

Kemangkusan Biobakterisida terhadap Penyakit Busuk Lunak (*Pseudomonas viridiflava*) pada *Phalaenopsis*

Nuryani, W, Silvia Yusuf, E, Hanudin, Djatnika, I, dan Marwoto, B

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

Naskah diterima tanggal 21 Mei 2012 dan disetujui untuk diterbitkan tanggal 30 Oktober 2012

ABSTRAK. Penyakit busuk lunak yang disebabkan oleh *Pseudomonas viridiflava* merupakan salah satu kendala utama dalam budidaya anggrek *Phalaenopsis* di Indonesia. Sampai saat ini belum ditemukan teknik pengendalian penyakit tersebut yang paling efektif. Penggunaan biobakterisida sudah diterapkan di luar negeri untuk menekan penyakit busuk lunak pada *Phalaenopsis*. Tujuan penelitian ialah : (1) jenis bakteri antagonis yang digunakan sebagai bahan aktif biobakterisida, (2) formula biopestisida yang efektif mengendalikan penyakit busuk lunak (PBL) pada anggrek *Phalaenopsis*, (3) mendapatkan informasi mekanisme penekanan bakteri antagonis, dan (4) memperoleh informasi kerapatan populasi bakteri antagonis yang mengkolonisasi pada daun setelah mendapat perlakuan biobakterisida. Percobaan dilaksanakan di Laboratorium Bakteriologi dan Rumah Kaca Biokontrol, Balai Penelitian Tanaman Hias Segunung pada Bulan Januari hingga Desember 2011. Isolat bakteri antagonis nomor B7 dan B30 disuspensikan ke dalam air steril dan bahan pembawa organik yang mengandung karbohidrat dan protein minimal, karbohidrat, dan protein optimal. Selanjutnya formula tersebut masing-masing diaplikasikan pada daun *Phalaenopsis* (metode *spraying*) sehari sebelum atau setelah inokulasi patogen busuk lunak (cara *pin pricking*). Rancangan yang digunakan ialah acak kelompok dengan 15 perlakuan dan tiga ulangan. Hasil penelitian menunjukkan bahwa (1) bakteri antagonis no. B7 dan B30 yang digunakan sebagai bahan aktif biobakterisida digolongkan ke dalam genus *Bacillus* sp., (2) suspensi bakteri antagonis no. B7 dalam bahan organik yang mengandung karbohidrat dan protein minimal dan diaplikasikan 1 hari sebelum inokulasi dapat menekan serangan PBL dengan persentase penekanan sebesar 33,45%, (3) mekanisme penekanan penyakit oleh biobakterisida dipengaruhi oleh derajat kolonisasi bakteri antagonis pada daun anggrek dan efek antibiosis, dan (4) kerapatan populasi bakteri antagonis sebelum aplikasi ialah $9 \pm 7 \times 10^2$ cfu/g, selanjutnya meningkat menjadi $8 \pm 3 \times 10^3$ cfu/g daun selama 3 hari. Aplikasi biobakterisida berbahan aktif bakteri antagonis diharapkan dapat meningkatkan pendapatan petani anggrek dan mendorong pengembangan industri biobakterisida berbasis sumber daya lokal.

Katakunci: Anggrek *Phalaenopsis*; Penyakit busuk lunak; *Pseudomonas viridiflava*; Kemangkusan; Biobakterisida; Bakteri antagonis

ABSTRACT. Nuryani, W, Silvia Yusuf, E, Hanudin, Djatnika, I, and Marwoto, B 2012. Effectiveness of Biobactericide on Soft Rot Bacterial Disease (*Pseudomonas viridiflava*) of *Phalaenopsis*. Soft rot caused by *Pseudomonas viridiflava* is one of the most important diseases on *Phalaenopsis* production in Indonesia. Until now, the effective technique to control the disease has not been found yet. Meanwhile biobactericide has been widely applied in other countries. The objectives of this research were (1) to determine type of antagonist bacteria used as biobactericide active material, (2) biopesticide formula which were effective to control soft rot disease, (3) to get information mechanism of suppressing on antagonist bacteria, and (4) to examine the population density that colonized on *Phalaenopsis* orchid leaves having treated. The study was conducted at Bacteriology Laboratory and Biocontrol Glasshouse of the Indonesian Ornamental Plant Research Institute, started from January to December 2011. Antagonist bacteria isolates no. B7 and B30 were suspended on the sterile water and the organic materials containing minimum or optimum of protein and carbohydrates, respectively. Then those biobactericides were applied by spraying to the leaves of *Phalaenopsis* orchids the day before or after the soft rot inoculation (by pin pricking method). A randomized block design with 15 treatments and three replications was used in this study. The results showed that (1) antagonist bacteria no. B7 and B30 used as biobactericide active material were grouping in to the *Bacillus* sp. genus (2) antagonist bacteria isolate no. B7 that suspended in an organic material containing minimum of carbohydrate-protein was applied 1 day before inoculation (treatment of a_1, b_7) was effective to control *P. viridiflava* with suppressing at 33.45%, (3) suppressing mode rate of action of this treatment to suppress this pathogen was influenced by the degree of colonization and antibiosis reactions, and (4) the population density of such treatment before application was $9 \pm 7 \times 10^2$ cfu/g and increased to $8 \pm 3 \times 10^3$ cfu/g leaf during 3 days. The application of the biobactericides was quite promising to increase orchids farmers' income and to push the development of national resources based biobactericide industry.

