



**EFEKTIVITAS BEBERAPA ISOLAT *Bacillus* spp.  
DALAM MENGHAMBAT *Ralstonia solanacearum*  
PADA CABAI**

**SKRIPSI**

**diajukan guna memenuhi salah satu persyaratan  
untuk menyelesaikan Program Sarjana pada  
Program Studi Ilmu Hama dan Penyakit Tumbuhan  
Jurusan Hama dan Penyakit Tumbuhan  
Fakultas Pertanian Universitas Jember**

**Oleh**

**Eka Nur Aini  
NIM. 031510401129**

**JURUSAN HAMA DAN PENYAKIT TUMBUHAN  
FAKULTAS PERTANIAN  
UNIVERSITAS JEMBER  
2007**

## RINGKASAN

**Efektivitas Beberapa Isolat *Bacillus* spp. dalam Menghambat *Ralstonia solanacearum* pada Cabai.** Eka Nur Aini, Jurusan Hama dan Penyakit Tumbuhan Fakultas Pertanian Universitas Jember.

Penyakit layu bakteri yang disebabkan oleh *Ralstonia solanacearum* merupakan salah satu kendala utama dalam budidaya cabai. Penyakit ini sulit dikendalikan karena tergolong patogen tular tanah dan mempunyai kisaran inang yang sangat luas. Berbagai upaya pengendalian telah dilakukan, tetapi penyakit ini masih menjadi kendala. Oleh karena itu, alternatif pengendalian secara hayati perlu dipertimbangkan untuk menekan penyakit layu bakteri pada cabai, salah satunya *Bacillus* spp. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui penyebab penyakit layu pada tanaman cabai, mengetahui efektivitas agens hayati *Bacillus* spp. terhadap penyakit layu bakteri *R. solanacearum* pada cabai.

Penelitian dilakukan di Laboratorium dan Rumah Kaca Jurusan Hama Penyakit Tumbuhan Fakultas Pertanian Universitas Jember dan dilaksanakan mulai bulan Desember 2006 sampai Mei 2007. Uji antagonisme secara *in vitro* dilakukan dengan metode *Dual Plating*. Pengujian di Rumah kaca menggunakan Rancangan Acak Kelompok (RAK) Faktorial yang terdiri atas dua faktor yaitu faktor waktu aplikasi (A) dan jenis isolat *Bacillus* (B), masing-masing perlakuan diulang sebanyak 3 kali. Data dianalisis menggunakan Sidik Ragam (ANOVA), jika berbeda nyata kemudian diuji dengan uji Duncan (DMRT) pada taraf 5%. Parameter yang diamati adalah masa inkubasi, intensitas penyakit (IP).

Hasil penelitian ini adalah diperoleh empat isolat bakteri layu yaitu Rs-2, Rs-4, Rs-5 dan Rs-10 dengan sifat fisiologis dan biokimia keempat isolat tersebut identik dengan bakteri *R. solanacearum* Ras 1. Hasil skrining secara *in vitro* dari 30 isolat *Bacillus* spp., diperoleh 18 isolat yang dapat menghambat bakteri layu, 16 isolat bersifat bakteriostatik dan dua isolat bersifat bakteriosidal yaitu Ba-90 dan Ba-197. Tiga strain *Bacillus* yang diuji yaitu Ba-53, Ba-67 dan Ba-90 memiliki efektivitas yang sama dalam menekan intensitas penyakit layu bakteri *R. solanacearum* di rumah kaca.

## DAFTAR ISI

	Halaman
<b>DAFTAR TABEL</b> .....	ix
<b>DAFTAR GAMBAR</b> .....	x
<b>DAFTAR LAMPIRAN</b> .....	xi
<b>BAB 1. PENDAHULUAN</b> .....	1
1.1 Latar Belakang .....	1
1.2 Perumusan Masalah.....	3
1.3 Tujuan dan Manfaat Penelitian .....	3
<b>BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA</b> .....	4
2.1 Penyakit Layu Bakteri pada Cabai.....	4
2.1.1 Penyebab Penyakit .....	4
2.1.2 Gejala Penyakit Layu Bakteri.....	5
2.1.3 Kisaran Inang dan penyebaran .....	6
2.1.4 Ekologi Patogen.....	6
2.2 Bakteri Antagonis <i>Bacillus</i> spp.....	7
2.3 Potensi <i>Bacillus</i> spp. sebagai Agensi Pengendali hayati.....	8
<b>BAB 3. METODE PENELITIAN</b> .....	10
3.1 Waktu dan Tempat .....	10
3.2 Alat dan Bahan.....	10
3.3 Pelaksanaan.....	10
3.3.1 Perbanyakkan Isolat <i>Bacillus</i> spp.....	10
3.3.2 Isolasi dan Identifikasi Bakteri Layu <i>R. solanacearum</i> .....	11
3.4 Uji Antagonisme <i>Bacillus</i> spp. terhadap <i>R. solanacearum</i> pada cabai secara in vitro.....	15
3.5 Uji Efektivitas beberapa isolat <i>Bacillus</i> spp. terhadap <i>R. solanacearum</i> pada Cabai di rumah kaca.....	16
<b>BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN</b> .....	17
4.1 Bakteri Layu <i>R. solanacearum</i> pada Cabai .....	17

