

PEDOMAN PRAKTIKUM BAKTERIOLOGI



Dr. Ir. Yenny Wuryandari, MP.
Dr. Ir. Arika Purnawati, MP.

**LABORATORIUM KESEHATAN TANAMAN
FAKULTAS PERTANIAN
UPN "VETERAN" JAWA TIMUR
SURABAYA
2021**

KATA PENGANTAR

Syukur Alhamdulillah kami panjatkan kehadirat Allah SWT, karena dengan rahmat dan hidayahNYA kami dapat menyelesaikan Pedoman Praktikum Bakteriologi ini. Pedoman praktikum ini berisi materi yang mendukung perkuliahan / teori tentang bakteri secara umum antara lain ; pembuatan media selektif, isolasi bakteri patogen, identifikasi bakteri patogen, perbanyakan bakteri, inokulasi bakteri patogen, uji hipersensitif, dan uji patogenisitas. Adapun untuk bakteri yang bermanfaat akan dilakukan isolasi bakteri bermanfaat (terutama yang berpotensi sebagai agensia hayati), uji antagonistik secara *in vitro*, dan uji antagonistik secara *in vivo*.

Buku pedoman ini diharapkan dapat lebih mempermudah dan memperlancar pelaksanaan praktikum di laboratorium dan berguna bagi pembaca secara umum. Sebagai akhir kata, semoga pedoman praktikum ini dapat memberi bimbingan bagi mahasiswa pengguna.

Surabaya, September 2021

Tim Penyusun

EVALUASI PENILAIAN PRAKTIKUM

1. Kehadiran dan Aktivitas : 40 %
2. Laporan : 30 %
 - Laporan Sementara (60 %)
 - Laporan Resmi (40 %)
3. UTS dan UAS : 30 %

I. PENDAHULUAN

1.1 Latar belakang

Bakteri memiliki tiga bentuk dasar, yaitu bulat, batang, dan spiral. yang masing-masing disebut sebagai coccus, bacillus, dan spirillum. Sebagian besar bakteri patogenik tanaman berukuran berkisar $1,0 - 5,0 \times 0,5 - 1,0 \text{ um}$ (Goto, M,1992).

Bakteri merupakan mikroorganisme yang terdapat di seluruh tempat, ada yang menguntungkan, ada yang merugikan. Salah satu bakteri yang merugikan adalah bakteri patogen tanaman yang dapat menyebabkan tanaman sakit dan menginfeksi tanaman melalui luka, alat-alat pertanian dan lubang alami pada tanaman. Namun demikian diagnosa penyakit tanaman yang disebabkan oleh bakteri, terutama didasarkan pada gejala dan tanda penyakit pada tanaman tersebut dan untuk menentukan penyebabnya maka dilakukan beberapa tahapan mulai dari sterilisasi dan pembuatan media selektif, isolasi bakteri patogen, identifikasi bakteri patogen, perbanyakan bakteri, inokulasi bakteri patogen, uji hipersensitif, dan uji patogenisitas.

Walaupun bakteri dapat menimbulkan penyakit, namun ada juga bakteri yang menguntungkan bagi manusia. Salah satu bakteri bermanfaat adalah bakteri yang berperan sebagai agensia hayati. Untuk itu dalam praktikum bakteriologi perlu melakukan isolasi bakteri bermanfaat (terutama yang berpotensi sebagai agensia hayati), uji antagonistik secara *in vitro*, dan uji antagonistik secara *in vivo*. Berdasar hal tersebut maka materi pedoman praktikum ini dititik beratkan pada hal tersebut dan diharapkan mendukung pustaka acuan perkuliahan bakteriologi.

1.2. Tujuan

Tujuan praktikum bakteriologi untuk memperkenalkan tahapan diagnosa penyakit tanaman karena bakteri yaitu mulai pembuatan media selektif, isolasi bakteri patogen, identifikasi bakteri patogen, perbanyakan bakteri, inokulasi bakteri patogen, uji hipersensitif, dan uji patogenisitas. Sedangkan untuk pemahaman tentang bakteri yang bermanfaat sebagai agensia hayati dipraktekkan cara isolasi bakteri bermanfaat, uji antagonistik secara *in vitro*, dan uji antagonistik secara *in vivo*.

I. STERILISASI DAN PEMBUATAN MEDIA SELEKTIF

3.1. Pendahuluan

Sterilisasi diartikan sebagai proses untuk mematikan semua organisme yang ada pada suatu benda atau terdapat di dalam benda tersebut. Saat melakukan proses pemindah-biakan bakteri dengan cara aseptik terutama, sterilisasi ini akan berperan sangat besar. Sterilisasi alat atau media dapat dikerjakan secara mekanik (misal : penyaringan), kimia (misal : desinfektan), dan fisik (misal : sinar ultra violet) dan cara sterilisasi yang digunakan tergantung pada jenis dan sifat bahan yang disterilkan (misal : ketahanan terhadap panas).

Sterilisasi dapat dilakukan dengan 4 cara :

- a. Sterilisasi dengan pemijaran
- b. Sterilisasi dengan udara panas (kering)
- c. Sterilisasi dengan uap air panas
- d. Sterilisasi dengan uap air panas bertekanan

Adapun penjelasan masing-masing cara sterilisasi tersebut adalah :

- a. Sterilisasi dengan pemijaran : cara ini digunakan untuk sterilisasi alat dari platina/nikrom dengan cara membakar di atas api Bunsen sampai pijar.
- b. Sterilisasi dengan udara panas (kering) : menggunakan oven (hot air sterilizer) pada 170° - 180° C selama 1-2 jam, digunakan untuk sterilisasi alat, bahan/media.
- c. Sterilisasi dengan uap air panas: menggunakan Arnold steam sterilizer pada 100° C selama 30 menit, digunakan untuk media tumbuh yang tidak tahan terhadap panas tinggi.
- d. Sterilisasi dengan uap air panas bertekanan : menggunakan autoklaf pada 121° C selama 15-20 menit dan tekanan 1-2 atm, digunakan untuk alat dan media / bahan.

3.2. Tujuan

Mengenalkan alat dan cara untuk sterilisasi alat juga cara membuat media/bahan dan sterilisasi media/bahan.

3.3. Cara Kerja

3.3.1. Sterilisasi Alat

Rendam dan rebus semua alat dari kaca dalam air mendidih untuk menghilangkan lemak/sisa-sisa jamur/ bakteri yang masih melekat pada alat.

Dinginkan air kemudian ambil semua alat atau dalam keadaan air agak panas ambil semua alat dengan menggunakan penjepit dan tampung dalam suatu tempat / bak plastik. Cuci semua alat dari kaca (misal : cawan petri, tabung reaksi) dengan sabun dan bilas dengan air mengalir. Keringkan dengan oven pada 70°C selama 24 jam atau kering angin. Bungkus cawan Petri dengan kertas dan sumbat tabung reaksi, Erlenmeyer dengan kapas kemudian sterilkan dengan oven pada 170°C selama 1.5 jam (dihitung setelah temperatur stabil) atau sterilkan dengan autoklaf pada 121°C dan tekanan 1-2 atm (dihitung setelah temperatur dan tekanan stabil) selama 15-20 menit. Untuk alat laboratorium yang bahannya dari logam seperti skalpel, pinset, jarum Ose cara sterilisasi dengan cara dipanaskan pada bagian mata pisau dan sedikit bagian di atasnya (tidak pada tangkai pemegangnya) pada api lampu bunsen sampai berpijar.

3.3.2. Pembuatan dan Sterilisasi Media

• **Media Nutrient Agar (NA)**

Bahan: 1 g ekstrak daging, 1 g ekstrak khamir, 5 g pepton, 5 g NaCl, 15 g agar-agar, 1000 ml aquades .

Cara membuat : Timbang masing-masing bahan dan siapkan. Larutkan ekstrak daging, ekstrak khamir dalam 200 ml aquades (larutan I). Didihkan 800 ml aquades dan masukkan larutan I kemudian masak sampai mendidih. Ukur pH media (6,8-7,0) dengan kertas lakmus. Untuk mencapai pH tersebut gunakan larutan NaOH 40%. Tambahkan agar-agar dan aduk sampai larut.

Bila telah siap tuang ke Erlenmeyer dan sterilkan dengan autoklaf pada 121°C, tekanan 1.5 atm selama 15-20 menit.

• **Media Yeast Pepton Glukosa Agar (YPGA)**

Bahan: 5 g yeast, 10 g pepton, 10 g glukosa, 15 g agar-agar, 1.000 ml aquades.

Cara membuat : Timbang masing-masing bahan dan siapkan. Larutkan yeast

dan pepton masing-masing dalam 200 ml aquades. Didihkan 800 ml aquades dan masukkan Larutan yeast dan larutan pepton kemudian masak sampai mendidih. Tambahkan glukosa, aduk sampai larut kemudian ukur pH media (6,8-7,0) dengan kertas lakmus. Untuk mencapai pH tersebut gunakan larutan NaOH 40% . Tambahkan agar-agar dan aduk sampai larut. Bila telah siap tuang ke Erlenmeyer . Sterilkan dengan autoklaf pada 121 °c, tekanan 1.5 atm selama 15-20 menit.

- **Media Uji Oksidatif / Fermentngatif**

Bahan : 1 g pepton, 5 g Na CL, 10 g glukosa, 0,3 g KH_2PO_4 , 3 ml Bromothimol blue (BTB), 3 g agar-agar, 1 000 ml aquades (1 resep).

Cara membuat : Timbang masing-masing bahan dan siapkan. Larutkan NaCL dan KH_2PO_4 masing-masing dalam 200 ml aquades. Didihkan 800 ml aquades kemudian masukkan pepton, larutan NaCL dan larutan KH_2PO_4 sambil aduk sampai larut. Tambahkan BTB dan glukosa dan aduk sampai larut dan mendidih. Ukur pH media (6,8-7,1) dengan kertas lakmus. Untuk mencapai pH tersebut gunakan larutan NaOH• 40%. Tambahkan agar-agar dan aduk sampai larut. Bila telah siap tuang ke Erlenmeyer dan Sterilkan dengan autoklaf pada 121 C, tekanan 1.5 atm selama 15 -20 menit.

- **Larutan KOH 3%**

Bahan : 3 g KOH, aquades steril.

