

LAMPIRAN

A. Sarana dan Prasarana

Penelitian ini akan dilaksanakan pada Laboratorium Mikrobiologi Jurusan Biologi FMIPA, Laboratorium Kimia Organik FMIPA dan Rumah Kaca di Laboratorium Hama dan Penyakit Tanaman Fakultas Pertanian Universitas Riau. Alat-alat yang tersedia yang mendukung pelaksanaan penelitian yang direncanakan seperti:

| No. | Nama Alat | Jumlah/Unit | Kondisi |
|-----|-------------------------------|-------------|---------|
| 1. | Laminar Flow | 1 | Baik |
| 2. | Inkubator (Hareus) | 2 | Baik |
| 3. | Hot plat | 1 | Baik |
| 4. | Mikroskop (Nikon) | 10 | Baik |
| 5. | Neraca analitik | 2 | Baik |
| 6. | Shaker (Gallenkamp) | 2 | Baik |
| 7. | Outoklaf | 1 | Baik |
| 8. | Spektrofotometer (Gallenkamp) | 2 | Baik |
| 9. | Perangkat KLT | 1 | Baik |
| 10. | Evaporator | 1 | Baik |
| 11. | Desikator | 5 | Baik |

B. BIOGRAFI/DAFTAR RIWAYAT HIDUP PENELITI

Ketua : Tetty Marta Linda, M.Si
Anggota 1 : Dra. Atria Martina, M.Si
Anggota 2 : Gulat Medali Emas, MP

C. DRAFT ARTIKEL ILMIAH

Publikasi ilmiah akan direncanakan pada HAYATI Journal of Biosciences dan Microbiology Indonesia setelah penelitian ini lengkap diselesaikan.



Aktivitas Antifungi Isolat Aktinomisetes dari Tanah Gambut yang Menghambat *Rhizoctonia solani*

Tetty Marta Linda¹, Atria Martina, Juni Sinaga, Gulat Medali Emas Manurung²

1Jurusan Biologi FMIPA Universitas Riau

2Jurusan Agronomi Fakultas Pertanian Universitas Riau

E-mail: tetty.martalinda@yahoo.com

Abstrak

Biological control offers an environmentally friendly alternative to the use of antifungal for controlling damping-off diseases. A collection of about 20 actinomycete strains from peat soil Riau was screened for the ability to produce metabolites that inhibit *R. solani* growth in vitro. Seven isolates showed strong in vitro antagonistic against *R. solani* in agar disc and well-diffusion methods by producing extra cellular antifungal metabolites.

Result obtained from the physiology and biochemical analyses including determination of characteristics proved that seven of the strains were similar whereas all the rest differed among each other.

Key word: actinomycetes, antifungal, biological control, *Rhizoctonia solani*

I. Pendahuluan

Hasil catatan FAO, kerugian karena penyakit tanaman tiap tahunnya untuk seluruh dunia kurang lebih 10%. Penyakit tanaman yang disebabkan oleh jamur umumnya menyebar melalui tanah. Jamur tersebut dapat menyerang perakaran dan pangkal batang dari tanaman, akibatnya tanaman akan mengalami penyakit rebah semai/rebah kecambah (*damping-off*), penyakit akar, penyakit busuk akar atau penyakit leher akar. Beberapa jamur yang terdapat di dalam tanah sebagai penyebab penyakit *damping-off* diantaranya *R. solani* dan *Sclerotium rolfsii* (Semangun 1991).

Jamur-jamur fitopatogen dapat dengan mudah dikendalikan dengan menggunakan senyawa kimia (fungisida). Pemakaian fungisida sintetik yang kurang tepat secara terus menerus menimbulkan efek samping yang merugikan seperti tertinggalnya residu kimia yang tidak dapat didegradasi alam dan menyebabkan

jamur patogen tanaman menjadi resisten terhadap senyawa kimia. Selain itu, pemakaian fungisida juga dapat membunuh organisme bukan sasaran (*non target organism*) yang berguna. Pada saat ini konsep yang harus dikembangkan dalam mengendalikan hama dan penyakit tanaman adalah selain memperhatikan efektivitas dan segi ekonominya juga masalah kelestarian lingkungan. Berpedoman pada konsep di atas, maka hal yang paling tepat dilakukan adalah pengendalian secara hayati yaitu suatu cara pengendalian hama penyakit tanaman dengan memanfaatkan musuh-musuh alami yang bersifat antagonis. Pemakaian agen pengendalian tersebut lebih menguntungkan karena tidak memberikan efek samping bagi lingkungan, dan agen pengendali tersebut dapat efektif untuk periode cukup lama bila telah diintroduksi di alam.