4.1.1 Karakteristik Morfologi koloni Bakteri <i>R. solanacearum</i> ...	17
4.1.2 Karakteristik Fisiologi dan Biokimia Bakteri <i>R. solanacearum</i> .....	18
4.2 Bakteri Antagonis <i>Bacillus</i> spp.....	24
4.2.1 Daya Antagonis <i>Bacillus</i> spp. terhadap <i>R. solanacearum</i> secara <i>in vitro</i> . .....	24
4.2.2 Penekanan <i>Bacillus</i> spp. terhadap Bakteri layu <i>R. solanacearum</i> pada Cabai di rumah kaca. ....	27
<b>BAB 5. SIMPULAN</b> .....	32
<b>DAFTAR PUSTAKA</b> .....	33
<b>LAMPIRAN</b> .....	38

## BAB 1. PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Penyakit layu bakteri yang disebabkan oleh *Ralstonia solanacearum* merupakan salah satu kendala utama dalam produksi tanaman solanaceae seperti tanaman cabai (Asrul *dkk.*, 2004) dan merupakan salah satu penyakit yang merugikan bagi petani cabai. Meskipun hanya ditemukan di daerah tropis dan subtropik yang memiliki curah hujan tinggi, namun kerusakan akibat penyakit ini bisa mengancam kegagalan panen yang cukup besar (Tanindo, 2006).

Brown *et al.* (1980) menyatakan bahwa di daerah Jawa lebih kurang 8% dari tanaman cabai mati karena penyakit layu, bahkan menurut Suhardi (1988) bahwa 90% penyakit ini terdapat di pertanaman cabai dataran rendah dengan intensitas serangan 6% di Jawa Tengah dan Jawa Timur, dan 27% di Lampung. Penyakit layu bakteri di Malaysia tergolong penyakit yang sangat merugikan pada cabai dan terung, sedangkan di Indonesia serangan yang berat dapat menyebabkan kerugian mencapai 10 %-24 %, bahkan meningkat hingga 93,1% (Rukmana dan Saputra, 1997).

Penyakit layu ini sulit dikendalikan, karena merupakan salah satu penyakit penting di daerah tropis, subtropik dan daerah dengan suhu tinggi, bakteri ini tergolong patogen tular tanah dan memiliki kisaran inang yang luas. Berbagai upaya pengendalian telah dilakukan, pengendalian secara kultur teknis, mekanik, maupun kimiawi, tetapi penyakit ini masih menjadi kendala. Pengendalian yang dapat dilakukan antara lain: a). rotasi tanam dengan tanaman yang bukan golongan solanaceae, b). pembuatan saluran irigasi sebaik mungkin sehingga tidak terjadi penggenangan, c). menghindari luka pada perakaran atau batang tanaman dekat permukaan tanah, d) eradikasi tanaman yang terserang dengan mencabut tanaman yang sakit kemudian membuangnya, e) secara kimiawi dengan mencelupkan bibit cabai ke dalam air yang telah diberi bakterisida Agrept atau Agrymicin dengan konsentrasi 1,2 g/l (Prajnanta, 2001; Nawangsih *dkk.*, 2001).

Sistem rotasi tanam jangka pendek kurang efektif dalam mengendalikan penyakit layu karena patogen dapat bertahan hidup di dalam tanah sekurang-

kurangnya 2 tahun tanpa adanya inang (Brown *et al.*, 1980). Selain itu rotasi tanam dianggap kurang efisien karena memerlukan waktu beberapa musim atau bahkan beberapa tahun untuk menurunkan populasi inokulum (Manhuri dan Yusriadi, 2001).

Pengendalian secara kimiawi selain memberikan dampak positif juga memiliki dampak negatif seperti pencemaran terhadap lingkungan, gangguan keseimbangan ekosistem maupun kesehatan manusia. Bahkan perlakuan dengan bakterisida, selain membutuhkan biaya tinggi juga dapat merangsang munculnya strain baru yang lebih resisten, matinya mikroorganisme berguna di dalam tanah serta terakumulasinya residu dalam produk-produk pertanian (Manhuri dan Yusriadi, 2001).

Oleh karena itu, alternatif pengendalian secara biologi perlu dipertimbangkan untuk menekan penyakit layu bakteri pada cabai. Pengendalian penyakit layu dengan memanfaatkan mikroorganisme banyak dipraktekkan di Indonesia (Yusriadi *dkk.*, 1998), salah satu mikroorganisme antagonis yang dapat mengendalikan *R. solanacearum* adalah *Bacillus* spp.

Beberapa spesies *Bacillus* spp., di antaranya *B. subtilis* strain A13 dan GB03 dari Australia diketahui mampu menghambat sembilan patogen penyebab “damping off” (*Rhizoctonia* sp.) pada kapas dan pustul daun (*X. campestris* pv. *glycines*) pada kedelai (Bremer, 2002; Kim *et al.*, 1997). Berdasarkan potensi yang dimiliki *Bacillus* spp. maka pemanfaatan bakteri tersebut sebagai agen pengendali bakteri layu pada cabai yang berwawasan lingkungan dan berkelanjutan perlu dipertimbangkan. Pengendalian hayati dengan agen hayati *Bacillus* spp. yang terseleksi ini sangat diharapkan dapat mengurangi ketergantungan dan mengatasi dampak negatif dari penggunaan pestisida kimiawi sintetik yang sampai saat ini masih dipakai untuk mengendalikan penyakit pada tanaman cabai di Indonesia.