Keywords: *Phalaenopsis* orchids; Bacterial soft rot; *Pseudomonas viridiflava*; Effectiveness; Biobactericide; Antagonist bacteria

Anggrek merupakan kelompok tanaman hias yang penting dan bernilai ekonomi tinggi. Di Indonesia anggrek banyak diusahakan oleh petani anggrek dan pengusaha secara komersial. Sebanyak 5.000 jenis anggrek tumbuh di Indonesia yang sebagian besar (lebih dari 1.327 jenis) tumbuh di Pulau Jawa dan selebihnya tumbuh di Pulau Sumatera, Kalimantan, Sulawesi, Papua, dan pulau lainnya (Irawati 2002). Pada tahun 2007 sekitar 100 juta tangkai anggrek diproduksi oleh petani dengan luas panen sekitar 123 ha. Salah satu kendala yang menjadi faktor pembatas

dalam budidaya anggrek ialah serangan patogen busuk lunak (PBL) yang disebabkan oleh bakteri *Erwinia carotovora* pv. *carotovora* atau *Pectobacterium carotovorum* pv. *carotovorum* (Samson *et al.* 2005).

Berdasarkan hasil penelitian Hanudin *et al.* (2011), PBL yang menyerang tanaman anggrek di Jawa Barat dan DKI Jakarta disebabkan oleh *Pseudomonas viridiflava*. Patogen ini merupakan salah satu kendala utama dalam budidaya tanaman anggrek dan tanaman lainnya di Indonesia dan juga di beberapa negara beriklim tropis dan subtropis di dunia (Chen *et al.* 2003).



Hanudin *et al.* 2011). Di Bogor (Jawa Barat) patogen tersebut dapat menginfeksi hampir 100% dari populasi anggrek *Oncidium* dan 80% dari populasi anggrek *Paphiopedilum* (Hanudin *et al.* 2011), sedangkan di DI Yogyakarta, PBL dapat menginfeksi tanaman anggrek *Grammatophylum*, *Dendrobium*, dan *Cattleya* dengan intensitas serangan berkisar antara 23,9 dan 41,7% (Joko *et al.* 2010).

Pada Agustus 2008, di Florida Selatan (USA), sekitar 50% populasi anggrek *Oncidium* var. Gower Ramsey terinfeksi penyakit ini (Cating & Palmateer 2011). Selain anggrek, sejak tahun 1999 patogen ini ditemukan dan menyebabkan kerusakan yang sangat parah pada tanaman kacang-kacangan (*Phaseolus vulgaris*), buah kiwi (*Actinidia deliciosa*), dan selada (*Lactuca sativa*) di wilayah Spanyol (Gonzalez *et al.* 2003, Goumans & Chatzaki 1998). Ayasan *et al.* (2003) melaporkan bahwa di Turki, PBL telah menginfeksi 10% tanaman melon (*Cucumis melo* cv. Nun).

Dalam penerapan pertanian organik pada era *green agriculture*, upaya-upaya pengendalian PBL diarahkan pada tujuan mendapatkan produk yang sehat serta ramah lingkungan sebagai fokus penelitian saat ini dan masa mendatang. Pengendalian PBL secara hayati merupakan salah satu alternatif yang dewasa ini semakin diminati dalam rangka pengembangan pertanian organik yang ramah lingkungan. Penggunaan biobakterisida berbahan aktif bakteri antagonis untuk pengendalian PBL pada anggrek *Phalaenopsis* mulai dirintis sejak tahun 2009. Hasil penelitian Nawangsih *et al.* (2010) menunjukkan bahwa biobakterisida berbahan aktif *Bacillus subtilis* nomor isolat B12 dan *Pseudomonas fluorescens* isolat Pf10 yang diformulasi dalam bentuk cair dalam larutan kascing dan molase dapat mengendalikan patogen tersebut pada anggrek *Phalaenopsis*. Selanjutnya Djatnika *et al.* (2010) melaporkan bahwa dua isolat bakteri antagonis (no. B7 dan B30) dapat menekan PBL, masing-masing sebesar 24,53 dan 34,07%. Bakteri antagonis tersebut diaplikasikan tanpa menggunakan media pembawa. Oleh karena itu pada penelitian ini diteliti media pembawa yang sesuai untuk meningkatkan keefektifannya dalam menekan PBL.