Cara membuat : Timbang KOH. Larutkan dengan aquades sampai volume mencapai 100 ml. Simpan dalam botol dan tutup rapat.

- **Uji Oksidase**

Bahan : kertas saring (Whatman), larutan tetramethylparaphenlylenediamine.

- **Uji Katalase atau Uji Reduksi Hidrogen Peroksida 5%**

Bahan : 5 g H_2O_2 , aquades.

Cara membuat : Timbang 5 g H_2O_2 larutkan dengan aquades sampai volume mencapai 100 ml. Simpan dalam botol dan tutup rapat

.II. PENGENALAN GEJALA DAN TANDA PENYAKIT TANAMAN OLEH BAKTERI

4.1. Pendahuluan

Gejala adalah perubahan-perubahan yang ditunjukkan oleh tumbuhan ,sebagai akibat adanya penyebab penyakit. Sering kali beberapa macam penyakit pada tumbuhan tertentu menunjukkan gejala yang sama, sehingga dengan memperhatikan gejala saja, tidak dapat menentukan diagnosis dengan pasti. Oleh karena itu juga harus memperhatikan tanda dari penyakit. Tanda adalah semua pengenal dari penyakit selain reaksi tumbuhan inang, misalnya miselium , warna spora, lendir dan sebagainya (Semangun, H., 1996).

Gejala penyakit merupakan reaksi spesifik yang dihasilkan tanaman karena adanya infeksi patogen sehingga dikatakan bahwa gejala penyakit merupakan reaksi fisiologi tanaman terhadap aktivitas patogen. Gejala penyakit dapat timbul pada sel, jaringan, organ yang dapat dideteksi secara visual dengan mata biasa atau secara mikroskopis dan pada gejala yang sama patogennya bisa sama atau berbeda.

4.2. Pengumpulan Contoh Tanaman Sakit Sehat atau Contoh Tanah

Pengumpulan contoh tanaman sakit untuk suatu diagnosa penyakit harus memenuhi syarat karena menentukan ketepatan diagnosa. Bila contoh terlalu sedikit kemungkinan besar gejala penyakit utama tidak terbawa sehingga terjadi kesalahan diagnosa. Kumpulan bahan sakit harus mewakili semua gejala dan tanda penyakit pada akar atau umbi, batang, daun, bunga, buah dan selanjutnya dibawa ke laboratorium untuk didiagnosa. Selain tanaman sakit, dugaan adanya bakteri juga dilakukan pada contoh tanah sekitar tanaman sakit.

4.2. Pengenalan Gejala dan Tanda Penyakit

Untuk diagnosa penyakit, tidak dapat dilihat gejalanya saja karena gejala yang sama kemungkinan patogennya berbeda. Dari alasan tersebut maka untuk mendiagnosa suatu penyakit, setelah pengamatan gejala dilanjutkan dengan pemeriksaan tanda penyakit. Bila gejala dan tanda penyakit sulit

ditemukan maka dilakukan pemeriksaan bakteri pada tanaman sehat dan contoh tanah. Contoh Gejala penyakit layu bakteri dapat dilihat pada Gambar 1. Kadang-kadang gejala hanya setengah bagian daun yang layu sedangkan setengah bagian yang lain belum. Pada gejala bagian dalam, ada perubahan warna cokelat pada jaringan pembuluh. Apabila tanaman yang layu batangnya dipotong, akan terlihat berkas-berkas pembuluhnya berwarna cokelat.



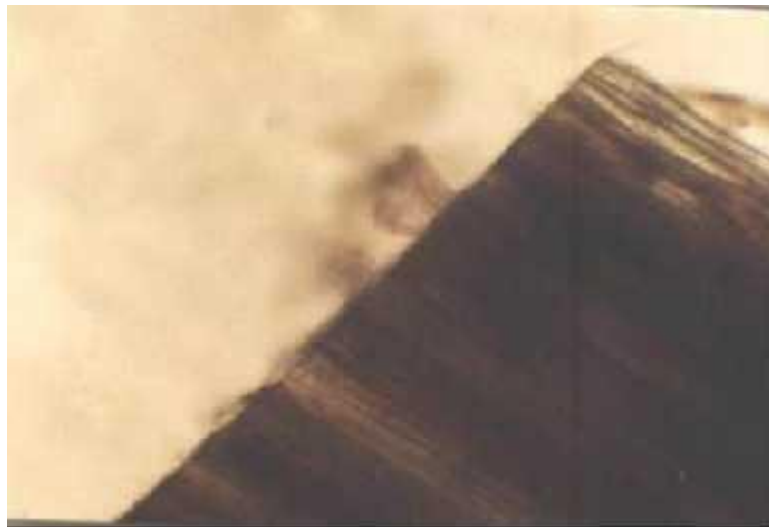
Gambar 1. Gejala layu pada tanaman tomat yang disebabkan oleh *Ralstonia solanacearum* (Wuryandari *et al.*, 2005)

Timbulnya gangguan tersebut mungkin karena terjadi degradasi selulosa di dalam dinding sel atau penyumbatan yang menyebabkan gangguan translokasi air dari akar ke bagian atas tanaman sehingga menimbulkan kelayuan. Hal ini sesuai dengan pendapat Goto (1992), bahwa kelayuan pada daun terjadi karena pembuluh tersumbat oleh massa bakteri sehingga menghambat pengangkutan air.

Pada serangan lanjut apabila pangkal batang atau akar dipotong dan ditekan akan keluar nenes atau oose berwarna putih kotor yang merupakan massa bakteri (Gambar 2). Aliran bakteri keluar dari jaringan pembuluh yang berwarna coklat dilihat di bawah mikroskop (Gambar 3).



Gambar 2. Masa bakteri berwarna putih kotor yang merupakan massa bakteri keluar dari jaringan pembuluh (dok. Yenny Wuryandari, 2015)



Gambar 3. Aliran bakteri dari jaringan pembuluh yang berwarna coklat pada tanaman sakit (dok. Yenny Wuryandari, 2000)

4.3. Tujuan

Mengenalkan gejala dan tanda penyakit karena bakteri pada tanaman

4.4. Cara Kerja

Kumpulkan contoh tanaman sakit dari lapang kemudian lembabkan dengan kapas dan masukkan ke plastik kemudian bawa ke laboratorium atau ambil akar tanaman sakit atau contoh tanah sekitar tanaman sakit. Amati gejala dan tanda penyakit tanaman yang anda temukan secara makroskopis dengan mikroskopis.

Secara makroskopis : sayat melintang bagian tanaman yang sakit dengan

skalpel / pisau bersih kemudian celupkan dalam air dan periksa ada / tidak ada massa bakteri yang keluar dari bagian tanaman sakit.

Secara mikroskopis : amati dengan mikroskop bagian tanaman sakit. Catat adanya aliran massa bakteri yang bergerak. Amati massa bakteri dengan perbesaran terlemah hingga terkuat. Tulis hasil pengamatan anda pada tabel berikut :

Tabel 1. Hasil Pengamatan Pengenalan Gejala dan Tanda Penyakit

No	Bahan / Spesimen	Gejala Penyakit	Tanda Penyakit Berupa Massa Bakteri (+/-)	Keterangan

III. ISOLASI BAKTERI

5.1. Pendahuluan

Teknik Isolasi

Isolasi adalah proses memisahkan suatu organisme / mikroba (patogen / non-patogen) dari inang / tempat tumbuh / hidup ketempat tumbuh / hidup baru (alami, buatan / sintesis). Bakteri jarang terdapat dalam keadaan murni bila berada di alam. Kebanyakan bakteri merupakan campuran berbagai macam spesies bakteri. Untuk mengisolasi bakteri patogen tanaman yang tidak diketahui, praktik yang baik adalah menggunakan beberapa media agar-agar yang berbeda (Schaad *et al.*, 2001). Cara yang umum untuk mengisolasi bakteri adalah:

1. Cara Goresan (*Streak Plate Method*)

Cara ini dasarnya adalah menggoreskan suspensi bahan yang mengandung bakteri pada permukaan medium agar yang sesuai dalam cawan petri. Setelah inkubasi maka pada bekas goresan akan tumbuh koloni-koloni terpisah yang mungkin berasal dari 1 sel bakteri, sehingga dapat dimurnikan lebih lanjut.

2. Cara Taburan (*Pour Plate Method*)

Cara ini dasarnya adalah menginokulasi medium dengan agar yang sedang mencair pada temperatur 50 °C dengan suspensi bahan yang mengandung bakteri, kemudian menuangkan ke dalam cawan petri. Setelah inkubasi akan terlihat koloni-koloni yang tersebar di permukaan agar yang mungkin berasal dari 1 sel bakteri sehingga dapat diisolasi lebih lanjut.

3. Cara Pengenceran (*Dillution Plate*)

Cara ini pertama kali dilakukan oleh Lister pada tahun 1865. Lister berhasil menghasilkan biakan murni *Streptococcus lactis* yang diisolasi dari susu yang sudah masam. Caranya dengan mengencerkan suspensi yang berupa campuran bermacam-macam species kemudian diencerkan dalam suatu tabung tersendiri. Dari pengenceran ini diambil 1 ml untuk diencerkan lagi, bila perlu diencerkan lagi hingga seterusnya.

Langkah selanjutnya adalah dari pengenceran diatas, diambil 0,1 ml untuk disebarkan pada suatu medium padat, sehingga kita mendapatkan beberapa koloni tumbuh dalam media tersebut, tetapi bisa saja hanya satu koloni yang tumbuh. Bila

diperoleh satu koloni murni, dan selanjutnya spesies ini dapat kita jadikan biakan murni. Sampel yang telah diambil kemudian disuspensikan dalam aquades steril. Tujuan dari teknik ini pada prinsipnya adalah melarutkan atau melepaskan mikroba dari substratnya ke dalam air sehingga lebih mudah penanganannya.

Isolasi bakteri dari tanaman sakit umumnya dilakukan dari jaringan tipis dan daerah sekitar perakaran dan tanah tempat tumbuh. Sedangkan, metodenya dilakukan dengan menggunakan metode gores / streak.

5.3. Cara kerja

5.3.1. Isolasi dari Jaringan Tipis

Bahan : daun sakit (komoditas menyesuaikan), aquades steril, sublimat 0,1% atau alkohol 70%, media NA steril.

Alat : Jarum Ose, lampu Bunsen, Skalpel, Pinset, Entkas.