## 1.2 Perumusan Masalah

Penyebab penyakit layu bakteri *R. solanacearum* pada tanaman Solanaceae khususnya pada tanaman cabai sulit dikendalikan baik dengan cara kultur teknis, kimiawi dan mekanik. Pengendalian secara hayati dengan memanfaatkan mikroorganisme antagonis dari golongan rhizobakteri seperti *Bacillus* spp. diharapkan mampu menekan intensitas penyakit layu bakteri. Oleh karena itu, perlu dilakukan pengujian tentang efektifitas *Bacillus* spp. serta mekanisme penghambatannya terhadap *R. solanacearum* pada cabai baik secara *in vitro* di Laboratorium maupun *in vivo* di rumah kaca.

## 1.3 Tujuan dan Manfaat Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui penyebab penyakit layu pada tanaman cabai, mengetahui daya hambat serta mekanisme penghambatan *Bacillus* spp. terhadap *R. solanacearum* secara *in vitro* dan mengetahui efektifitas beberapa isolat *Bacillus* spp. dalam menghambat *R. solanacearum* pada tanaman cabai di rumah kaca.

Hasil penelitian ini diharapkan bermanfaat sebagai informasi dan masukan khususnya pada petani untuk dipertimbangkan sebagai alternatif pengendalian penyakit layu bakteri serta dapat mengurangi penggunaan pestisida sebagaimana yang dilakukan oleh petani saat ini.

## BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Penyakit Layu Bakteri pada Tanaman Cabai

#### 2.1.1 Penyebab Penyakit

Bakteri yang menyebabkan penyakit layu pada tanaman cabai awalnya diketahui dengan nama *Bacillus solanacearum* dan setelah beberapa kali mengalami perubahan taksonomi menjadi *Pseudomonas solanacearum*, perubahan taksonomi terakhir dengan nama *Ralstonia solanacearum* (Moorman, 2004).

*R. solanacearum* bersifat Gram negatif, berbentuk batang dengan ukuran 0,5  $\mu\text{m}$  x 1,5  $\mu\text{m}$ , dapat bergerak dengan satu atau beberapa flagela, aerobik, dapat mereduksi nitrat dan memproduksi amonia. Bakteri ini diklasifikasikan menjadi Ras berdasarkan perbedaan kisaran inang dan Biovar berdasarkan sifat biokimia (penggunaan sumber karbon) (Moorman, 2004). Karakteristik lain adalah tidak membentuk pigmen pendar fluor, katalase dan kovac's oksidase positif, kemoorganotrof, tidak mampu tumbuh pada suhu 4°C atau 40°C, tumbuh pada medium yang mengandung 1% NaCl, tetapi tidak tumbuh pada medium yang mengandung 2% NaCl (Hayward, 1976; EPPO, 2004). Lima biovar dapat dibedakan dengan penggunaan karbohidrat (Goto, 1992).

Tabel 1. Beberapa Biovar *R. solanacearum*

Karbohidrat	Biovar				
	I	II	III	IV	V
Selobiosa	-	+	+	-	+
Laktosa	-	+	+	-	+
Maltosa	-	+	+	-	+
Dulsitol	-	-	+	+	-
Manitol	-	-	+	+	+
Sorbitol	-	-	+	+	-

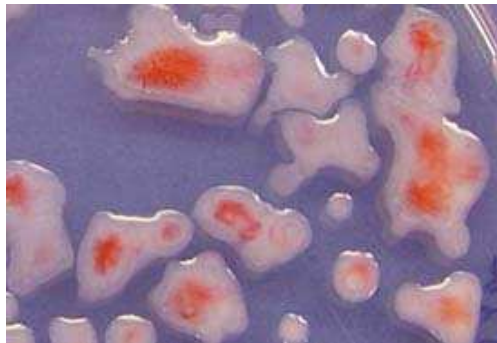
Sumber: Goto, 1992; EPPO, 2004.

Bakteri ini diketahui dapat mengakumulasi poly- $\beta$ -hidroxybutirat yang dapat dideteksi dengan Sudan Black B, reaksi pada medium yang mengandung *Tryphenil Tetrazolium Chloride* yaitu warna koloni strain virulen merah muda



sedangkan strain avirulen berwarna merah tua (Gambar 1), dapat memproduksi ekstrapolisakarida (EPS), tidak memproduksi levan dari sukrosa dan tidak menghidrolisa gelatin (Brown *et al.*, 1980).

Terdapat dua tipe isolat yang ditumbuhkan pada media yang mengandung 0,5% sukrosa atau glukosa, yaitu basah (fluidal) karena bakteri mampu menghasilkan ekstrapolisakarida, sedangkan tipe yang lain adalah kering (butirus) (Schaad, 2001), strain yang patogenik memiliki tipe koloni basah (fluidal) dan tidak berflagela pada media agar sedangkan strain yang avirulen koloni kering (butirus), berflagela dan dapat bergerak (motil) (Goto, 1992).



Gambar 1. Koloni virulen *R. solanacearum* pada media TZC. Sumber: Momol dan Olson, 2005.

### 2.1.2 Gejala Penyakit Layu Bakteri

Tanaman yang terserang awalnya menunjukkan gejala kehilangan kesegaran pada daun dan diikuti proses kelayuan tanaman dan akhirnya tanaman mengalami kemunduran pertumbuhan kemudian mati (Nawangsih *dkk.*, 2001). Pada batang, pangkal batang atau cabang yang terserang jika dibelah akan terlihat berkas pembuluh pengangkutan yang berwarna coklat tua dan membusuk (Prajnanta 2001), jika ditekan akan mengeluarkan lendir berwarna putih kotor yang merupakan koloni bakteri (Imdad, 2001), infeksi pada akar segera menjalar ke batang (Brown *et al.*, 1980).