Salah satu cara pencegahan kerusakan lingkungan dan resistensi



mikroorganisme akibat pemakaian senyawa kimia dapat dilakukan dengan pemanfaatan kelompok aktinomisetes. Aktinomisetes adalah bakteri tanah yang berpotensi menghasilkan senyawa metabolik sekunder yang dapat dimanfaatkan dalam bidang pertanian sebagai pengendali hayati. Aktinomisetes hasil isolasi dari tanah gambut Riau tergolong unik karena hidup dalam ekosistem yang "tidak normal" (ekstrim) yaitu pH rendah (*acidophilic*), tanah gambut mengandung beberapa senyawa toksik, seperti fenol dan H₂S dan logam berat (Pb dan Fe). Aktinomisetes indigenous ini memiliki potensi untuk dikembangkan sebagai pengendali hayati. Salah satu lokasi yang potensial untuk mendapatkan aktinomisetes adalah tanah gambut. Hasil penelitian pendahuluan di laboratorium kami diperoleh aktinomisetes dari tanah gambut Kecamatan Siak 19 isolat (Linda *et al.* 2006^a), di tanah gambut Desa Langkai diperoleh 10 isolat aktinomisetes yang memiliki aktivitas terhadap *Rhizoctonia solani* dan *Sclerotium rolfsii* (Linda 2006^b) dan isolasi aktinomisetes di Desa Sungai Mempura diperoleh 12 isolat aktinomisetes yang diujikan terhadap bakteri Gram negatif dan positif (Linda *et al.* 2007). Penelitian ini bertujuan menyeleksi dan mengetahui aktivitas aktinomisetes endogenous Riau terhadap *R. solani* serta mengkarakterisasi aktinomisetes tersebut.

BAHAN DAN METODE

Peremajaan aktinomisetes

Aktinomisetes yang digunakan (40 isolat) merupakan koleksi Laboratorium Mikrobiologi Jurusan Biologi FMIPA Universitas Riau. Aktinomisetes ini hasil isolasi dari tanah gambut di Riau. Aktinomisetes

diremajakan dengan menumbuhkannya ke dalam medium *Casein Gliserol Agar* (CGA). Diinkubasi pada suhu kamar selama 7-14 hari.

Peremajaan *Rhizoctonia solani*

R. solani merupakan jamur patogen pada tanaman sawi didapat dari Laboratorium Hama dan Penyakit Tumbuhan Fakultas Pertanian Universitas Riau. *R. solani* ditumbuhkan pada medium PDA (*Potato Dextrosa Agar*).

Seleksi aktinomisetes yang memiliki aktivitas terhadap *R. solani* dengan metode agar disk

Isolat aktinomisetes ditumbuhkan pada medium CGA pada suhu kamar pada cawan petri selama 7 hari. *R. solani* ditanam secara *pour plate* ke dalam medium PDA dengan populasi 10⁶ CFU/ml. Aktinomisetes yang berumur 7 hari dipotong dengan ukuran 6 mm lalu ditransfer ke cawan PDA yang telah diinokulasikan spora *R. solani*, selanjutnya kultur diinkubasi pada suhu kamar selama 7 hari. Aktivitasnya dilihat dengan mengukur diameter zona hambatnya (Aghighi *et al.* 2004).

Aktivitas aktinomisetes dalam media fermentasi terhadap *R. solani*

Aktinomisetes terseleksi diuji lanjut menggunakan media fermentasi. Aktinomisetes ditumbuhkan dalam media CG cair sebanyak 50 ml dalam erlenmeyer 100 ml. Di shaker dengan kecepatan 150 rpm pada suhu kamar yang diinkubasi selama 15 hari. Cawan petri yang berisi medium PDA yang telah diinokulasikan spora *R. solani*, dibuat sumuran 6 mm menggunakan *cork borer*. Secara aseptis, diambil 20 µl kultur setiap 24 jam di mulai pada hari ke 7 lalu dimasukkan kultur dalam sumuran,

diinkubasi pada suhu kamar selama 3 hari. Pengamatan waktu inkubasi dalam media fermentasi bertujuan untuk melihat pada hari ke berapa aktinomisetes memiliki aktivitas tertinggi (Singh dan Agrawal 2001).

