rot)

Tdh = Tidak dihitung (No counted)

gibberelin, 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 tanaman (OPT) termasuk di dalamnya *P. viridiflava* pada *Phalaenopsis*. Serangan PBL pada tanaman yang mendapat perlakuan tersebut cenderung lebih rendah bila dibandingkan dengan perlakuan lainnya.

Luas Areal di Bawah Kurva Perkembangan PBL

Pada percobaan ini perlakuan yang menunjukkan nilai AUDPC yang paling rendah (105) ditunjukkan oleh perlakuan ekstrak kascing yang ditambah dengan molase dan isolat *B. subtilis* yang digabungkan dengan *P. fluorescens*, serta perlakuan streptomisin sulfat. Kedua perlakuan tersebut menunjukkan persentase penekanan yang sama terhadap PBL yaitu 80% (Tabel 4).

Dari data pada Tabel 3 dan 4, tampak bahwa perlakuan ekstrak kascing + molase yang ditambah dengan isolat *B. subtilis* dan *P. fluorescens* cenderung konsisten dapat menekan PBL. Hal ini berarti keefektifan perlakuan tersebut dalam menekan PBL pada anggrek sebanding dengan streptomisin sulfat.

KESIMPULAN DAN SARAN

1. Komposisi gabungan antara *B. subtilis* Bs12 dan *P. fluorescens* Pf10 yang difermentasikan dalam media ekstrak kascing dan molase, merupakan perlakuan yang konsisten dapat menekan PBL pada anggrek *Phalaenopsis* dengan persentase penekanan sebesar 80%.
2. Reaksi kimia formula biopestisida pada kondisi sebelum dan setelah fermentasi diindikasikan dengan perubahan pH basal medium yang sebelum fermentasi menunjukkan pH 3,75 dan berubah menjadi pH 3,50 setelah difermentasikan. Pertumbuhan populasi mikrob antagonis (*B. subtilis* Bs12 dan *P. fluorescens* Pf10) setelah fermentasi meningkat secara signifikan dibandingkan pada kondisi sebelum difermentasikan.
3. Isolat bahan aktif (*B. subtilis* dan *P. fluorescens*) bersifat kompatibel dengan bahan pembawanya (ekstrak kascing dan molase).

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih dan penghargaan yang setinggi-tingginya kepada Kepala Badan

Penelitian dan Pengembangan Pertanian, Kepala Pusat Penelitian dan Pengembangan Hortikultura, dan Kepala Balai Penelitian Tanaman Hias melalui Proyek Kerjasama Penelitian dengan Perguruan Tinggi (KKP3T) Tahun Anggaran 2009, yang telah membiayai penelitian ini. Penulis mengucapkan terima kasih juga kepada Sdr/i. C. Hakim, M. Handiyanti, Endang Sutarya, Dede Surachman, Ridwan Daleni, Muhidin, Dadang Kusnandar, Ade Sulaeman, Iskandar Sanusie, M. Irman Firmansyah, Arlan Hernawan, Asep Samsudin, dan semua pihak yang telah membantu pelaksanaan dan pelaporan penelitian ini.

PUSTAKA

1. Aira, M, Monroy, F & Dominguez, J 2006, 'Changes in microbial biomass and microbial activity of pig slurry after the transit through the gut of the earthworm *Eudrilus eugeniae* (Kinberg, 1867)', *Biol Fertil Soil*, vol. 42, pp. 371-6.
2. Barras, F, van Gijsegem, F & Chatterjee, AK 1994, 'Extracellular enzymes and pathogenesis of soft-rot *Erwinia*', *Annu. Rev. Phytopathol.*, vol. 32, pp. 201-34.
3. Beatty, PH & Susan, EJ 2002, '*Paenibacillus polymyxa* produces fusaricidin-type antifungal antibiotics active against *Leptosphaeria maculans*, the causative agents of blackleg disease of canola', *Can. Microbiol.*, vol. 48, pp. 159-69.
4. Cating, RA & Palmateer, AJ 2011, 'Bacterial soft rot of *Oncidium* orchids caused by *A. Dikeya* sp. (*Pectobacterium chrysanthemi*) in Florida', *APSnet. Plant Disease.*, vol. 95, no. 1, pp. 741-1.
5. Collmer, A & Keen, NT 1985, 'The role of pectic enzymes in plant pathogenesis', *Annu. Rev. Phytopathol.*, vol. 24, pp. 383-453.
6. Damayanti, TA & Katerina, T 2008, 'Protection of hot pepper against multiple infection of viruses by utilizing root colonizing bacteria', *J. ISSAAS*, vol. 14, pp. 92 -100.
7. Djatnika, I 2012, 'Seleksi bakteri antagonis untuk mengendalikan layu Fusarium pada tanaman *Phalaenopsis*', *J. Hort.*, vol. 22, no. 3, pp. 276-84.
8. Gonzales, AJ, Rodicio, MR & Mendoza, MC 2003, 'Identification of an emergent and a typical *Pseudomonas viridiflava* lineage causing bacteriosis in plants of agronomic importance in a spanish region', *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 69, no. 5, pp. 2936-41.
9. Gurusidaiah, S, Weller, DM, Sakar, A & Cook, RJ 1986, 'Characterization of antibiotic produced by strain of *Pseudomonas fluorescens* inhibitory to *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* and *Pythium* spp.', *Antimicrob. Agent. and Chemoter.*, vol. 29, pp. 448-59.
10. Hanudin & Marwoto, B 2003, 'Pengendalian penyakit layu bakteri dan akar gada pada tomat dan caisim menggunakan *Pseudomonas fluorescens*', *J. Hort.*, vol. 13, no. hlm. 58-66.
11. Hanudin, Nuryani, W & Budiarto, K 2008, 'The efficacy of *B. subtilis* and *P. fluorescens* in liquid formulation to control important diseases on chrysanthemum and chinese cabbage', *J. Agrivita*, vol. 30, no. 3, hlm. 255-62.
12. Hanudin, Marwoto, B, Tjahjono, B, Machmud, M & Mulya, K 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.