Gejala layu tampak akibat jaringan pembuluh vaskular terhalang oleh massa bakteri dan lendir polisakaridanya, walaupun ada yang menyatakan bahwa bakteri memproduksi toksin dan dapat menginduksi tanaman menjadi layu,

bakteri akan menyebar dengan cepat dan memperbanyak diri di dalam jaringan pengangkutan (vaskular) (Brown *et al.*, 1980).

### 2.1.3 Kisaran Inang dan Penyebaran

Bakteri ini memiliki kisaran inang yang sangat luas dan menyerang sejumlah tanaman penting meliputi lebih dari 140 spesies tanaman yang tergolong dalam lebih dari 40 famili. Inang yang terpenting dari patogen ini adalah tomat, pisang, tembakau, kentang, cabai, kapas, karet, ubi jalar dan jahe. Beberapa gulma dapat menjadi inang bagi patogen dan kemungkinan besar berpeluang sebagai sumber inokulum (Hayward, 1994).

Patogen ini dapat menyebar lewat air, tanah atau lewat pisau yang digunakan untuk memotong. Penyakit dapat menyebar melalui biji, serangga, nematoda, bahan tanaman sakit, manusia dan alat pertanian (Rukmana dan Saputra, 1997; Kelman, 1953).

Bakteri masuk ke dalam jaringan tanaman melalui luka pada akar yang disebabkan oleh serangga, nematoda, atau pengolahan tanah. Bakteri juga masuk ke akar tanaman secara alami melalui akar lateral/primer yang baru tumbuh, mengkoloni akar dan menyerang petumbuhan pembuluh xilem (Kersten dan Allen, 1998 ).

### 2.1.4 Ekologi

*R. solanacearum* hidup baik pada tanah berpasir yang kelembabannya tinggi dan suhu di atas 24°C (Nawangsih *dkk.*, 2001). Faktor suhu berperan sangat penting terhadap perkembangan patogen, suhu optimum untuk pertumbuhan *R. solanacearum* tergantung pada strainnya dan bervariasi antara 27°C-37°C dengan suhu maksimum sekitar 39°C dan suhu minimum 10°C-15°C (Hayward, 1976). Bakteri tidak mampu tumbuh pada suhu 4°C atau 40°C (EPPO, 2004), apabila temperatur tinggi (35°C-37°C) dengan kelembaban tinggi 80%, bakteri akan cepat berkembang dan menginfeksi tanaman (Rukmana dan Saputra, 1997).

Populasi *R. solanacearum* menurun secara signifikan ketika terjadi peningkatan suhu tanah dan penurunan kelembaban tanah. Akan tetapi, pada kelembaban yang tinggi dan temperatur yang rendah, bakteri dapat bertahan

dalam waktu relatif lama di dalam tanah (Akiew, 1985). Bakteri layu sangat merugikan pada tanah-tanah yang basah, karena pada keadaan basah absorpsi air oleh tanaman akan lebih tinggi dan mengakibatkan tanaman menjadi lebih sukulen dan aktivitas bakteri meningkat (Sastrahidayat, 1990).

## 2.2 Bakteri Antagonis *Bacillus* spp.

*Bacillus* spp. memiliki karakteristik sebagai berikut: bersifat Gram positif berbentuk batang, dengan ukuran 2-3  $\mu\text{m}$  x 0,7-0,8  $\mu\text{m}$ , dapat bergerak dengan beberapa flagela peritrik. Bakteri ini mampu membentuk endospora yang tahan panas dan bila dibiakkan dalam medium NA koloni berwarna putih hingga krem, berkerut atau halus dan berlipat, temperatur minimum untuk pertumbuhan yaitu 5°C sedangkan temperatur maksimum sebesar 55°C (Buchanan dan Gibbon, 1974). pH minimum untuk pertumbuhan *Bacillus* bervariasi mulai 7,5-8,0 toleransi terhadap NaCl berkisar 2%-25%, mampu menghidrolisa pati, selulosa, pektin, protein, hidrokarbon, dapat mereduksi nitrat menjadi nitrit serta memfiksasi nitrogen (Todar, 2005).

*Bacillus* spp. dalam mengendalikan penyakit tanaman melalui beberapa mekanisme seperti kompetisi, menginduksi ketahanan sistemik pada tanaman dan memproduksi antibiotik (Monteiro *et al.*, 2006).

Beberapa spesies memproduksi antibiotik dari golongan polipeptida, satu strain dapat memproduksi lebih dari satu jenis antibiotik (Buchanan dan Gibbon, 1974), misalnya menyatakan bahwa antibiotika pumulin, laterosporin, gramicidin dan tyrocidin efektif menghambat bakteri Gram positif; sedangkan colistin dan polymyxin efektif menghambat bakteri Gram negatif (Todar, 2005). Salah satunya *B. subtilis* yang memproduksi senyawa antibiotik kelompok lipopeptida yaitu iturin. Iturin membantu *B. subtilis* bersaing dengan mikroorganisme lain dengan cara membunuh atau menghambat pertumbuhan mikroorganisme tersebut (Nysaes Cornell Education, 2004).

Mekanisme antibiosis memiliki beberapa keuntungan dibanding mekanisme yang lain, antara lain a) substansi/senyawa yang dilepaskan oleh antagonis dapat terdifusi ke dalam film air dan pori-pori tanah; b) jarak

antagonisme oleh antagonis yang memproduksi antibiotik umumnya lebih besar, lebih cepat dan efektif; c) antibiotik dapat tetap berpengaruh, walaupun antagonisnya telah mati (Baker dan Cook, 1974).