Karakterisasi Aktinomisetes

Melihat pertumbuhan aktinomisetes digunakan medium *Starch Casein Agar* (SCA) Singh dan Agrawal (2001; Panday *et al.* 2002), *Glycerol Yeast Extract Agar* (GYEA) dan *Gliserol Arginin Agar* (GAA) (Oskay *et al.* 2004).

Pengamatan miselium aerial dan miselium substrat dilakukan dengan teknik *slide agar* yang diinkubasi selama 3 hari pada suhu kamar. Diamati dengan mikroskop cahaya Olympus CX-41.

Kemampuan aktinomisetes dalam memanfaatkan sumber karbohidrat dilakukan dengan cara mencampurkan Nutrien Broth dengan 5 g sumber karbon yang diuji (selobiosa, dekstrosa, fruktosa, galaktosa, glukosa, laktosa, manitol, sukrosa dan silosa) 2 tetes indikator merah fenol, yang dilarutkan dengan 1000 ml akuades sehingga homogen. Reaksi positif jika medium berubah menjadi berwarna merah dan reaksi negatif jika medium berwarna kuning.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Seleksi aktinomisetes yang memiliki aktivitas terhadap *R. solani*

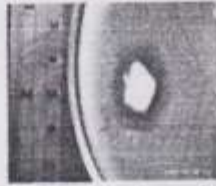
Aktinomisetes yang memiliki aktivitas ditandai dengan adanya zona bening disekitarnya. Pertumbuhan aktinomisetes tersebut mampu menghambat pertumbuhan jamur patogen *R. solani*. Pengujian dengan metode *agar disk* diperoleh 7 isolat aktinomisetes yang memiliki aktivitas. Hasil seleksi dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1 Hasil seleksi aktinomisetes terhadap pertumbuhan *R. solani*

| Kode isolat | Zona bening (cm) |
|-------------|------------------|
| Isolat L18 | 3.2 |
| Isolat L223 | - |
| Isolat L421 | - |
| Isolat L11 | - |
| Isolat L12 | 2.1 |
| Isolat L15 | 2.1 |
| Isolat L17 | - |
| Isolat L121 | - |
| Isolat L513 | - |
| Isolat L221 | - |
| Isolat L313 | 1.0 |
| Isolat SM11 | 2.1 |
| Isolat SM12 | 1.9 |
| Isolat SM13 | - |
| Isolat SM14 | - |
| Isolat SM15 | - |
| Isolat SM16 | - |
| Isolat SM17 | - |
| Isolat MH23 | 2.2 |
| Isolat MH11 | - |

Ket: (-) tidak memiliki aktivitas

Zona bening yang terbentuk menunjukkan bahwa isolat aktinomisetes termasuk isolat yang potensial menghasilkan senyawa antifungi. Isolat aktinomisetes yang mampu menghambat pertumbuhan *R. solani* adalah isolat L18, L12, L15, L313, SM11, SM12 dan LMH23. Tidak semua isolat aktinomisetes mampu menghambat *R. solani*. Hal ini disebabkan karena tidak semua aktinomisetes mampu menghambat pertumbuhan jamur target seperti *R. solani*. Diduga senyawa bioaktif yang dimiliki aktinomisetes yang diuji tidak mampu menghambat pertumbuhan jamur target. Salah satu kemampuan daya hambat isolat aktinomisetes terhadap *R. solani* dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Aktivitas solat aktinomisetes L12 terhadap *R.solani*

Hasil penelitian Linda (2006^b) isolat aktinomisetes L18, L11, L12 dan L15 tidak memiliki aktivitas terhadap *R.solani* dengan metode penumbuhan antara aktinomisetes dan jamur target serentak dalam medium PDA. Sebaliknya, isolat L223 dan L421 uji sebelumnya memiliki aktivitas masing-masing 4 mm dan 2 mm. Hal ini disebabkan karena, pertama isolat L223 dan L421 tidak stabil dalam memproduksi senyawa antifungi, kedua isolat L223 dan L421 waktu produksi senyawa bioaktifnya sebelum hari ke-7. Sedangkan isolat L18, L11, L12 dan L15 dengan metode *agar disk*, produksi senyawa antifungi lebih baik.

Menurut Kenneth (2000) mekanisme serangan senyawa antimikroba yang dihasilkan aktinomisetes berbeda-beda terhadap mikroba target, seperti *Streptomyces orientales* penghasil vankomisin mampu menghambat pembentukan dinding sel dari mikroba target, *Micromonospora* penghasil gentamisin mampu menghambat proses sintesis protein, *Streptomyces noursei* penghasil nistatin mampu merusak membran sitoplasma dan *Nocardia mediterranei* penghasil rifampisin mampu menghambat proses replikasi sel.

Menurut Suwandi (1993) selain *Streptomyces* sp. kelompok aktinomisetes lain yang dapat menghasilkan senyawa bioaktif adalah *Actinoplanes*, *Micromonospora*, *Actinomadura*, dan *Dactylosporangium*. Dipihak lain, Moncheva *et al.* (2002) berhasil diisolasi

Micromonospora dan *Saccharopolyspora* yang merupakan sumber antibiotik dari kelompok makrolida, *Actinomadura* sp. dan *Amycolatopsis* yang dikenal sebagai *Nocardia* mampu menghasilkan antibiotik vankomisin sejenis glikopeptida, dan antibiotik naftasin-quinon.

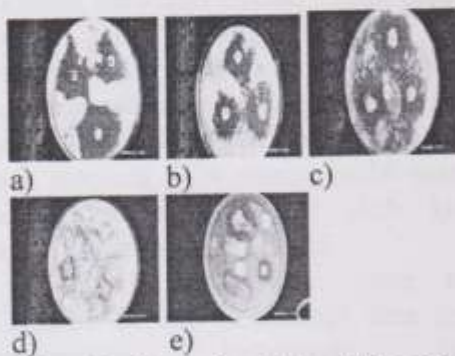
Augustine *et al.* (2005) mengatakan bahwa kemampuan aktinomisetes dalam menghambat pertumbuhan jamur target disebabkan karena aktinomisetes mampu menghasilkan senyawa antimikroba yang dapat bersifat fungisida. Menurut Suwanto (1994) mekanisme serangan senyawa antifungi dalam menekan pertumbuhan jamur target dapat disebabkan oleh produksi asam organik dan siderofor (protein pengkelat besi). Kemungkinan penyebab lain adalah karena dihasilkannya enzim kitinase dari aktinomisetes yang dapat melisis dinding sel dari jamur patogen. Meryandini *et al.* (2004) menjelaskan bahwa enzim kitinase banyak dihasilkan oleh aktinomisetes, sehingga akan menjadi kontrol biologi yang efektif.

Zona bening yang terbentuk dari masing-masing isolat potensial aktinomisetes terhadap pertumbuhan *R. solani* memperlihatkan diameter zona bening yang beragam. Penyeleksiaan menggunakan metode *agar disk* diperoleh daya hambat terbesar pada isolat L18 yaitu sebesar 3.2 cm dan yang terendah pada isolat L313 yaitu 1 cm. Ukuran diameter zona bening yang terbentuk sangat menentukan kemampuan daya hambat dari masing-masing isolat. Semakin besar diameter zona bening yang terbentuk, maka semakin besar pula kemampuan aktinomisetes menghambat pertumbuhan *R. solani*. Yuan dan Crawford (1995) aktivitas *S. lydicus*

WYEC108 terhadap *R.solani* sebesar 2,0 cm, inkubasi 5 hari.

Uji nilai tengah isolat aktinomisetes yang memiliki kriteria tinggi (>2.32 cm) yaitu isolat L18 dengan persentase sebesar 21.92%. Isolat dengan kriteria sedang (1,5-2,32 cm) ada 71.23% pada isolat SM12, SM11, L15, L12 dan MH23. Isolat aktinomisetes yang termasuk ke dalam kriteria rendah sebanyak 6.85% yaitu L313 sebesar (<1.5 cm).

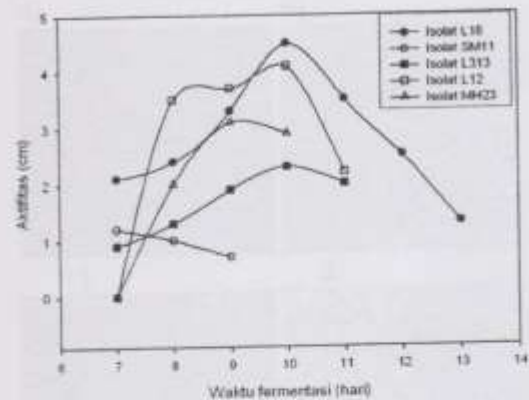
Pengujian tahap kedua dengan menggunakan media fermentasi untuk melihat waktu inkubasi aktinomisetes yang optimal dalam menghasilkan senyawa bioaktif. Aktivitas tertinggi masing-masing isolat adalah L18 (4,5 cm), SM11 (1,2 cm), L313 (2,3 cm), L12 (4,1 cm), MH23 (3,1 cm). Isolat aktinomisetes L15 dan SM12 tidak memiliki aktivitas. Zona bening yang dihasilkan menggunakan medium fermentasi dapat dilihat pada Gambar 2.



Gambar 2. Daya hambat aktinomisetes dalam medium cair terhadap *R.solani*. a) L18, b) L12, c) SM11, d) L313 dan e) MH23.

Setiap isolat aktinomisetes memiliki waktu produksi senyawa bioaktif yang berbeda-beda. Hasil penelitian Shahrokhi *et al.* 2005 aktivitas *S.olivaceus* strain 115 terhadap *R. solani* menghasilkan senyawa bioaktif

tertinggi 2,0 cm pada masa inkubasi 7 hari menggunakan medium CG cair, inkubasi pada 30°C, 130 rpm. Gambar 3 di bawah ini memperlihatkan waktu inkubasi optimal dari masing-masing isolat aktinomisetes uji.



Gambar 3 Aktivitas isolat aktinomisetes dalam medium fermentasi terhadap *R. solani*

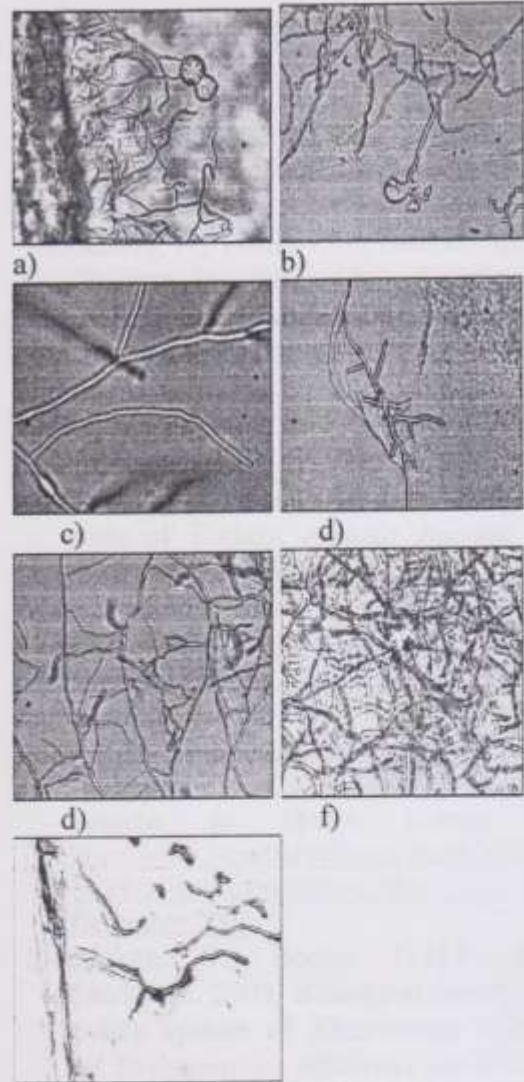
Isolat aktinomisetes yang memiliki senyawa bioaktif dapat digunakan untuk mengatasi penyakit rebah semai (*damping-off*) yang disebabkan oleh *R. solani* pada tanaman sawi dan cabe. Lahdenpera (2000) membuat biokontrol dari miselium dan spora *S. griseoviridis* untuk mengatasi fitopatogen dari *Phyium* spp., *Fusarium* spp. dan *R. solani* dengan nama dagangnya *Mycostop*. Diharapkan isolat aktinomisetes endogenous ini dimasa yang akan datang dapat menjadi alternatif pengganti fungisida untuk menangani tanaman sawi dan cabe yang diserang oleh jamur patogen *R. solani*. Sehingga diperoleh produk pertanian sawi dan cabe yang organik.

Karakterisasi Aktinomisetes

Isolat aktinomisetes pada medium CGA inkubasi 7 hari terjadi perubahan warna. Isolat aktinomisetes

L12, L15, L18, SM11 dan SM12 inkubasi 3 hari berwarna putih. Isolat MH23 berwarna kuning, diduga menghasilkan melanin, isolat L313 berwarna krem. Setelah hari ke 7-15, L12 berserbuk abu-abu sampai kehitaman, L15 berserbuk putih, L18 berserbuk putih sampai kecoklatan, SM11 dan SM12 berserbuk putih sampai abu-abu, MH23 berserbuk putih sampai kecoklatan, dan L313 berserbuk putih. Umumnya warna yang dihasilkan dari masing-masing isolat aktinomisetes yaitu putih setelah 15 hari permukaan bertepung. Ketujuh isolat berbau serah atau tanah yang diduga mengeluarkan senyawa geosmin (Alexander, 1977). Warna koloni berubah pada 7-14 hari karena aktinomisetes mampu menghasilkan zat-zat warna hasil pigmentasi yang dapat melarut ke dalam medium dengan warna dan intensitas yang berbeda-beda tergantung dari komposisi medium. Pada medium GYEA, isolat yang tumbuh lebih dominan berwarna coklat. Untuk medium GAA, isolat yang tumbuh lebih menunjukkan warna-warna yang terang yaitu warna kemerahan dan orange, selain itu isolat agak cepat pertumbuhannya. Pada medium SCA semua isolat mampu tumbuh. Pengamatan dari *slide* kultur dapat dilihat pada Gambar 5.

Hasil karakterisasi yang telah dilakukan belum mencukupi data untuk menentukan kelompok isolat aktinomisetes. Diduga ke-7 isolat aktinomisetes endogenous Riau berbeda spesies. Karakterisasi isolat aktinomisetes dapat dilihat pada Tabel 2



Gambar 4. Pengamatan isolat aktinomisetes dengan mikroskop cahaya (400x) . a) SM12 ; b) SM11 ; c) MH23 ; d) L313 ; e) L18; f) L12 dan g) L15 (40x).

Tabel 2 Karakterisasi Aktinomisetes

| Karakteristik | A | B | C | D | E | F | G |
|-----------------|---|---|---|---|---|---|---|
| Rantai spora | - | - | - | - | - | + | - |
| Produksi enzim: | | | | | | | |
| • Protease | + | + | + | + | + | + | + |
| • Amilase | + | + | + | + | + | + | * |



Lanjutan Tabel 2

Perombakan

Karbon :

| | | | | | | | |
|-----------|---|---|---|---|---|---|---|
| Selobiosa | - | - | - | - | - | - | - |
| Dextrosa | - | - | - | - | - | - | - |
| Fruktosa | - | - | - | - | - | - | - |
| Galaktosa | - | - | - | - | - | - | - |
| Laktosa | - | - | - | - | - | - | - |
| Manitol | - | - | - | - | - | - | - |
| Sukrosa | - | - | - | - | - | - | - |
| Xilosa | - | - | - | - | - | - | - |
| Tween 80 | + | + | + | + | + | + | * |
| Gelatin | + | + | + | - | + | + | - |
| Melanin | - | - | + | - | - | - | - |

*: tidak terdeteksi; A.SM12; B.SM11; C.MH23, D.L313; E.L18;F.L12;GL15

UCAPAN TERIMAKASIH

Penelitian ini didanai oleh DP2M-DIKTI dalam riset Hibah Bersaing 2008.

DAFTAR PUSTAKA

Alexander, M. 1977. *Introduction to Soil Microbiology*. Second Edition. Cornell University. New york

Kenneth, T. 2000. *Antibiotik*. University of Wisconsin-Madison. <http://lecturer.ukdw.ac.id/dhira/ControlGrowth/antibiotic.html>. [25 Maret 2005].

