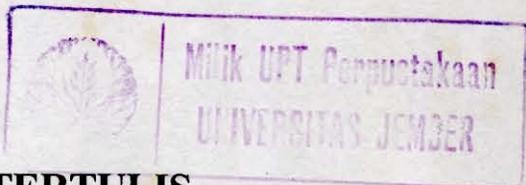
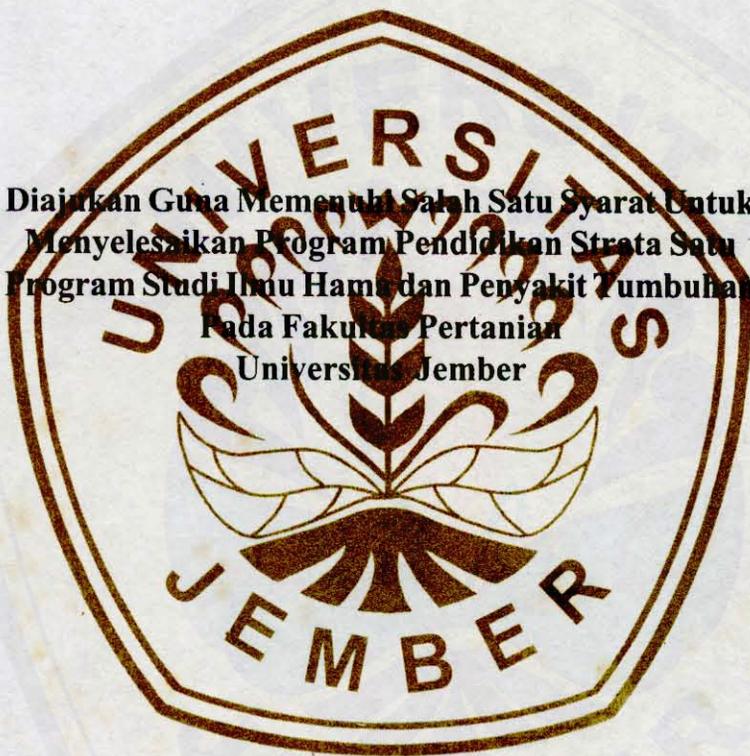


Digital Repository Universitas Jember  
KARAKTERISTIK DAN POTENSI ANTAGONISME PSEUDOMONAD  
FLUORESENS TERHADAP BAKTERI PENYEBAB PENYAKIT LAYU  
(*Ralstonia solanacearum*) PADA PISANG SECARA INVITRO



KARYA ILMIAH TERTULIS  
(SKRIPSI)

Diajukan Guna Memenuhi Salah Satu Syarat Untuk  
Menyelesaikan Program Pendidikan Strata Satu  
Program Studi Ilmu Hama dan Penyakit Tumbuhan  
Pada Fakultas Pertanian  
Universitas Jember



Oleh :

**TATIK RESPATI SIGIT**

971510401065

**UNIVERSITAS JEMBER - FAKULTAS PERTANIAN  
AGUSTUS, 2001**

Asal	Hadiah	Klasifikasi 632.9 SIG K
Terima Tanggal	001 2001	
No. Induk	10236902	

5

**PEMBIMBING :**

**Ir. Rachmi Masnilah, MSi ( DPU )**

**Ir. Tatang Pranata, Dpl. Agr ( DPA )**

Diterima Oleh

FAKULTAS PERTANIAN UNIVERSITAS JEMBER

Sebagai SKRIPSI

Dipertahankan pada

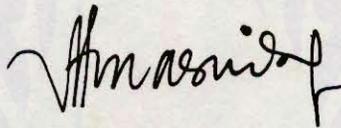
Hari : Jumat

Tanggal : 14 September 2001

Tempat : Fakultas Pertanian  
Universitas Jember

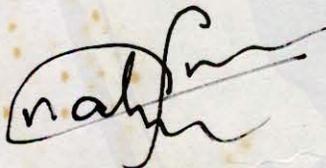
Tim Penguji

Ketua



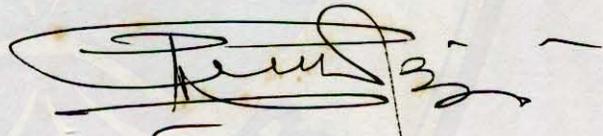
Ir. Rachmi Masnilah, MSi  
NIP. 131 759 539

Anggota I



Ir. Tatang Pranata, Dpl.Agr  
NIP. 131 593 403

Anggota II



Ir. Paniman Ashna Mihardjo, MP  
NIP. 130 812 643

Mengesahkan

DEKAN FAKULTAS PERTANIAN



Ir. Arie Mudijharjati, MS /s/   
NIP. 130 609 808

## KATA PENGANTAR

Puji syukur penulis panjatkan kehadiran Allah SWT atas limpahan rahmat, taufiq dan hidayahNya, sehingga Karya Ilmiah Tertulis (Skripsi) yang berjudul : **“Karakteristik Dan Potensi Antagonisme Pseudomonad Fluoresens Terhadap Bakteri Penyebab Penyakit Layu ( *Ralstonia solanacearum* ) Pada Pisang Secara *In vitro*”** dapat diselesaikan dengan baik.

Karya Ilmiah Tertulis ini disusun untuk melengkapi persyaratan dalam menyelesaikan studi program sarjana (S1) pada Program Studi Ilmu Hama dan Penyakit Tumbuhan, Fakultas Pertanian Universitas Jember.

Pada kesempatan ini penulis mengucapkan terima kasih kepada :

1. **Dekan dan Ketua Program Studi Ilmu Hama dan Penyakit Tumbuhan** Fakultas Pertanian Universitas Jember yang telah memberi kesempatan untuk menyelesaikan pendidikan dan penelitian pada Program Srata 1 (S1).
2. **Ir. Rachmi Masnilah, MSi** selaku Dosen Pembimbing Utama.
3. **Ir. Tatang Pranata, Dpl. Agr** selaku Dosen Pembimbing Anggota I.
4. **Ir. Paniman Ashna Mihardjo, MP** selaku Dosen Pembimbing Anggota II.
5. Ayah (alm. **H.Widodo Tjokrowirjono**), Ibu (**Hj. Niniek Sri Rahayu**), kakak (**Hapsoro Widyonondo S, SH., Diah Sayekti W.S, SE., Fitri Rahardini S**) dan adik penulis (**Lenny Kurniati S, Yuli Widarini S**) yang telah memberikan bantuan dan dukungan baik materiil dan spirituil sehingga Karya Ilmiah Tertulis ini dapat penulis selesaikan.
6. **Arwan Prahara, SP** yang selalu memberikan dorongan dan semangat kepada penulis sejak awal hingga selesainya penulisan Karya Ilmiah Tertulis ini.
7. Rekan – rekan HPT '97 dan '96 atas kerjasama dan bantuannya.

Harapan penulis semoga hasil penelitian ini dapat bermanfaat sebagai sumber informasi.

Jember, Agustus 2001

Penulis

## INTISARI

Penyebab penyakit layu bakteri (*Ralstonia solanacearum*) merupakan salah satu bakteri paling merugikan bagi pertanaman pisang di seluruh dunia sehingga diperlukan suatu strategi pengendalian penyakit yang tepat. *Pseudomonas fluorescens* sebagai bakteri pengkoloni akar merupakan salah satu komponen pengendalian hayati yang dapat menekan *R. solanacearum*. Tujuan penelitian ini adalah mempelajari karakterisasi *pseudomonas fluorescens* pada pisang di daerah Jember dan Sukamantri (koleksi IPB) dan potensi antagonismenya terhadap *R. solanacearum* secara *in vitro*. Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Ilmu Penyakit Tumbuhan Program Studi Ilmu Hama dan Penyakit Tumbuhan Fakultas Pertanian Universitas Jember, pada bulan Maret sampai Juni 2001. Kelima isolat bakteri bersifat gram negatif, fluoresen, oksidatif, mampu mencairkan gelatin, koloni berwarna krem pada uji YDCA, bereaksi positif pada uji katalase, pembentukan levan sukrosa, pembusukan kentang, hidrolisis arginin dan bereaksi negatif pada uji hidrolisis pati, reduksi nitrat, pembentukan indol, mampu tumbuh baik pada suhu 25-37°C. Uji reaksi hipersensitif pada tembakau menunjukkan hasil negatif. Berdasarkan karakteristiknya bakteri *pseudomonas fluorescens* dapat digolongkan sebagai *Pseudomonas fluorescens*. Hasil uji *in vitro* menunjukkan bahwa kelima isolat *P. fluorescens* efektif menghambat pertumbuhan *R. solanacearum*. Persentase penghambatan *P. fluorescens* tertinggi yaitu isolat PfRa3 sebesar 56,13 %.

Kata kunci : *Pseudomonas fluorescens*, *Ralstonia solanacearum*, antagonisme.

## RINGKASAN

Tatik Respati Sigit. 971510401065. Program Studi Ilmu Hama dan Penyakit Tumbuhan. Karakteristik dan Potensi Antagonisme *Pseudomonad fluoresens* Terhadap Bakteri Penyebab Penyakit Layu (*Ralstonia solanacearum*) Pada Pisang Secara *In vitro*. Ir. Rachmi Masnilah, MS. sebagai Dosen Pembimbing Utama, Ir. Tatang Pranata, Dpl. Agr. sebagai Dosen Pembimbing Anggota.

Penyakit layu bakteri yang disebabkan oleh *Ralstonia solanacearum* Yabuuchi *et.al* (sinonim *Pseudomonas solanacearum* E.F Smith) ras 2 merupakan salah satu penyakit penting pada pertanaman pisang. Kerugian hasil akibat penyakit ini sangat besar yang terjadi di daerah-daerah atau negara-negara penghasil pisang. Untuk mengatasi masalah ini maka perlu di cari suatu strategi pengendalian penyakit yang tepat. Salah satu alternatif cara pengendalian adalah pengendalian hayati dengan menggunakan mikroorganisme dalam tanah. *Pseudomonad fluoresens* merupakan bakteri pengkoloni akar dan memiliki kemampuan untuk mengendalikan beberapa patogen akar. Tujuan penelitian ini adalah untuk mempelajari karakteristik *pseudomonad fluoresens* pada pisang di daerah Jember dan Sukamantri (koleksi IPB) serta mengetahui potensi antagonismenya terhadap bakteri layu *Ralstonia solanacearum* secara *in vitro*.