Berdasarkan sifat toksisitasnya, antibiotika dibagi menjadi dua kelompok yaitu mekanisme bakteriostatik dan bakterisida, a) sifat bakteriostatik adalah antibiotika yang bersifat menghambat pertumbuhan bakteri dengan mekanisme kerja mengganggu proses sintesa protein suatu bakteri. Untuk kehidupannya, sel bakteri perlu mensintesis berbagai protein yang berlangsung didalam ribosom dengan bantuan mRNA dan tRNA, ribosom bakteri terdiri dari dua subunit yaitu sub unit 30S dan 50S, agar dapat berfungsi pada sintesis protein, kedua komponen tersebut harus bersatu pada pangkal rantai mRNA membentuk ribosom 70S. Antibiotika golongan ini bekerja dengan mengganggu ikatan kedua komponen tersebut sehingga kode pada mRNA salah dibaca oleh tRNA pada saat sintesis protein, akibatnya terbentuk protein yang abnormal dan nonfungsional bagi sel bakteri. Contohnya antibiotika golongan aminoglikosida, makrolida, linkomisin, tetrasiklin dan kloramfenikol. b). Sifat bakteriosidal adalah antibiotika yang bersifat membunuh bakteri dengan mekanisme kerja mempengaruhi proses pembentukan dinding sel atau permeabilitas membran sel suatu bakteri. Dinding sel bakteri terdiri dari polipeptidoglikan, yaitu suatu kompleks polimer mukopeptida (glikopeptida). Antibiotika golongan ini bekerja dengan menghambat proses transpeptidasi rantai peptidoglikan tersebut, akibatnya tekanan osmotik di dalam sel bakteri lebih tinggi dibanding di luar sel dan terjadinya kerusakan dinding sel bakteri (lisis) (Community of Pharmaceutical Students , 2006).

### **2.3 Potensi *Bacillus* Sebagai Agensia Pengendali Hayati**

Potensi *Bacillus* spp. dalam mengendalikan beberapa patogen antara lain: berdasarkan hasil pengujian di laboratorium dan rumah kaca, *B. subtilis* nomor isolat BHN 13 yang disolasi dari perakaran tanaman amarilis di Cibadak dan Sukabumi, dapat mengendalikan penyakit rebah kecambah yang disebabkan oleh *Rhizoctonia solani* pada tanaman krisan. Diduga antibiotik yang dikeluarkan

bakteri tersebut dapat menekan pertumbuhan *R. solani* (Balai Penelitian Tanaman Hias, 2006).

*Bacillus* merupakan salah satu genus yang sangat penting untuk pengendalian hayati baik pada permukaan daun, disamping untuk penyakit perakaran maupun pasca panen. Bakteri ini sangat berpotensi karena mudah diformulasikan dan relatif dapat mengkoloni berbagai spesies tanaman (Backman, *et al.*, 1997), misalnya kemampuan *Bacillus* spp. mengkoloni spermosfer tanaman jagung hingga 90% serta melindungi dari serangan *R. solani* (Ugoji *et al.*, 2005).

*Bacillus* spp. strain KB-1, KB-2 dan KB-3 mampu mengendalikan patogen tular tanah (*Verticilium dahliae* dan *Fusarium oxysporum*) berkisar 50% - 70% (Kawai *et al.*, 2006), bakteri ini juga mampu melindungi tanaman jahe dari serangan *R. solanacearum* dengan penurunan infeksi sebesar 80% (Bustamam, 2006). Hasil penelitian Monteiro *et al.* (2005) menunjukkan bahwa empat strain *Bacillus* spp. yaitu RI-4, RAB-7, R-116 dan C-210 mampu menghambat pertumbuhan *X. campestris* pv. *campestris* secara *in vitro* dengan daya hambat sebesar 11,3 mm.

Kelompok *Bacillus* memiliki keunggulan dibandingkan kelompok bakteri lainnya yaitu mampu menghasilkan endospora yang tahan terhadap panas, dingin, pH yang ekstrim, pestisida, pupuk dan waktu penyimpanan serta mudah dibiakkan (Arwiyanto, 1997). Selain itu, *Bacillus* spp. juga dapat dipadukan dengan teknik pengendalian lain dalam praktek pengelolaan hama terpadu (*Integrated Pest Management (IPM)*) (Jacobsen *et al.*, 2004)

## **BAB 3. METODE PENELITIAN**

### **3.1 Waktu**

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium dan Rumah Kaca Penyakit Tumbuhan Jurusan Ilmu Hama dan Penyakit Tumbuhan Fakultas Pertanian Universitas Jember sejak bulan Desember 2006 sampai Mei 2007.