Lahdenpera, M. 2000. Mycostop in controlling *Rhizoctonia solani*. <http://www.growquest.com/mycstop.htm>

Linda, T.M. Roza, R.M dan Hafniriska. 2006. Eksplorasi Aktinomisetes dari Tanah Gambut Siak Riau. Proseding Seminar Bersama FST Universitas Kebangsaan Malaysia –FMIPA UNI ke-4, 1-2 Agustus 2006

Linda, T. M. 2006. Penapisan Aktinomisetes Asal Tanah Gambut Desa Langkai Kec. Siak yang Tahan Terhadap *Rhizoctonia solani* dan *Sclerotium rolfsii*. Proseding Seminar

Program Pengembangan Diri 2006 Bidang FMIPA. Jakarta, 23-24 Agustus 2006

Linda, TM. Roza, R.M dan Yuliati, R. 2007. *Jurnal Natur Indonesia*. Vol (10) 1: 18-23

Moncheva, P., Tishkov, S., Dimitrova, N., Chipeva, V. (2002). Characteristics of Soil Actinomycetes From Antarctica. *Journal of Culture Collection*. 3 : 3-14.

Oskay, M., Tamer, A.U., Azeri, C. 2004. Antibacterial activity of some actinomycetes isolated from farming soils of Turkey. *African Journal of Biotechnology*. Vol.3 : 441-446.

Semangun, H. 1991. *Penyakit-penyakit Tanaman Pangan di Indonesia*. Gadjah Mada Universitas Press. Yogyakarta.

Singh, D. dan Agrawal, V.P. 2001. Biodiversity of Actinomycetes of Lobiche in Mount Everest I. <http://www.nepalschools.org/rfabb/biodiversity-of-actinomycetes-of.htm>. (9 Desember 2005)

Shahrokhi, S., Bonjar G.H.S dan Saadoun,I. 2005. Biological control of potato isolate of *Rhizoctonia solani* by *Streptomyces olivaceus* strain115. *Biotechnology*. 4(2):132-138

Suwandi, U. 1993. Skringing Mikroorganisme Penghasil Antibiotik. Pusat Penelitian dan Pengembangan P.T. Kalbe Farma, Jakarta. Cermin Dunia Kedokteran No. 89, 1993.

Yuan, W.M, dan Crawford, D.L. 1995. Characterization of *Streptomyces lydicus* WYEC108 as a potential biocontrol agenst fungal root and and seed rots. *Applied and Enviromental*. 61 (8): 3119-3128.



C. SINOPSIS PENELITIAN LANJUTAN

D.1. Tujuan Khusus

Setelah dilakukan penelitian pada tahun ke-1 (2008) dimana telah diperoleh 7 isolat aktinomisetes yang memiliki aktivitas terhadap *R. solani*. Untuk mendapatkan senyawa bioaktif yang dapat dikembangkan sebagai biokontrol terhadap *R. solani* penyebab rebah semai maka diperlukan penelitian lanjutan. Adapun tujuan dari penelitian tahun ke-kedua (2009) adalah sebagai berikut:

- o Mengisolasi dan mengetahui jenis, sifat senyawa bioaktif yang dihasilkan oleh ke-7 aktinomisetes terpilih yang bersifat anti jamur patogen *R. solani*. Isolasi senyawa bioaktif menggunakan pelarut polar, non polar dan semipolar dan dilanjutkan dengan uji KLT.
- o Menguji masing-masing senyawa bioaktif hasil ekstraksi dengan jamur target *R. solani* secara in vitro
- o Optimalisasi masing-masing aktinomisetes dalam medium fermentasi dengan variasi pH medium, kecepatan aerasi, suhu inkubasi.
- o Melanjutkan karakterisasi masing-masing aktinomisetes dengan metode slide agar (umur 7, 14 dan 21 hari), uji fermentasi dengan berbagai gula (inkubasi 7, 14 dan 21 hari).

D.2. Metode Penelitian

Pada tahun kedua (2009) ini, akan dilakukan penelitian yang meliputi aspek-aspek sebagai berikut:

- (1) Ekstraksi senyawa bioaktif dari ke-7 aktinomisetes menggunakan berbagai pelarut (kloroform, etil asetat dan campuran keduanya). Hasil ekstraksi di fraksinasi dengan kolom Silika gel. Sebelum dan setelah fraksinasi, dilakukan kromatografi lapis tipis (KLT) dari masing-masing ekstrak yang dipekatkan, maupun fraksi yang diperoleh, kemudian ditentukan nilai R_f masing-masing (Moncheva, *et al.* 2002).
- (2) Senyawa hasil fraksinasi diuji aktivitasnya terhadap jamur *R. solani* pada medium PDA. Jamur ditumbuhkan pada bagian tengah cawan

petri, kemudian kertas cakram steril direndamkan ke masing-masing larutan senyawa fraksi, kemudian dikering anginkan. Selanjutnya, kertas cakram diletakkan pada bagian pinggir sekeliling jamur *R. solani*.

