

III. BAHAN DAN METODE

3.1. Tempat dan Waktu

Penelitian ini telah dilaksanakan di Laboratorium Penyakit Tumbuhan Fakultas Pertanian Universitas Riau, Pekanbaru yang berlangsung selama 4 bulan, dimulai dari bulan November 2007 sampai Februari 2008.

3.2. Bahan dan Alat

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah medium King's B, medium TZC (*Trypenyl Tetrazolium Chloride*), medium NA, aquades steril, alkohol 70 %, kapas, aluminium foil, kertas whatman, label, tissue, plastic wrap, isolat *R. solanacearum* dan tanah yang diisolasi di sekitar perakaran dekat tanaman yang sakit dan sehat. Tanah yang diambil yaitu dekat perakaran tanaman yang sehat, di Kabupaten Kampar yang diambil dari empat lokasi yaitu desa Binuang, Pasir Sialang, Komantan, dan Muara Uwai.

Alat yang digunakan adalah erlermeyer 250 ml, gelas ukur, *automatic mixer*, *orbital shaker*, sentrifius, cawan petri, tabung reaksi, batang pengaduk, kuas steril, jarum ose, pinset, cangkul, pisau, otoklaf, lampu bunsen, kompor, lumpang porselin, pipet tetes, timbangan analitik, ruang isolasi, inkubator dan laminar air flow cabinet.

3.3. Metode Penelitian

Sumber isolat *Pseudomonas berfluorescens* yang diambil dari empat desa di Kabupaten Kampar yaitu desa Binuang, desa Pasir Sialang, desa Komantan, dan desa Muara Uwai. Desa-desa tersebut merupakan desa yang persentase serangan bakteri *R.solanacearum* pada tanaman pisang paling tinggi dengan tingkat serangan mencapai 50 %. Data yang diperoleh dianalisis statistik deskriptif yang ditampilkan dalam bentuk tabel dan gambar.

3.4. Pelaksanaan Penelitian

3.4.1. Di Lapangan

3.4.1.1. Pengambilan Sampel Tanah

Pengambilan sampel tanah dilakukan di sekitar perakaran dekat tanaman pisang yang sehat dan perakaran tanaman pisang yang sakit akibat *R.solanacearum*. Tanah yang diambil yaitu dekat perakaran tanaman pisang yang sehat dengan kedalaman 10 – 15 cm. Sampel tanah pada masing-masing lahan diambil secara diagonal sebanyak 5 titik.

3.4.2. Di Laboratorium

3.4.2.1. Isolasi *Pseudomonas Berfluorescens* dari Tanah di Sekitar Pertanaman Pisang

Tanah diambil masing-masing sebanyak 10 gram dan disuspensikan ke dalam 90 ml aquades steril. Sebanyak 7 buah tabung reaksi, diisi masing-masing 9 ml aquades steril, diambil 1 ml menggunakan gelas ukur dari hasil suspensi tanah, lalu di kocok sampai homogen dengan menggunakan *automatic mixer* selama 5 menit. Dari hasil homogen diambil 1 ml dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Dan dilakukan pengenceran dari 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} sampai 10^{-7} . Suspensi tanah dengan tingkat pengenceran 10^{-7} dimasukkan sebanyak 1 ml ke dalam cawan petri yang telah berisi medium King's B, kemudian diinkubasi selama 3 hari dalam inkubator pada suhu kamar.

3.4.2.2. Isolasi *Ralstonia solanacearum* pada Tanaman Pisang

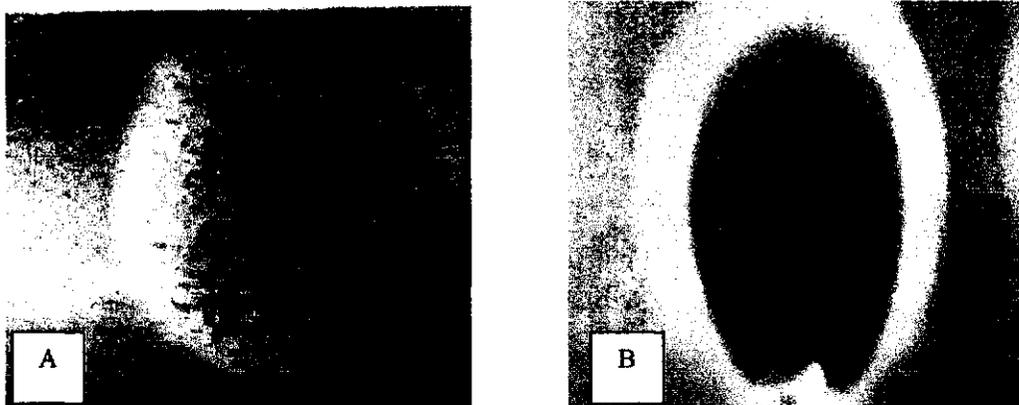
Sumber inokulum diambil dari buah tanaman pisang di beberapa desa di Kabupaten Kampar. Kebun yang dipilih yaitu yang terserang penyakit layu bakteri. Gejala buah tampak masih hijau dari luar dan kelihatan sehat, tetapi jika buah dibelah kelihatan lendir berwarna putih kotor sampai coklat kekuningan.