### **3.2 Bahan dan Alat**

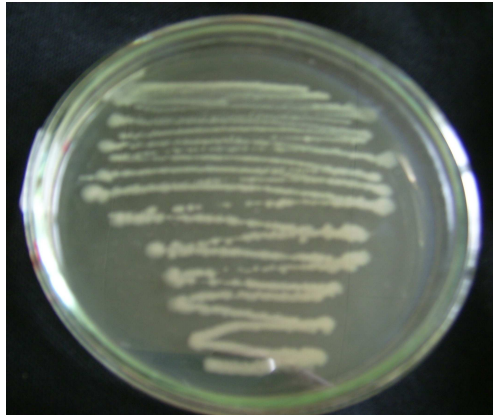
Bahan yang digunakan dalam pelaksanaan penelitian antara lain: Media NA (*Nutrient Agar*), TZC (*Tryphenil Tetrazolium Chloride*), TSA (*Tryptic Soy Agar*), CPG (*Casaminoacid Pepton Glucose*), kentang serta beberapa media uji sifat fisiologi dan biokimia *R. solanacearum*, patogen *R. solanacearum* yang diisolasi dari tanaman cabai yang menunjukkan gejala layu dan beberapa isolat *Bacillus* spp. (koleksi Ir. Rachmi Masnilah, MSi), medium agar air 0,6%, tanaman tembakau dan air pepton 1 %. Reagen yang digunakan untuk pengujian adalah larutan iodin (KI<sub>2</sub>), larutan KOH 3%, reagen Kovac's oksidase, reagen nitrat, reagen asam sulfanilat,  $\alpha$ -naphthylamine. Bahan kimia lain yang meliputi kloroform, alkohol dan minyak parafin steril.

Peralatan yang digunakan meliputi: cawan petri, tabung reaksi, pipet volume, laminar air flow, mikropipet eppendorf, gelas objek, pinset, erlenmeyer, jarum ose, jarum ent, syring, tusuk gigi, vortex dan pot plastik.

### **3.3 Pelaksanaan**

#### **3.3.1 Perbanyak Isolat *Bacillus* spp.**

Isolat *Bacillus* spp. sebanyak 30 isolat diperoleh dari koleksi Ir. Rachmi Masnilah, MSi. yang ditumbuhkan pada medium TSA untuk diperbaharui dan diamati morfologi koloninya. Karakteristik morfologi koloni *Bacillus* spp. adalah koloni berbentuk bulat, butirus (seperti mentega) dengan tepi rata (Gambar 2).



Gambar 2. Morfologi koloni *Bacillus* spp. pada medium TSA

### 3. 2 Isolasi dan Identifikasi Bakteri Layu *R. solanacearum*

Isolasi *R. solanacearum* dilakukan dengan cara mengambil contoh tanaman yang terserang bakteri layu, dicuci dengan air steril dan didesinfeksi dengan alkohol 70%. Batang tanaman yang sakit dipotong melintang, kemudian masukkan ke dalam tabung reaksi dan dibiarkan selama 30 menit supaya massa bakteri keluar. Suspensi massa bakteri kemudian digoreskan pada medium TZC dalam cawan petri dengan menggunakan jarum ose dan diinkubasi dalam suhu ruangan selama 24 jam. Koloni tunggal bakteri kemudian dipindahkan ke medium CPG yang baru untuk mendapatkan isolat murni. Uji patogenisitas dilakukan dengan uji hipersensitif pada daun tembakau dan uji virulensi menggunakan bibit tanaman cabai. Identifikasi bakteri berdasarkan sifat fisiologis dan biokimia yang meliputi: uji Gram, oksidatif fermentatif, uji pati, pembentukan indol, pembusukan kentang, pertumbuhan pada suhu 37°C dan 41°C, pertumbuhan pada NaCl 5%, uji reduksi nitrat dan pembentukan pigmen pendar fluor pada medium King's B. Uji biokimia dilakukan dengan menumbuhkan isolat bakteri pada medium yang mengandung sumber karbon maltosa, laktosa, dan dulcitol (Schaad *et al.*, 2001; Lelliot dan Stead, 1987).

#### a. Uji Gram

Gelas obyek dibersihkan dengan alkohol 70% dan dikeringanginkan di atas Bunsen. Isolat bakteri yang telah berumur 24 jam diambil satu ose dan

diletakkan pada gelas obyek yang telah ditetesi dengan KOH 3%, bakteri dan KOH 3% diaduk dan dicampur dengan hingga rata. Setelah rata jarum ose diangkat perlahan-lahan. Apabila bakteri tersebut lengket atau terangkat maka bakteri tersebut bereaksi positif dan termasuk Gram negatif dan jika tidak lengket maka tergolong dalam Gram positif reaksi negatif (Lelliot dan Stead, 1987).

**b. Uji oksidatif -fermentatif**

Menyiapkan medium Oksidatif-Fermentatif sebanyak 2 tabung reaksi untuk setiap isolat masing-masing 5 ml. Satu ose bakteri ditusukkan pada 2 medium tersebut, untuk tabung 1 ditutupi dengan minyak parafin dan tabung 2 tidak ditutupi dengan minyak parafin, kemudian masing-masing tabung diinkubasikan selama 7-14 hari dan diamati dengan melihat perubahan warna dari hijau menjadi kuning baik pada tabung yang ditutupi parafin maupun yang tidak ditutupi parafin. Apabila seluruh media berwarna kuning maka bersifat oksidatif fermentatif (Lelliot dan Stead, 1987).

**c. Uji pembentukan indol**

Menumbuhkan bakteri pada media yang mengandung 1% Trypton dan diinkubasikan 2-5 hari pada suhu ruang. media ditetesi dengan reagen Kovac's sebanyak 10-12 tetes. Bila kemudian terbentuk lapisan berwarna merah, maka bakteri membentuk indol (Lelliot dan Stead, 1987, Nofiani dan Gusrizal, 2004).