Tujuan penelitian ialah (1) mendapatkan informasi jenis bakteri antagonis yang dapat mengendalikan *P. viridiflava* pada anggrek dan digunakan sebagai bahan aktif biobakterisida, (2) mendapatkan formula bakteri antagonis yang efektif mengendalikan *P. viridiflava* pada anggrek *Phalaenopsis*, (3) mendapatkan informasi tentang mekanisme penekanan bakteri antagonis, dan (4) memperoleh informasi kerapatan populasi bakteri antagonis yang berkoloni pada daun setelah mendapat perlakuan biobakterisida. Hipotesis

pada penelitian ialah (1) bakteri antagonis yang dapat mengendalikan PBL pada anggrek diduga berasal dari genus *Bacillus* sp., (2) salah satu bakteri antagonis yang disuspensikan ke dalam larutan bahan organik yang mengandung karbohidrat dan protein, efektif mengendalikan *P. viridiflava* pada anggrek, (3) mekanisme penekanan biobakterisida terhadap PBL dipengaruhi oleh kolonisasi atau efek antibiosis dari bakteri antagonis, dan (4) kerapatan populasi bakteri antagonis yang berkoloni pada daun setelah mendapat perlakuan biobakterisida diduga dapat meningkat bila dibanding sebelum aplikasi.

BAHAN DAN METODE

Penelitian dilakukan di Laboratorium Bakteriologi dan Rumah Kaca Biokontrol, Balai Penelitian Tanaman Hias (Balithi) Segunung (1100 m dpl.), mulai Bulan Januari sampai dengan Desember 2011.

Penyiapan Tanaman Uji

Pada penelitian ini digunakan anggrek *Phalaenopsis* berumur 7 bulan sejak dikeluarkan dari botol (aklimatisasi) yang mempunyai rerata daun 4–5 helai, diperoleh dari *Nursery* Harry Fonte Jakarta. Bibit anggrek ditanam dalam pot plastik berdiameter 10 cm yang berisi media campuran potongan pakis dan spagnum (1:1 v/v) serta dilindungi dari sinar matahari langsung dengan naungan paranet 65%.

Pemeliharaan rutin tanaman dilakukan sesuai standar operasional prosedur (SOP) budidaya anggrek. Penyiraman tanaman dilakukan minimal dua kali sehari pagi dan sore hari, dengan cara menyemprotkan air ke seluruh bagian tanaman terutama permukaan bawah daun dengan volume semprot 50 ml/tanaman. Pemupukan dengan Growmore 32:10:10 pada masa vegetatif dan Growmore 20:20:20 pada masa generatif, rutin diberikan secara homogen pada semua tanaman perlakuan. Pemupukan dilakukan 1 minggu sekali dengan cara menyemprotkan larutan pupuk ke seluruh bagian tanaman, terutama permukaan bawah daun dengan volume semprot 30 ml/tanaman.

Identifikasi Bakteri Antagonis

Isolat bakteri antagonis yang digunakan sebagai bahan aktif biopestisida ini ialah no. B7 dan B30, diperoleh dari hasil penelitian Djatnika *et al.* (2010). Kedua isolat bakteri tersebut diidentifikasi karakteristik morfologi dan biokimianya (warna dan bentuk koloni pada media King's B, elevasi permukaan, dan tepian koloni) yang dilakukan berdasarkan metode Schad *et al.* (2001).

Pengujian gram dilakukan dengan cara yang paling sederhana dan akurat yang dikenal dengan metode



Ryu, yaitu dengan cara meneteskan 10 µl larutan KOH 3% pada isolat bakteri pada gelas objek, kemudian digosok menggunakan jarum oose dan angkat jarum oose tersebut pelan-pelan. Amati reaksi yang terjadi, apabila oose diangkat, maka suspensi bakteri tersebut lengket dan terbentuk benang halus, berarti bakteri tersebut ialah gram negatif dan sebaliknya (Suslow *et al.* 1982).

Pembuatan Biobakterisida dan Propagul Bakteri Patogen

Biakan murni isolat bakteri nomor B7 dan B30 masing-masing ditumbuhkan pada media *nutrient agar* (NA) atau King's B (KB), kemudian dieramkan dalam inkubator suhu $30 \pm 2^\circ\text{C}$ selama 24 jam. Isolat bakteri tersebut diambil tiga loop penuh dan disuspensikan ke dalam 10 ml air steril, divorteks supaya homogen, sehingga terbentuk suspensi dengan kerapatan 10^{12} colony forming unit (cfu)/ml. Satu ml suspensi isolat tersebut dituangkan ke dalam 500 ml media *nutrient broth* (NB) pada erlenmeyer kapasitas 750 ml, kemudian dimasukkan ke dalam penangas air pada suhu 30°C sambil digoyang dengan kecepatan 3 rpm selama 24 jam. Sel bakteri dihitung dengan metode tidak langsung (pengenceran) dengan kerapatan 10^9 cfu/ml, kemudian disuspensikan ke dalam air steril atau campuran bahan organik yang mengandung karbohidrat minimal dan protein optimal (sesuai perlakuan), kemudian diaplikasikan pada tanaman uji dengan cara menempelkan kapas yang telah dicelupkan ke dalam larutan biopestisida dan penyemprotan menggunakan *hand sprayer* kapasitas 2 l.

Inokulasi Bakteri Patogen dan Aplikasi Biobakterisida

Isolat bakteri patogen yang digunakan ialah *P. viridiflava* no. isolat Phal Sgn-7, yang diperoleh dari

koleksi Laboratorium Bakteriologi Balithi Segunung. Phal Sgn-7 merupakan isolat *P. viridiflava* yang bervirulensi tinggi terhadap berbagai jenis anggrek (Hanudin *et al.* 2011). Isolat tersebut merupakan hasil isolasi dari daun tanaman anggrek *Phalaenopsis* yang tumbuh di Rumah Sere Bagian Pemuliaan Kebun Percobaan (KP) Segunug, yang dikoleksi pada 9 September 2008.

Daun anggrek diinokulasi *P. viridiflava* dengan cara *pin pricking* sebanyak lima tusukan sedalam kurang lebih 1-2 mm bergantung pada ketebalan daun (Gambar 1), kemudian pada bekas tusukan ditempelkan kapas yang sebelumnya telah dicelupkan pada suspensi PBL selama 10 menit (Hanudin *et al.* 2011). Sepuluh menit kemudian kapas yang menempel pada daun anggrek tersebut diganti dengan kapas baru yang sebelumnya telah dicelupkan pada suspensi sesuai perlakuan (Tabel 1) dan diikuti *spraying* dengan interval 7 hari sekali. Pada setiap kompot anggrek, *pin pricking* dilakukan terhadap dua helai daun (daun pertama dan kedua dari bawah)/perlakuan.

Rancangan Percobaan dan Model Analisis

Rancangan percobaan yang digunakan ialah acak kelompok dengan 15 perlakuan dan diulang sebanyak tiga kali. Model analisis rancangan tersebut ialah:

$$Y_{ij} = \mu + t_i + k_j + e_{ij}$$

di mana :

Y_{ij} = Nilai pengamatan pada perlakuan ke-*i* pada kelompok ke-*j*;

μ = Rerata umum;

t_i = Pengaruh perlakuan ke-*i*;

k_j = Pengaruh kelompok ke-*j*;

e_{ij} = Galat percobaan (pengaruh acak) pada perlakuan ke-*i* kelompok ke-*j*.



Daun anggrek dilukai menggunakan jarum hypodermic syringe (berdiameter 0,6 mm)



Pada bekas luka, ditempelkan kapas yang sebelumnya dicelupkan dalam suspensi *P. viridiflava*

Gambar 1. Metode inokulasi *P. viridiflava* pada anggrek *Phalaenopsis* secara *pin pricking* (Inoculation method of *P. viridiflava* on leaves of *Phalaenopsis* orchids used *pin pricking* method)



Tabel 1. Jumlah perlakuan dalam percobaan kemangkusan biobakterisida berbahan aktif bakteri antagonis terhadap patogen busuk lunak pada anggrek (*Number of treatments on the effectiveness of biobactericide containing antagonist bacteria against bacterial soft rot disease on Phalaenopsis orchids*)

Kode perlakuan (Treatments code)	Keterangan (Remarks)
$f_0 a_1 b_7$	f = Media formulasi bakteri antagonis dengan air suling
$f_0 a_2 b_7$	f1= Media formulasi dari bahan alami yang mengandung karbohidrat dan protein minimal
$f_0 a_1 b_{30}$	f2 = Media formulasi dari bahan alami yang mengandung karbohidrat dan protein optimal
$f_0 a_2 b_{30}$	a1 = Aplikasi formulasi bakteri antagonis dilakukan sehari sebelum inokulasi PBL dan diikuti setiap 7 hari
$f_1 a_1 b_7$	a2 = Aplikasi formulasi bakteri antagonis dilakukan sehari setelah inokulasi PBL dan diikuti setiap 7 hari.
$f_1 a_2 b_7$	s = Streptomisin sulfat (0,2 %)
$f_1 a_1 b_{30}$	K = Kontrol (air steril)
$f_1 a_2 b_{30}$	* Media f1 dan f2 yang efektif, rencananya diajukan patennya, sehingga tidak diuraikan secara rinci.
$f_2 a_1 b_7$	B7= Bakteri antagonis nomor isolat 7
$f_2 a_2 b_7$	B30= Bakteri antagonis nomor isolat 30
$f_2 a_1 b_{30}$	
$f_2 a_2 b_{30}$	
$s a_1$	
$s a_2$	
K (kontrol= air steril)	

Data yang terkumpul dalam percobaan dianalisis menggunakan analisis varian (anova) dengan SAS 3.0. Jika di antara perlakuan terdapat pengaruh perbedaan yang nyata, maka dilakukan pengujian nilai rerata perlakuan menggunakan uji jarak berganda duncan pada taraf kepercayaan 95%.

Pengamatan

Pengamatan dilakukan setiap hari meliputi : (1) waktu inkubasi, (2) intensitas serangan PBL (keparahan

penyakit), dan (3) kolonisasi bakteri antagonis pada daun. Waktu inkubasi diamati 1–7 hari setelah inokulasi (HSI), sedang derajat kolonisasi (DK) diamati 1 hari setelah aplikasi berdasarkan metode Hsu *et al.* (1993). Intensitas serangan (IS) dihitung menggunakan rumus Abdalah & Kadzimin (1993), sebagai berikut:

$$IS = A/N \times 100\%$$

di mana:

IS = Intensitas serangan

A = Luas bagian daun yang bergejala penyakit busuk lunak;

N = Luas bagian daun sebelum diinokulasi.