Sediakan media NA dalam cawan Petri. Ambil bahan / spesimen sakit bersihkan dengan aquades steril. Potong-Potong bahan tersebut, pisahkan bagian sakit dan sehat. Rendam potongan tersebut dalam larutan sublimat (HgCl_2) 0,1% atau alkohol 70% selama 1 menit kemudian cuci dengan aquades steril hingga alkohol atau sublimat hilang.

Masukkan potongan bahan yang telah steril ke cawan Petri yang telah diisi aquades steril kemudian cacah potongan bahan hingga keluar massa bakterinya dan membentuk suspensi bakteri. Ambil suspensi dengan jarum Ose dan goreskan ke media NA dan inkubasikan 24 jam. Amati koloni yang tumbuh dan pindah ke media NA baru dan inkubasikan 24 jam. Catat hasil pengamatan pada Tabel 2.

5.3.2. Isolasi dari Jaringan Tebal

Bahan : buah sakit (komoditas menyesuaikan) aquades steril, sublimat 0,1% atau alkohol 70 %, media NA steril.

Alat : jarum Ose, lampu Bunsen, skalpel, pinset, entkas.

Sediakan media NA dalam cawan Petri. Ambil bahan / spesimen sakit bersihkan dengan aquades steril. Bersihkan atau usap bahan sakit dengan alkohol 70% atau sublimat 0,1 %. Potong-potong bahan tersebut, pisahkan

bagian sakit dan sehat. Rendam potongan tersebut dalam larutan sublimat (HgCl_2) 0,1 % atau alkohol 70% selama 1menit kemudian cuci dengan aquades steril hingga alkohol atau sublimat hilang. Masukkan potongan bahan yang telah steril ke cawan Petri yang telah diisi aquades steril kemudian cacah potongan bahan hingga keluar massa bakterinya dan membentuk suspensi bakteri.

Cara lain, bersihkan atau usap bahan sakit dengan alkohol 70% atau sublimat 0,1 %. Bagian kulit buah atau bagian kulit tanaman sakit diiris dengan menggunakan skalpel steril dan dibuang. Potong-potong bagian jaringan antara yang sehat dan sakit. Masukkan potongan tersebut dimasukkan ke dalam aquades steril dalam tabung reaksi. Ditunggu sekitar 5-10 menit sampai keluar masa bakteri dengan terlihat keruhnya aquades dalam tabung reaksi.

Ambil suspensi dengan jarum Ose dan goreskan ke media NA dan inkubasikan 24 jam, Amati koloni yang tumbuh dan pindah ke media NA baru dan inkubasikan 24 jam. Catat hasil pengamatan pada tabel 2. Tahapan Isolasi bakteri terlihat pada Gambar 4.





i

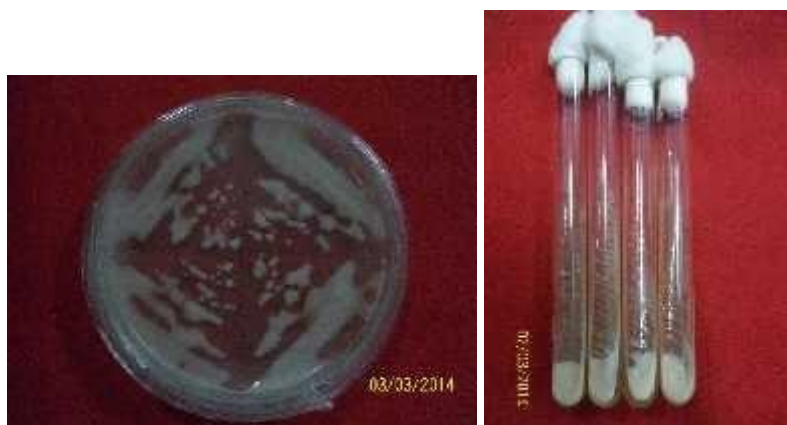
j

Gambar 4. Tahapan Isolasi bakteri *Ralstonia solanacearum*

Keterangan gambar

- a. Jaringan batang dari tanaman yang menunjukkan gejala layu, dibuang bagian kulitnya setelah didisinfektan dengan diusap menggunakan alkohol 70%
- b. Jaringan kayu dipotong dengan alas cawan petri steril
- c. Jaringan kayu dari batang yang telah dipotong kecil-kecil di dalam cawan petri
- d. Potongan jaringan dimasukkan dalam tabung reaksi yang ada air sterilnya, menggunakan pinset steril
- e. Proses memasukkan potongan jaringan tetap di depan lampu bunsen
- f. Bila potongan jaringan sudah masuk, tabung reaksi ditutup kembali menggunakan kapas
- g. Beberapa saat (5 sd 10 menit) potongan jaringan akan mengeluarkan masa bakteri dengan ditanda aquades dalam tabung reaksi menjadi keruh
- h. Masa bakteri diambil menggunakan jarum ose yang sebelumnya dipanaskan pada lampu bunsen
- i. Masa bakteri dalam jarum ose digoreskan pada media tumbuh yang telah disiapkan
- j. Diinkubasikan selama 24 sd 48 jam, sampai tumbuh bakteri hasil goresan

Hasil isolasi bakteri *Ralstonia solanacearum* dapat dilihat pada Gambar 5. Ciri-ciri koloni adalah sebagai berikut; koloni bakteri berwarna putih, fluidal, dan berbentuk tidak teratur bila ditumbuhkan pada medium Yeast Peptone Glukose Agar (YPGA). Bakteri *Ralstonia solanacearum* (Smith 1896, dahulu *Pseudomonas solanacearum*) yang merupakan bakteri dengan koloni bervariasi dari *fluidal*, keruh (*opaque*) sampai menyerupai mentega (*butyrous*). Perbedaan antara tipe koloni dan tingkat virulensi dihubungkan dengan tingkat ada atau tidaknya polisakarida ekstraseluler. Strain patogenik membentuk koloni yang keruh dan *fluidal*, sedangkan strain mutan membentuk koloni transparan yang menyerupai mentega (Goto, 1992).



Gambar 5. Hasil isolasi koloni bakteri *R. solanacearum* pada medium YPGA

5.3.3. Isolasi Bakteri dari Tanah

Bahan : tanah sekitar tanaman sakit, aquades steril, media NA steril.

Alat : timbangan, tabung reaksi steril, pengaduk, pipet tetes .

• Metode Pengenceran

Timbang 1 g contoh tanah kemudian buat suspensi dalam 10 ml aquades steril. Buat 4 seri pengenceran (10^{-4}) yaitu setiap 1 ml suspensi tanah dilarutkan dalam 9 ml aquades steril dan setiap suspensi harus dikocok hingga homogen.

Teteskan 1 ml suspensi terakhir menggunakan mikropipet ke media NA yang telah siap dan ratakan. Inkubasikan 24 jam, amati dan catat hasil pengamatan pada Tabel 2 .

• Metode Penaburan

Timbang 1 g contoh tanah kemudian kering anginkan beberapa saat . Taburkan sedikit (1 kolong Ose) ke media NA yang telah siap. Inkubasikan 24 jam. Catat hasil pengamatan pada Tabel 2.

Tabel 2. Hasil Isolasi bakteri

No	Isolasi Dari	Bentuk Koloni	Warna Koloni	Wajah Koloni	Permukaan Koloni

IV. IDENTIFIKASI BAKTERI PATOGEN

Pendahuluan

Identifikasi merupakan suatu cara untuk mengelompokkan organisme berdasarkan sifat-sifatnya terutama sifat fisiologi dan biokimiannya. Identifikasi bakteri patogen, tanaman ada 2 tahap yaitu : 1). Identifikasi awal dengan parameter bentuk dan warna dari koloni maupun sel bakteri , 2). Identifikasi lanjutan dengan uji fisiologi dan biokimia bakteri. Uji fisiologi dan biokimia bakteri meliputi uji gram, oksidase, katalase dan Oksidasi Fermentasi (OF). Untuk identifikasi bakteri, bakteri dari biakan murni yang berumur 24 - 48 jam adalah yang paling baik karena pertumbuhan bakteri optimal/proses metabolisme paling baik.

Tujuan.

1. Melatih mahasiswa untuk dapat mengidentifikasi bakteri
2. Mengelompokkan bakteri patogen tanaman berdasarkan sifat-sifatnya

Bahan :

Biakan murni bakteri, media YPGA, NA, KOH, H₂O₂, Kovac's dan media uji OF

Alat : Autoklaf, jarum ose, tabung reaksi, gelas benda, dll

Cara Kerja

Pengujian fisiologi dan biokimia

I. Pengujian gram

1. Teteskan KOH 3 % pada gelas benda.
2. Letakkan satu ose koloni bakteri yang diambil dari biakan murni berumur 48 jam, pada gelas benda yang telah diberi KOH 3%
3. Lakukan gerakan berputar-putar dengan menggunakan jarum ose dan tarik-tarik keatas.
4. Jika larutan KOH menjadi lentur seperti benang dengan panjang kurang lebih 0,5 - 2cm berarti reaksi positif sebagai gram negatif.

Reaksi gram merupakan sifat dasar untuk divisi atau kelompok utama dari bakteri (Fahy & Hayward, 1983). Tujuan dilakukan uji gram adalah untuk

mengetahui sifat struktur selubung sel bakteri (Goto, 1992). Berdasarkan pengujian yang telah dilakukan, ke-15 isolat yang diuji menunjukkan bakteri gram negatif. Hal ini ditunjukkan dengan adanya perubahan mengental dari larutan KOH dan menjadi benang-benang dengan panjang kurang lebih 0,5 – 2 cm dari larutan 3 % KOH yang telah diberi koloni bakteri (Gambar 6).



Gambar 6. Uji gram ditunjukkan dengan pembentukan benang pada koloni bakteri yang diberi KOH 3%

II. Uji katalase atau reduksi hydrogen peroksida

- I. Goreskan biakan bakteri yang telah berumur 48 jam pada gelas benda
2. Teteskan H_2O_2 5% pada gelas benda
3. Tunggu selama 1 - 2 detik, bila terjadi gelembung udara, menunjukkan bahwa bakteri mereduksi H_2O_2 (katalase positif)

Hasil pengujian yang telah dilakukan menunjukkan bahwa ke-15 isolat bakteri yang diuji bersifat katalase positif dengan terbentuknya gelembung udara pada bakteri yang diberi H_2O_2 (Gambar 7).