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Ilmu Penyakit Tumbuhan Program Studi Ilmu Hama dan Penyakit Tumbuhan Fakultas Pertanian Universitas Jember pada bulan Maret sampai Juni 2001. Ada empat tahap yang dilaksanakan pada penelitian ini meliputi a) pengambilan sampel tanah yang mengandung *pseudomonad fluoresens*, b) isolasi dan identifikasi bakteri antagonis, c) perbanyakan isolat *R. solanacearum* dan d) uji antagonisme *pseudomonad fluoresens* secara *in vitro*. Pengambilan sampel tanah dilakukan di daerah Jelbuk, Rembangan, Rambipuji dan Ambulu dengan metode survei. Tanah yang diambil berasal dari daerah sekitar perakaran tanaman pisang yang sehat kemudian dibawa ke laboratorium untuk diteliti

lebih lanjut. Selanjutnya dilakukan isolasi bakteri pada medium King's B sampai di dapat isolat yang murni.

Identifikasi bakteri dilakukan dengan mengamati karakteristik fisiologi bakteri. Karakteristik fisiologi dilaksanakan dengan melakukan serangkaian uji yang meliputi uji gram, fluoresen, oksidatif fermentatif, pencairan gelatin, uji YDCA, katalase, hidrolisis pati, reduksi nitrat, pembentukan indol, pembentukan levan sukrosa, pembusukan kentang, hidrolisis arginin, pengaruh suhu. Perbanyakkan isolat *R. solanacearum* dilakukan dengan menggosokkan suspensi bakteri pada media CPG kemudian dipindahkan pada media TZC, koloni yang virulen disimpan dalam air steril. Uji antagonisme *in vitro* dilakukan dengan meletakkan kertas filter yang mengandung *R. solanacearum* di bagian tengah cawan petri yang berisi media King's B kemudian meletakkan empat kertas filter yang mengandung pseudomonad fluoresens dari satu isolat yang sama pada empat titik di bagian tepi dari cawan petri tersebut.

Berdasarkan hasil identifikasi, kelima bakteri pseudomonad fluoresens bersifat gram negatif, fluoresen, oksidatif, mampu mencairkan gelatin, koloni berwarna krem pada uji YDCA, bereaksi positif pada uji katalase, pembentukan levan sukrosa, pembusukan kentang, hidrolisis arginin, bereaksi negatif pada uji hidrolisis pati, reduksi nitrat, pembentukan indol. Bakteri ini mampu tumbuh baik pada suhu 25-37<sup>0</sup>C. Pada uji reaksi hipersensitif pada tembakau, bakteri tidak menimbulkan gejala nekrosis pada daun tembakau.

Berdasarkan pengujian yang telah dilakukan disimpulkan bahwa bakteri pseudomonad fluoresens di daerah Jember (Jelbuk, Rembangan, Rambipuji dan Ambulu) dan Sukamantri (koleksi IPB) adalah *Pseudomonas fluorescens*. Kelima isolat tersebut efektif menghambat pertumbuhan bakteri *R. solanacearum*. Persentase penghambatan *P. fluorescens* tertinggi yaitu dari isolat PfRa3 sebesar 56,13 %.

DAFTAR ISI

	Halaman
DAFTAR TABEL .....	x
DAFTAR GAMBAR .....	xi
DAFTAR GRAFIK .....	xii
DAFTAR LAMPIRAN .....	xiii
I. PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang .....	1
1.2 Tujuan dan Manfaat Penelitian .....	2
II. TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 Arti Penting Penyakit Layu Bakteri Pada Pisang .....	4
2.2 Gejala Penyakit Layu Bakteri Pada Pisang .....	5
2.3 Penyebab Penyakit Layu Bakteri Pada Pisang .....	5
2.4 Epidemiologi .....	6
2.5 Pengendalian Penyakit Layu Pada Pisang .....	8
2.6 Bakteri Pseudomonad Fluoresens Sebagai Agen Antagonis .....	9
2.7 Hipotesis .....	11
III. BAHAN DAN METODE	
3.1 Tempat dan Waktu Penelitian .....	12
3.2 Bahan dan Alat .....	12
3.3 Metode Penelitian .....	12
3.3.1 Pengambilan Sampel Tanah yang Mengandung Pseudomonad Fluoresens .....	12
3.3.2 Isolasi dan Identifikasi Mikroorganisme Antagonis (Pseudo monad Fluoresens) .....	13
3.3.3 Perbanyakkan Isolat <i>R. solanacearum</i> .....	17
3.3.4 Uji Antagonisme Pseudomonad Fluoresens terhadap <i>R. solanacearum</i> secara <i>In vitro</i> .....	18

	Halaman
IV. HASIL DAN PEMBAHASAN	
4.1 Isolat Bakteri Pseudomonad Fluoresens .....	19
4.2 Identifikasi Bakteri Pseudomonad Fluoresens .....	20
4.3 Uji Antagonisme <i>In vitro</i> .....	32
4.3.1 Rata-rata Diameter Pertumbuhan Koloni <i>R. solanacearum</i> .....	32
4.3.2 Rata-rata Persentase Penghambatan <i>P. fluorescens</i> Terhadap <i>R. solanacearum</i> .....	35
V. KESIMPULAN DAN SARAN	
5.1 Kesimpulan .....	37
5.2 Saran .....	37
DAFTAR PUSTAKA .....	38
LAMPIRAN .....	43

**DAFTAR TABEL**

<b>Nomer</b>	<b><u>Teks</u></b>	<b>Halaman</b>
1	Lokasi Sampel Tanah dan Nama Isolat Bakteri.....	19
2	Hasil Pengujian Sifat-sifat Fisiologi Isolat PfJb1, PfRe3, PfRa3, PfAm2, dan PfSk1.....	20
3	Rata-rata Diameter Pertumbuhan Koloni <i>R. solanacearum</i> pada Pengamatan Hari Ke I sampai VII.....	32
4	Rata-rata Persentase Penghambatan <i>Pseudomonas fluorescens</i> Terhadap <i>R. solanacearum</i> selama Tujuh Hari.....	35

**DAFTAR GAMBAR**

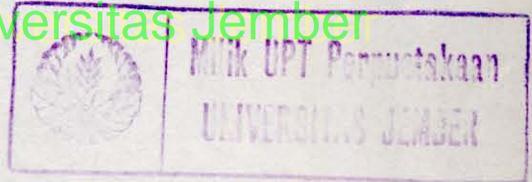
<b>Nomer</b>	<b><u>Teks</u></b>	<b>Halaman</b>
1	Tata Letak Pengujian Antagonisme <i>Pseudomonad fluoresens</i> Terhadap <i>R. solanacearum</i> .....	18
2	Hasil Uji Fluoresen Pada Isolat Bakteri <i>Pseudomonad</i> Fluoresens.....	22
3	Hasil Uji Oksidatif Fermentatif Pada Isolat Bakteri <i>Pseudomonad</i> Fluoresens.....	23
4	Hasil Uji Pembentukan Indol Pada Isolat Bakteri <i>Pseudomonad</i> Fluoresens.....	24
5	Hasil Uji Reaksi Hipersensitif Tembakau.....	25
6	Hasil Uji Hidrolisis Arginin.....	26
7	Hasil Uji YDCA Pada Isolat Bakteri <i>Pseudomonad</i> Fluoresens...	27
8	Hasil Uji Reduksi Nitrat dan Levan Sukrosa Pada isolat Bakteri <i>Pseudomonad</i> Fluoresens.....	28
9	Hasil Uji Pembusukan Kentang Pada Isolat Bakteri <i>Pseudomonad</i> Fluoresens.....	29
10	Hasil Uji Hidrolisis Pati Pada Isolat Bakteri <i>Pseudomonad</i> Fluoresens.....	30
11	Hasil Uji Pertumbuhan Isolat Bakteri <i>Pseudomonad</i> Fluoresens Pada Berbagai Suhu.....	31
12	Hasil Uji Antagonisme <i>P. fluorescens</i> Terhadap <i>R. solanacearum</i> .....	33

**DAFTAR GRAFIK**

<b>Nomer</b>	<b><u>Teks</u></b>	<b>Halaman</b>
1	Grafik Rata-rata Diameter Pertumbuhan Koloni <i>R. solanacearum</i> Selama Tujuh Hari .....	34
2	Grafik Rata-rata Persentase Penghambatan <i>P. fluorescens</i> Terhadap <i>R. solanacearum</i> Selama Tujuh Hari .....	36

DAFTAR LAMPIRAN

Nomer	<u>Lampiran</u>	Halaman
1	Bagan Isolasi Pseudomonad Fluoresens .....	43
2	Anova Diameter Koloni <i>R. solanacearum</i> Hari Ke 1.....	44
3	Anova Diameter Koloni <i>R. solanacearum</i> Hari Ke 2.....	44
4	Anova Diameter Koloni <i>R. solanacearum</i> Hari Ke 3.....	45
5	Anova Diameter Koloni <i>R. solanacearum</i> Hari Ke 4.....	45
6	Anova Diameter Koloni <i>R. solanacearum</i> Hari Ke 5.....	46
7	Anova Diameter Koloni <i>R. solanacearum</i> Hari Ke 6.....	46
8	Anova Diameter Koloni <i>R. solanacearum</i> Hari Ke 7 .....	47
9	Anova Persentase Penghambatan <i>P. fluorescens</i> pada <i>R. solanacearum</i> .....	47
10	Komposisi Bahan Media.....	48



## I. PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Pisang memiliki arti yang sangat penting bagi pemenuhan kebutuhan pangan, peningkatan gizi makanan serta sebagai sumber pendapatan petani (Zulfar dan Hutagalung, 1983) oleh karena itu pisang merupakan salah satu komoditas penting buah-buahan di Indonesia. Menurut Sulyo (1992) pisang menduduki luas areal maupun produksi tertinggi di antara buah-buahan di Indonesia. Permintaan dari luar negeri akan pisang terus meningkat dari tahun ke tahun, sementara permintaan di dalam negeri masih kurang terpenuhi hal ini disebabkan karena masih rendahnya produksi pisang (Martoredjo, 1995 dalam Aeny, 1997). Salah satu faktor yang mempengaruhi rendahnya produksi pisang adalah penyakit layu bakteri.