13. Hanudin & Rahardjo, IB 2011, 'Karakteristik *Pseudomonas viridiflava*: penyebab penyakit busuk lunak dan evaluasi virulensinya pada klon anggrek *Phalaenopsis*', *J. Hama dan Penyakit Tumbuhan Tropika*, vol. 11, no. 2, hlm. 185 - 93.
14. Hanudin, Marwoto, B, Hersanti & Muharam, A 2012, 'Kompatibilitas *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas fluorescens*, dan *Trichoderma harzianum* untuk mengendalikan *Ralstonia solanacearum* pada tanaman kentang', *J. Hort.*, vol. 22, no. 2, hlm. 173-80.
15. Hsu, ST, Chen, CC, Liu, HY & Tzeng, KC 1994, 'Colonization of roots and control of bacterial wilt of tomato by *Pseudomonas fluorescens*', Hartman, G. L, and Hayward, AC (eds), Bacterial wilt, *Proc. An Inter. Conf. ACIAR Procc.*, No. 45, pp. 305-11.
16. Hugouvieux-Cotte-Pattat, N, Condemine, G, Nasser, W & Reverchon, S 1996, 'Regulation of pectinolysis in *Erwinia chrysanthemi*', *Ann. Rev. Microbiol.*, vol. 50, pp. 213-57.
17. Jeger, MJ & Viljanen-Rollinson, SLH 2001, 'The use of the area under disease-progress curve (AUDPC) to assess quantitative disease resistance in crop cultivars', *Theor. Appl. Genet.*, vol. 102, pp. 32- 40.
18. Joko, T, Hanudin & Subandiyah, S 2010, *Karakterisasi biologi dan molekuler bakteri penyebab busuk lunak pada anggrek untuk mendukung pengembangan deteksi dini dan perakitan tanaman tahan melalui introduksi bakteri endo-simbion*, Laporan hasil penelitian KKP3T, T. A. 2009, Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian, Jakarta.
19. Jones, KA & Burges, HD 1998, 'Technology of formulation and application, in Burges, HD (ed.), *Formulation of microbial Biopesticides: beneficial microorganisms, nemathodes, and seed treatments*', Kluwer Academic Publisher, Dordrecht, Netherlands, pp. 7-30.
20. Kuta, FA, Nimzing, L & Orka'a, RY 2009, 'Screening of *Bacillus* species with potential of antibiotics production', *Appl. Medic. Inform.*, vol. 24, no. 1-2, pp. 42-6.
21. Lodewyckx, J, Vangronsveld, F, Porteus, ERB, Moore, S, Taghavi, M, Mezgeay, M & Lelie, DV 2002, 'Endophytic bacteria and their potential applications', *Critical Rev. Plant Sci.*, vol. 21, pp. 586-606.
22. Lee, KD, Bai, Y, Smith, D, Han, HS & Supanjani 2005, 'Isolation of plant-growth-promoting endophytic bacteria from nodule bean', *Res. J. Agric. Biol. Sci.*, vol. 1, no. 3, PP. 232-6.
23. Lee, KJ, Kamala-Kannan, S, Sub, HS, Seong, CK & Lee, GW 2008, 'Biological control of *Phytophthora* blight in red pepper (*Capsicum annuum* L.) using *Bacillus subtilis*', *World J. Microbiol. Biotech.*, vol. 24, pp. 1139-45.
24. Lelliot, RA & Stead, DE 1987, *Methods for the diagnosis of bacterial diseases of plants*, British. Soc. for Plant. Pathol. Black Well. Scientific Publication, London.
25. Murphy, JF, Zehnder, GW, Schuster, DJ, Sikora, EJ, Polston, JE & Kloeper, JW 2000, 'Plant growth promoting rhizobacterial mediated protection in tomato against tomato mottle virus', *Plant Dis.*, vol. 84, pp. 779-84.
26. Nakkeeran, S, Kavitha, K, Chandrasekar, G, Renukadevi, P & Fernando, WGD 2006, 'Induction of plant defense compound by *Pseudomonas chlororaphis* PA 23 and *Bacillus subtilis* BSCBE 4 in controlling damping-off of hot pepper caused by *Pythium aphanidermatum*', *Biocontrol Sci. and Technol.*, vol. 16, no. 4, pp. 403-16.
27. Nusantara, AD, Mansyur, I, Kusmana, C, Darusman, LK & Soedarmadi 2007, 'Peran substrat alami, kadar air, dan sterilisasi dalam produksi spora melalui simbiosis *Pueraria javanica* dan *Glomus etunicatum*', *J. Akta Agrosia (Ed. Khusus)* no. 2, hlm, 204-12.