**d. Uji pembusukan kentang**

Kentang dicuci dengan air mengalir sampai bersih, kemudian dipotong-potong ukuran kurang lebih 1-2 cm, dicuci dengan air steril dan didesinfeksi dengan alkohol 70% dan dicuci dengan air steril tiga kali. Taruh kentang pada petridish steril yang dialasi kertas filter steril kemudian menggoreskan isolat bakteri berumur 24-48 jam, inkubasi dan amati pembusukan kentang (Lelliot dan Stead, 1987; Kelman, 1953).



**e. Uji pertumbuhan pada suhu 37°C dan 41°C**

Isolat bakteri yang telah berumur 24 jam diinokulasikan ke dalam tabung reaksi yang berisi media NB, inkubasikan pada suhu 41°C untuk suhu maksimum dan 37°C untuk suhu optimum selama 48 jam. Setelah 48 jam tabung reaksi dikocok dan diamati tingkat kekeruhannya (Lay, 1994).

**f. Uji pertumbuhan pada NaCl 5%**

Isolat bakteri yang telah berumur 24 jam diinokulasikan ke dalam tabung reaksi yang berisi media NB yang dicampur dengan NaCl 5%, inkubasikan pada suhu ruang dan amati kekeruhannya (Kelman, 1953).

**g. Uji reduksi nitrat**

Bakteri yang telah berumur 24 jam diambil 1 ose dan diletakkan pada medium Nitrat dalam tabung reaksi, kemudian diinkubasikan selama 3 hari. Setelah 3 hari media tersebut ditetesi dengan reagen *asam sulfanilat* ditambah dengan 1 ml  *$\alpha$ -naphthylamine*. Apabila terjadi perubahan warna medium dari kuning menjadi merah atau biru maka bakteri bersifat positif (Schaad *et. al.*, 2001).

**h. Uji reaksi hipersensitif pada daun tembakau**

Suspensi inokulum dari isolat *R. solanacearum* dengan kerapatan  $1 \times 10^8$  cfu/ml diinfiltrasikan pada daun tanaman tembakau, inkubasikan selama kurang lebih 48 jam sampai muncul gejala hipersensitif. Jika muncul gejala hipersensitif, maka isolat yang diuji merupakan bakteri patogen (Hartman dan Hayward, 1994).

**i. Uji penggunaan sumber karbon**

Bakteri digores pada medium yang mengandung sumber karbon (maltosa, laktosa, dan dulsitol) dan diinkubasikan pada suhu 28-32°C selama 5 hari. Reaksi positif terjadi apabila terjadi perubahan warna medium dari hijau menjadi kuning (Lelliot dan Stead, 1987).

#### **j. Uji pembentukan pigmen pendar fluor**

Isolat bakteri yang berumur 24 jam ditumbuhkan pada medium King's B kemudian diinkubasi selama 72 jam. Reaksi positif terjadi apabila isolat bakteri menghasilkan pigmen pendar fluor ketika diamati dibawah sinar UV(Lelliot and Stead, 1974).

#### **k. Uji hidrolisa pati**

Isolat bakteri yang berumur 24 jam ditumbuhkan pada medium pati, kemudian diinkubasi selama 3-5 hari. Setelah lima hari, medium ditetesi dengan reagen pati. Reaksi positif terjadi apabila di sekitar koloni bakteri yang tumbuh menjadi bening, reaksi negatif apabila di sekitar koloni bakteri menjadi gelap/berwarna biru tua (Lelliot and Stead, 1974).

### **3.4 Uji Antagonisme *Bacillus* spp. terhadap *R. solanacearum* pada Cabai secara *in vitro***

Pengujian dilakukan secara *in vitro* di Laboratorium Penyakit Tumbuhan Jurusan Hama dan Penyakit Tumbuhan Fakultas Pertanian Universitas Jember.

Uji antagonisme dilakukan dengan metode *dual plating* untuk mengetahui terbentuknya antibiosis secara *in vitro*. *Bacillus* spp. ditumbuhkan pada cawan petri yang berisi media TSA sebanyak enam strain per cawan petri dan diinkubasi selama 48 jam pada suhu 30°C, kemudian dituang larutan kloroform 1ml dari tepi tutup petri dan cawan petri diletakkan dengan posisi terbalik dan biarkan selama 2 jam. Cawan petri dibalik ke posisi semula setelah 2 jam. Pada permukaan medium tersebut dituangkan media suspensi *R. solanacearum* (0,2 ml suspensi air steril *R. solanacearum* dalam 4 ml 0,6 % agar air pada suhu 45°C), diinkubasikan selama 24 jam pada suhu 30°C, kemudian ukur zona hambatan yang terbentuk. Strain yang mampu menghambat diuji sebanyak dua kali dengan medium dan metode yang sama.

Untuk mengetahui mekanisme penghambatan, agar yang berada dalam zona hambatan diambil secara aseptis dengan skalpel steril kemudian dimasukkan dalam tabung reaksi berisi 1% air pepton dan dihancurkan dengan jarum preparat. Air pepton berisi agar kemudian digojok menggunakan *rotary shaker* selama 24

jam pada suhu 30°C. Air pepton yang menjadi keruh setelah 24 jam menunjukkan adanya mekanisme penghambatan *Bacillus* bersifat bakteriostatik. Air pepton yang tidak menjadi keruh terus digojok sampai lima hari kemudian dan jika tetap bening, maka mekanisme penghambatan bersifat bakteriosidal.