Bagian buah yang bergejala dipotong dengan menggunakan pisau steril kemudian potongan buah pisang disterilisasi permukaan dengan alkohol 70 % selanjutnya dibilas dengan aquades steril sebanyak 3 kali. Potongan buah pisang kemudian dihaluskan dengan menggunakan lumpang porselin dan ditambah 15 ml aquades steril. Dari hasil suspensi bakteri diambil 1 ml dan dimasukkan ke dalam 9 ml aquades steril dari pengenceran 10^{-1} sampai 10^{-7} .

Suspensi bakteri dengan pengenceran 10^{-7} diambil 1 ml dan dipindahkan ke medium TZC (*Trypenyl Tetrazolium Chloride*) dengan metode cawan tuang ke dalam cawan petri steril. Bakteri *R. solanacearum* yang virulen berwarna putih bening dengan pusat merah muda sedangkan *R. solanacearum* yang avirulen berwarna merah tua. Sifat morfologi isolat *R. solanacearum* dapat dilihat pada Tabel 1. dan Gambar 1.

Tabel 1. Sifat morfologi bakteri *R. solanacearum* pada medium TZC

Isolat	Sifat Morfologi	
	Bentuk koloni	Warna koloni
<i>R. solanacearum</i> virulen	Tidak beraturan	Putih bening dengan pusat merah muda
<i>R. solanacearum</i> avirulen	Tidak beraturan	Merah tua



Gambar 1. Morfologi bakteri *R. solanacearum* pada medium TZC. (A = *R. solanacearum* virulen B = *R. solanacearum* avirulen).

Hasil penelitian Utami. S. 2008 morfologi bakteri *R. solanacearum* (Tabel 1 dan Gambar 1) terlihat bahwa bentuk koloni tidak beraturan, *R. solanacearum* virulen berwarna putih bening dengan pusat merah muda dan *R. solanacearum* avirulen berwarna merah tua.

Hal ini diperkuat oleh Masnilah, Yuliani, Tjahjani dan Trisujilawati (2001) yang menunjukkan hasil yang sama dimana sifat morfologi bakteri

R. solanacearum pada medium TZC yaitu bentuk koloni tidak beraturan dan berwarna putih bening dengan pusat merah muda.

Dari hasil isolasi *R. solanacearum* pada tanaman pisang didapat beberapa isolat untuk setiap desa, namun yang dilihat adalah *R. solanacearum* virulen dan *R. solanacearum* avirulen.

3.4.2.3. Karakterisasi

3.4.2.3.1. Karakterisasi sifat morfologi

Koloni yang telah tumbuh pada medium NA setelah 3 X 24 jam diamati morfologi koloninya yaitu bentuk koloni, warna koloni dan bentuk permukaan koloni.

3.4.2.3.2. Uji Pigmen Berfluorescens

Pengujian ini dilakukan dengan cara memindahkan bakteri secara goresan pada medium King's B dan diinkubasi selama 3 X 24 jam pada suhu kamar. Apabila koloni menunjukkan warna kuning kehijauan berarti bakteri menghasilkan pigmen berfluorescens (Klement, 1990).

3.4.2.3.3. Uji Indikasi Antagonis

Pengujian antagonis *Pseudomonas* berfluorescens dilakukan dengan goresan suspensi pada permukaan media TZC yang telah diinokulasi dengan suspensi *Pseudomonas* berfluorescens umur 24 jam setelah inkubasi (Hartman *et al* 1993).

Pelaksanaan Pengujian Antagonis

Pelaksanaan pengujian antagonis yaitu disiapkan isolat *Pseudomonas* berfluorescens dari desa Benuang, Komantan, Pasir Sialang, dan Muara Uwai. Isolat yang berumur 3 hari diambil dari medium King's B dengan cara menambahkan 10 ml aquades steril pada biakan, kemudian dipisahkan dari medium King's B secara perlahan dengan menggunakan kuas steril dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi steril, lalu dikocok sampai homogen dengan menggunakan *automatic mixer* dengan kecepatan 180 rpm selama 5 menit. Masing-masing isolat di dalam tabung reaksi steril diambil 1 ml dimasukkan ke dalam medium King's B cair dan diinkubasi selama 2 hari pada *orbital shaker* dengan kecepatan 150 rpm. Setelah diinkubasi medium disentrifugasi pada

kecepatan 3000 rpm selama 15 menit. Kemudian supernatan *Pseudomonas* berfluorescens akan terpisah pada medium King's B cair. Kertas whatman steril dicelupkan ke dalam supernatan *Pseudomonas* berfluorescens dan diletakkan di atas medium TZC yang sudah tercampur dengan *R. solanacearum* yang telah padat, kemudian diinkubasi sampai adanya zona hambatan disekitar kertas whatman.

3.5. Pengamatan

3.5.1. Karakterisasi Sifat Morfologi

Pengamatan sifat morfologi koloni dilakukan pada biakan medium NA secara visual terhadap isolat meliputi:

3.5.1.1 Warna Koloni, Bentuk Koloni dan Bentuk Permukaan Koloni

Dilakukan pada medium NA setelah 3 X 24 jam setelah inkubasi.

3.5.2. Uji Pigmen Berfluorescens

Pada uji pigmen berfluorescens yang diamati adalah kemampuan bakteri menghasilkan pigmen fluorescens pada medium King's B berupa goresan dengan warna kuning kehijauan dan mengkilat atau hijau terang.

3.5.3. Uji Indikasi Antagonis

Pengamatan yang dilakukan terhadap pengujian indikasi antagonis bakteri *Ralstonia solanacearum* pada tanaman pisang adalah melihat zona hambatan disekeliling antagonis pada media TZC (*Trypenyl Tetrazolium Cloride*).