Penyakit layu bakteri yang disebabkan oleh *Ralstonia solanacearum* merupakan salah satu penyakit penting pada pisang di Indonesia dan beberapa negara lain (Hayward, 1990). Menurut Semangun (1989), penyakit ini pertama kali dilaporkan di Sulawesi Selatan pada tahun 1910. Penyakit ini telah menyebar di beberapa daerah di Indonesia, yang meliputi daerah Jawa Barat, Jawa Tengah dan Sulawesi Selatan. Kerugian hasil akibat penyakit ini sangat besar. Mujim dkk. (1995) melaporkan penurunan hasil produksi pisang akibat bakteri layu ini bisa sampai 95 persen. Sebelum terjadinya serangan, dari setiap hektar kebun (populasi 1000 pohon) dapat dipanen sebanyak 100 tandan per 20 hari, tetapi setelah terjadi serangan produksi yang diperoleh hanya 5 tandan per hektar per 20 hari.

Berbagai cara pengendalian telah dilakukan, tetapi penyakit ini masih menjadi kendala produksi pisang. Penggunaan bakterisida dapat menimbulkan resistensi terhadap patogen dan menyebabkan mikroorganisme berguna yang hidup di dalam tanah menjadi mati disamping itu residunya memberikan ancaman terhadap kualitas lingkungan. Cara pengendalian yang biasa digunakan adalah penggunaan varietas tahan tetapi hasilnya kurang efektif menekan perkembangan patogen. Ketahanan

tanaman seringkali tidak menunjukkan tingkat ketahanan tinggi yang konsisten pada berbagai daerah (Hanson *et al.*, 1998).

Salah satu alternatif pengendalian yang dapat digunakan adalah pengendalian hayati (biologi) dengan menggunakan mikroorganisme antagonis dalam tanah. Menurut Cook dan Baker (1983) usaha pengendalian penyakit tanaman secara biologi terhadap *R. solanacearum* mempunyai peluang yang cukup baik karena mikroorganisme antagonisnya ada di dalam tanah dan aktivitasnya dapat dirangsang dengan modifikasi lingkungan. Hasil penelitian Hsu dkk. (1993) menunjukkan bahwa *Pseudomonas* kelompok fluoresens (*Pseudomonad fluoresens*) dapat mengurangi serangan penyakit layu bakteri pada tomat yang diuji di rumah kaca.

*Pseudomonad fluoresens* merupakan bakteri pengkolonisasi akar dan memiliki kemampuan di dalam mengendalikan beberapa patogen akar. Dilaporkan dengan adanya sifat antagonis yang dimiliki oleh *pseudomonad fluoresens* (Weller, 1988) maka mikroorganisme tersebut potensial untuk dikembangkan sebagai agensia pengendali hayati dalam menekan penyakit layu bakteri pisang.

Berdasarkan hal diatas, karena sampai saat ini belum pernah dilakukan penelitian mengenai potensi antagonisme *pseudomonad fluoresens* pada tanaman pisang di Jember, maka perlu kiranya untuk mengetahui sifat – sifat *pseudomonad fluoresens* isolat dari beberapa daerah di Jember yang diambil dari pertanaman pisang agar untuk selanjutnya dapat digunakan sebagai agensia pengendalian hayati.

## 1.2 Tujuan dan Manfaat Penelitian

Penelitian ini bertujuan : (1) Mengidentifikasi *pseudomonad fluoresens* hasil isolasi dari daerah Jember dan Sukamantri Bogor (2) Mengevaluasi keefektivan *pseudomonad fluoresens* tersebut sebagai agens biokontrol *R. solanacearum* pada pisang secara *in vitro*.

Hasil penelitian ini bermanfaat sebagai bahan informasi mengenai karakteristik dan potensi antagonisme bakteri pseudomonad fluoresens pada pisang di daerah Jember dan Sukamantri sebagai dasar untuk menyusun strategi pengendalian penyakit layu bakteri pisang yang berwawasan lingkungan dan berkelanjutan.





## II. TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Arti Penting Penyakit Layu Bakteri Pada Pisang

Bakteri penyebab penyakit layu bakteri (*Ralstonia solanacearum*) merupakan salah satu bakteri penyebab penyakit pada pisang yang menimbulkan kerugian yang sangat besar. Penyakit ini memiliki daerah penyebaran yang luas yaitu daerah tropis dan subtropis (Persley *et al.*, 1985).

Tahun 1910 di pulau Selayar (Sulawesi Selatan) penyakit layu bakteri pada pisang telah menimbulkan kerugian yang sangat besar. Menurut Gauman, tahun 1915 diketahui bahwa tanaman pisang di Jawa terjangkit penyakit yang serupa tetapi tidak menunjukkan gejala yang tampak dari luar, sedang pada tahun 1923 hasil pengamatan Gauman diketahui bahwa penyakit ini sudah meluas ke hampir seluruh Sulawesi Selatan (Semangun, 1989). Hasil survei yang dilakukan oleh Pusat Karantina Pertanian tahun 1983/1984 dan 1984/1985 menunjukkan selain Sulawesi Selatan ditemukan pula di Minahasa, Maluku Tengah, Jayapura dan Banjar Baru (Kalimantan Selatan) (Nurhadi dkk., 1994).

Di Indonesia penyakit layu bakteri merupakan salah satu penyebab menurunnya produksi pisang. Dilaporkan bahwa pada tahun 1988 sekitar 70-80 persen pisang di Jenepono (Sulawesi) telah terinfeksi penyakit layu bakteri (Roesmiyanto, 1992). Menurut Sumardiyono dkk. (1997) bahwa tanaman pisang yang terserang di kabupaten Batang (Jawa Tengah) mencapai 42-55 persen. Berdasarkan Diperta propinsi Lampung, di propinsi Lampung sejak Januari sampai Juni 1993 seluas 2006 ha dari 72. 677 ha areal tanaman pisang telah terserang bakteri penyebab penyakit layu (Dwiragupti, 1993).

Penyebaran *R. solanacearum* di Jawa rata-rata lebih dari 25 km per tahun dan akan memberikan ancaman serius bagi negara-negara di Asia Tenggara jika tidak ada tindakan karantina yang tepat (Eden-Green, 1994).

## 2.2 Gejala Penyakit Layu Bakteri Pada Pisang

Gejala penyakit layu bakteri yang disebabkan oleh (*R. solanacearum*) dibedakan menjadi gejala luar dan gejala dalam. Gejala luar antara lain berupa layu, klorotik dan nekrotik pada daun, serta penghambatan pertumbuhan sedangkan gejala dalam antara lain berupa perubahan warna pada jaringan pembuluh, tilosis dan degradasi selulose dalam dinding sel (Buddenhagen dan Kelman, 1964).

Gejala pada buah yaitu pada umumnya buah terjadi perubahan warna pada berkas pembuluh menjadi kuning atau coklat, kemudian meluas ke plasenta dan parenkim buah bahkan ke berkas pembuluh kulit buah (Semangun, 1989). Menurut Tjahjono (1988 dalam Sulyo, 1992) bahwa kulit buah sering tampak normal, kadang-kadang ada yang tampak kuning terlalu awal, dan apabila buah dipotong bagian dalam buah terlihat berwarna coklat kemerah-merahan. Gejala pada batang yaitu apabila batang dibelah terjadi perubahan warna pada berkas pembuluh batang yang berwarna kecoklat-coklatan dan mengeluarkan eksudat putih susu dari permukaannya (Lelliot dan Stead, 1987). Gejala serangan yang sama akan terjadi pada anakan pisang yang akhirnya akan menyebabkan anakan pisang mati (Dwiragupti, 1993).

Gejala penyakit layu bakteri mempunyai banyak persamaan gejala luar dengan penyakit layu yang disebabkan Fusarium. Pada layu bakteri terdapat eksudat bakteri, pembusukan pada buah dan perubahan warna pada batang asli menjadi merah kecoklat-coklatan. Pada layu Fusarium, batang yang dipotong tidak mengeluarkan lendir kemerahan, tidak terjadi perubahan warna di bagian dalam buah serta perubahan warna merah kecoklat-coklatan berpusat pada batang semu (Semangun, 1989; Sulyo, 1992).

## 2.3 Penyebab Penyakit Layu Bakteri Pada Pisang

Penyebab layu bakteri pada pisang semula dikenal sebagai bakteri *Pseudomonas* telah diidentifikasi sebagai *Ralstonia solanacearum* Yabuuchi *et al.* (sinonim *Pseudomonas solanacearum* E.F. Smith) (Twaithes *et al.*, 1999). Bakteri

tersebut dilaporkan mempunyai sinonim *Pseudomonas celebensis* Gaum, *Xanthomonas celebense* (Gaum.) Elliot, *Phytomonas celebensis* (Gaum.) Mangrou, *Bacterium musae* (Gaum.) Elliot (Semangun, 1989).

Ciri umum bakteri yaitu selnya bersifat gram negatif, tidak membentuk spora berkapsul (Semangun, 1989), berbentuk batang pendek berukuran  $0,5 - 1,0 \times 1,5 - 4,0 \mu\text{m}$ , mempunyai satu atau lebih flagela dan tidak menghasilkan pigmen fluoresen. Bakteri bersifat katalase, oksidasi dan aerob, mengakumulasi polyhidraksi butirat (PHB), tidak dapat menghidrolisa arginin (Sands *et al.* dalam Supriadi, 1995). Menurut Hayward (1991 dalam Munardini, 1995) bahwa *R. solanacearum* mempunyai enzim nitrase, tidak dapat tumbuh pada media nutrisi cair yang mengandung dua persen natrium klorida. Suhu optimum untuk pertumbuhannya yaitu  $27-37^{\circ}\text{C}$  tergantung strainnya. Suhu maksimum kurang lebih  $39^{\circ}\text{C}$ , suhu minimum  $10-15^{\circ}\text{C}$  (Hayward, 1976).