Selain pengamatan tersebut di atas diamati persentase penekanan (PP) 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

Karakteristik Morfologi dan Biokimia Bakteri Antagonis

Berdasarkan hasil identifikasi metode Schad *et al.* (2001), kedua isolat tersebut (B7 dan B30) dikelompokkan ke dalam bakteri gram positif dan genus *Bacillus* (Tabel 2). Dinding sel gram positif terdiri atas satu lapisan homogen, yang susunan kimia dinding sel bakteri tersebut 86% atau lebih terdiri atas mukopeptid dan senyawa-senyawa polisakarida sederhana, seperti asam teichoat. Sifat dari polisakarida ialah terbentuknya gel apabila bereaksi dengan KOH (Suslow *et al.* 1982).

Yuen *et al.* (1985) melaporkan bahwa salah satu bakteri gram positif ialah *Bacillus subtilis*. Bakteri ini dapat menekan serangan *F. oxysporum* f. sp. *dianthi* pada tanaman anyelir sampai dengan 40%, penyakit karat pada buncis (Baker *et al.* 1985), penyakit layu *Verticillium* pada maple (Hall *et al.* 1986, Hall & Davis 1990), dan penyakit busuk coklat yang disebabkan oleh *Monilinia fructicola* Wint. pada tanaman peach (Pusey *et al.* 1986). Sementara *B. subtilis* isolat kisan dapat menekan serangan *damping off* yang disebabkan oleh *Rhizoctonia solani* (Hanudin *et al.* 2004).



Tabel 2. Karakteristik spesies bakteri antagonis berdasarkan uji morfologi dan biokimia (*Suspected antagonist bacterial species based on morphological and biochemical characteristics*)

Jenis pengujian (<i>Property tests</i>) Morfologi dan biokimia pada media King's B	Kode isolat (<i>Isolates code</i>)	
	B7	B30
Gram (<i>Gram</i>)	Positif (<i>Positive</i>)	Positif (<i>Positive</i>)
Warna koloni (<i>Colony color</i>)	Krem/putih kekuning-kuningan (<i>White yellowish</i>)	Krem/putih kekuning-kuningan (<i>White yellowish</i>)
Bentuk koloni (<i>Colony shape</i>)	Bulat (<i>Round</i>)	Bulat (<i>Round</i>)
Ukuran koloni (<i>Colony size</i>)	1–3 mm	1–3 mm
Tepian koloni (<i>Colony edge</i>)	Rata/bergelombang (<i>Flat/wave</i>)	Rata/bergelombang (<i>Flat/wave</i>)
Elevasi permukaan koloni (<i>Colony surface elevation</i>)	Datar dan kasar (<i>Smooth and rough</i>)	Datar dan kasar (<i>Smooth and rough</i>)
Kesimpulan genus (<i>Conclusions genus</i>):	<i>Bacillus</i>	<i>Bacillus</i>

Pengaruh Biobakterisida terhadap Waktu Inkubasi dan Intensitas Serangan *P. viridiflava*

Gejala awal serangan *P. viridiflava* pada anggrek *Phalaenopsis* ialah daun yang terinfeksi berwarna hijau pucat, selanjutnya tampak bercak kebasahan berwarna hijau tua dan akhirnya seluruh daun membusuk (Gambar 2). Penyakit selanjutnya berkembang ke arah batang. Daun dan batang yang terserang menimbulkan bau busuk.

Bau busuk disebabkan oleh *P. viridiflava* yang mensekresikan satu set enzim maupun isoenzim dalam jumlah besar, sehingga mampu mendegradasi kompleksitas polimer dinding sel tanaman (Collmer & Keen 1986). Enzim pektinase yang merupakan faktor utama patogenisitas bakteri PBL digunakan untuk memecah pektin dalam lamela tengah dan dinding sel tanaman, sehingga menyebabkan kematian jaringan tanaman dan kerusakan sel (Barras *et al.* 1994). Patogen ini 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).

Intensitas serangan *P. viridiflava* pada tanaman anggrek yang diuji bervariasi bergantung pada kemangkusan tiap perlakuan. Intensitas serangan tersebut berkisar antara 0,82 dan 92% yang setelah ditransformasi berkisar antara 2,33 dan 8,55% dengan waktu inkubasi pada semua perlakuan adalah 1 hari (Tabel 3).

Pada pengamatan 1 sampai dengan 7 hari setelah inokulasi (HSI) tampak bahwa perlakuan bakteri antagonis no.B30 yang disuspensikan ke dalam air suling dan diaplikasikan 1 HSI (perlakuan $f_{0.2}b_{30}$), dapat menekan serangan *P. viridiflava* pada *Phalaenopsis* dengan persentase penekanan paling besar (41,55%). Namun perlakuan tersebut berdasarkan penelitian Nawangsih *et al.* (2010) tidak bertahan lama disimpan (maksimal 3 bulan) akibat tidak adanya sumber bahan makanan bagi bakteri antagonis dalam formulasi air steril, sehingga perlakuan tersebut tidak memenuhi syarat komersialisasi (ketahanan simpan minimal 6



Gambar 2. Gejala penyakit busuk lunak pada daun anggrek *Phalaenopsis* hasil inokulasi dengan metode *pin pricking*, gejala positif (tanda panah kanan) (*Symptoms of bacterial soft rot resulting by pin pricking inoculation method on orchid *Phalaenopsis* leaves, positive symptoms (right side arrow)*)

bulan) dari Pusat Perlindungan Varietas Tanaman dan Perizinan Pertanian, Kementerian Pertanian Republik Indonesia (dalam Basuki & Suharyanto 2003).

