



REPUBLIK INDONESIA
KEMENTERIAN HUKUM DAN HAK ASASI MANUSIA

SERTIFIKAT PATEN

Menteri Hukum dan Hak Asasi Manusia atas nama Negara Republik Indonesia berdasarkan Undang-Undang Nomor 13 Tahun 2016 tentang Paten, memberikan hak atas Paten kepada:

Nama dan Alamat Pemegang Paten : LPPM UNIVERSITAS JENDERAL SOEDIRMAN
Jl. Dr. Suparno, Purwokerto 53122

Untuk Invensi dengan Judul : BIOPESTISIDA BERBASIS *PSEUDOMONAS FLUORESCENS* P60

Inventor : Prof. Ir. Loekas Soesanto, M.S., Ph.D.
Endang Mugiastuti, S.P., M.P.
Ruth Feti Rahayuniati, S.P., M.P.

Tanggal Penerimaan : 16 Desember 2011

Nomor Paten : IDP000066661

Tanggal Pemberian : 21 Januari 2020

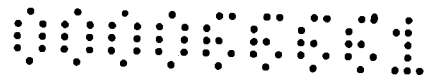
Perlindungan Paten untuk invensi tersebut diberikan untuk selama 20 tahun terhitung sejak Tanggal Penerimaan (Pasal 22 Undang-Undang Nomor 13 Tahun 2016 tentang Paten).

Sertifikat Paten ini dilampiri dengan deskripsi, klaim, abstrak dan gambar (jika ada) dari invensi yang tidak terpisahkan dari sertifikat ini.



a.n. MENTERI HUKUM DAN HAK ASASI MANUSIA
DIREKTUR JENDERAL KEKAYAAN INTELEKTUAL

Dr. Freddy Harris, S.H., LL.M., ACCS.
NIP. 196611181994031001



(12) PATEN INDONESIA

(11) IDP000066661 B

(19) DIREKTORAT JENDERAL
KEKAYAAN INTELEKTUAL

(45) 21 Januari 2020

(51) Klasifikasi IPC⁸ : A 01N 37/00, A 01N 63/00, A 01N 63/02, C 12N 1/20

(21) No. Permohonan Paten : P00201100899

(22) Tanggal Penerimaan: 16 Desember 2011

(30) Data Prioritas :
(31) Nomor (32) Tanggal (33) Negara

(43) Tanggal Pengumuman: 27 Juni 2013

(56) Dokumen Pembanding:
CN102517226 (A)
KR20120037237 (A)
KR20120037235 (A)
KR20120037234 (A)
CN102382879 (A)
KR20110128263 (A)
KR20110088102 (A)

(71) Nama dan Alamat yang Mengajukan Permohonan Paten :
LPPM UNIVERSITAS JENDERAL SOEDIRMAN
Jl. Dr. Suparno, Purwokerto 53122

(72) Nama Inventor :
Prof. Ir. Loekas Soesanto, M.S., Ph.D., ID
Endang Mugiastuti, S.P., M.P., ID
Ruth Feti Rahayuniati, S.P., M.P., ID

(74) Nama dan Alamat Konsultan Paten :

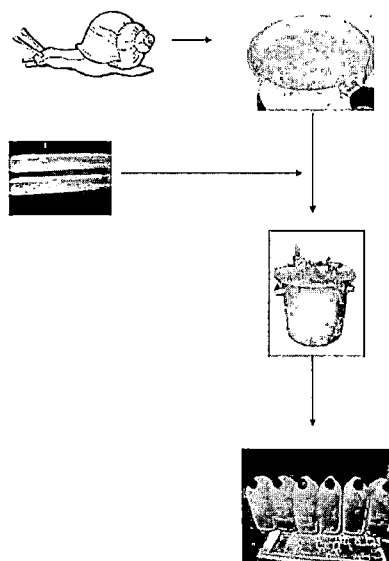
Pemeriksa Paten : Drs. Ahmad Muniri

Jumlah Klaim : 3

(54) Judul Invensi : BIOPESTISIDA BERBASIS *PSEUDOMONAS FLUORESCENS* P60

(57) Abstrak :

Biopestisida berbasis *Pseudomonas fluorescens* P60 berbahan pembawa daging keong 100 g/l dan terasi 2 g/l merupakan formulasi biopestisida yang berpotensi untuk dikembangkan dalam skala industri. Biopestisida ini merupakan salah satu pestisida yang ramah lingkungan dan efektif digunakan untuk mengendalikan penyakit tanaman, terutama patogen tular-tanah, dan mudah diaplikasikan di lapangan. Formulasi kaldu keong memiliki keunggulan dalam hal penekanan penyakit tanaman yang disebabkan oleh patogen tular-tanah. Keunggulan teknologi ini adalah bahwa formula kaldu keong ini mudah dibuat dan harganya relatif lebih murah dibandingkan dengan pestisida (fungisida dan bakterisida) kimiawi sintetis. Penggunaan keong sebagai bahan baku kaldu secara tidak langsung juga membantu petani padi dalam pengendalian hama keong mas, sehingga diharapkan melalui pengembangan formulasi kaldu keong ini, dapat dicapai dua hal yaitu (1) keong mas dapat dikendalikan dan (2) peningkatan produksi padi dan peningkatan pendapatan petani tanaman pangan, hortikultura, dan perkebunan.



Gambar 1.



Deskripsi

BIOPESTISIDA BERBASIS *PSEUDOMONAS FLUORESCENS* P60

5 **Bidang Teknik Invensi**

Invensi ini berkaitan dengan formula kaldu biopestisida atau secara khusus biofungisida berbasis bakteri antagonis *Pseudomonas fluorescens* P60 dengan kepadatan 10^9 - 10^{12} cfu/ml dengan bahan pembawa kaldu daging keong sebanyak 100 g/l dan
10 terasi sebanyak 2 g/l untuk mengendalikan penyakit tanaman, baik di tanaman pangan, hortikultura, maupu perkebunan.

Latar Belakang Invensi

Masyarakat konsumen telah semakin maju dan sadar akan
15 produk tanaman yang sehat dan aman dikonsumsi. Di samping itu, masalah penyakit tanaman merupakan salah satu masalah yang penting dan sampai saat ini belum dapat diselesaikan atau dikendalikan. Penggunaan agensia kimia sintetis untuk mengendalikan penyakit tanaman telah banyak digunakan, namun
20 hasilnya masih belum memuaskan. Selain itu, dampak negatif penggunaan agensia kimia sintetis tersebut sangat dirasakan, tidak saja terhadap petani dan lingkungan, tetapi juga terhadap kualitas produk pertanian yang dihasilkan.

Alternatif pengendalian penyakit tanaman telah banyak
25 digali dan digunakan dalam rangka mengurangi dampak negatif tersebut dan dapat mengendalikan penyakit tanaman. Selain itu, juga akhirnya akan meningkatkan produk tanaman. Agensia pengendali hayati, baik jamur maupun bakteri antagonis, akhir-akhir ini banyak dibicarakan dan digunakan dalam banyak .
30 kegiatan penelitian dan kegiatan lainnya, kaitannya dengan upaya penemuan cara pengendalian penyakit tanaman yang ramah lingkungan. Penggunaan agensia pengendali hayati ini muncul karena akibat dampak negatif yang ditimbulkan oleh penggunaan agensia kimia sintetis, yang dikenal dengan fungisida, baik



terhadap lingkungan, manusia, maupun produk tanaman (Untung, 1996; Gamliel et al., 1997).