#### 2.4 Epidemiologi

Penularan penyakit ini dapat terjadi lewat bibit yang sakit, serangga yang mengunjungi bunga (*Trigona* spp, *Polibia* spp, dan *Drosophilla* spp) alat pemangkas seperti parang yang dipakai untuk menebang, membersihkan batang, memotong bunga jantan, atau memotong anakan pisang sakit. Bakteri ini juga dapat menular melalui kontak akar, sisa tanaman sakit (Sulyo, 1992). Bakteri juga dapat menyebar dari bibit (rumpun) yang sakit melalui udara dan menginfeksi buah yang dilakukan serangga saat pembuahan. Penyebaran dapat juga terjadi melalui pemakaian tunas yang sakit sebagai bibit (Semangun, 1989).

Waktu inkubasi bakteri penyebab penyakit layu pada pisang berkisar 10-17 hari setelah inokulasi, tetapi menurut Wardlaw (1972 dalam Aeny, 1997) waktu inkubasi adalah dua minggu setelah inokulasi meskipun ada dua gejala yang baru muncul setelah satu bulan. Menurut Kelman (1953 dalam Aeny, 1997) bahwa adanya

perbedaan waktu inkubasi dapat disebabkan oleh umur dan spesies tanaman inang dan patogen.

Menurut Podkina *et al.* (1980 dalam Buddenhagen, 1985) *R. solanacearum* menyerang bermacam-macam polong-polongan. Di Indonesia bakteri *R. solanacearum* menyerang kacang-kacangan, jahe, pisang, tembakau, kentang, ubi jalar (Mahmud, 1985). Di India bakteri ini menyerang kentang, tomat, terung, kacang tanah, seledri, kapas, jahe, jute (Sinha, 1985). Bakteri ini juga menyerang gulma seperti *Ageratum conyzoides*, *Portulaca volarasia*, *Eupatorium odoratum*, *Solanum ningrum*, *Ipomoea* sp, *Tagetes* sp namun tidak menunjukkan gejala (Ramesh dan Bandyopadhyay, 1992).

Bakteri penyebab layu ini dapat bertahan di dalam tanah minimal satu tahun. Bakteri dapat terbawa oleh tanah yang dihanyutkan air. Dari dalam tanah bakteri menginfeksi akar-akar dan batang melalui luka (Dwiragupti, 1993). Menurut Semangun (1989), diperkirakan bakteri dapat bertahan lebih lama dalam akar-akar yang busuk. Infeksi bakteri melalui luka-luka pada bonggol, akar-akar, dan batangnya dapat terjadi saat bercocok tanam, melalui celah karena pertumbuhan akar sekunder dan tusukan nematoda. Luka tusukan yang disebabkan oleh nematoda *Meloidogyne* spp dapat membantu penetrasi bakteri sehingga jaringan tanaman cocok untuk kolonisasi bakteri (Hayward, 1983). Menurut Dinesen *et al.*, (1990) bakteri fitopatogen yang bertahan dalam tanah dengan mengkolonisasi jaringan tanaman tidak dapat bersaing dengan bakteri saprofit bila jaringan sudah sangat rusak, kecuali *R. solanacearum*.

Pada umumnya penyakit berkembang paling cepat pada tanaman yang masih muda dan dibantu suhu yang tinggi. Menurut hasil penelitian yang dilaporkan Kelman (1953) perkembangan bakteri layu minimum pada suhu 8-10<sup>0</sup>C dan optimum 27-37<sup>0</sup>C. Bakteri layu masih mampu bertahan sampai suhu 41<sup>0</sup>C. Pada suhu diatas 47<sup>0</sup>C bakteri akan mati. Kelembaban tanah yang tinggi berpengaruh terhadap meningkatnya infeksi, dan kelebihan air akan membantu penyebaran bakteri bersama-

sama dengan tanah yang hanyut (Buddenhagen dan Kelman, 1964 *dalam* Munardini, 1995). Bakteri ini dapat hidup dan berpotensi aktif dalam tanah kurang lebih dua tahun, bahkan apabila masih ada tanaman inangnya dapat hidup lebih lama pada lapisan tanah 55-65 cm dibandingkan dengan lapisan permukaan 10-15 cm (Asman, dkk., 1995)

## 2.5 Pengendalian Penyakit Layu Bakteri Pada Pisang

Terdapat beberapa cara pengendalian terhadap penyakit pisang. Pertama, tindakan karantina. Kedua, pergiliran tanaman pisang dengan tanaman lain atau gulma yang bukan merupakan tumbuhan inang patogen. Ketiga, usaha sanitasi yaitu pengurangan inokulum di sekitar pertanaman pisang dan penggunaan zat kimia desinfektan untuk membersihkan alat-alat yang digunakan untuk perawatan tanaman. Keempat, membuang bunga jantan yang dapat berfungsi sebagai sumber inokulum yang disebarkan oleh serangga (Thurston, 1984 *dalam* Aeny, 1997). Penggunaan varietas yang tahan terhadap penyakit layu bakteri pisang diduga juga dapat diandalkan. Hanya saja, belum banyak dilaporkan mengenai jenis-jenis pisang yang bersifat tahan terhadap penyakit layu bakteri. Salah satu penelitian yang dilakukan oleh Hartati, Supriadi, dan Eden-Green tahun 1989 di Jawa Barat mendapatkan bahwa empat varietas pisang yang diuji bersifat peka terhadap penyakit layu, dengan urutan paling peka adalah pisang Siem, Ambon, Nangka dan Lampung (Aeny, 1997). Dari hasil penelitian Mujim dkk., (1995) diketahui bahwa hampir semua jenis pisang yang diuji menunjukkan reaksi rentan terhadap penyakit layu bakteri. Hanya Janten dan Muli yang agak tahan.

Cara lain untuk mengendalikan penyakit layu pada pisang adalah dengan penggunaan bahan kimia. Akan tetapi, dilaporkan bahwa pengendalian penyakit ini dengan menggunakan bahan kimia belum ada yang ekonomis (Montcel, 1986 *dalam* Aeny, 1997). Dari beberapa bahan kimia yang telah dicoba untuk diaplikasikan dengan cara tebar di lubang tanam maupun melalui fumigasi tanah, tidak satupun

bahan kimia yang dapat mencegah infeksi apabila daerah yang telah terinfeksi bakteri tersebut ditanami pisang kembali.

Pengendalian secara biologi dengan bakteri antagonis dapat dilakukan, namun sampai saat ini bakteri antagonis belum tersedia di Indonesia (Yulia dan Suganda, 1999).

## 2.6 Bakteri *Pseudomonad* Floresens Sebagai Agen Antagonis

*Pseudomonad* floresens merupakan anggota kelompok *Pseudomonas* yang terdiri atas *Pseudomonas aeruginosa*, *P. fluorescens*, *P. putida*, *P. chlororaphis*, *P. aureofaciens* dan dua spesies patogen tanaman *P. cichorii* dan *P. syringae* (Oedjijono, 1993).

Menurut Palleroni (1984 dalam Widiyastuti dan Arwiyanto, 2001), genus *Pseudomonas* mempunyai ciri-ciri gram negatif, bentuk batang, sel berukuran: lebar 0,5-1,0  $\mu\text{m}$  dan panjang 1,5-4  $\mu\text{m}$ , bergerak dengan flagella polar, obligat aerob, katalase positif dan tidak pernah fermentatif. Kelompok *pseudomonas* "floresens" mempunyai ciri-ciri kebanyakan strain menghasilkan pigmen floresen, arginin hidrolisis positif sedangkan yang arginin hidrolisisnya negatif adalah *P. syringae* dan *P. cichorii* dan kelompok ini biasanya bersifat patogen. Spesies-spesies *pseudomonad* floresens ditandai oleh kemampuannya dalam mengeksresi pigmen-pigmen hijau-kuning yang larut dan floresens di bawah sinar UV. Pigmen-pigmen ini terutama dihasilkan dalam media yang defisien dalam besi atau media khusus (King's B). Beberapa spesies *pseudomonad* floresens juga menghasilkan pigmen-pigmen phenazine biru, hijau atau orange yang khas (terutama dalam media King's A) (Oedjijono, 1993).

*Pseudomonad* floresens merupakan bakteri pengkolonisasi akar dan memiliki kemampuan di dalam mengendalikan beberapa patogen akar. Sebagian strain dikenal mampu menekan pertumbuhan atau membunuh patogen cendawan maupun bakteri, diantaranya *P. aeruginosa*, *P. putida* dan *P. fluorescens*. Penekanan

patogen oleh antagonis dari genus *Pseudomonas* adalah dapat melalui produksi antibiotik, siderophore dan substansi-substansi volatil, dan yang paling umum adalah dengan cara menghasilkan antibiotik dan siderophore. Antibiotik adalah substansi kimia sebagai produk metabolisme sekunder mikroorganisme yang dapat membunuh atau menghambat pertumbuhan mikroorganisme lain. Pada dasarnya bakteri pseudomonad fluoresens merupakan kelompok terbesar penghasil antibiotik (Schroth dan Hancock, 1982 dalam Djatnika, 1998). Banyak senyawa yang dihasilkannya dapat menghambat aktivitas patogen tanaman, dan beberapa diantaranya efektif mengendalikan patogen (Coyle dan Mount, 1984 dalam Djatnika, 1998).

*P. fluorescens* diketahui dapat menghasilkan antibiotik seperti phenazine, pyrrolnitrin, dan asam pseudomonik, dilaporkan telah terbukti efektif mengendalikan mikrobia yang bersifat patogen baik yang menyerang manusia maupun tanaman (Oedjijono, 1993). *P. fluorescens* strain 3551 yang diisolasi dari rizosfer tanaman kapas mampu melindungi tanaman tersebut dari serangan *Phytophthora ultimum* dan meningkatkan daya kecambah biji kapas yang disemai pada tanah yang mengandung patogen (Park *et al.*, 1988 dalam Djatnika, 1998). Selain antibiotik, *P. fluorescens* menghasilkan siderophore yaitu pseudobactin. Senyawa ini mengkelat Fe menjadi bentuk senyawa kompleks sehingga mikroba rizosfer tidak dapat memanfaatkan Fe untuk perkembangannya terutama dalam lingkungan dengan Fe terbatas (Cook, 1991 dalam Djatnika, 1998). Menurut Loper (1988 dalam Mulya, 1997) *P. fluorescens* menghasilkan pyoverdin yaitu sejenis siderophore, pyoverdin ini terbukti merupakan faktor utama yang menentukan *P. fluorescens* strain 3551 aktif menekan pertumbuhan *Pythium* spp dan perkembangan penyakit damping-off pada kapas. Mulya (1997) melaporkan bahwa beberapa strain *P. fluorescens* yang diisolasi dari berbagai rizosfer tanaman terung-terungan bersifat antagonis terhadap berbagai strain *P. solanacearum*. Kedua jenis senyawa aktif diatas yaitu antibiotik dan siderophore diduga diproduksi oleh *P. fluorescens* PfG32 dan berperan dalam menekan pertumbuhan *P. solanacearum* Ps27. Dengan adanya sifat antagonisme tersebut



### III. BAHAN DAN METODE

#### 3.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan di laboratorium Ilmu Penyakit Tumbuhan Program Studi Ilmu Hama dan Penyakit Tumbuhan Fakultas Pertanian, Universitas Jember pada bulan Maret sampai Juni 2001.

#### 3.2 Bahan dan Alat

Bahan yang digunakan untuk penelitian ini adalah isolat murni *R. solanacearum* berasal dari daerah Jember koleksi laboratorium Ilmu Penyakit Tumbuhan Fakultas Pertanian UNEJ, isolat Jelbuk (kode isolat J-11), kapas, alkohol 70 %, media CPG (Casamino Acid Pepto Glucose), media NB (Nutrient Broth), media TZC (Tetrazolium Chloride), media indol, media nitrat, media pati, media levan sukrosa, media King's B, media oksidatif fermentatif, media YDCA (Yeast Dekstrosa Kalsium Agar), media pencairan gelatin, air steril, reagen kovac, larutan iodium, reagen iodium pati, KOH 3 %, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3 %.

Peralatan yang digunakan antara lain cawan petri, pipet ukur, pipet tetes, jarum ose, tabung reaksi, lampu bunsen, gelas ukur, gelas benda, erlenmeyer, autoklaf, laminar air flow, dan peralatan tulis.

#### 3.3 Metode Penelitian

##### 3.3.1 Pengambilan Sampel Tanah yang Mengandung *Pseudomonad fluoresens*

Sampel tanah diperoleh dari daerah pertanaman pisang di daerah Jember antara lain di Jelbuk, Rembangan, Rambipuji dan Ambulu dengan metode survey. Tanah diambil di daerah sekitar perakaran tanaman pisang yang sehat kemudian dimasukkan ke dalam kantong plastik dan dibawa ke laboratorium.

### 3.3.2 Isolasi dan Identifikasi Mikroorganisme Antagonis (*Pseudomonad fluoresens*)

#### I. Isolasi Mikroorganisme Antagonis *Pseudomonad fluoresens*

Isolasi bakteri dilakukan dengan cara melarutkan satu gram sampel tanah dalam 10 ml air steril kemudian dibuat seri pengenceran sampai  $10^{-6}$ . Dari seri pengenceran  $10^{-6}$  diambil 0,1 ml dan diinokulasi sebar pada cawan petri yang berisi medium King's B, diinkubasi pada suhu kamar. Setelah diinkubasi selama tiga hari, koloni-koloni bakteri yang tumbuh pada setiap cawan petri diamati di bawah lampu ultraviolet dengan panjang gelombang 366 nm. Koloni bakteri yang menghasilkan pigmen fluorescens dimurnikan dalam medium King's B (Oedjijono, 1993).

#### II. Identifikasi *Pseudomonad fluoresens*

Identifikasi dilakukan dengan menerapkan serangkaian pengujian secara fisiologi yang mengacu pada metode yang dideskripsikan oleh Fahy dan Hayward (1983) dan Stolp dan Gadkari (1981) Pengujian ini meliputi uji gram, uji fluoresen, uji oksidatif fermentatif, uji pencairan gelatin, uji YDCA, uji katalase, uji hidrolisis pati, uji reduksi nitrat, uji pembentukan indol, uji pembentukan levan sukrosa, uji pembusukan kentang, uji hidrolisis arginin, uji pertumbuhan pada suhu  $4^{\circ}\text{C}$ ,  $11^{\circ}\text{C}$ ,  $25^{\circ}\text{C}$ ,  $30^{\circ}\text{C}$ ,  $37^{\circ}\text{C}$ ,  $41^{\circ}\text{C}$ , Uji hipersensitif tembakau.

**Uji Gram.** Pada pengujian ini digunakan biakan bakteri yang berumur 24 jam. Gelas obyek dibersihkan dengan 70 % alkohol untuk menghilangkan kotoran yang ada, kemudian dikeringkan dengan cara dipanaskan diatas api bunsen. Pada gelas obyek tersebut diteteskan satu tetes 3 % KOH. Satu ose isolat bakteri yang akan diuji diletakkan pada gelas obyek tersebut, dicampur dan diaduk sampai merata selama 5 – 10 detik. Bila larutan KOH telah tercampur rata selanjutnya diangkat perlahan-lahan menggunakan jarum ose. Jika campuran bersifat lengket setelah diangkat sekitar 0,5 – 2 cm berarti bakteri bereaksi positif dan mempunyai sifat gram

negatif. Reaksi negatif terjadi bila tidak terbentuk lendir yang ikut terangkat dan disebut sebagai bakteri gram positif (Fahy dan Hayward, 1983).

**Uji Fluoresen.** Isolat bakteri berumur 24 jam ditumbuhkan pada media King's B (Komposisi media tertera di Lampiran 10 H) dan diinkubasi selama 3 hari pada suhu kamar. Uji positif ditunjukkan apabila bakteri mengeluarkan warna biru atau hijau yang berpendar di bawah sinar ultraviolet (Lelliot dan Stead, 1987).

**Uji Oksidatif-Fermentatif.** Uji ini dilakukan dengan menusukkan isolat bakteri yang berumur 24 jam pada kedua jenis media oksidatif-fermentatif (Komposisi media tertera di Lampiran 10 D) yaitu media yang ditutup dengan parafin cair dan yang tidak ditutup dengan parafin cair. Diinkubasi pada suhu kamar selama 14 hari untuk mengetahui perubahan warna biru menjadi kuning pada medianya.

**Uji Katalase.** Pada pengujian ini digunakan biakan bakteri yang berumur 24 jam. Gelas obyek obyek dibersihkan dengan 70 % alkohol kemudian dikeringkan dengan cara dipanaskan diatas api bunsen. Pada gelas obyek tersebut diteteskan satu tetes  $H_2O_2$  3 %, kemudian diletakkan satu ose bakteri yang akan diuji, dicampur dan diaduk sampai merata. Reaksi positif ditandai dengan terdapatnya gelembung-gelembung udara, sedangkan reaksi negatif ditandai dengan tidak terbentuknya gelembung-gelembung udara (Hadioetomo, 1993).

**Uji Pembentukan Indol.** Isolat bakteri yang berumur 24 jam ditumbuhkan pada media indol (Komposisi media tertera di lampiran 10 F) di dalam tabung reaksi dan diinkubasikan selama 2 –5 hari pada suhu ruang. Setelah diinkubasi, biakan bakteri yang tumbuh ditetesi dengan reagen kovac sebanyak 10 –12 tetes. Reaksi positif ditandai dengan terbentuknya warna merah pada media setelah ditetesi reagen (Lay, 1994).

**Uji Reaksi Hipersensitif Pada Tembakau.** Suspensi bakteri yang berumur 24 jam diinjeksikan ke dalam ruang antar sel pada daun tembakau menggunakan jarum suntik dengan volume 1 ml sampai membasahi ruang interseluler dari mesofil daun yang terlihat dari jaringan yang kebasah-basahan. Sebagai kontrol diinjeksikan

air steril pada daun tembakau dan diinkubasikan pada suhu kurang dari 30°C selama tujuh hari. Reaksi positif ditunjukkan dengan mucuknya gejala nekrosis pada tanaman selama tujuh hari pengamatan (Klement *et al.*, 1990).

**Uji Pencairan Gelatin.** Isolat bakteri yang berumur 24 jam ditumbuhkan ke dalam tabung reaksi berisi media nutrient ditambah 10 ml 12 % gelatin yang telah disterilkan pada suhu 121°C selama 15 menit (Komposisi media tertera di Lampiran 10 G). Selanjutnya diinkubasi pada suhu kamar selama 14 hari. Untuk mengetahui reaksinya, tabung yang telah diinkubasi disimpan terlebih dahulu ke dalam lemari es suhu 5°C selama 2 jam. Reaksi positif ditandai dengan cairnya gelatin pada tabung yang diinokulasi (Lelliot dan Stead, 1987).

**Uji Hidrolisis Arginin.** Satu ose bakteri yang berumur 24 jam diinokulasikan dengan cara ditusukkan ke dalam tabung reaksi berisi media yang mengandung arginin (Komposisi media tertera di Lampiran 10 G) kemudian medium ditutup dengan parafin cair. Diinkubasikan selama tujuh hari pada suhu ruangan. Hasil positif ditunjukkan oleh perubahan warna medium dari merah tua menjadi merah muda atau orange (Oedjijono, 1993).

**Uji YDCA.** Satu ose isolat bakteri yang berumur 24 jam diinokulasikan secara goresan (streak cross) ke dalam cawan petri yang mengandung media YDCA (Komposisi media tertera di Lampiran 10 G). Diinkubasikan pada suhu ruang selama tujuh hari. Mengamati warna koloni bakteri yang tumbuh pada media YDCA.

**Uji Reduksi Nitrat.** Isolat bakteri yang berumur 24 jam diinokulasikan ke dalam tabung reaksi yang berisi media nitrat (Komposisi media tertera di Lampiran 10 E) kemudian diinkubasi selama 3-7 hari pada suhu ruang. Setelah diinkubasi diberi reagen iodin pati (larutan A+ larutan B) sebanyak 5-10 tetes. Reaksi positif ditandai dengan terjadinya warna biru pada media setelah ditetesi dengan reagen (Fahy dan Hayward, 1983).

**Uji Pembentukan Levan Sukrosa.** Isolat bakteri yang berumur 24 jam ditumbuhkan pada cawan petri yang berisi 5 – 10 ml NA yang telah ditambahkan 5 %

sukrosa (Komposisi media tertera di Lampiran 10 K). Diinkubasi pada suhu kamar selama dua hari. Reaksi yang positif ditandai dengan tumbuhnya koloni yang transparan sampai buram, bercahaya, berlendir (mucoid) dengan bentuk cembung sedangkan reaksi yang negatif ditandai dengan tumbuhnya koloni berbentuk cekung dan tidak berlendir (Fahy dan Hayward, 1983).

**Uji Pembusukan Kentang.** Umbi kentang yang sehat dibersihkan dari tanah dengan air dan sabun. Skapel dibersihkan dengan larutan 70 % alkohol kemudian dipanaskan. Umbi kentang dikupas lalu dipotong menjadi irisan – irisan setebal 7-8 mm. Selanjutnya irisan tersebut diletakkan di atas kertas saring yang ditetesi air steril pada cawan petri. Satu ose bakteri diinokulasikan dengan cara menggoreskannya di bagian tengah permukaan irisan kentang untuk tiap isolat. Untuk kontrol goreskan air steril pada permukaan tersebut dan diinkubasikan selama 24-48 jam. Terjadinya warna coklat dan busuk kehitaman menandakan terjadinya reaksi positif (Sand, 1990).

**Uji Hidrolisis Pati.** Isolat bakteri yang berumur 24 jam diinokulasikan pada cawan petri yang berisi media pati (Komposisi media tertera di 10 C). Diinkubasi selama 3-5 hari pada suhu kamar. Setelah diinkubasi, biakan bakteri yang tumbuh ditambah dengan larutan iodium sebanyak 2-3 tetes. Reaksi positif ditandai dengan warna kontras di koloni, sedangkan reaksi negatif ditandai dengan tidak terbentuknya bagian berwarna kontras di sekitar koloni dan seluruh media berwarna hitam (Lay, 1994).

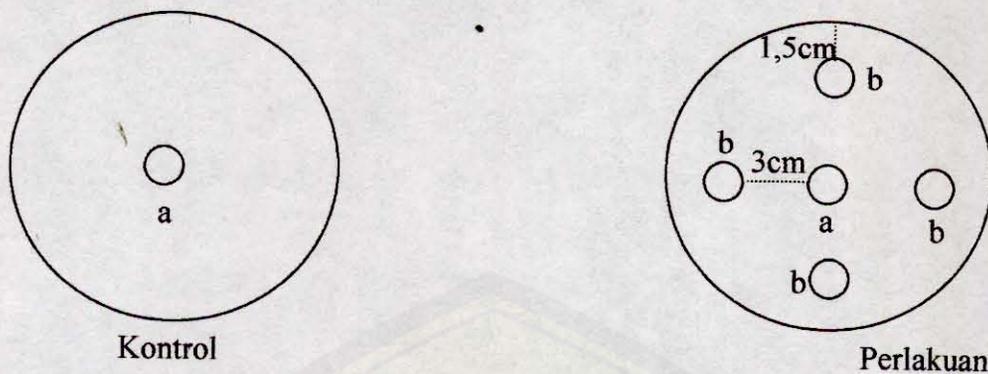
**Uji Pertumbuhan Pada Berbagai Suhu.** Satu ose isolat bakteri yang berumur 24 jam diinokulasikan ke dalam tabung reaksi yang berisi media nutrient broth (Komposisi media tertera di Lampiran 10 M) kemudian meletakkan medium untuk suhu 4<sup>o</sup>C ke dalam lemari es, 11<sup>o</sup>C, 25<sup>o</sup>C, 30<sup>o</sup>C, 37<sup>o</sup>C dan 41<sup>o</sup>C di dalam inkubator. Setelah ditumbuhkan selama 48 jam, tabung dikocok dan diamati tingkat kekeruhannya (Lay, 1994).

### 3.3.3 Perbanyak Isolat *Ralstonia solanacearum*

. Isolat murni *R. solanacearum* ditumbuhkan pada medium CPG (Komposisi media tertera di Lampiran 10 A), kemudian ditumbuhkan pada medium TZC (Komposisi media tertera di Lampiran 10 B) untuk mengetahui virulensinya. Apabila diperoleh koloni bakteri yang tidak beraturan, berwarna putih dan di bagian tengahnya berwarna merah muda maka bakteri tersebut bersifat virulen sebaliknya apabila di bagian tengah koloni berwarna merah tua maka bakteri tersebut bersifat avirulen. Bakteri yang bersifat virulen disimpan di dalam air steril dan akan digunakan untuk uji antagonisme dengan bakteri pseudomonad fluoresens secara *in vitro*.

### 3.3.4 Uji Antagonisme Pseudomonad fluoresens Terhadap *R. solanacearum* Secara *In vitro*.

Uji antagonisme yang dilakukan mengacu pada metode yang dideskripsikan oleh Dhingra (1985). Medium King's B dituangkan ke dalam cawan petri. Kertas filter steril berukuran 0,5 cm yang mengandung *R. solanacearum* diletakkan di bagian tengah pada medium King's B yang telah memadat kemudian kertas filter steril dengan ukuran yang sama yang mengandung bakteri pseudomonad fluoresens diletakkan di empat titik dengan jarak 1,5 cm dari bagian tepi dan 3 cm dari kertas filter yang mengandung *R. solanacearum*. Untuk setiap cawan petri berisi empat kertas filter yang mengandung isolat pseudomonad fluoresens dari satu lokasi yang sama dan satu kertas filter yang mengandung *R. solanacearum*. (Gambar 1).



Gambar 1. Tata Letak Pengujian Antagonisme *Pseudomonad fluorescens* Terhadap *R. solanacearum*.

a = *Ralstonia solanacearum*

b = *Pseudomonad fluorescens*

Pengamatan ada tidaknya penghambatan pertumbuhan bakteri patogen oleh *pseudomonad fluorescens* dilakukan setiap hari selama tujuh hari dilakukan dengan cara mengukur diameter pertumbuhan koloni bakteri patogen. Persentase penghambatan *pseudomonad fluorescens* dihitung dengan menggunakan rumus :

$$I = \frac{r1 - r2}{r1} \times 100 \%$$

Keterangan : I = persentase penghambatan

r1 = jari-jari koloni (a) yang berseberangan dengan koloni (b)

r2 = jari-jari koloni (a) yang berhadapan dengan koloni (b)

(Fokhema dalam Abadi, 1987)

Nilai jari-jari koloni (a) yang berseberangan dengan koloni (b) adalah nilai kontrol sedangkan nilai jari-jari koloni (a) yang berhadapan dengan koloni (b) adalah nilai pada perlakuan. Nilai jari-jari koloni terlalu kecil sehingga diganti dengan diameter koloni. Rancangan percobaan yang dipergunakan adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan lima perlakuan yaitu isolat Jelbuk (PfJb), Rembangan (PfRe), Rambipuji (PfRa), Ambulu (PfAm) dan Sukamantri (PfSk).



## V. KESIMPULAN DAN SARAN

### 5.1 Kesimpulan

Dari uraian di atas dapat disimpulkan bahwa bakteri isolat PfJb1, PfRe3, PfRa3, PfAm2 dan PfSk1 adalah bakteri *Pseudomonas fluorescens*. Kelima isolat *Pseudomonas fluorescens* tersebut efektif untuk menghambat perkembangan koloni *Ralstonia solanacearum* secara *in vitro*, dan tingkat persentase penghambatan *Pseudomonas fluorescens* tertinggi yaitu isolat PfRa3 rata-rata sebesar 56,13 %.

### 5.2 Saran

Untuk mengetahui efektivitas *Pseudomonas fluorescens* isolat PfJb1, PfRe3, PfRa3, PfAm2 dan PfSk1 terhadap *R. solanacearum* pada pisang di lapang, perlu dilakukan penelitian lanjutan.

**DAFTAR PUSTAKA**

- Abadi, A.L. 1987. Biologi ganoderma bininense pat. pada kelapa sawit (*Elais guinensis* jacq) dan pengaruh beberapa mikroba tanah antagonistik terhadap pertumbuhannya. **Desertasi Fakultas Pasca Sarjana**. Institut Pertanian Bogor.
- Aeny, T.N. 1997. Pengendalian penyakit layu bakteri (*Pseudomonas solanacearum*) pada pisang dengan bakterisida. **Pros. Kongr. Nas. XIV dan Seminar Ilmiah PFI**. Palembang 25-29 Oktober : 463-466
- Alcano, I.E. 1983. **Laboratory Fundamentals of Microbiology**. Addison – Wesley Publising Company, New-York.
- Asman, S., D. Sitepu dan S.B. Nazarudin. 1995. Strategi penanggulangan penyakit (*Pseudomonas solanacearum*) pada tanaman jahe. **Pros. Kongres Nasional XIII dan Seminar Ilmiah PFI, Mataram 27-29 September 1995**. Mataram
- Buchanan, R.E and Gibbons, N.E. 1974. **Bergey's Manual Determinative Bacteriology**. 8<sup>th</sup> Edition. The Williams and Wilkins Company. Baltimore
- Buddenhagen, I.W. And A. Kelman. 1964. Biological aspects of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. **Ann.Rev.Phytopath.** 2:203-230
- Buddenhagen, I.W. 1985. Bacterial wilt revisited. *in* Persley, G.J. (Eds). Bacterial wilt disease in asia and the south pacific. **ACIAR Proc.** Canberra (13): 126-139.
- Cook, R.J and K. Baker. 1983. **The Nature and Practice of Biological Control of Plant Pathogens**. American Phytopathol. Soc. St.Paul. Minnoseta.
- Dhingra, O.K. 1985. **Basic Plant Pathology Methods**. CRC Press, Inc Boca Raton. Florida. 246 p.
- Dinesen, I.G., V. Zeller, S.S. Hirano, C.D. Upper, J. Caristi and D.C. Sands. 1990. Epidemiology. *in*. Klement, Z., K. Rudolph and D.C Sands (eds). **Methods in Phytobacteriology**: 281-268. Akademiai Kiado. Budapest
- Djatnika. I. 1998. Pengaruh *Pseudomonas fluorescens* migula terhadap patogenisitas *Fusarium oxysporum* schlecht pada tanaman krisan. **J. Hort.** 8(1): 1014-1020
- Dwidjoseputro, D. 1990. **Dasar – Dasar Mikrobiologi**. Djambatan. Jakarta.

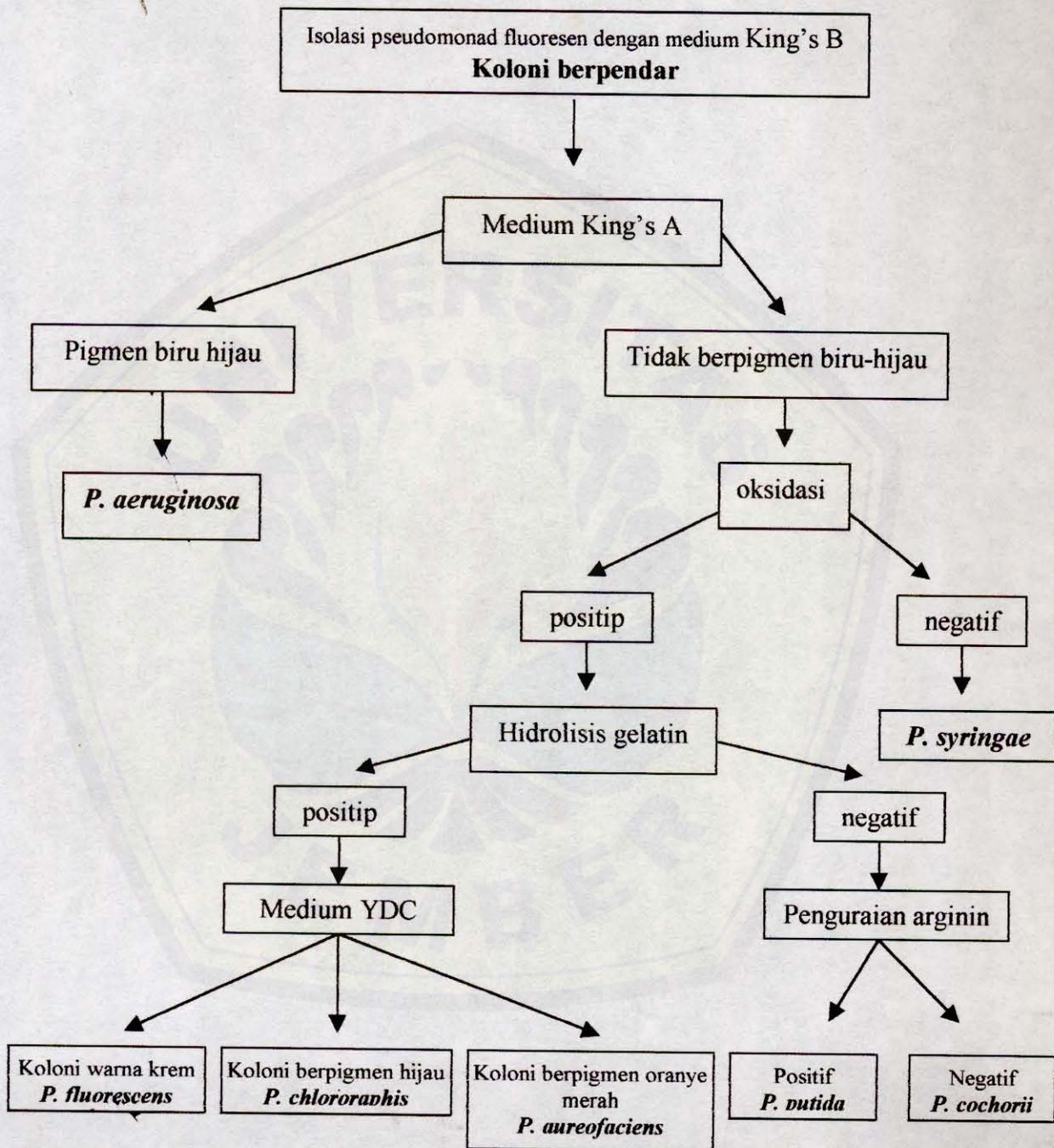
- Dwiragupti, M. 1993. Wabah penyakit menyerang pisang di lampung. **Trubus (April: XXIV)**. No. 286: 16-17
- Eden-Green, S.J. 1994. Diversity of *Pseudomonas solanacearum* in south east asia: new direction for moko disease in Hayward, A.C. dan G. J. Hartman (eds). bacterial wilt; the disease and its causative agent, *Pseudomonas solanacearum*: 25-29. **CAB. Internasional**. Australia
- Fahy, P.C and A.C. Hayward. 1983. Media and methods for isolation diagnostic test: pp 337-378 in (P.C. Fahy and G. J. Persley, eds). **Plant Bacterial Diseases : A Diagnostic Guide**. Academic Press. Sidney.
- Hadioetomo, R.S. 1993. **Mikrobiologi Dasar dalam Praktek Teknik dan Prosedur Dasar Laboratorium**. Gramedia. Jakarta.
- Hanson, P.M., O. Licardo, Hanudin, J.F. Wang and J.T. Chen. 1998. Diallel analysis of bacterial wilt resistance in tomato derived from different sources. **Plant Disease 82**: 74-78.
- Hayward, A.C., 1976. Sysmatics and relationship of *Pseudomonas solanacearum*: 6-21 in L. Sequere and Kelman. **Proc. I<sup>st</sup> International Plann. Conf. Of Bacterial Wilt Caused by Pseudomonas solanacearum "Raleigh"**. North Carolina.
- \_\_\_\_\_. 1983. Pseudomonad: the non fluorescent pseudomonads in P.C. Fahy dan G.J. Persley (eds). **Plant Bacterial Disease : a Diagnostic Guide** : 107-140. Academic Press. Australia.
- \_\_\_\_\_. 1990. Diagnosis, distribution and status of groundnut bacterial wilt in **Proc. ACIAR/ICRISAT Collaborative Research Planning Meeting, Genting Highlands, Malaysia**. Middleton & AC Hayward (eds). Canberra: 12-17.
- Hsu, S.T., C.C. Chen, H.Y. Liu & Tzeng. 1993. Colonization of roots and control of bacterial wilt of tomato by fluorescent pseudomonad. in **Bacterial Wilt, International Conference, Kaohsiung, Taiwan. Oct 1992, ACIAR**. GL Hartman & AC Hayward (eds). Canbera: 305-311.
- Kelman, A. 1953. The bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum* : a literature and bibliography. **Tech.Bul. 99**. North Carolina Agricultural Experiment Station. 194 p.

- Klement, Z., Mavridis, A., Rudolph, K. and Vivader, A. 1990. Inoculation of plant tissues *in* **Methods in Phyto-bacteriology**. Z. Klement, K. Rudolph and D.C. Sands (eds). Akademiai Kiado. Budapest. 101-102
- Lay, B.W. 1994. **Analisis Mikroba di Laboratorium**. Raja Grafindo Persada. Jakarta.
- Lelliot, R.A and D.E. Stead. 1987. **Methods for Diagnosis of Bacterial Diseases on Plants**. 2<sup>nd</sup> Ed. Blackwell Scientific Publication. Oxford.
- Mahmud, M. 1985. Bacterial wilt in indonesia *in* Persley, G. J (eds) Bacterial wilt disease in asia and the south pacific. **ACIAR Proc**. Canberra: 32-34.
- Mujim, S., T.N. Aeny dan Efri. 1995. **Patogenisitas Bakteri Penyebab Penyakit Layu Pisang di Lampung pada Beberapa Kultivar Tanaman Pisang**. Fakultas Pertanian Universitas Lampung. Lampung.
- Mulya, K. 1997. Penekanan perkembangan penyakit layu bakteri tomat oleh *Pseudomonas fluorescens* PfG32. **J. Hort.** 7(2): 685-691.
- Munardini, I.I., 1995. Identifikasi strain bakteri penyakit layu pada pisang dengan bakteriofage. **Tesis**. Fakultas Pertanian Universitas Gadjah Mada. Yogyakarta. 59p. Tidak dipublikasikan.
- Nurhadi, M. Rais dan Harlion. 1994. **Serangan Bakteri dan Cendawan pada Tanaman Pisang di Propinsi Dati I Lampung**. Badan Penelitian dan Pengembangan Hortikultura. Jakarta: 37-40.
- Oedjijono. 1993. **Isolasi dan Deteksi Metabolit Sekunder Pseudomonas fluorescens yang Menghambat Pertumbuhan Mikroba Patogen**. Laporan Hasil Penelitian Fakultas Biologi Universitas Jenderal Sudirman. Purwokerto: 4-10.
- Palleroni, N.J. 1981. Introduction to the family Pseudomonadaceae *in* **The Prokaryotes A Handbook on Habitats, Isolation, and Identification of Bacteria**. Phytopathogenic Bacteria, M.P. Starr (eds), University of California. New York: 655-660.
- \_\_\_\_\_. 1984. **Pseudomonad in Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. N.R. Krieg and J.G. Holt (eds). Vol I. 141-199

- Persley, G.J., P. Batugal., P. Gapasin and P. Vender Zaag., 1985. Summary of discussion and recommendation. **Proc. Of an Int. Work. Held at PCARRD** : 7-13. Los Banos Philipines. 8-10 October 1985.
- Ramesh, C.R and A.K. Bandyopadhyay. 1992. Bacterial wilt of tomato in andaman and nicobar islands *in* Hartman, G. J and A.C Hayward (eds). Bacterial wilt: 316-319. **Proc. of an Int. Conf. Held at Kaohsun 28-31 October 1992**. Taiwan.
- Roesmiyanto. 1992. Penyakit darah pada tanaman pisang. **Trubus (November : XXIII)**. (276):38-39.
- Sands, D.C. 1990. Physiological criteria determinate test *in* Klement, Z., K. Rudolph dan D.C Sands (eds). **Methods in Phytobacteriology**: 133-143. Akademiai Kiado. Budapest.
- Schaad, N.W. 1988. **Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria**. 2<sup>nd</sup> ed. APS Press. St. Paul, Minnesota. 164 p.
- Seeley, H.W and P.J.V. Denmark. 1971. **Selected Exercises from Microbes in Action**. W.H. Freeman and Company. San Francisco and London.
- Semangun, H. 1989. **Penyakit-Penyakit Tanaman Hortikultura di Indonesia**. Gadjah Mada University Press. Yogyakarta.
- Sinha, S.K. 1985. Bacterial wilt in india *in* Persley, G. J. (eds). Bacterial wilt disease in asia and the south pacific. **ACIAR Proc (13)** : 28-29
- Stolp, H and D. Gadkari. 1981. Nonpathogenic members of the genus pseudomonas *in* **The Prokaryotes a Handbook on Habitats, Isolation and Identification of Bacteria: Phytopathogenic Bacteria**. M.P. Starr (eds). University of California New York: 723 – 729
- Sulyo, Y. 1992. Informasi mengenai hasil-hasil penelitian penyakit pisang mutakhir. **Pros. Seminar Sehari Pisang Sebagai Komoditas Andalan Prospek dan Kendalanya 28-31 October 1992**. Segunung : 18-22.
- Sumardiyono, C., S. Subandiyah., S. Sulandari dan T. Martoredjo. 1997. Peningkatan ketahanan terhadap penyakit layu bakteri (*Pseudomonas solanacearum*) pisang dengan radiasi kultur jaringan. **Pros. Kongres. Nas. XIV dan Seminar Ilmiah PFI 27-29 Oktober 1997**. Palembang: 459-461.

- Supriadi. 1995. Karakteristik *Pseudomonas solanacearum*, *P. syringae* dan bakteri penyebab penyakit darah (blood disease bacterium) pada pisang. **Pros. Kong. Nas. XIII dan Seminar Ilmiah PFI 27-29 September 1999**. Mataram : 577-579
- Twaithe, R., J. Mansfield, S., Eden Green and S. Seal. 1999. RAPD and Rep. PCR-based fingerprinting of vaskular bacterial pathogens of *Musa* spp. **Plant Pathol. (48)**: 121-128.
- Widyastuti, D.R dan T. Arwiyanto. 2001. **Pencirian Pseudomonad Fluoresen Agensia Pengendalian Hayati Layu Bakteri**. Seminar Regional V Perhimpunan Fitopatologi Indonesia Komda Jateng dan DIY, 3 Februari 2001, Universitas Wangsa Manggala. Yogyakarta. Tidak dipublikasikan.
- Weller, D.M. 1988. Biological control of soilborne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria. **Annual Review of Phytopathology 26**: 379 – 407.
- Yulia, E dan T. Suganda. 1999. Pengendalian penyakit layu bakteri (*Ralstonia solanacearum*) pada tanaman tomat dengan air rendaman kulit kayu jati, mahoni, pinus dan suren. **Pros. Kong. Nas. XV dan Seminar Ilmiah PFI Purwokerto 16-18 September 1999**. Purwokerto: 300-305
- Zulfiar, I.S dan Hutagalung. 1983. Evaluasi hasil survai penyakit pisang di pulau jawa. **J. Litbang Pertanian II (2)** : 53-57.

Lampiran 1. Bagan Isolasi Pseudomonad Fluoresen (Stolp dan Gadkari, 1981)



Lampiran 2. Anova Diameter Koloni *R. solanacearum* Hari Ke 1 (mm)

SV	SS	df	MS	F Hitung
Perlakuan	258,2667	5	51,6533	12,9673 **
Galat	95,6	24	3,9833	
Total	353,8667	29		

Keterangan: \*\* = sangat berbeda nyata

Lampiran 3. Anova Diameter Koloni *R. solanacearum* Hari Ke 2 (mm)

SV	SS	df	MS	F Hitung
Perlakuan	423,3667	5	84,6733	11,4941 **
Galat	176,8	24	7,367	
Total	600,1667	29		

Keterangan: \*\* = sangat berbeda nyata

Lampiran 4. Anova Diameter Koloni *R. solanacearum* Hari Ke 3 (mm)

SV	SS	df	MS	F Hitung
Perlakuan	673,9	5	134,78	15,3449 **
Galat	210,8	24	8,7833	
Total	884,7	29		

Keterangan: \*\* = sangat berbeda nyata

Lampiran 5. Anova Diameter Koloni *R. solanacearum* Hari Ke 4 (mm)

SV	SS	df	MS	F Hitung
Perlakuan	1140,2667	5	228,0533	20,3317 **
Galat	269,2	24	11,2167	
Total	1409,4667	29		

Keterangan: \*\* = sangat berbeda nyata

Lampiran 6. Anova Diameter Koloni *R. solanacearum* Hari Ke 5 (mm)

SV	SS	df	MS	F Hitung
Perlakuan	1775,0667	5	355,0133	25,4794 **
Galat	334,4	24	13,9333	
Total	2109,4667	29		

Keterangan: \*\* = sangat berbeda nyata

Lampiran 7. Anova Diameter Koloni *R. solanacearum* Hari Ke 6 (mm)

SV	SS	df	MS	F Hitung
Perlakuan	2147,4667	5	429,4933	31,6191 **
Galat	326	24	13,5833	
Total	2473,4667	29		

Keterangan: \*\* = sangat berbeda nyata

Lampiran 8. Anova Diameter Koloni *R. solanacearum* Hari Ke 7 (mm)

SV	SS	df	MS	F Hitung
Perlakuan	2615,7667	5	523,1533	40,3460 **
Galat	311,2	24	12,9667	
Total	2926,9667	29		

Keterangan: \*\* = sangat berbeda nyata

Lampiran 9. Anova Persentase Penghambatan *P. fluorescens* Pada *R. solanacearum* (%)

SV	SS	df	MS	F Hitung
Perlakuan	590,1534	4	147,5383	2,8354 *
Galat	1561,0134	30	52,0338	
Total	2151,1668	34		

Keterangan: \* = berbeda nyata

## Lampiran 10. Tabel Komposisi Bahan Media

A. Komposisi Bahan Media *Casamino Acid Pepto Glucose* (CPG)

No.	Jenis/Bahan	Jumlah
1.	Pepton	10 g
2.	Kasein Hidrolisat	1,0 g
3.	Glukosa	5 g
4.	Bacto Agar	16 g
5.	Aquades	1000 ml

B. Komposisi Bahan Media *Tetrazolium Chloride* (TZC)

No.	Jenis/Bahan	Jumlah
1.	Pepton	10 g
2.	Kasein Hidrolisat	1,0 g
3.	Glukosa	5 g
4.	Bacto Agar	16 g
5.	Aquades	1000 ml
6.	TTC 1 % tiap 200 ml media	

## C. Komposisi Bahan Media Hidrolisis Pati

No.	Jenis/Bahan	Jumlah
1.	Agar	15,0 g
2.	Pati	2,0 g
3.	Pepton	5,0 g
4.	Beef Extract	3,0 g

## D. Komposisi Bahan Media Oksidatif Fermentatif

No.	Jenis/Bahan	Jumlah
1.	Pepton	1,0 g
2.	$\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$	1,0 g
3.	KCl	0,2 g
4.	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,2 g
5.	Bromthymol Blue	0,08 g
6.	Agar	1,0 g

## E. Komposisi Bahan Media Reduksi Nitrat

No.	Jenis/Bahan	Jumlah
1.	$\text{KNO}_3$	1,0 g
2.	Yeast Extract	1,0 g
3.	Pepton	10,0 g
4.	Aquadest	1000 ml

## F. Komposisi Bahan Media Untuk Pengujian Pembentukan Indol

No.	Jenis/Bahan	Jumlah
1.	Trypton	10 g
2.	Aquadest	1000 ml

## G. Komposisi Bahan Media Pencairan Gelatin

No.	Jenis/Bahan	Jumlah
1.	Pepton	5,0 g
2.	Yeast Extract	2,0 g
3.	Agar	120,0 g

## H. Komposisi Bahan Media King's B

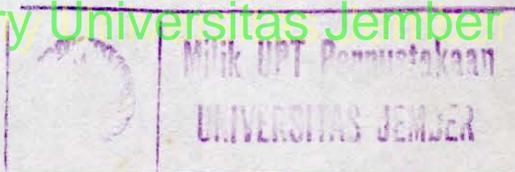
No.	Jenis/Bahan	Jumlah
1.	Protease Pepton (Difco)	20,0 g
2.	$K_2HPO_4$	1,5 g
3.	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	15,0 g
4.	Agar	15,0 g
5.	Gliserol	10,0 g

## I. Komposisi Bahan Media YDCA

No.	Jenis/Bahan	Jumlah
1.	Yeast Extract	10,0 g
2.	Dekstrosa (Glukosa)	20,0 g
3.	Kalsium Karbonat (USP, Light Powder)	30,0 g
4.	Agar	15,0 g

## J. Komposisi Bahan Media Reagen Iodium Pati

No.	Jenis/Bahan	Jumlah
1.	Iodium	10 g
2.	Kalium Iodida	20 g
3.	Aquadest	100 ml

**K. Komposisi Bahan Media Levan Sukrosa**

No.	Jenis/Bahan	Jumlah
1.	Pepton	5,0 g
2.	Beef Extract	3,0 g
3.	Gluokose	2,5 g
4.	Sukrose	5 %
5.	Dextrose Agar	15,0 g
6.	Aquadest	1000 ml

**L. Komposisi Bahan Media Untuk Uji Hidrolisis Arginin**

No.	Jenis/Bahan	Jumlah
1.	Peptone	1,0 g
2.	NaCl	5,0 g
3.	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,3 g
4.	Phenol Red	0,01 g
5.	L-Arginin. HCl	10,0 g
6.	Agar	30,0 g
7.	Aquadest	1000 ml

**M. Komposisi Bahan Media Untuk Nutrien Broth**

No.	Jenis/Bahan	Jumlah
1.	Nutriient Broth	
2.	Aquadesh	1000 ml