Gambar 7. Uji katalase dengan ditunjukkan adanya gelembung udara pada koloni bakteri yang diberi H_2O_2

Uji katalase dilakukan untuk mengetahui apakah bakteri dapat menghasilkan enzim katalase. Katalase adalah hemienzim yang dapat mendekomposisi hidrogen peroksida menjadi air dan gas oksigen. Katalase pada larutan asam bersifat tidak stabil dan akan rusak pada pH 3,0. Katalase sebagian besar dihasilkan oleh bakteri aerob dan tidak dihasilkan oleh bakteri obligat anaerob. Sebagian besar bakteri dan bakteri patogen tumbuhan bersifat katalase positif (Sands, 1990).

III. Uji Oksidase

1. Goreskan satu ose bakteri yang berumur 24 - 48 jam pada kertas saring yang telah diperlakukan dengan larutan Kovac's Oxydase.
2. Tunggu selama 10 detik
3. Apabila pada spot yang ada goresan, kertas berubah warna menjadi ungu berarti hasil oksidase positif

Pada pengujian oksidase yang menggunakan uji kovac's oxydase yaitu kertas filter Whatman yang diperlakukan dengan 1% larutan tetramethyl paraphenilenediamine dihydrochloride, menunjukkan bahwa ke-15 isolat bereaksi positif. Reaksi positif ditunjukkan dengan munculnya warna ungu pada goresan koloni bakteri pada kertas filter (Gambar 8).



Gambar 8. Uji Oksidase, ditunjukkan dengan adanya warna ungu pada kertas kovac's yang ada goresan bakteri

IV. Oksidatif Fermentatif = OF (kebutuhan oksigen)

1. Inokulasikan suspensi bakteri pada medium untuk OF test dalam tabung reaksi
2. Tutup permukaan medium dengan minyak parafin steril setinggi 1 cm pada salah satu tabung reaksi yang telah diinokulasi dan satu tabung yang lain tidak ditutup minyak parafin
3. Inkubasikan selama 3 - 4 hari, selanjutnya amati pertumbuhannya dan perubahan warna. Adanya pertumbuhan ditandai dengan perubahan warna kuning.

Adanya reaksi atau perubahan warna kuning pada medium seperti tersebut di atas menunjukkan terbentuknya asam pada medium. Isolat yang mampu tumbuh pada medium baik yang ada atau tidak ada minyak parafin berarti bersifat oksidatif fermentatif. Adapun isolat yang hanya dapat tumbuh pada medium yang tidak ditutup minyak parafin saja berarti bersifat oksidatif (Gambar 9).



Gambar 9. Pertumbuhan bakteri pada medium yang tidak ditutup minyak parafin (warna kuning) dan tidak ada pertumbuhan pada medium yang ditutup (warna tetap hijau)

6). Hidrolisis Pati

Pada medium yang mengandung pati, isolat bakteri yang diuji tidak dapat menghidrolisis pati. Hal ini ditunjukkan dengan tidak terjadinya perubahan warna jernih pada daerah pertumbuhan bakteri ketika ditetesi dengan larutan yodida (I₂). Sebagai kontrol positif yaitu bakteri yang mampu menghidrolisis pati digunakan bakteri *Xanthomonas* sp. (Gambar 10).



Gambar 10. Isolat bakteri tidak dapat menghidrolisis pati (a). Sebagai kontrol positif dengan warna bening disekitar pertumbuhan bakteri digunakan *Xanthomonas* sp. (b)

Uji hidrolisis pati bertujuan untuk mengetahui aktivitas enzim amilase dari bakteri untuk mendegradasi amilum. Dengan hasil bahwa bakteri tidak membentuk warna bening menunjukkan bahwa isolat bakteri *R. solanacearum* tidak mampu membentuk enzim amilase yang dapat mendegradasi amilum atau pati, sehingga amilum masih ada dalam medium, terbukti dengan masih tetap berwarna biru setelah ditetesi dengan yodida

8). Pembentukan pigmen fluoresen

Beberapa bakteri patogenik tanaman menghasilkan pigmen larut air atau tidak larut air yang beragam warnanya, antara lain hijau, biru, kuning, merah, dan coklat di bawah kondisi medium aerob. Pigmen ini dapat membantu dalam identifikasi bakteri (Goto,

1992). Pigmen fluorezen merupakan salah satu variabel untuk membendakan bakteri *R. solanacearum* dengan bakteri lain terutama dengan bakteri *Pseudomonas fluorescent* yang dapat membentuk pigmen fluorezen pada medium King's B. Pigmen fluorezen dapat diamati di bawah sinar ultraviolet gelombang panjang (365 nm). Pembentukan pigmen akan meningkat pada medium yang kekurangan zat besi atau Fe, misalnya medium King's B.

Dari hasil pengujian terhadap ke-15 isolat *R. solanacearum*, menunjukkan kesemuanya tidak mampu menghasilkan pigmen fluorezen kuning kehijauan pada medium King's B. Hal ini nampak berbeda dengan kontrol yaitu menggunakan bakteri *Pseudomonas fluorescent* yang dapat mengeluarkan pigmen fluorezen hijau kekuningan pada medium King's B (Gambar 11).



Gambar 11. Pembentukan pigmen fluorezen

Tabel 3. Hasil Pengamatan Identifikasi

No	Kelarutan KOH 3% (+ / -)	Katalase (+ / -)	Oksidatif / Fermentatif (O / F)	Oksidase (+ / -)	Keterangan

VI. UJI REAKSI HIPERSENSITIF DAN PATOGENISITAS

Pendahuluan

Reaksi hipersensitif merupakan salah satu mekanisme pertahanan yang sangat penting pada tumbuhan. Hal ini terjadi hanya pada kombinasi yang tidak cocok antara tumbuhan inang dengan patogen (Agrios, 1998). Pada infeksi daun oleh bakteri, reaksi hipersensitif menyebabkan hancurnya semua membran seluler dari sel-sel yang berkontak dengan bakteri, dan kemudian diikuti dengan pengeringan dan nekrotik jaringan daun. Jaringan yang mengalami nekrotik mengisolasi parasit obligat dari substansi hidup di sekitarnya karena patogen sangat tergantung pada bahan makanan, dan oleh karena itu keadaan demikian menyebabkan patogen mati (Agrios, 1988).

Tujuan

1. Melatih mahasiswa untuk dapat melakukan pengujian hipersensitif
2. Memahami dan melakukan uji patogenisitas dari bakteri ke suatu tanaman

Bahan : Biakan murni bakteri, air steril, tanaman tembakau dan tanaman inang lain

Alat : Alat penyuntik (Spet), jarum ose, Erlenmeyer, gelas ukur dll

Cara kerja

Uji Hipersensitif

1. Tumbuhkan bakteri patogen (*Ralstonia solanacearum*) pada medium YPGA miring dalam tabung reaksi selama 48 jam pada suhu 28 C
2. Suspensikan dalam air steril dengan konsentrasi 10^8 CFU/ml.
3. Injeksikan suspensi bakteri kedalam ruang antar sel pada daun tembakau kultivar White Burley yang berumur sekitar 2 bulan
4. Lakukan pengamatan terhadap timbulnya nekrosis pada daerah suntikan dalam waktu 18 - 24 jam.

Pada hasil uji reaksi hipersensitif yang menggunakan daun tembakau, isolat yang menunjukkan gejala nekrosis pada daerah suntikan dalam waktu 18 – 24 jam (Gambar 12).



Gambar 12. Reaksi hipersensitif pada daun tembakau, 24 jam setelah inokulasi

Gejala nekrosis tidak terbatas pada area yang terinfiltrasi saja tetapi meluas ke bagian daun yang lain bahkan sampai ke tulang daun. Pada semua isolat nekrosis diikuti dengan meluasnya gejala pada daun dan menjadi layu dalam waktu satu minggu. Reaksi tersebut di atas menunjukkan bahwa patogen yang diinfiltrasikan ke daun tembakau menimbulkan reaksi kompatibel. Hal ini berarti tembakau juga termasuk salah satu inangnya, sehingga isolat tersebut dapat dimasukkan dalam ras 1. Seperti pendapat Klement *et al.* (1990), yang menyatakan bahwa uji reaksi hipersensitif dengan *R. solanacearum* ras 1 akan mengakibatkan klorosis setelah 2 hari dan diikuti kelayuan setelah satu minggu.

Uji patogenisitas

1. Siapkan bibit tanaman (tomat, lombok, tembakau atau terung) yang telah berumur 30-40 hari (Gambar 13)
2. Siapkan suspensi bakteri dengan konsentrasi 10^8 CFU/ ml sebanyak 10ml Per tanaman (Gambar 14)
3. Sebelum inokulasi, lukai akar dengan cara memotong akar sedikit

4. Tuangkan inokulum ke daerah perakaran dekat dengan akar yang telah dilukai
5. Tutup kembali tanah diatas akar yang dilukai (Gambar 15)
6. Tempatkan tanaman di dalam rumah kaca dan amati waktu timbulnya gejala dan perkembangannya.



Gambar 13. Bibit tanaman cabai yang telah berumur 30-40 hari



Gambar 14. Isolat bakteri *Ralstonia solanacearum* dibuat suspensi sebagai inokulum



Gambar 15. Tahap inokulasi bakteri *Ralstonia solanacearum* pada tanaman inang cabai

Lima belas isolat dilakukan uji patogenisitas pada tanaman inangnya masing-masing. Semua isolat menunjukkan hasil dapat menimbulkan gejala yang sama dengan gejala di lapangan yaitu layu setelah patogen tersebut diinokulasikan pada tanaman inang masing-masing (Gambar 16). Dari uji patogenisitas, didapatkan hasil bahwa isolat tomat dari Poncokusumo dan Wajak menunjukkan paling virulen karena masa inkubasi tercepat yaitu 3 hari dan perkembangan penyakit atau indeks penyakit tertinggi dan kematian tanaman paling cepat (Tabel 4).

Tabel 4. Indeks penyakit dari 15 isolat *R. solanacearum*

No	Isolat	Masa inkubasi	Mati hari ke
1	RS I	2	5
2	RS II	2	6
3	RS III	3	10
4	RS VIII	3	5
5	RS XXII	5	10
6	RS 30	3	7
7	RS 31	3	9
8	RS 33	3	7
9	RS 34	3	10
10	RS 38	3	12
11	RS 39	3	7
12	RS 40	3	7
13	RS 44	3	12
14	RS 49	3	6
15	RS 52	3	7

Gambar 16. Uji patogenisitas *Ralstonia solanacearum* pada tanaman tomat

VIII. ISOLASI BAKTERI BERMANFAAT

Pendahuluan

Di antara bakteri-bakteri Gram negatif yang telah diisolasi dari rizosfer, *Pseudomonad fluorescent* selalu merupakan kelompok yang dominan (Stolp & Godkari, 1981). Sebagian besar genus *Pseudomonad fluorescent* hanya memerlukan nutrisi yang sederhana untuk keperluan hidupnya, lebih bersifat netral dan dapat tumbuh pada kondisi di bawah normal bersama-sama dengan mikroorganisme lain serta mempunyai kisaran temperatur mesophilik.

Pertumbuhan *Pseudomonad fluorescent* selalu menonjol dibandingkan mikroorganisme lain yang diisolasi dengan menggunakan medium selektif maupun menggunakan medium yang sesuai lainnya (Palleroni, 1981). Banyak dilaporkan bahwa bakteri rizosfer yang termasuk dalam kelompok *Pseudomonad fluorescent* dapat menekan pertumbuhan patogen tumbuhan baik jamur maupun bakteri (Fukui *et al.*, 1994; Trigalet *et al.*, 1994). Koloni bakteri ini mudah dikenal dan cepat tumbuh dalam waktu yang relatif singkat pada medium buatan (King'B). Hasil isolasi dari tanah rizosfer diperoleh koloni bulat, tepi rata dan berpendar hijau kekuningan. Bakteri kelompok *Pseudomonad fluoresen* bersifat Gram negatif, katalase positif dan oksidase positif.

Tujuan

1. Melatih mahasiswa untuk dapat melakukan isolasi bakteri agensia hayati
2. Memahami dan melakukan isolasi bakteri agensia hayati

I. Isolasi Bakteri rizosfer

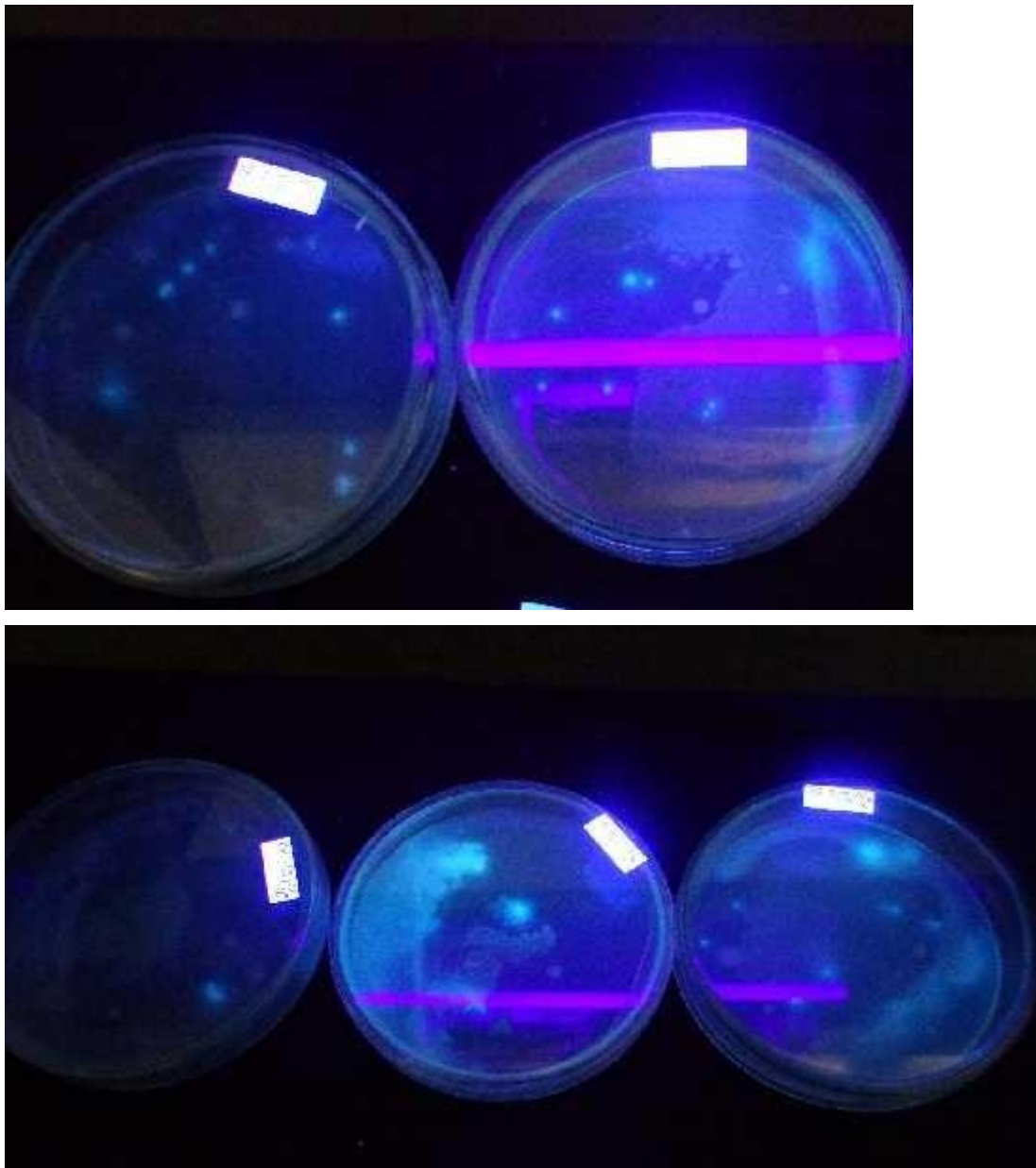
Bahan : tanah rizosfer, media King's B, aquades, alkohol

Alat : Alat penyuntik (Spet), jarum ose, Erlenmeyer, gelas ukur dll

Cara kerja

Sebanyak 10 gram tanah rizosfer beserta akar tomat sehat dimasukkan ke dalam Erlenmeyer 250 ml yang berisi 90 ml 0,1 M buffer fosfat pH 7,0 + 0,1 % pepton. Erlenmeyer tersebut kemudian digojok selama 30 menit. Setelah penggojokan, didiamkan selama 10 menit kemudian dilakukan seri pengenceran per sepuluh kali dengan buffer yang sama. Pada pengenceran ke- 10^3 dan 10^4 diambil 0,1

ml kemudian ditumbuhkan pada medium King's B + 100 ppm sikloheksimid. Setelah masa inkubasi selama 48 jam pada suhu 30⁰ C, koloni tunggal yang berpendar diambil dengan ose steril dan ditumbuhkan pada cawan Petri berisi medium yang sama tanpa sikloheksimid sebanyak 10 strain per cawan Petri. Bakteri kemudian diinkubasikan selama 24 jam pada suhu 30⁰C. Koloni bakteri kelompok pseudomonad fluorescent hasil isolasi yang berpendar di bawah lampu UV (Gambar 17).



Gambar 17. Koloni bakteri kelompok pseudomonad fluorescent hasil isolasi dari tanah rizosfer tanaman solanaceae sehat diantara tanaman bergejala ayu



Gambar 18. Biakan murni bakteri kelompok pseudomonad fluorescent (menghasilkan pigment fluorescent / hijau kekuningan hasil isolasi dari tanah rizosfer dilihat di bawah lampu UV

II. Isolasi Bakteri Endofit

Bahan : tanaman sehat di sekitar tanaman sakit, aquades steril, media Nutrient Agar (NA) steril, alkohol 70%, sodium hipoklorit (NaOCl) 5%.

Alat : cawan Petri steril, pinset dan skalpel steril.

Cara Kerja

Isolasi bakteri endofit

Cara kerja isolasi bakteri endofit dilakukan menurut Purnawati *et al.*, (2018)

Bakteri endofit dapat diisolasi dari daun, batang dan akar dalam kondisi sehat dan segar. Isolasi bakteri endofit didahului dengan pengambilan sampel atau contoh tanaman sehat di lapangan. Adapun bagan alir isolasi bakteri endofit (Gambar 19, 20, dan 21).

Sterilisasi permukaan sampel tanaman (daun, batang, akar) dilakukan seperti pada Gambar 19



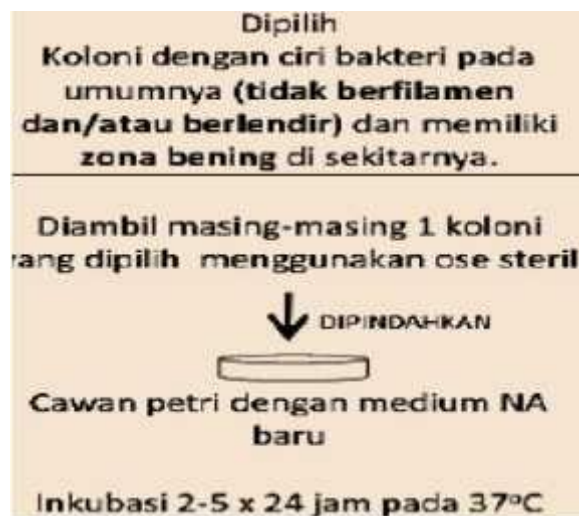
Gambar 19. Sterilisasi sampel tanaman

1. Sampel tanaman yang telah dipotong kecil-kecil selanjutnya diisolasi dengan cara pada Gambar 20



Gambar 20. Isolasi bakteri endofit

2. Pemurnian dan peremajaan bakteri endofit (Gambar 21).



Gambar 21. Pemurnian dan peremajaan bakteri endofit

3. Hasil pemurnian dan peremajaan diamati dan dicocokkan dengan buku Dasar-dasar Mikrobiologi dengan penulis Dwidjoseputro (2017) atau media internet dan dicatat pada Tabel 5.
4. Contoh hasil isolasi bakteri endofit (Gambar 22).



Gambar 22. Isolat bakteri endofit pada medium NA umur 24 jam (Purnawati *et al.*, 2018)

Tabel 5. Hasil isolasi bakteri endofit

No	Isolasi Dari	Bentuk Koloni	Warna Koloni	Wajah Koloni	Permukaan Koloni	Keterangan
1	Daun					
2	Batang					
3	Akar					
4						
5						

Identifikasi bakteri endofit

Bahan : biakan murni bakteri endofit, media NA dan King's B steril, H₂O₂, aquades steril, alkohol 70 %, larutan kristal violet (Gram A), larutan Yodium (Gram B), larutan alkohol 96 % (Gram C), larutan safranin (Gram D), spiritus, umbi kentang.

Alat : gelas benda, gelas penutup, mikroskop, lampu Bunsen, jarum Ose, tabung reaksi, cawan Petri.

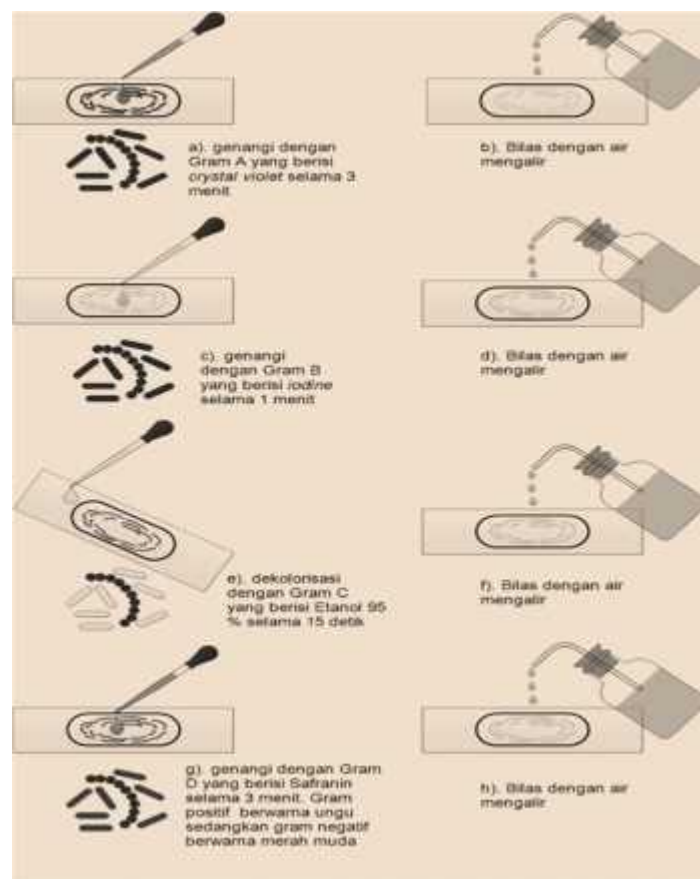
Cara Kerja :

Pengujian fisiologi dan biokimia

I. Pewarnaan Gram

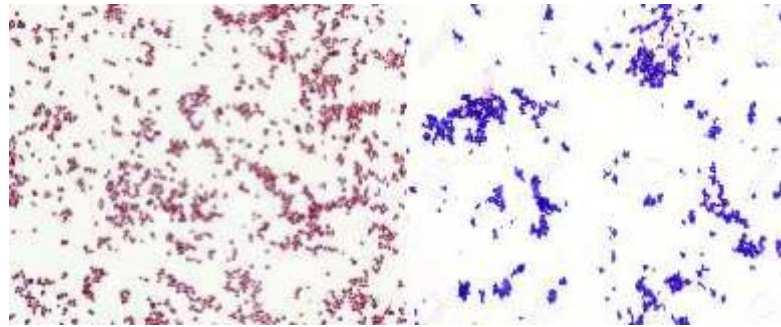
Cara kerja pewarnaan Gram dilakukan menurut Hadioetomo (1985) pada Gambar 23 :Siapkan biakan bakteri endofit umur 48 jam.

1. Bersihkan gelas benda dengan alkohol 70% kemudian fiksasi di atas lampu Bunsen, ambil isolat bakteri endofit menggunakan Ose, letakkan di atas gelas benda dan fiksasi kembali di atas lampu Bunsen.



Gambar 23. Cara kerja Pewarnaan Gram

1. Teteskan larutan Gram A (kristal violet) 2-3 tetes selama 1 menit, kemudian cuci dengan air steril dan keringkan.
2. Teteskan larutan Gram B (yodium) selama 1 menit, cuci dengan air steril dan keringkan.
3. Teteskan larutan Gram C (Alkohol 96 %) selama 30 detik, lalu cuci dengan air steril dan keringkan.
4. Teteskan larutan Gram D (safranin) selama 1 menit, lalu cuci dengan air steril dan kelebihan air hilangkan menggunakan kertas tisu.
5. Amati bentuk dan warna sel menggunakan mikroskop dengan perbesaran 400-1000x dan foto hasilnya. Bila warna sel ungu menunjukkan Gram positif, bila warna sel merah menunjukkan Gram negatif, contoh pada Gambar 24.

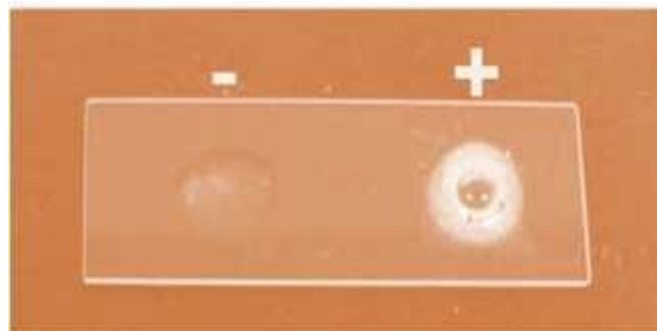


Gambar 24. Hasil pewarnaan Gram p. 1000x (Purnawati *et al.*, 2018)

II. Uji katalase atau reduksi hidrogen peroksida

Cara kerja pewarnaan Gram dilakukan menurut Schaad *et al.*, (2011)

1. Goreskan biakan bakteri yang telah berumur 48 jam pada gelas benda.
2. Teteskan H₂O₂ 5% pada gelas benda.
3. Tunggu selama 1-2 detik, bila terjadi gelembung udara, menunjukkan bahwa bakteri mereduksi H₂O₂ (katalase positif), contoh pada Gambar 25.



Gambar 25. Hasil uji katalase (Purnawati *et al.*, 2018)

4. Catat hasil pengamatan pada Tabel 6.

III. Uji Pigmentasi

Cara kerja uji pigmentasi dilakukan menurut Petcharat dan Duangpaeng (2012)

1. Goreskan (*streak*) koloni bakteri endofit berumur 48 jam pada media King's B, lalu inkubasikan selama 24-48 jam pada suhu 37⁰C.
2. Amati warna pendarnya atau fluorescent koloni (warna pigmen biru kehijauan) di bawah sinar UV dengan panjang gelombang 366 nm, contoh pada Gambar 26.
3. Catat hasil pengamatan pada Tabel 6.

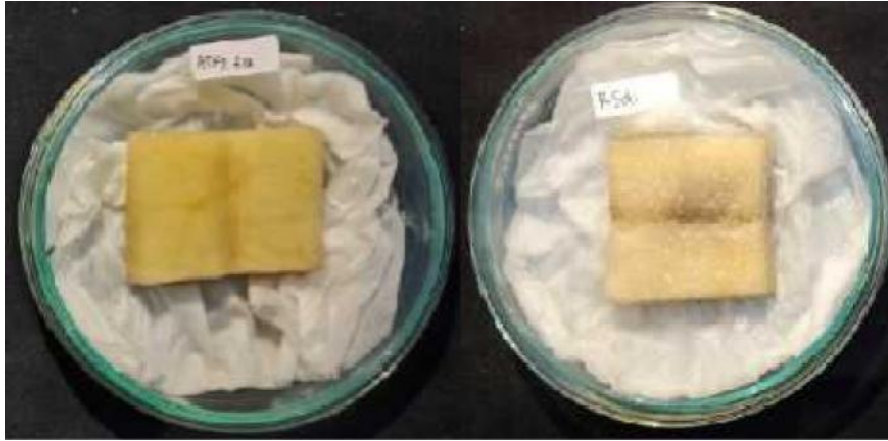


Gambar 26. Hasil uji pigmentasi (Purnawati *et al.*, 2018)

IV. Uji busuk lunak (soft rot) pada umbi kentang (Lelliot dan Stead, 1987) Cara

kerja uji pigmentasi dilakukan menurut Lelliot dan Stead (1987)

1. Potong kotak- kotak umbi kentang sehat dengan ukuran 5 x 3 x 1 cm dan pada bagian tengah permukaan kentang buat parit kecil.
2. Masukkan dua lembar kertas tisu steril ke dalam cawan Petri dan tetesi dengan aquades steril sampai terlihat agak basah namun tidak menggenang untuk menjaga kelembaban.
3. Cuci kentang menggunakan alkohol 70% lalu pindahkan ke aquades steril sebanyak dua kali, keringkan menggunakan kertas tisu steril dan letakkan kentang tersebut dalam cawan Petri.
4. Inokulasikan isolat bakteri endofit umur 24-48 jam dengan cara goreskan koloni bakteri ke bagian parit di tengah permukaan kentang.
5. Inkubasikan pada suhu 37⁰C selama Setelah 48 jam dan amati terjadinya gejala busuk lunak pada kentang tersebut, bila reaksi (-) atau tidak terjadi busuk lunak pada umbi kentang artinya bakteri endofit tidak bersifat sebagai patogen, contoh pada Gambar 27.



Gambar 27. Hasil uji soft rot (Purnawati *et al.*, 2018)
(a) tidak busuk, (b) busuk

6. Catat hasil pengamatan pada Tabel 6.

Tabel 6. Hasil identifikasi bakteri endofit

No	Uji Pewarnaan Gram (+/-)	Uji Katalase (+/-)	Uji Pigmentasi (+/-)	Uji Busuk Lunak pada Umbi Kentang (+/-)	Keterangan
1					
2					
3					
4					
5					
6					
7					

IX. UJI ANTAGONIS SECARA *IN VITRO*

Pendahuluan

Bakteri antagonis diperoleh dengan suatu metode yang didasarkan pada antibiosis di laboratorium sehingga hanya bakteri yang mampu mengeluarkan senyawa penghambat pertumbuhan saja yang dapat dideteksi. Cara yang demikian tidak memungkinkan didapatkan bakteri antagonis yang bersifat kompetitif atau hiperparasitisme. Menurut Cook dan Baker (1983), tidak selalu ada korelasi positif antara daya hambat di laboratorium dengan penekanan penyakit di rumah kaca maupun di lapangan.

Telah banyak dilaporkan bahwa bakteri rizosfer yang termasuk dalam kelompok *Pseudomonad fluorescent* dapat menekan pertumbuhan patogen tumbuhan baik jamur maupun bakteri (Fukui *et al.*, 1994); Trigalet *et al.*, 1994). Bakteri *Pseudomonad fluorescent* merupakan bakteri pengkoloni akar yang agresif dan efektif (Balton *et al.*, 1993). Faktor lain yang mendukung sifat mengkoloninya adalah kemampuannya membentuk berbagai senyawa penghambat pertumbuhan seperti HCN, monoacetylphloroglucinol, siderofor, 2,4-diacetylphloroglucinol, puoluserin, asam salisilat (Defago *et al.*, 1990), pyrrolnitrin, altericidins dan cepacin (Homma *et al.*, 1989). Peran masing-masing senyawa sangat bergantung pada strain penghasil, misalnya siderofor merupakan faktor utama yang menentukan antagonisme strain 3551 terhadap *Pythium* spp. (Loper, 1988), sedangkan bagi strain HV 37a antibiotik oomycin A merupakan faktor utama yang menentukan antagonisme terhadap patogen yang sama (Gutterson, 1990).

Mulya *et al.*, (1992) melaporkan bahwa beberapa strain *pseudomonad fluorescent* yang diisolasi dari berbagai rizosfer tanaman terung-terungan bersifat antagonis terhadap berbagai strain *P. solanacearum*. Kedua jenis senyawa aktif di atas yaitu antibiotik dan siderofor diduga diproduksi oleh *P. fluorecens* Pf G 32 dan berperan dalam menekan pertumbuhan *P. solanacearum* Ps 27. Untuk mengetahui senyawa dari isolat *Pseudomonad fluorescent* dalam penelitian ini yang berperan dalam menekan pertumbuhan *Ralstonia solanacearum* harus dilakukan penelitian lebih lanjut

Cara uji antagonisme secara *in vitro* ini merupakan cara yang paling mudah dan cepat untuk menyeleksi ribuan strain bakteri antagonis. Selain itu banyak pula agensia hayati yang dikembangkan, didapatkan dari metode antibiosis (Fravel dan Larkin, 1996).

Tujuan

1. Melatih mahasiswa untuk dapat melakukan uji antagonistik secara *in vitro*
2. Memahami dan melakukan uji antagonistik secara *in vitro*

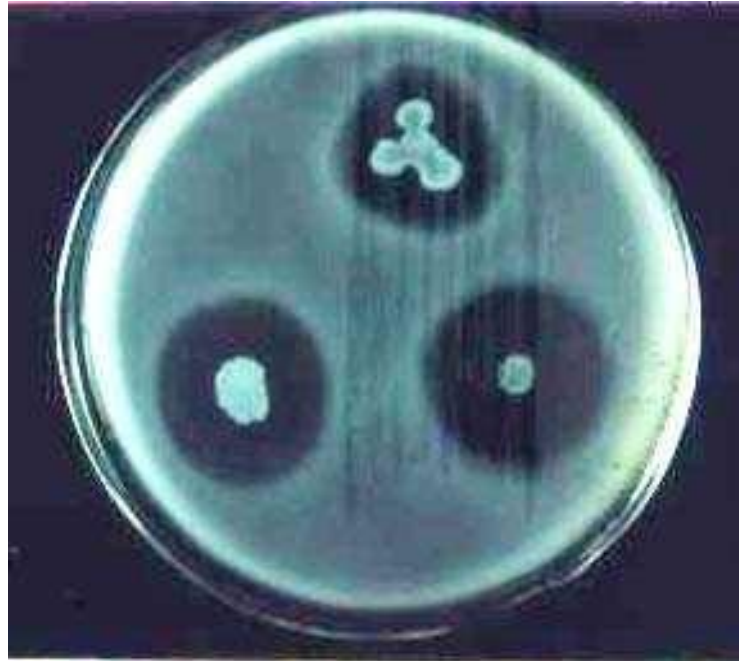
Bahan : tanah rizosfer, media King's B, aquades, alkohol

Alat : Alat penyuntik (Spet), jarum ose, Erlenmeyer, gelas ukur dll

Cara kerja

Pseudomonad fluorescent ditumbuhkan pada cawan Petri berisi medium King's B sebanyak tiga strain per cawan Petri. Setelah masa inkubasi selama 48 jam pada suhu 30⁰ C cawan petri dibalik dan pada tutupnya dituangi dengan 1 ml kloroform. Dua jam kemudian cawan Petri dibalik kembali pada posisi semula. Pada permukaan medium tersebut dituangkan suspensi *R. solanacearum* (0,2 ml suspensi air steril *R..solanacearum* dalam 4 ml 0,6% agar air pada suhu 45⁰ C).

Biakan diinkubasikan selama 24 jam pada suhu 30⁰ C kemudian zona hambatan yang terbentuk diukur. Strain yang mampu menghambat diuji sebanyak dua kali lagi dengan medium dan metode yang sama. Strain-strain yang konsisten menghambat pertumbuhan *R. solanacearum* secara *in vitro* kemudian disimpan. Hasil terbentuknya zona hambatan merupakan kemampuan menghambat bakteri PF terhadap bakteri patogen *Ralstonia solanacearum* (Gambar 28)



Gambar 28. Zona hambatan yang terbentuk merupakan kemampuan menghambat bakteri PF terhadap bakteri patogen *Ralstonia solanacearum*

X. UJI ANTAGONIS SECARA *IN VIVO*

Pendahuluan

Pengendalian biologi menggunakan mikroorganisme antagonis untuk meminimalkan penggunaan bahan kimia dalam sistem pengendalian terpadu penyakit tanaman, menjadi lebih penting akhir-akhir ini (Mao *et al.*, 1997; Papavizas *et al.*, 1984). Pengendalian biologi patogen terbawa tanah dengan bakteri dipelajari sebagai suatu alternatif atau pendekatan untuk melengkapi tindakan pengendalian fisika dan kimiawi, sudah lebih dari 70 tahun (Leeman *et al.*, 1995).

Di antara *Plant Growth Promoting Rhizobacteria* (PGPR), pseudomonad fluorescent mendapat banyak perhatian. Strain dari pseudomonad fluorescent tertentu menunjukkan kemampuannya dalam menekan perkembangan beberapa penyakit tumbuhan yang disebabkan oleh patogen terbawa tanah (Fukui *et al.*, 1994; Raaijmakers *et al.*, 1995; Schippers, 1992). Pada umumnya pseudomonad fluorescent yang telah diuji berasal dari kelompok *P. fluorescens* dan *P. putida* (Stolp & Gadkari, 1981). Penggunaan pseudomonad fluorescent untuk mengendalikan penyakit terbawa tanah semakin meningkat, hal itu antara lain karena bakteri tersebut mudah diisolasi, diidentifikasi, dan ditumbuhkan (Campbell, 1989; Weller, 1983). Banyak kelebihan yang dimiliki oleh bakteri pseudomonad fluorescent sebagai agensia pengendali biologi yang potensial yaitu antara lain kebutuhan nutrisi yang mudah, pengkoloni akar yang efektif, menghasilkan berbagai macam senyawa penghambat, dapat mengimbas ketahanan tanaman.

Pseudomonad fluorescent dapat dibedakan karena kemampuannya membentuk pigmen fluorescent pada medium yang kekurangan ion besi, misalnya medium King's B (Alabouvette, 1991; Xiao & Kisaalita, 1995). Di samping itu dasar pengelompokkan pada tingkat jenis adalah melalui uji gelatin. Pseudomonad fluorescent yang mempunyai kemampuan memecah gelatin adalah *Pseudomonas fluorescens*, sedangkan bakteri yang tidak mampu memecah gelatin adalah *Pseudomonas putida* (Palleroni, 1981).

Pengendalian biologi menggunakan mikroorganisme antagonis saja atau gabungan untuk meminimalkan penggunaan pestisida kimiawi dalam sistem pengendalian terpadu penyakit tanaman, menjadi lebih penting akhir-akhir ini (Papavizas & Lewis, 1989). Antagonistik bakteri dan jamur diaplikasikan sebagai perlakuan benih terutama

untuk pengendalian patogen terbawa tanah (Mao *et al.* 1997). Penyalutan benih dengan mikroorganisme antagonis melindungi benih dari patogen terbawa tanah (Windels, 1981). Mikroorganisme antagonistik mempunyai kemampuan untuk tumbuh dan berkembangbiak pada benih yang berkecambah, dan mengkoloni seluruh system perakaran atau rizosfer, sehingga akan lebih dapat berkompetisi dengan patogen di rizosfer (Mao *et al.* 1997).

Tujuan

1. Melatih mahasiswa untuk dapat melakukan uji antagonistik secara *in vivo*
2. Memahami dan melakukan uji antagonistik secara *in vivo*

Bahan : tanah rizosfer, media King's B, aquades, alkohol, tanaman inang

Alat : Alat penyuntik (Spet), jarum ose, Erlenmeyer, gelas ukur dll

Cara kerja

Uji antagonisme secara *in vivo*

Pseudomonad fluorescent yang memiliki zona hambatan besar (lebih dari 14 mm) ditumbuhkan pada medium King's B miring (Gambar 29) dan disuspensikan dalam akuades pada konsentrasi 10^9 cfu/ml (Gambar 30). Bibit tembakau yang berumur 40 hari dicelup akarnya dalam suspensi *pseudomonad fluorescent* selama 30 menit (Gambar 31) kemudian ditanam dalam pot yang berisi tanah yang terinfestasi *R. solanacearum* sebanyak enam bibit per pot (Gambar 32). Sebagai pembanding positif bibit tomat dicelup dalam air steril kemudian ditanam dalam pot berisi tanah steril. Pembanding negatif terdiri atas bibit tomat yang dicelup dalam air steril selama 30 menit dan ditanam dalam pot yang terinfestasi *R. Solanacearum*.

Berat serangan dihitung menurut skala sebagai berikut:

0 = tidak ada gejala, 2 = 11 s.d. 30% daun layu, 4 = 61 s.d 99 % daun layu

1 = 1 s.d. 10% daun layu 3 = 31 s.d 60% daun layu 5 = 100 % daun layu

Besarnya indeks penyakit dihitung dengan rumus (Arwiyanto, 1995):

Ket: I = indeks penyakit

$$I = \frac{\sum_{i=0}^k k.nk}{Z \times N} \times 100\%$$

- nk = jumlah tanaman yang bergejala sakit dengan skala k (0, 1, 2, 3, 4, 5)
 N = jumlah total tanaman yang diinokulasi
 Z = kategori serangan tertinggi.



Gambar 29. Koloni rhizobacteria pseudomonad fluorescens pada medium King's B, berpendar hijau kekuningan di bawah lampu UV (dok. Yenny Wuryandari)



Gambar 30. Suspensi bakteri dari biakan murni Bakteri Pseudomonad fluorescens 122 yang berumur 48 jam (dok. Yenny Wuryandari)



Gambar 31. Bibit tanaman cabai direndam dengan suspensi bakteri *Pseudomonas fluorescens* (dok. Yenny Wuryandari, 2014)



Gambar 32. Tanaman yang telah direndam bakteri PF ditanam dalam pot yang berisi tanah yang terinfeksi *R. solanacearum* sebanyak enam bibit per pot

DAFTAR PUSTAKA

- Arwiyanto, T. 1995. Strategi pengendalian penyakit layu bakteri tembakau cerutu di Sumatera Utara secara terpadu. *Ekspose hasil penelitian Tembakau Deli IV, Medan*. 34 p.
- Campbell, R. 1989. *Biological Control of Microbial Plant Pathogens*. Cambridge University Press. Cambridge. 218 p.
- Cook, R.J & Baker 1983. *The Nature and Practice of Biological Control of Plant Pathogen*. APS Press, St. Paul, Minnesota. 539 p.
- Defago, G; C.H. Berling; U. Burger; D. Haas; G. Kahr; C. Keel; C. Vostard; P. Wirthner; & B. Wurthrich. 1990. Suppression of Black root of Tobacco and Other Root Disease by Strain *Pseudomonas fluorescens* : Potensial Application and Mechanisms. p. 75-81. In : D. Hornby (ed.). *Biological Control of Soilborne Plant pathogens*. CAB international Wallingford.
- Dwidjoseputro, D. 1985. *Dasar-dasar Mikrobiologi*, Djambatan. Jakarta
- Fahy, P.C. dan G.J. Persley. 1983. *Plant Bacterial Diseases*. Academic Press. Toronto.
- Fravel, D.R. & Larkin, R.P. 1996. Availability and Application of Biocontrol Products. *Biol. Cult. L Tests For Control of Plant Disease*. 11 : 1-7.
- Fukui, R., Schroth, M.N., Hendson, M. & Hancock, J.G. 1994. Interaction between Strain of *Pseudomonas* in Sugar Beet Spermosphere and Their Relationship to Pericarp Colonization by *Pythium ultimum* in Soil. *Phytopathology* 84: 1330-1332.
- Goto, M. 1992. *Fundamental of Bacterial Plant Pathology*. Academic Press, Tokyo. 342 p.
- Gutterson, N. 1990. Microbial Fungicides: Recent approach to Elucidating Mechanism. *Crit. Rev. Biotechnol.* 10: 69 -91.
- Hadioetomo, R.S. 1990. *Dasar-dasar Mikrobiologi*, PT. Gramedia. Jakarta.
- Homma, Y. ; Z. Sato; F. Hirayama ; K.Kohno ; H. Shirahama and T. Suzui. 1989. Production of Antibiotic by *Pseudomonas cepacia* as an Agent for Biologic Control of Soilborne Plant Pathogens. *Soil Biol. Biochem.* 21. 723 - 728.
- Jutono, J. Soedarsono, S. Hartadi, S. Kabirun, Suhadi, Soesanto. 1980. *Pedoman Praktikum Mikrobiologi UITIUITI*. Depart. Mikrobiologi. Fak. Pertanian. UGM Yogyakarta.

- Klement, Z.; Mavridis, A.; Rudolph, K.; and Vivader, A. 1990. Inoculation of Plant Tissues. In : Z. Klement, K. Rudolph & D.C. Sands (eds.). Methods in Phytobacteriology. Akademiai Kiado. Budapest. 101-102.
- Kumala, S., Agustina, E., Wahyudi, P. 2007. Uji Aktivitas Antimikroba Metabolit Sekunder Kapang Endofit Tanaman Trengguli (*Cassia fistula* L.). Jur. Bahan Alam Indonesia, 6 (2) : 46-48.
- Leeman, M., Van Pelt J.A, Den Ouden, F.M., Heinsbroek, M., Bakker, P.A.H.M., dan Schippers, B. 1995. Introduction of systemic resistance against Fusarium wilt of radish by lipopolysaccharides of *Pseudomonas fluorescens*. Phytopathology. 85:1021-1027
- Lelliot R.A., and D.E. Stead. 1987. Methods for the Diagnosis of Bacterial Disease of Plant. Blackwell Scientific Publ. London. Petrini O. 1991. Fungal endophytes of tree leaves. Di dalam : Andrews J.A., S.S., Hirano (ed.). Microbial ecology of leaves. Springer. hlm 179-197.
- Loper, J. F. 1980. Role of Fluorecent Siderophore Production in Biological Control of *Pythium ultimum* by a *Pseudomonas fluorescen* Strain . *Phytopathology*. 78 : 166 – 172 .
- Mao, W., Lewis, J.A., Hebbar, P.K., & Lumsden, R.D. 1997. Seed Treatment with a Fungal or a Bacterial Antagonist for Reducing Corn Damping-off Caused by Species of *Pythium* and *Fusarium*. *Plant Dis*. 82: 450-454.
- Mulya , K. 1997. Penekanan perkembangan Penyakit Layu Bakteri Tomat oleh *Pseudomonas fluorescens* PfG 32. Journal Hortikultura 7 (2); 685 - 691
- Palleroni, N.J. 1981. Introduction to the Family Pseudomonadaceae. In : M. P. Starr (eds.). The Prokaryotes A Hand Book on Habitats, Isolation, and Identification of Bacteria : Phytopathogenic Bacteria. University of California. New York. 655-660.
- Palleroni, N.J. 1984. Pseudomonad. p. 141-199. In: Krieg, N.R. & Holt, J.G. (eds.). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Vol. I. Williams & Wilkins. Baltimore.
- Phetcharat, P., A. Duangpaeng. 2012. Screening of endophytic bacteria from organic rice tissue for indole acetic acid production. *Procedia Engineering* 32 : 177-183.
- Purnawati, A., N. Rahmadhini, E. Syafriani. 2018. Eksplorasi bakteri endofit potensial dari tanaman pertanian dataran rendah terhadap *Ralstonia solanacearum*. Laporan Riset Unggulan Keilmuan (RUK). 20 hal.

- Raaijmakers, J.M., Leeman, M., Van Oorschot, M.M.P., Van der Sluis, I., Schipper, B., & Bakker, P.A.H.M. 1995. Dose-response relationships in biological control of fusarium wilt of radish by *Pseudomonas* spp. *Phytopathology* 85: 1075-1081.
- Sands, D.C.1990. Physiological Criteria. Determinative Tests. In: Methods in Phyto-bacteriology, Z. Klement K. Rudolph and D.C.Sands. (eds.) Akademiai Kiado.Budapest. 134 – 141.
- Schaad, N., J. Jones dan W. Chun. 2001. *Laboratory Guide for the Identification of Plant Pathogenic Bacteria*, 3rd edition. APS Press. Amerika. 71 hal.
- Schippers, B. 1992. Prospects for management of natural suppressiveness to control soilborne pathogens. p.21-34. In: Tjamos, E.C., Papaviras,G.C. & Cook, R.L.(eds.). *Biological control of plant diseases. Progress and challenges for the future*. Plenum Press, New York & London.
- Semangun, H. 1991. *Penyakit-penyakit Tanaman Perkebunan Indonesia*. Gadjah Mada University Press. Yogyakarta. 808p.
- Stolp, H & Gadkari, D. 1981. Nonpathogenic Members of The Genus *Pseudomonas*. p . 723-729. In: Starr, M.P. (eds.). *The Prokaryotes A Handbook On Habitats, Isolation and Identification of Bacteria: Phytopathogenic Bacteria*. University of California, New York.
- Tjuk Suwartijah. 1997. Penuntun Praktikum Bakteriologi. Fak. Pertanian. Univ. Brawijaya. Malang.
- Trigalet, A., P. Frey & D. Trigalet-Demery. 1994. Biological Control of Bacterial Wilt Caused by *Pseudomonas solanacearum* : State of the Art and Understanding. P. 225-233. In : Bacterial Wilt. The Disease and Its Causative Agent *Pseudomonas solanacearum*. CAB. International. Wallingford. UIC.
- Weller, D.M. 1983. Colonization of wheat roots by a fluoerescent pseudomonad suppressive to take-all. *Phytopathology* 73: 1548 – 1553.
- Weller, D.M. 1988. Biological Contrl of Soilborne Plant Pathogens in The Rhizosphere with Bacteria. Agricultural Research Service. US Department of Agriculture Pullman. Washington. 379-407 hal.
- Wuryandari, Y; Purnawati, A.; Arwiyanto, T; Hadisutrisno, B. 2007. Pengaruh *Pseudomonad* fluoresen Terhadap Perkembangan Penyakit Layu *Ralstonia solanacearum* di Rumah kaca. Jurnal Saintek Kopertis Wilayah VII. Jawa Timur. Vol.4. No.2: 48-52.
- Wuryandari, Y; Purnawati,A.;Arwiyanto,T; Hadisutrisno, B. 2008a..Kemampuan Antagonistik Beberapa Isolat *Pseudomonad* fluoresen Terhadap *Ralstonia solanacearum* Penyebab Penyakit Layu Pada Tanam\ n Tomat.Jurnal Pengendalian Hayati. Univ Jember.Vol.1.No1

Wuryandari, Y; Wiyatiningsih, S& Sulistyono, A. 2012. Induksi Pertumbuhan dan Ketahanan Tanaman Cabai Terhadap Penyakit Utama Layu *Ralstonia solanacearum* dan *Fusarium oxysporum* menggunakan Rhizobacteria. Lap Pen. Strategis Nasional. Dikti 2012. Jakarta