### 3.5 Uji Efektifitas beberapa *Bacillus* spp. terhadap *R. solanacearum* pada Cabai di Rumah Kaca.

Pengujian dilakukan di Rumah Kaca Penyakit Tumbuhan Jurusan Hama dan Penyakit Tumbuhan Fakultas Pertanian Universitas Jember. Rancangan yang digunakan yaitu Rancangan Acak Kelompok (RAK) Faktorial dengan dua faktor, faktor pertama (A) waktu aplikasi; A1= aplikasi *Bacillus* spp. 7 hari sebelum tanam; A2= aplikasi *Bacillus* spp. 7 hari sebelum tanam dan 7 hari sesudah inokulasi patogen. Faktor kedua yaitu (B) jenis Isolat *Bacillus* spp. yang digunakan, B0= tanpa bakteri antagonis (Kontrol); B1= Ba-53; B2= Ba-67 dan B3= Ba-90. Masing-masing perlakuan diulang sebanyak 3 kali dan setiap ulangan ada 5 tanaman. Kombinasi perlakuan adalah

A2B3	A2B2	A2B1	A1B3	A1B2	A1B1	A1B0	A2B0
A1B1	A1B0	A1B2	A1B3	A2B0	A2B1	A2B2	A2B3
A1B0	A1B1	A2B2	A2B0	A2B1	A1B2	A2B3	A1B3

Analisis data menggunakan Sidik Ragam (ANOVA), jika berbeda nyata kemudian dilanjutkan dengan Duncan (DMRT) pada taraf 5%.

Media tanam yang digunakan yaitu terdiri atas campuran tanah sawah, pupuk kandang dan kompos (1:1:1). Tanah disterilisasi dalam *autoklaf* (121°C) selama lima jam kemudian dimasukkan ke dalam pot-pot sesuai denah perlakuan (Gambar 3) kemudian dilakukan aplikasi *Bacillus* spp. (A1=sebelum tanam) sebanyak 10 ml/pot kecuali kontrol dengan kerapatan suspensi 10<sup>8</sup> cfu/ml, seminggu kemudian pot-pot yang sudah diaplikasi bakteri maupun kontrol baru ditanam bibit cabai. Inokulasi patogen *R. solanacearum* 7 hari setelah penanaman bibit sebanyak 5 ml/pot dengan kerapatan 10<sup>12</sup> cfu/ml yang sebelumnya dilakukan

pelukaan menggunakan pisau steril di perakaran tanaman, 7 hari setelah aplikasi patogen dilakukan aplikasi bakteri antagonis untuk perlakuan A2. Penyiraman cabai menggunakan air pada pagi atau sore hari.



Gambar 3. Denah perlakuan di rumah kaca

Pengamatan masa inkubasi dilakukan setiap hari sejak 1 hari setelah inokulasi patogen sampai muncul gejala awal. Intensitas penyakit diamati setiap lima hari sekali selama tujuh kali pengamatan. Intensitas penyakit dihitung dengan menggunakan rumus :

$$IP = \frac{\sum_{i=1}^k k \times N_k}{Z \times N} \times 100\%$$

dengan  $k$  = jumlah tanaman yang terserang pada tiap nilai skala

$N_k$  = jumlah tanaman dengan skala keparahan  $k$  ( $k = 0, 1, 2, 3$ )

$N$  = jumlah tanaman yang digunakan dalam percobaan

$Z$  = skala keparahan penyakit tertinggi

dengan skala: 0 = tidak ada gejala layu,

1 = 1-25% daun layu,

2 = 25-75% daun layu,

3 = 75-100% daun layu (Arwiyanto, 1997).

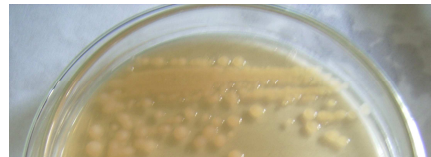
## BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN

### 4.1 Bakteri layu (*R. solanacearum*) pada Cabai

#### 4.1.1 Karakteristik Morfologi Koloni Bakteri *R. solanacearum*

Diperoleh empat isolat bakteri hasil isolasi dari batang tanaman cabai yang diduga terserang patogen layu bakteri yang memiliki koloni dengan karakteristik koloni berwarna putih keruh (agak coklat), bentuk tidak beraturan, kebasah-basahan dan mengkilap. Hal ini sesuai dengan Semangun (2001), bahwa koloni bakteri *R. solanacearum* pada medium agar membentuk koloni keruh, berwarna kecoklatan, kecil dan tidak bentuknya tidak teratur, halus, kebasah-basahan dan bercahaya (mengkilap).

Koloni bakteri layu memiliki warna yang berbeda antara koloni yang sifatnya virulen dan avirulen pada medium CPG+TZC, koloni yang virulen pada bagian pusat koloni warnanya merah muda dan bagian tepi berwarna putih. Sedangkan koloni yang avirulen berwarna merah tua, hal ini sesuai dengan Hayward (1994) bahwa koloni virulen *R. solanacearum* berwarna putih dengan pusat koloni berwarna merah jambu (Gambar 4).



Gambar 4. Morfologi koloni *R. solanacearum* pada media pada media A. TZC (a. Virulen dan b. Avirulen) dan B. CPG

#### 4.1.2 Karakteristik Fisiologi dan Biokimia Bakteri *R. solanacearum*

Hasil uji hipersensitif dan uji virulensi, terdapat 4 isolat bakteri yang merupakan bakteri patogen dan bersifat virulen. Pengujian dilanjutkan

ERROR: ioerror  
OFFENDING COMMAND: image

STACK: