

VIABILITAS PSEUDOMONAD FLUORESCENS ISOLAT PF-122 DALAM BEBERAPA FORMULA

Yenny Wuryandari, Arika Purnawati, dan Siswanto

Fakultas Pertanian Universitas Pembangunan Nasional "Veteran" Jawa Timur

ABSTRACT

The objectives of this research were to examine effect of several formulas on the viability of *Pseudomonas Fluorescens* isolate Pf-122. The eight formulations include carriers, additives, and concentration of Pf-122. The efficacy of various formulation in maintaining the population of Pf-122 in storage was assessed. The result of the viability test of Pf-122 in formula showed that the highest population of Pf-122 in week 0 was observed on the formula 1, viz the formula with combination of pupuk kandang as carrier and CMC as additive and Pf-122 at the concentration of 10^{10} CFU/ml. The bacterial population of the formula number 1 could reach 4.8×10^{10} CFU/formula and followed by the formulas number 2, 3, 4, 5, 6, and 7. The lowest population was observed on the formula number 8 with the density of 5.8×10^6 CFU/formula. The bacterial population decreased during storage in all of the formulas and even it could not be detected in the formulas number 3 and 4 after the first week of storage. In the formulas number 1 and 2 survived within 3 months.

Key words: viability, *Pseudomonad fluorescens*, formulas

PENGANTAR

Pseudomonas fluorescens strain Pf-122 merupakan salah satu strain yang menunjukkan kemampuan paling tinggi dalam menekan perkembangan penyakit layu bakteri dengan metode aplikasi pencelupan akar bibit tembakau. Aplikasi pengendalian dengan cara pencelupan ini sangat tidak praktis dan sulit dilakukan pada skala lapangan. Oleh karena itu, perlu dilakukan penelitian untuk mencari suatu formula yang paling tepat untuk aplikasinya. Formulasi untuk agensia hayati mempunyai tantangan khusus karena bahan aktifnya adalah mikroorganisme yang secara relatif tidak berubah dan tidak aktif selama penyimpanan tetapi aktif kembali melakukan metabolisme setelah diaplikasikan.

Tembakau (*Nicotiana tabacum* L.) merupakan salah satu komoditas yang cukup penting dalam perekonomian Indonesia, yaitu sebagai sumber pendapatan petani, penyerapan tenaga kerja, penunjang industri rokok yang terkait dengan cukai serta penerimaan devisa negara (Surachmad, 1998). Salah satu penyebab utama tidak terpenuhinya target produksi dan mutu tembakau adalah karena gangguan penyakit layu bakteri yang disebabkan oleh *Ralstonia solanacearum* (Smith, 1896) (dahulu *Pseudomonas solanacearum*). Di Indonesia, penyakit ini menyebabkan kerugian yang sangat besar dan intensitas penyakit dapat mencapai 75%. Pada tahun 1994, tembakau Deli-4 yang layu karena bakteri menunjukkan angka yang tinggi, berkisar dari 13,5% sampai 53,8% (Arwiyanto, 1995).

Berbagai usaha pengendalian telah diusahakan namun belum ditemukan cara pengendalian yang efektif dan efisien sehingga penyakit layu bakteri masih menjadi masalah

terpenting. Salah satu pengendalian yang ramah lingkungan, dan merupakan komponen yang sangat penting dalam pengendalian secara terpadu adalah pengendalian biologi. Penggunaan *P. fluorescens* yang merupakan organisme pengkoloni akar yang potensial, telah dilaporkan berhasil menghambat pertumbuhan patogen terbawa tanah (Fukui *et al.*, 1994; Pierson dan Weller, 1994). Di antara *Plant Growth Promoting Rhizobacteria* (PGPR), *P. fluorescens* mendapat banyak perhatian. Strain dari *P. fluorescens* tertentu menunjukkan kemampuannya dalam menekan perkembangan beberapa penyakit tumbuhan yang disebabkan oleh patogen terbawa tanah (Raaijmakers *et al.*, 1995; Schippers, 1992). Hasil penelitian Wuryandari *et al.* (2005), penekanan penyakit layu *R. solanacearum* oleh *P. fluorescens* isolat Pf-122 yang dilakukan pada tomat dengan metode pencelupan selama 30 menit mampu menekan penyakit layu sebesar 60%.

Aplikasi pengendalian dengan cara pencelupan yang telah dilakukan dirasakan tidak praktis pada skala lapangan. Menurut Vidhyasekaran dan Muthamilan (1995), metode pencelupan pada bibit tidak praktis karena sulit dalam penanganannya, transportasi dan penyimpanannya serta dari segi ekonomi kurang menguntungkan. Oleh karena itu, diperlukan metode yang lebih efektif dalam pengendalian penyakit layu bakteri yaitu berupa formula dengan bahan aktif bakteri untuk pengendalian penyakit layu tanpa menghambat pertumbuhan tanaman bahkan akan dapat memperbaiki produksinya.

Produk mikroorganisme sebagai agens pengendali biologi sebaiknya dalam bentuk yang mudah digunakan oleh petani, untuk itu perlu diformulasikan. Formulasi

dari mikroorganisme ini sebaiknya dapat disalurkan ke petani dalam bentuk yang akrab dan tidak perlu peralatan, teknologi, atau teknik aplikasi baru. Formulasi pada umumnya berupa tepung untuk penyemprotan, butiran, pelet atau berupa bubuk untuk penyerbukan (Butt *et al.*, 1999). Formulasi untuk biopestisida bakteri dapat berupa cairan atau formulasi kering (Boyetchko *et al.*, 1999). Aplikasi formula *P. fluorescens* dengan bahan dasar talk dan gambut bahan organik pada benih akan menaikkan populasi bakteri tersebut di rizosfer sehingga dapat memberikan pengendalian biologi terhadap patogen akar karena strain tersebut mempunyai kemampuan untuk mengkoloni akar pada waktu perkecambahan benih (Vidhyasekaran dan Muthamilan, 1995). Dengan demikian maka pseudomonad fluorescens yang telah mengkoloni akar diharapkan mampu melindungi akar dari serangan *R. solanacearum* sejak awal pertumbuhan bibit.

Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui pengaruh berbagai formula antara konsentrasi pseudomonad fluorescens isolat Pf-122 dan bahan pembawa pupuk dengan teknik penyalutan benih dan pelet terhadap viabilitas pseudomonad fluorescens isolat Pf-122.

BAHAN DAN CARA KERJA

Penelitian dilakukan di laboratorium Penyakit Tumbuhan, dan Screen House program studi Ilmu Hama dan Penyakit Tumbuhan, Fakultas Pertanian, UPN "Veteran" Jawa Timur. Bakteri patogen yang digunakan adalah *R. solanacearum*. Adapun bakteri antagonis adalah *Pseudomonad fluorescens* isolat Pf-122 yang selanjutnya disebut Pf-122. Bahan-bahan yang digunakan dalam pembuatan formula (pelet dan pil-benih) selain Pf-122 dengan konsentrasi 10^{10} , 10^9 CFU/ml, juga bahan pembawa pupuk kandang dan pupuk organik plus, serta bahan aditif Carboxyl Methyl Cellulose (CMC) 1%.

Komposisi bahan pembawa pupuk organik plus antara lain adalah kompos daun, serbuk gergaji, pupuk kandang sapi, kompos biji kapuk, endapan lumpur, dan guano. Adapun pupuk kandang terbuat dari campuran pupuk kandang dan humus tanaman. Bahan pembawa dihaluskan dan disaring dengan saringan berukuran 30 mm selanjutnya disterilkan dengan oven suhu 60°C selama 4 jam.

Proses Penyalutan Benih

Sebelum pengujian, perlu dilakukan penyalutan benih. Proses penyalutan benih dilakukan dengan mengkombinasikan bahan pembawa, bahan aditif atau bahan perekat serta inokulum bakteri antagonis Pf-122.

Benih tembakau sebelum disaluti didesinfeksi dengan

NaOCl selama 30 detik kemudian dikeringanginkan (Gamliel dan Katan, 1992). Benih tersebut diletakkan pada cawan petri berdiameter 15 cm, dan agar benih terpisah satu sama lain cawan petri digoyang-goyang. Bakteri Pf-122 dalam bahan aditif disemprotkan secara merata pada benih, selanjutnya ditaburi secara cepat dengan bahan pembawa. Untuk mengambil sekaligus menjaga agar benih tersaluti satu per satu oleh bahan pembawa maka pengambilan digunakan kuas dengan gerakan berputar-putar atau melingkar. Butiran pada tahap pertama tersebut masih kecil karena bahan pembawa masih sedikit yang menempel. Setelah dioven lebih kurang 5–10 menit pada suhu 35°C untuk membantu penempelan bahan pembawa, butiran diambil dan diletakkan pada cawan petri yang telah diberi kertas steril, selanjutnya digoyang-goyang agar terpisah satu sama lain. Penyemprotan dan penaburan dilakukan seperti pada tahap pertama. Proses yang sama dilakukan sampai tahap 5 sehingga ukuran diameter benih yang disaluti mencapai lebih kurang 1,5 mm. Hasil penyalutan benih tembakau dari berbagai formula yang berupa butiran selanjutnya disebut pil-benih. Formulasi tersebut sekaligus digunakan sebagai perlakuan untuk pengujian selanjutnya.

Pembuatan Pelet

Proses pembuatan pelet dilakukan dengan mengkombinasikan bahan pembawa, bahan aditif atau bahan perekat serta inokulum bakteri antagonis Pf-122. Bahan pembawa yang telah dibersihkan dan dihaluskan selanjutnya dicampur dengan bahan aditif CMC yang telah dicampur bakteri *P. fluorescens* dengan konsentrasi 10^9 dan 10^{10} CFU/ml, dimasukkan pada alat pembuat pellet sehingga campuran yang terbentuk berupa granul atau butiran yang agak lonjong.

Hasil pembuatan pelet dari berbagai formula yang berupa butiran selanjutnya disebut pelet. Formulasi tersebut sekaligus digunakan sebagai perlakuan untuk pengujian selanjutnya. Semua formula yang dibuat sebanyak 8 formula, yaitu Formula no 1 (F1): Pelet Kandang 10^{10} , F2: Pelet Kandang 10^9 , F3: Pelet Organik 10^{10} , F4: Pelet Organik 10^9 , F5: Pil-benih Kandang 10^{10} , F6: Pil-benih Kandang 10^9 , F7: Pil-benih Organik 10^{10} , F8: Pil-benih Organik 10^9 CFU/ml.

Viabilitas Pf-122 dalam Pil-benih dan Pelet

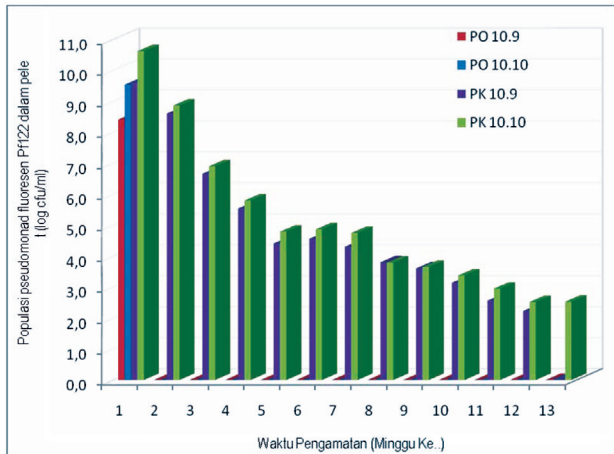
Untuk mengetahui pengaruh perlakuan penyalutan benih dan pelet pada formula pada perlakuan terhadap daya tahan hidup Pf-122, maka dilakukan penghitungan populasi Pf-122 pada interval waktu tertentu. Penelitian dilakukan pada benih yang telah disaluti atau benih dalam

pil-benih dan pelet, tetapi benih tidak ditanam dalam persemaian. Benih dalam pil-benih disimpan pada suhu kamar. Dinamika populasi bakteri Pf-122 diamati dengan interval 1 minggu. Sepuluh butir benih yang telah disaluti atau pelet dengan berat 0,02 g dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang berisi 9 ml 0,1 M buffer fosfat pH 7 ditambah 0,1% pepton. Tabung reaksi kemudian digojog selama 15 menit dan didiamkan selama 5 menit, suspensi bagian atas diambil 1 ml dan dilakukan seri pengenceran. Dari tiap seri pengenceran diambil 0,1 ml dan ditumbuhkan pada medium King's B dalam cawan Petri. Biakan diinkubasikan pada suhu kamar selama 48 jam. Populasi bakteri Pf-122 dihitung dalam satuan CFU/pil-benih. Setiap perlakuan diulang 3 kali.

HASIL

Viabilitas *Pseudomonas fluorescens* Pf-122 dalam Pelet

Berdasarkan hasil penghitungan populasi bakteri *P. fluorescens* Pf-122 dalam formula pelet setiap interval waktu satu minggu, dapat diketahui daya tahan hidup atau viabilitas bakteri antagonis *P. fluorescens* Pf-122 dalam pelet. Hasil dari penghitungan populasi bakteri alam formula pelet dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Viabilitas *Pseudomonas fluorescens* Pf-122 dalam pelet

Keterangan:

Formula no. 1 = F1 = PK10¹⁰ = formula pelet pupuk kandang konsentrasi Pf 10¹⁰

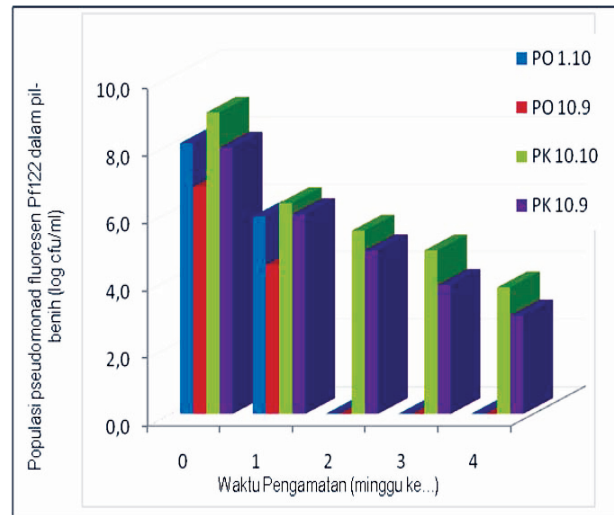
Formula no. 2 = F2 = PK10⁹ = formula pelet pupuk kandang konsentrasi Pf 10⁹

Formula no. 3 = F3 = PO10¹⁰ = formula pelet pupuk organik konsentrasi Pf 10¹⁰

Formula no. 4 = F4 = PO10⁹ = formula pelet pupuk organik konsentrasi Pf 10⁹

Viabilitas *Pseudomonas fluorescens* Pf-122 dalam pil-benih

Berdasarkan hasil penghitungan populasi bakteri *P. fluorescens* Pf-122 dalam formula pil-benih setiap interval waktu satu minggu, dapat diketahui daya tahan hidup atau viabilitas bakteri antagonis *P. fluorescens* Pf-122 dalam pil-benih. Hasil dari penghitungan populasi bakteri alam formula pil-benih dapat dilihat pada Gambar 2.



Gambar 2. Viabilitas *Pseudomonas fluorescens* Pf-122 dalam pil-benih

Keterangan:

Formula no 5 = F5 = PK10¹⁰ = formula pil-benih pupuk kandang konsentrasi Pf 10¹⁰

Formula no 6 = F6 = PK10⁹ = formula pil-benih pupuk kandang konsentrasi Pf 10⁹

Formula no 7 = F7 = PO10¹⁰ = formula pil-benih pupuk organik konsentrasi Pf 10¹⁰

Formula no 8 = F8 = PO10⁹ = formula pil-benih pupuk organik konsentrasi Pf 10⁹

PEMBAHASAN

Berdasarkan hasil yang ditampilkan pada Gambar 1 dan 2, populasi awal Pf-122 dalam pelet tertinggi adalah formula no 1 (F1), yaitu formula pelet dengan bahan pembawa pupuk kandang bahan aditif CMC dan konsentrasi Pf 10¹⁰ CFU/ml. Populasi awal pada formula nomor 1 (F1) dapat mencapai $4,8 \times 10^{10}$ CFU/ml, kemudian diikuti formula nomor F 2, F3, F4, F5, F6, F7, dan terendah formula nomor 8 (F8) dengan populasi hanya $5,8 \times 10^6$ CFU/ml. Populasi tersebut menurun seiring dengan lamanya penyimpanan pada semua formula, bahkan pada formula nomor 3 (F3) dan F4 pada minggu pertama penyimpanan populasinya sudah tidak terdeteksi. Populasi Pf-122 pada

formula nomor 1 (F1) dan 2 (F2) terlihat masih bertahan sampai minggu ke-12 (Gambar 1). Menurut Mc Guire (2000) bahwa populasi Pf dalam formula penyalutan saat awal adalah 10^6 CFU/ml, turun sampai 10^3 CFU/ml dalam waktu 24 jam.

Dari ke-8 formula tersebut di atas yang dapat bertahan sampai lebih dari 4 minggu adalah formula yang bahan pembawanya pupuk kandang. Adapun yang membedakan tingginya populasi adalah selain pengaruh konsentrasi Pf-122 juga jenis formulanya. Semakin tinggi konsentrasi Pf-122 yang digunakan pada saat pembuatan formula, semakin tinggi populasi Pf-122 yang teramati pada formula. Hal tersebut sesuai dengan hasil penelitian Wuryandari (2004), bahwa semakin tinggi konsentrasi Pf-20 yang digunakan pada saat pembuatan formula yaitu penyalutan benih semakin tinggi populasi Pf-20 yang teramati pada formula pil-benih. Formula berupa pelet lebih tinggi populasinya dibandingkan formula pil-benih pada konsentrasi bakteri awal yang sama.

Apabila ditinjau dari komponen bahan pembawa, maka bahan pembawa yang baik untuk membuat formula baik yang berupa pelet maupun pil-benih adalah pupuk kandang. Hal tersebut terlihat bahwa dengan konsentrasi dan bahan aditif yang sama, apabila bahan pembawa yang digunakan pupuk kandang maka populasi Pf-122 akan jauh lebih tinggi dibandingkan bahan pembawa pupuk organik plus. Hal tersebut mungkin disebabkan karena pH dari kedua bahan pembawa berbeda, pH pupuk kandang 7 lebih sesuai untuk pertumbuhan Pf-122 dibandingkan pupuk organik plus yang pH-nya 6,1. Selain itu, pada pupuk organik plus yang komponen penyusunnya terdiri dari bahan yaitu kompos daun, serbuk gergaji, pupuk kandang sapi, kompos biji kapuk, dan endapan lumpur laut mungkin memengaruhi viabilitas Pf-122. Adanya penurunan populasi Pf-122 yang sangat cepat, mungkin dapat disebabkan oleh beberapa hal yaitu di antaranya endapan lumpur laut yang diambil dari laut yang sudah tercemar yang secara otomatis juga berdampak negatif pada daya tahan hidup Pf-122. Faktor lain yang dapat memengaruhi viabilitas Pf-122 adalah serbuk gergaji salah satu komponen pupuk organik plus mungkin belum terdegradasi sempurna sehingga keadaan tersebut tidak dapat digunakan sebagai sumber nutrisi bagi Pf-122.

Viabilitas Pf-122 dalam pelet maupun pil-benih lebih tinggi dan lebih lama pada formula dengan bahan pembawa pupuk kandang dibandingkan pada pupuk organik plus. Viabilitas Pf-122 pada formula nomor 1 (F1), yaitu formula pelet dengan komposisi bahan pembawa pupuk kandang, bahan aditif CMC, dan konsentrasi Pf-122 10^{10} CFU/ml,

mempunyai daya hidup yang paling tinggi, yaitu dapat bertahan hidup sampai 12 minggu.

Berdasarkan hasil uji viabilitas Pf-122 dalam formula, maka dapat diketahui bahwa daya tahan hidup bakteri Pf-122 dalam formula relatif tidak lama. Dengan demikian maka pembuatan formula untuk usaha pengendalian penyakit layu bakteri pada tembakau harus langsung diaplikasikan, tidak dapat disimpan lama karena populasi bakteri Pf-122 dalam formula telah turun dan tidak efektif lagi untuk berkompetisi dengan patogen *Ralstonia solanacearum* penyebab penyakit layu.

KEPUSTAKAAN

- Arwiyanto T, 1995. Strategi pengendalian penyakit layu bakteri tembakau cerutu di Sumatera Utara secara terpadu. *Ekspose hasil penelitian Tembakau Deli IV, Medan*. 34 p.
- Boyetchko S, Pedersen E, Punja Z, dan Reddy M, 1999. Formulation of Biopesticides. p. 487–508. In: Hall FR dan Menn JJ (ed.). *Biopesticides Use and Delivery*. Humana Press. Totowa, New Jersey.
- Butt TM, Harris JG, dan Powell KA. 1999. Microbial Biopesticides The European Scene. p. 23–44. In: Hall FR dan Menn JJ (ed.). *Biopesticides Use and Delivery*. Humana Press. Totowa, New Jersey.
- Fukui R, Schroth MN, Hendson M, dan Hancock JG, 1994. Interaction between Strain of *Pseudomonas* in Sugar Beet Spermosphere and Their Relationship to Pericarp Colonization by *Pythium ultimum* in Soil. *Phytopathology* 84: 1330–2.
- Gamliel A, dan Katan J, 1992. Influence of seed and root exudates on fluorescent pseudomonads and fungi in solarized soil. *Phytopathology* 82: 320–7.
- Mc Guire, 2000.
- Pierson EA, dan Weller DM, 1994. Use of Mixtures of Fluorescent Pseudomonads to suppress. Take-all and Improve the Growth of Wheat. *Phytopathology* 84: 940–7.
- Raaijmakers JM, Leeman M, Van Oorschot MMP, Van der Sluis I, Schipper B, dan Bakker PAHM, 1995. Dose-response relationships in biological control of fusarium wilt of radish by *Pseudomonas* spp. *Phytopathology* 85: 1075–81.
- Schippers B, 1992. Prospects for management of natural suppressiveness to control soilborne pathogens. p. 21–34. In: Tjamos EC, Papaviras GC, dan Cook RL (eds.). *Biological control of plant diseases. Progress and challenges for the future*. Plenum Press, New York & London.
- Surachmad, 1998. Pemasaran Tembakau Cerutu Indonesia. Kumpulan Makalah Penyegaran Penelitian dan Praktisi Tembakau Lingkup PTPN II dan X. APPI.
- Vidhyasekaran P, dan Muthamilan M, 1995. Development of Formulation of *Pseudomonas fluorescens* for Control of Chickpea Wilt. *Plant Dis.* 7: 782–6.

Wuryandari Y, 2004. Formulasi Pil-Benih Tembakau dengan *Pseudomonas putida* Strain Pf-20 untuk Pengendalian Biologi Penyakit Layu Bakteri (*Ralstonia solanacearum*). Disertasi. Universitas Gadjah Mada. Yogyakarta.

Wuryandari Y, Purnawati A, Arwiyanto T, Hadisutrisno B, 2005. Perlakuan Benih Tomat Secara Biologi dengan *Pseudomonad fluorescens* untuk Pengendalian Penyakit Layu bakteri (*Ralstonia solanacearum*). Laporan Hibah Pekerti.

Reviewer: **Dr. Ir. Tini Surtiningsih, DEA**