Formulasi biobakterisida yang memenuhi syarat komersialisasi ialah perlakuan bakteri antagonis no. isolat B7 yang disuspensikan ke dalam bahan alami yang mengandung karbohidrat dan protein minimal dan diaplikasikan 1 hari sebelum inokulasi *P. viridiflava* (perlakuan $f_{1a}b_7$). Perlakuan tersebut diduga bersifat preventif dan dapat menekan serangan *P. viridiflava* sebanyak 33,45%. Kemangkusan perlakuan biobakterisida $f_{1a}b_7$ setara dan tidak berbeda nyata dengan perlakuan $f_{0.2}b_{30}$ dan streptomisin sulfat (bakterisida kimia sintetik/perlakuan Sa_2 tanpa b_{30}) yang diaplikasikan 1 HSI patogen (kuratif). Persentase penekanan kedua perlakuan tersebut ($f_{0.2}b_{30}$ dan Sa_2 tanpa b_{30}) masing-masing ialah 41,55% dan 49,18%



Tabel 3. Waktu inkubasi, intensitas serangan PBL, dan persentase penekanannya pada tanaman anggrek *Phalaenopsis* yang mendapat perlakuan beberapa formulasi biopestisida (Incubation time, disease intensity of SRBD, and percentage of suppression on *Phalaenopsis* orchid treated by several different biopesticide formulation*)

Perlakuan (Treatments)	Waktu inkubasi (Incubation times), Hari (Days)	Intensitas serangan PBL menurut waktu setelah inokulasi (SRBD intensity according to time after inoculation), %				Penekanan dibanding kontrol (Suppression compared with control treatment) %
		1	3	5	7 ***	
F0 a1 b7	1	2,48 ab	5,16 a	7,18 a	7,86 a	-
F0 a2 b7	1	2,58 ab	5,57 a	7,75 a	8,24 a	-
F0 a1 b30	1	2,48 ab	4,38 ab	5,82 ab	6,00 b	-
F0 a2 b30	1	2,42 ab	3,89 b	4,66 b	4,98 b	41,55
F1 a1 b7	1	2,33b**	3,92 b	5,06 b	5,67 b	33,45
F1 a2 b7	1	2,64 a	6,07 a	7,55 a	8,55 a	-
F1 a1 b30	1	2,40 b	4,84 ab	6,46 a	6,70 ab	-
F1 a2 b30	1	2,43 ab	4,22 b	6,22 a	6,28 ab	-
F2 a1 b7	1	2,49 ab	4,92	6,49 a	6,56 ab	-
F2 a2 b7	1	2,52 ab	4,91 a	6,61 a	6,71 ab	-
F2 a1 b30	1	2,56 ab	5,53 a	7,14 a	7,35 a	-
F2 a2 b30	1	2,57 ab	5,55 a	7,17 a	7,18 a	-
Sa ₁ (Streptomisin sulfat diaplikasikan sebelum inokulasi patogen) (Streptomycin sulphate applied before pathogen inoculation)	1	2,66 a	5,45 a	7,17 a	7,65 a	-
Sa ₂ (Streptomisin sulfat diaplikasikan setelah inokulasi patogen) (Streptomycin sulphate applied after pathogen inoculation)	1	2,28 b	2,9 b	3,85 b	4,33 b	49,18
Kontrol = air steril (Check = sterile water)	1	2,69 a	6,19 a	8,32 a	8,52 a	-

* Data ditransformasi ke dalam $\sqrt{\text{Arc sin}}$ - perlakuan tersebut tidak dapat menekan *P. viridiflava* (Data transformed into $\sqrt{\text{Arc sin}}$ that treatment could not suppress the bacteria)

** Angka rerata yang diikuti huruf yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata menurut uji LSD pada taraf nyata 5% (Mean followed by the same letters are not significantly different at 5% level according to LSD test)

*** Pengamatan dilakukan sampai 7 HSI karena pada 8 HSI sebanyak 80% perlakuan terinfeksi *P. viridiflava* dengan intensitas serangan berkisar antara 75 dan 100% (Observation conducted until 7 DAI because on the 8 DAI 80% of the treatments infected by *P. viridiflava* with 75-100% of intensity)

Tabel 4. Kolonisasi bakteri antagonis pada filosfer daun anggrek sebelum perlakuan dan 3 HSI, daun anggrek (Colonization of antagonist bacteria on orchid leaves phyllosphere at 3 days before and after biobactericide application orchids leaves)