Beberapa agensi pengendali hayati telah menunjukkan hasil yang menggembirakan di dalam memecahkan persoalan penyakit tanaman, baik terhadap komponen patosistem maupun komponen pertumbuhan sebagai pengaruh tidak langsung. Pengaruh tersebut ditunjukkan dengan memperlambat masa inkubasi, menurunkan intensitas penyakit, atau menurunkan kepadatan populasi patogen tanaman di dalam tanah. Selain itu, beberapa agensi pengendali hayati juga memberikan pengaruh positif terhadap komponen pertumbuhan tanaman, seperti menaikkan tinggi tanaman, berat basah atau kering tanaman, bahkan meningkatkan produksi tanaman.

Pseudomonas kelompok *fluorescens* merupakan salah satu kelompok bakteri yang banyak dipelajari sebagai agensi pengendali hayati. Bakteri tersebut memiliki kombinasi mekanisme pengendalian hayati yang efektif. *Pseudomonas* menghasilkan beberapa metabolit sekunder dengan aktivitas antimikroba terhadap bakteri lain dan jamur patogen. Selain itu, bakteri ini menghasilkan siderofor yang mampu menghambat pertumbuhan patogen dengan membatasi penggunaan zat besi yang tersedia di dalam tanah (Duijff et al., 1993; Duffy dan Defago, 1999). Beberapa strain juga mampu menunjukkan kemampuan untuk mengimbas ketahanan tanaman terhadap patogen. Pengaruh tersebut tidak hanya berifat lokal, tetapi sistemik, sehingga tidak hanya berperan sebagai pelindung tanaman dari serangan patogen akar namun juga patogen daun (Maurhofer et al., 1994; Kloepper et al., 1997)

Pseudomonas fluorescens P60 merupakan salah satu bakteri antagonis yang telah menunjukkan kemampuannya di dalam mengendalikan beberapa patogen tanaman, khususnya patogen tular-tanah, baik secara *in vitro*, *in planta*, maupun *in vivo*. Pengujian masih terbatas pada kondisi lingkungan terkendali, meskipun beberapa sudah dilakukan di lapangan.



Antagonis *P. fluorescens* P60 dikenal mampu menghasilkan antibiotika, yaitu 2,4-diasetilfloroglusinol (yang disingkat dengan Phl atau DAPG) (Raaijmakers and Weller, 1998; Soesanto, 2000). Hal ini nampak dari zona hambatan yang ditimbulkannya, yang dapat menghambat pertumbuhan patogen ketika diuji secara "dual culture". Selain itu, *P. fluorescens* juga mampu menghasilkan siderofor pseudobaktin atau pioverdin, yang bersaing terhadap mineral besi di dalam tanah (Alabouvette et al., 1996). Mekanisme antagonisme dan penghambatan penyakit tanaman sangat erat hubungannya dengan fisiologi dan biokimia bakteri, antara lain persaingan mendapatkan nutrisi, karbon, dan nitrogen (Hemming, 1990).

Tuntutan akan cara yang ramah lingkungan, aman, dan murah mendorong dituntaskannya kajian terhadap agensia hayati tersebut menjadi biofungisida. Sampai saat ini, keberadaan biofungisida di lapangan masih terbatas baik dalam jumlah maupun kemampuannya. Kemudahan di dalam penyiapan, penyimpanan, pemformulaan, dan penerapan terhadap penyakit tanaman sangat diperlukan sehingga biofungisida tersebut akan lebih efektif, efisien, murah, dan mudah. Pemformulaan bakteri antagonis sangat diperlukan demi mencapai maksud tersebut di atas. Jadi, perakitan biofungisida *Pseudomonas fluorescens* P60 merupakan terobosan penting di dalam menjawab tuntutan masyarakat, untuk nantinya dapat meningkatkan produksi tanamannya.

Uraian Singkat Invensi

Invensi ini berkaitan dengan suatu biopestisida untuk mengendalikan penyakit tanaman berbasis bakteri antagonis *Pseudomonas fluorescens* P60 dengan kepadatan 10⁹-10¹² cfu/ml dengan bahan pembawa kaldu daging keong sebanyak 100 g/l dan terasi 2 g/l. Aplikasi biopestisida dilakukan pada tanaman yang dipilih yaitu kedelai, kacang tanah, terung, bawang merah, bunga gladiol, pisang, kentang, tomat, genjer, pala, dan



mentimun. Pada tanaman tersebut, dijumpai beberapa penyakit tanaman yang merugikan. Biopestisida telah diaplikasikan pada penyakit tanaman dipilih yaitu penyakit layu verticillium karena *Verticillium dahliae*, penyakit rebah semai karena *Pythium* sp., penyakit layu bakteri karena *Ralstonia solanacearum*, penyakit layu fusarium karena *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*, penyakit busuk pangkal batang karena *Sclerotium rolfsii*, penyakit layu fusarium karena *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense*, penyakit layu fusarium karena *Fusarium oxysporum* f.sp. *allii*, penyakit layu fusarium karena *Fusarium oxysporum* f.sp. *gladioli*, dan penyakit jamur akar putih karena *Rigidoporus lignosus*.

Tujuan invensi ini adalah untuk mendapatkan formula biopestisida yang murah dan praktis serta ramah lingkungan, untuk mengendalikan penyakit tanaman, baik pada tanaman pangan, hortikultura, maupun perkebunan.

Uraian Singkat Gambar

Gambar 1 adalah alur proses pembuatan biopestisida sesuai invensi ini.

Uraian Lengkap Invensi

Pseudomonas fluorescens P60 telah diketahui efektif untuk menekan perkembangan penyakit tanaman karena patogen tular-tanah. Kemampuan tersebut berpeluang untuk dikembangkan sebagai biopestisida. Oleh karena itu, perlu dilakukan perakitan biopestisida *P. fluorescens* P60 yang efektif untuk mengendalikan penyakit tanaman dan meningkatkan produksi tanaman.

Penelitian tentang *P. fluorescens* P60 sebagai agensia hayati patogen tanaman yang efektif dan memiliki kemampuan sebagai PGPR telah dilakukan sejak tahun 2002. Penelitian yang dilakukan meliputi uji penekanan perkembangan patogen baik secara *in vitro*, *in planta*, maupun *in vivo*. Beberapa pengujian



terhadap kemampuan *P. fluorescens* P60 yang telah dilakukan antara lain adalah: Uji *P. fluorescens* P60 sebagai agensia pengendali hayati terhadap jamur *Sclerotium rolfsii* Sacc. pada tanaman kedelai (Soesanto et al., 2003a); Uji Penerapan
 5 Agensia Hayati *Pseudomonas fluorescens* P60 in vivo Terhadap Penyakit Busuk Pangkal Batang Kacang Tanah (Soesanto, 2004); Kajian *Pseudomonas fluorescens* P60 sebagai agensia pengendali hayati jamur *Verticillium dahliae* Kleb (Soesanto, 2001); Tanggapan beberapa varietas terung terhadap penyakit layu
 10 bakteri dan pengendalian hayatinya dengan *Pseudomonas fluorescens* (Mawarni et al., 2002); Prospek pemanfaatan *Pseudomonas fluorescens* P60 untuk pengendalian penyakit busuk batang pada kacang tanah (Soesanto et al., 2003b); Pengendalian hayati *Verticillium dahliae* pada *Arabidopsis*
 15 *thaliana* dan terung dengan penggabungan *Pseudomonas fluorescens* dan *Talaromyces flavus* (Soesanto and Termorshuizen, 2004). Penekanan hayati penyakit moler pada bawang merah dengan *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma koningii*, dan *Pseudomonas fluorescens* P60 (Santoso et al.,
 20 2007); Penekanan beberapa mikroba antagonis terhadap penyakit layu *Fusarium* pada gladiol (Soesanto et al., 2008). Hasil penelitian tersebut semuanya telah dipublikasikan dalam jurnal nasional terakreditasi.

Berdasarkan penelitian tersebut di atas diketahui bahwa *P. fluorescens* P60 efektif untuk menekan perkembangan penyakit
 25 tanaman karena patogen tular-tanah. Kemampuan tersebut berpeluang untuk dikembangkan sebagai biopestisida.

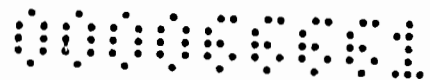
Dalam rangka perakitan biopestisida *P. fluorescens* P60 sebagai agensia hayati yang memiliki kemampuan untuk
 30 meningkatkan produksi tanaman, dilakukan serangkaian kegiatan penelitian secara bertahap selama 3 tahun.

Penelitian telah dilakukan terhadap potensi biopestisida ini. Pada tahun pertama telah dilakukan pencirian (karakterisasi) *P. fluorescens* P60 untuk mengetahui sifat



morfologi, biokimia, dan fisiologi *P. fluorescens* P60. Melalui kegiatan pencirian yang telah dilakukan tersebut, diketahui bahwa *P. fluorescens* P60 pada medium NA berwarna putih, bagian tepi halus, permukaan cembung. Jika diterawang ke arah cahaya matahari terdapat sedikit pendar kuning kehijauan di sekitar koloni. Pada medium King's B, koloni berwarna kuning kehijauan, tepi halus, permukaan cembung, dan berpendar di bawah sinar UV. Hasil pewarnaan sederhana dengan menggunakan cristal violet menunjukkan Pf 60 berbentuk batang, dan bersifat gram negatif. Pf 60 mampu tumbuh pada berbagai kisaran pH dan berbagai kisaran suhu. Bakteri masih mampu hidup pada pH antara 5-8, dengan pH optimum antara 7-8. Kisaran suhu untuk pertumbuhan Pf 60 antara 15-35° C, dengan suhu optimum 25-35° C. Pada pengujian biokimia diketahui bahwa Pf P60 mampu melarutkan fosfat dan berperan sebagai *denitrifyer*, mampu mengubah nitrit menjadi nitrat serta mampu menghidrolisis pati. Secara in vitro, Pf P60 diketahui dapat menghambat pertumbuhan *Sclerotium rolfsii* sebesar 48,08 %, *Fusarium oxysporum* (kentang) 58,10 %, *Fusarium oxysporum* (tomat) 30,21 %, *Pyricularia oryzae* 70,69 %, *Curvularia* sp. 28 %, dan menghambat *Ralstonia solanacearum* dengan zona hambat 15 mm setelah 24 jam. Pada pangujian in vivo yang dilakukan pada tanaman tomat, diketahui bahwa aplikasi suspensi Pf P60 pada saat tanam mampu meningkatkan panjang akar hingga 57%. Pemberian supernatant Pf P60 pada 5 hari setelah tanam mampu meningkatkan bobot basah akar sebesar 139,19%; sedangkan pemberian supernatant Pf P60 dan suspensi Pf P60 pada 5 hari setelah tanam mampu meningkatkan diameter batang sebesar 26,32%.

Untuk memudahkan aplikasi di lapangan, Pf P60 harus dibuat dalam formulasi tertentu. Pembuatan formulasi yang baik, dapat dilakukan bila subtrat untuk pertumbuhan dan perkembangan sesuai. Oleh karena itu pada tahun kedua telah dilakukan studi penentuan subsrat terbaik bagi pertumbuhan dan perbanyakan *P.*

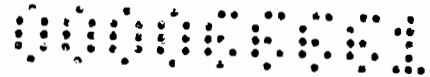


fluorescens P60, dilanjutkan dengan pengujian formulasi. Kegiatan ini dilakukan untuk mengetahui substrat terbaik dari sisi kualitas dan ekonomi untuk pertumbuhan dan perbanyakan *P. fluorescens* P60 dan menentukan formulasi terbaik dalam aplikasinya.

Pada tahun kedua diketahui bahwa formula kaldu daging keong mas mampu menurunkan keparahan penyakit sampai 100%, sama dengan perlakuan fungisida; terhadap jamur *Pythium* sp. yaitu jamur penyebab penyakit rebah semai. Keong atau dapat juga bekicot diambil, dipecahkan cangkangnya, kemudian dicuci dagingnya dan ditimbang sebanyak 100 g/l air. Selanjutnya daging keong ditambahkan terasi 2 g/l direbus sampai mendidih dan sampai daging keong lunak, kemudian disaring dengan saringan yang dilapisi kapas bertingkat, disterilkan, dan dimasukkan ke dalam jerigen bersih dan steril. Kaldu didinginkan dengan cara merendam jerigen ke dalam air dingin. Setelah kaldu dingin, starter bakteri *Pseudomonas fluorescens* P60 dimasukkan sebanyak 10 ml/l kaldu secara aseptis. Starter bakteri *Pseudomonas fluorescens* P60 disiapkan dengan menambah 10 ml air steril ke dalam biakan bakteri pada medium King's B di dalam cawan Petri. Jerigen kemudian dikocok dengan alat pengocok horizontal dengan kecepatan 135-150 rpm pada suhu ruang selama 3 x 24 jam. Di akhir pengocokan, kepadatan bakteri dihitung sampai mendapatkan kepadatan 10^9 - 10^{12} cfu/ml dengan pengenceran.

**Klaim**

1. Suatu biopestisida untuk mengendalikan penyakit tanaman berbasis bakteri antagonis *Pseudomonas fluorescens* P60 dengan kepadatan 10^9 - 10^{12} cfu/ml dengan bahan pembawa kaldu daging keong sebanyak 100 g/l dan terasi 2 g/l.
2. Suatu biopestisida sesuai klaim 1, di mana tanaman dapat dipilih adalah kedelai, kacang tanah, terung, bawang merah, bunga gladiol, pisang, kentang, tomat, genjer, pala, dan mentimun.
3. Suatu biopestisida sesuai klaim 1, di mana penyakit tanaman yang dipilih adalah penyakit layu verticillium karena *Verticilliumdahliae*, penyakit rebah semai karena *Pythium* sp., penyakit layu bakteri karena *Ralstoniasolanacearum*, penyakit layu fusarium karena *Fusariumoxysporum* f.sp. *lycopersici*, penyakit busuk pangkal batang karena *Sclerotiumrolfsii*, penyakit layu fusarium karena *Fusariumoxysporum* f.sp. *cubense*, penyakit layu fusarium karena *Fusariumoxysporum* f.sp. *allii*, penyakit layu fusarium karena *Fusariumoxysporum* f.sp. *gladioli*, dan penyakit jamur akar putih karena *Rigidoporuslignosus*.



Abstrak

BIOPESTISIDA BERBASIS *PSEUDOMONAS FLUORESCENS* P60

5 Biopestisida berbasis *Pseudomonas fluorescens* P60 berbahan
pembawa daging keong 100 g/l dan terasi 2 g/l merupakan
formulasi biopestisida yang berpotensi untuk dikembangkan
dalam skala industri. Biopestisida ini merupakan salah satu
10 pestisida yang ramah lingkungan dan efektif digunakan untuk
mengendalikan penyakit tanaman, terutama patogen tular-tanah,
dan mudah diaplikasikan di lapangan. Formulasi kaldu keong
memiliki keunggulan dalam hal penekanan penyakit tanaman yang
disebabkan oleh patogen tular-tanah. Keunggulan teknologi ini
adalah bahwa formula kaldu keong ini mudah dibuat dan harganya
15 relatif lebih murah dibandingkan dengan pestisida (fungisida
dan bakterisida) kimiawi sintetis. Penggunaan keong sebagai
bahan baku kaldu secara tidak langsung juga membantu petani
padi dalam pengendalian hama keong mas, sehingga diharapkan
melalui pengembangan formulasi kaldu keong ini, dapat dicapai
20 dua hal yaitu (1) keong mas dapat dikendalikan dan (2)
peningkatan produksi padi dan peningkatan pendapatan petani
tanaman pangan, hortikultura, dan perkebunan.