28. Paa, AS 1998, *Formulation of beneficial organisms applied to soil*, Burges, HD (ed.), *Formulation of microbial biopesticides: beneficial microorganisms, nemathodes, and seed treatments*, Kluwer Academic Publishe, Dordrecht, Netherlands.
29. Raupeh, GS, Liu, L, Murphy, JF, Tuzun, S & Kloepper, JW 1996, 'Induced systemic resistance in cucumber mosaic virus using plant growth promoting rhizobacteria (PGPR)', *Plant Dis.*, vol. 80, pp. 891-94.
30. Reiter, B, Pfeifer, U, Schwab, H & Sessitsch, A 2002, 'Response of endophytic bacterial communities in potato plants to infection with *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*', *Applied and Environ. Microbiol.*, vol.68, no.5, pp. 2261-68.
31. Samson, R, Legendre, JB, Christen, R, Fischer-Le Saux, M, Achouak, W & Gardan, L 2005, 'Transfer of *Pectobacterium chrysanthemi* (Burkholder *et al.* 1953) Brenner *et al.* 1973 and *Brenneria paradisiaca* to the genus *Dickeya* gen. Nov. as *Dickeya chrysanthemi* comb. Nov. and *Dickeya paradisiaca* comb. Nov. and delineation of four novel species, *Dickeya dadantii* sp. Nov., *Dickeya dianthicola* sp. Nov., *Dickeya dieffenbachia* sp. Nov., and *Dickeya zeae* sp. Nov.', *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, vol. 55, pp. 1415-27.
32. Sapak, Z, Meon, S & Ahmad, ZAM 2008, 'Effect of endophytic bacteria on growth and suppression of *Ganoderma* infection in oil palm', *Int. J. Agri. Biol.*, vol. 10, no. 2, pp. 127-32.
33. Shimizu, M, Meguro, A, Hasegawa, S, Nishimura, T & Kunoh, H 2006, 'Disease resistance induced by nonantagonistic endophytic *Streptomyces* spp. on tissue cultured seedlings of *Rhododendron*', *J. Gen. Plant Pathol.*, vol. 72, pp. 351-4.
34. Shofyan, 2010, *Fermentasi Bahan kuliah pada Universitas Negeri Malang*, diunduh 14 Mei 2011, <<http://community.um.ac.id./forum.um.id/index.php?topic=2504>>.
35. Suryana, A & Cahyono, D 2008, *Teknologi pembuatan pupuk dan biopestisida organik*, Diklat peningkatan kompetensi pegawai dan guru bidang keahlian pertanian organik, Departemen Bioteknologi dan Lingkungan, Departemen Pendidikan Nasional, Jakarta.
36. Sutariati, GAK & Wahab, A 2010, 'Isolasi dan uji kemampuan rizobakteri *indigenous* sebagai agensia pengendali hayati penyakit pada tanaman cabai', *J. Hort.*, vol. 20, no. 1, hlm. 86-95.
37. Strobel, GA, Daisy, B, Castillo, U & Harper, J 2004, 'Natural products from endophytic microorganisms', *J. Nat. Prod.*, vol. 67, pp. 257-68.
38. Sturz, B, Christie, R & Nowak, J 2000, 'Bacteria endophytes: potential role in developing sustainable systems of crop production', *Critical Rev. Plant Sci.*, no. 19, pp. 1-30.
39. Taufiq, MAA, Wahab & Hidayat, SH 2010, 'Mekanisme ketahanan terinduksi oleh *plant growth promoting rhizobacteria* (PGPR) pada tanaman cabai terinfeksi *cucumber mosaic virus* (CMV)', *J. Hort.*, vol. 20, no. 3, hlm. 274-83.
40. Taufiq, SH, Hidayat, G, Suastika, SM, Sumaraw & Sujprihati, S 2005, 'Kajian *plant growth promoting rhizobacteria* sebagai agens proteksi *cucumber mosaic virus* dan *chilli veinal mottle virus* pada cabai', *Hayati*, vol. 12, no. 4, hlm. 139- 44.
41. Velho, RV, Medina, LF, Segalin, J & Brandelli, A 2011, 'Production of lipopeptides among *Bacillus* strains showing growth inhibition of phytopathogenic fungi', *Folia Microbiol. (Praha)*, vol. 56, no. 4, pp. 297-303.
42. Wikipedia 2010, *Fermentasi and action*, viewed 15 May, <<http://id.wikipedia.org/wi/index.php?Berkas:Fermentasi.Jpg>>.