Perlakuan (Treatments)	Populasi bakteri antagonis pada filosfir daun anggrek (Population of antagonist bacteria on phyllosphere orchids leaf) cfu/mg	
	Sebelum perlakuan (Before treatment)	3 hari setelah aplikasi (3 days after application times)
F0 a1 b7	(9±1)10 ^{2*}	(5±2)10 ³
F0 a2 b7	(7±2)10 ²	(5±2)10 ³
F0 a1 b30	(7±2)10 ²	(9±5)10 ⁴
F0 a2 b30	(7±2)10 ²	(6±3)10 ⁵
F1 a1 b7	(9±7)10 ²	(8±3)10 ³
F1 a2 b7	(3±2)10 ²	(7±4)10 ³
F1 a1 b30	(2±1)10 ²	(2±1)10 ³
F1 a2 b30	(2±1)10 ²	(7±3)10 ³
F2 a1 b	(2±1)10 ²	(2±1)10 ²
F2 a2 b7	(7±2)10 ²	(2±1)10 ³
F2 a1 b30	(9±7)10 ²	(8±3)10 ³
F2 a2 b30	(3±2)10 ²	(7±4)10 ²
S a1 (kontrol tanpa B7)	(2±1)10 ²	(3±1)10 ²
S a2 (kontrol tanpa B30)	(2±1)10 ²	(4±1)10 ²
Kontrol = air steril	(2±1)10 ²	(2±1)10 ²

*Rerata dan nilai ragam (Average and value variants)



(Tabel 3). Mekanisme penekanan suatu mikroba antagonis terhadap patogen dapat terjadi melalui hiperparasitisme, kompetisi ruang dan hara, serta antibiosis dan lisis.

Pengaruh Biobakterisida terhadap Kolonisasi Bakteri Antagonis pada Daun

Kemangkusan formulasi biobakterisida terhadap intensitas serangan *P. viridiflava* pada tanaman angrek *Phalaenopsis* tampaknya dipengaruhi oleh derajat kolonisasi bakteri antagonis pada daun angrek. Pada Tabel 4 tampak bahwa perlakuan formulasi biobakterisida $f_{0.2}b_{30}$ menunjukkan DK pada 3 HSI yang paling tinggi bila dibandingkan sebelum aplikasi meningkat menjadi $6 \pm 3 \times 10^5$ cfu/g daun pada 3 HSI. Formulasi biobakterisida $f_{1.1}b_7$ sebelum aplikasi sebesar $9 \pm 7 \times 10^2$ meningkat menjadi $8 \pm 3 \times 10^3$ cfu/g daun pada 3 HSI.

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 (Cook & Baker 1983).

KESIMPULAN

1. Bakteri antagonis nomor isolat B7 dan B30 yang digunakan sebagai bahan aktif biobakterisida termasuk ke dalam genus *Bacillus*.
2. Biobakterisida yang efektif menekan *P. viridiflava* dan memenuhi syarat komersialisasi ialah perlakuan bakteri antagonis no. isolat B7 yang disuspensikan ke dalam bahan alami yang mengandung karbohidrat dan protein minimal dan diaplikasikan 1 HSI *P. viridiflava* (perlakuan $f_{1.1}b_7$).
3. Perlakuan tersebut diduga bersifat preventif dan dapat menekan serangan *P. viridiflava* sebanyak 33,45%.
4. Mekanisme penekanan biopestisida tersebut ialah dengan cara kolonisasi.
5. Kerapatan populasi perlakuan tersebut sebelum aplikasi selalu meningkat pada 3 HSA.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih dan penghargaan yang setinggi-tingginya kepada Kepala Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian, melalui Kepala Pusat Penelitian dan Pengembangan Hortikultura, dan Kepala Balai Penelitian Tanaman

Hias yang telah membiayai melalui APBN TA 2011, memberikan saran, kritik dalam perencanaan dan pelaksanaan penelitian. Ucapan terima kasih juga disampaikan kepada Ridwan Daelani, Dede Surachman, Muhidin, Ade Sulaeman, M. Irman Firmansyah, Arlan Hernawan, Asep Samsudin, dan semua pihak yang telah membantu terlaksananya penelitian ini.