- (3) Senyawa fraksi dari isolat aktinomisetes terpilih yang memiliki daya hambat terhadap jamur *R. solani* selanjutnya dikarakterisasi.
- (4) Melakukan optimalisasi uji aktinomistes yang memiliki aktivitas mempergunakan media fermentasi yang lain yaitu SCA (Singh dan Agrawal 2001; Pandayet *et al.* 2002) dan GYEA (Oskay *et al.* 2004).
- (5) Melakukan optimalisasi terhadap ke-7 aktinomisetes dengan variasi pH medium (4,5 dan 6), kecepatan aerasi (150, 175 dan 200) dan suhu (27, 30 dan 35°C)
- (6) Melakukan optimalisasi uji aktinomistes yang memiliki aktivitas dengan variasi kecepatan aerasi (150, 175 dan 200)
- (7) Melakukan optimalisasi uji aktinomistes yang memiliki aktivitas dengan variasi suhu pertumbuhan (27, 30 dan 35°C)
- (8) Melanjutkan karakterisasi masing-masing aktinomisetes dengan metode slide agar, uji fermentasi berbagai gula dengan waktu inkubasi yang berbeda-beda.

Pada tahun ketiga (2010), akan dilakukan penelitian yang merupakan aplikasi daya hambat aktinomisetes ke tanaman sawi dan cabe yang terserang *R. solani* penyebab penyakit rebah kecambah.

- (1) Pemilihan formulasi bioaktif. Isolat-isolat aktinomisetes yang memiliki daya hambat terhadap jamur *R. solani* di amati kemampuan daya serangnya menggunakan rancangan percobaan RAL (Rancangan Acak Lengkap) dengan perlakuan isolat- isolat aktinomisetes. Sehingga nanti diperoleh apakah isolat tunggal atau campuran dari aktinomisetes yang paling baik digunakan (formula bioaktif).
- (2) Uji patogenisitas. Media tanam berupa tanah (tanpa pemupukan) dicampur dengan jamur *R. solani* dimasukkan dalam polybag sebanyak 5 kg. Ke dalam media tanah di tambahkan formula bioaktif aktinomisetes. Formula bioaktif ini ditebar pada media tanam dengan kedalaman 2-3 cm, kemudian ditimbun dengan tanah untuk

menghindari kekeringan. Masing-masing polybag di tanam 5 biji sawi atau cabe (Suwahyono dan Wahyudi 1996).

- (3) Penelitian aplikasi ini yang diamati diantaranya: persentase daya kecambah benih, persentase serangan sebelum muncul ke atas permukaan tanah, persentase serangan setelah muncul ke atas permukaan tanah, saat timbulnya gejala pertama, persentase bibit tumbuh sehat, biomasa (berat basah dan berat kering) (Yulfida dan Rustam 2003).

D.3. Jadwal Kerja

Pekerjaan akan dilaksanakan selama 10 bulan penelitian seperti pada tabel berikut:

| Kegiatan | Bulan ke | | | | | | | | | |
|--|----------|---|---|---|---|---|---|---|---|----|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
| Ekstraksi senyawa bioaktif dari aktinomisetes terpilih menggunakan berbagai pelarut | ■ | ■ | ■ | | | | | | | |
| Senyawa hasil fraksinasi diuji aktivitasnya terhadap jamur <i>R. solani</i> pada medium CGA. | | | ■ | ■ | ■ | | | | | |
| Karakterisasi senyawa bioaktif & menentukan Rf | | | | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | | |
| Optimalisasi masing-masing aktinomisetes dalam medium fermentasi | | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | | |
| Melanjutkan karakterisasi masing-masing aktinomisetes. | | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | | |
| Analisa data. | | | | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | |
| Laporan. | | | | | | | | ■ | ■ | ■ |