PUSTAKA

1. Abdallah, H & Kadzimin S 1993, 'Etiology of bacterial soft rot of orchids', University Malaysia Press, *Pertanika J. Trop. Agric. Sci.*, vol. 16, no. 91, pp. 1-4.
2. Ayasan, Y, Mirik, M, Ala, A, Sahin, F & Cinar, O 2003, 'First report of *Pseudomonas viridiflava* on melon in Turkey', *BSPP New Dis. Rep.*, vol. 7, pp. 22.
3. Basuki & Suharyanto 2003, 'Persyaratan dan pengujian mutu produk biopestisida', Makalah Lokakarya Biopestisida, Direktorat Jenderal Pupuk dan Pestisida, Departemen Pertanian RI, Jakarta, 30 Oktober.
4. Baker, CJ, Stavely, RJ & Mock, N 1985, 'Biocontrol of bean rust by *Bacillus subtilis* under field conditions', *Plant. Dis.* vol. 69, pp. 770-72.
5. Barras, F, Van Gijsegem, F & Chatterjee, AK 1994, 'Extracellular enzymes and pathogenesis of soft rot of *Oncidium* orchids caused by *Dikeya* sp. (*Pectobacterium chrysanthemi*) in Florida', *Apsnet, Plant Dis.*, vol. 95, no.1, pp. 74.1.
6. Cating, RA & Palmateer, AJ 2011, 'Bacterial soft rot of *Oncidium* orchids caused by a *Dickeya* sp. (*Pectobacterium chrysanthemi*) in Florida', *APSnet, Plant Dis.*, vol. 95, no. 1, pp. 74.1 -74.1.
7. Chia, HL, JLu, JC, Prasad, V, Hsiao, HH, Lee, SJ, Yang, NS, Huang, HE, Feng, TY & Chan, WH 2003, 'The sweet pepper ferredoxin-like protein (pflp) conferred resistant against soft rot disease in *Oncidium* orchid', *Transgenic Res.*, vol. 12, no. 3, pp. 329-36.
8. Collmer, A & Keen, NT 1986, 'The role of pectic enzymes in plant pathogenesis', *Annu. Rev. Phytopathol.*, vol. 24, pp. 383-453.
9. Cook, RJ & Baker, KF 1983, *The nature and practice of biological control of plant pathogens*, The American Phytopathol. Soc., USA.
10. Djatnika, I, Nuryani, W, Hanudin & Silvia, E 2010, *Seleksi bakteri antagonis yang efektif untuk mengendalikan penyakit tular media tanaman anggrek (4 isolat)*, Laporan Hasil Penelitian, Balai Penelitian Tanaman Hias, Segunung.
11. 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.
12. Goumans, DE & Chatzaki, AK 1998, 'Characterization and host range evaluation of *Pseudomonas viridiflava* from melon, blite, tomato, chrysanthemum and eggplant', *Europ. J. Plant Pathol.*, vol. 104, pp. 181-88.
13. Hall, TJ, Schreiber, RL & Leben, C 1986, 'Effect of rhizome colonizing *Bacillus* spp. on *Verticillium* wilt in melons', *Plant Dis.* vol. 70, pp. 521-24.



14. Hall, TJ & Davis, WEE 1990, 'Survival of *Bacillus subtilis* in silver and sugar maple seedlings over a two year period', *Plant Dis.*, vol. 74, pp. 608-9.
15. Handayati, W, Hanudin & Soedjono, S 2004, 'Resistensi genotip anggrek *Phalaenopsis* terhadap penyakit busuk lunak', *J. Hort. Ed. khusus*, vol. 14, hlm. 398-402.
16. Hanudin, Silvia, E, Marwoto, B, Suhardi & Handayati, W, 2004a. 'Skrining antagonistik beberapa strain *Bacillus spp.* terhadap *Rhizoctonia solani* isolat krisan', *J. Penel. dan Informasi Pertanian Agrin*, vol. 8, no. 1, hlm. 1-5.
17. 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, pp. 185-93.
18. Hsu, ST, Chen, CC, Liu, HY & Tzeng, KC 1993, Colonization of roots and control of bacterial wilt of tomato by *Pseudomonas fluorescens*, ' *Proceeding of an International Conference Aciar*', vol. 74, pp. 305-11.
19. Hugouvieux-Cotte Pattat, N, Condemine, G, Nasser, W & Reverchon, S 1996, 'Regulation of pectonolysis in *Erwinia chrysanthemi*', *Ann. Rev. Microbiol.*, vol. 50, pp. 213-57.
20. Irawati 2002, Pelestarian jenis anggrek di Indonesia, *Prosiding seminar anggrek Indonesia*, Yogyakarta, 26 Oktober, hlm. 9-17.
21. Joko, T, Hanudin & Subandriyah, S 2010, *Karakterisasi mikrobiologi dan molekular bakteri penyakit busuk lunak pada anggrek untuk mendukung pengembangan deteksi dini dan perakitan tanaman tahan melalui introduksi bakteri endosimbion*, Laporan Hasil Penelitian KKP3T TA 2009, Balai Penelitian Tanaman Hias, Segunung.
23. Nawangsih, AA, Hanudin, Tjahjono, B & Sanjaya, L 2010, *Pengendalian Erwinia spp. pada anggrek menggunakan biopestisida mikrobial berbahan aktif Bacillus subtilis dan Pseudomonas fluorescens*. Laporan Hasil Penelitian KKP3T, TA. 2008-2009. Kerjasama antara Badan Litbang Pertanian dan Institut Pertanian Bogor, Bogor.
24. Pusey, PL, Wilson, CL, Hotchkiss, MW & Franklin, JD 1986, 'Compatibility of *Bacillus subtilis* for postharvest control of peach brown rot with commercial fruit waxes, dicloran, and cold-storage conditions', *Plant Dis.*, vol. 70, pp. 587-90.
25. 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.
26. Schaad, NW, Jones, JB & Chun, W 2001, *Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria*, APS Press USA, America.
27. Suslow, TV, Scorth, NN & Isaka, M 1992, 'Application of rapid method from gram differentiation of plant pathogenic and saprophytic bacteria without staining', *Phytopathol.*, vol. 72, pp. 917-18.
28. Yuen, GY, Schroth, MN & McCain, AH 1985, 'Reduction of *Fusarium* wilt of carnation with suppressive soils and antagonistic bacteria', *Plant Dis.*, vol. 69, pp. 1071-75.

