

3. BAHAN DAN METODE

3.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan mulai bulan Juni sampai Desember 2012 di rumah kaca Fakultas Pertanian Universitas Brawijaya Malang. Isolasi dan perbanyakan bakteri dilaksanakan di Laboratorium Bakteriologi Jurusan Hama dan Penyakit Tumbuhan, Fakultas Pertanian Universitas Brawijaya Malang.

3.2 Alat dan Bahan Penelitian

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini ialah spektrofotometer, cuvet, tabung reaksi, cawan petri, bunsen, jarum ose, scalpel, pinset, botol media, gunting, mikropipet, tabung *ependorf*, sprayer, laminar, pipet tetes, jarum suntik, ember, pot, gelas beaker, kertas label, *autoclave*, kapas, tisu steril, aluminium foil, dan penggaris..

Bahan-bahan yang digunakan ialah benih tomat varietas Betavila, media tanam steril, kompos, pupuk urea, fungisida, tanaman tomat yang terinfeksi layu bakteri di lapang, media Natrium Agar (NA), *Triphenyl Tetrazolium Chlorida* (TTC), spiritus, alkohol 70%, aquades, aquades steril, isolat bakteri *Ralstonia solanacearum*, tanaman tembakau sebagai tanaman indikator, *Streptomycin sulfat* 20%, pupuk cair akar dan daun.

3.3 Metode Penelitian

Metode penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) yang diuji pada tanaman tomat dengan 6 perlakuan, 3 ulangan dan jumlah tanaman yang digunakan setiap ulangan berjumlah 10 tanaman dengan keterangan sebagai berikut:

1. T1 : Kontrol (Aquades steril)
2. T2 : Pupuk cair daun 0,2%
3. T3 : Pupuk cair daun 2%
4. T4 : Pupuk cair akar 0,2%
5. T5 : Pupuk cair akar 2%
6. T6 : *Streptomycin sulfat* 20%

Istilah pupuk cair daun adalah pupuk cair yang diaplikasi pada daun, sedangkan pupuk cair akar adalah pupuk cair yang diaplikasi pada media tanam (disiram). Jenis pupuk cair yang diaplikasi melalui daun berbeda dengan yang diaplikasi melalui media tanam.

3.4 Variabel Pengamatan

Pengamatan yang dilakukan dalam penelitian ini adalah :

1. Masa Inkubasi dan Gejala Penyakit

Masa inkubasi ialah periode waktu dari inokulasi sampai munculnya gejala pada tanaman tomat. Pengamatan ini dilakukan dimulai dari satu hari setelah inokulasi sampai muncul gejala pertama pada tanaman tomat.

2. Persentase Penyakit Layu

Persentase penyakit layu bakteri dihitung setiap 3 hari sekali dengan rumus seperti yang dikemukakan Wang (1998) :

$$P = a/b \times 100\%$$

Keterangan :

- P : Persentase penyakit layu bakteri
a : Jumlah tanaman yang terinfeksi layu bakteri
b : Jumlah tanaman yang diamati

3. Tinggi Tanaman

Tinggi tanaman diukur dari pangkal batang sampai ke ujung titik tumbuh tanaman dengan satuan pengukuran dalam centimeter (cm).

4. Jumlah Daun

Jumlah daun diperoleh dengan menghitung jumlah daun yang telah membuka sempurna dengan satuan pengukuran dalam helai.

5. Laju pertambahan tinggi tanaman dan jumlah daun

Laju pertambahan tinggi tanaman dan jumlah daun yang menunjukkan kemampuan tanaman mengalami pertumbuhan dalam parameter tinggi tanaman dan jumlah daun. Laju pertambahan tinggi tanaman dan jumlah daun dihitung berdasarkan pertambahan tinggi tanaman dan jumlah daun per satuan waktu.

$$\text{Laju pertambahan tinggi tanaman} = \frac{\text{Ln } H_2 - \text{Ln } H_1}{T_2 - T_1} \text{ (cm/hari)}$$

dimana: H = Tinggi tanaman (cm)

T = waktu (hari)

$$\text{Laju pertambahan jumlah daun} = \frac{\text{Ln } J_2 - \text{Ln } J_1}{T_2 - T_1} \text{ (helai/hari)}$$

dimana: J = jumlah daun (helai)

T = waktu (hari)

(FAO, 1980)

5. Jumlah Koloni Bakteri *R. solanacearum* dalam tanah

Perhitungan jumlah koloni bakteri *R. solanacearum* bertujuan untuk mengetahui jumlah populasi bakteri di dalam tanah yang dihitung di akhir pengamatan dengan metode pengenceran (*dilution plate count*).

3.5 Pelaksanaan Penelitian

3.5.1 Penanaman Benih Tanaman Uji

Benih tanaman yang digunakan dalam pengujian penelitian ini ialah benih tomat varietas Betavila. Benih disemai didalam *tray* yang sudah berisi tanah steril setelah itu bibit yang telah tumbuh dalam *tray* dipindah di dalam pot dengan media tanam yang digunakan ialah tanah dan kompos dengan perbandingan 1:1 yang telah disterilkan dengan metode solarisasi. Bibit siap dipindah tanamkan ketika tanaman sudah berumur 21 hari.

3.5.2 Isolasi dan Pemiakan Bakteri *R. solanacearum*

Inokulum bakteri *R. solanacearum* virulen diperoleh dengan mengisolasi tanaman tomat yang terinfeksi di lapang. Sebelum dilakukan isolasi, tanaman tomat yang terinfeksi layu bakteri dicuci dengan air bersih. Pada bagian perakaran dipotong melintang kemudian dimasukkan dalam aquades untuk melihat *ooze* (massa bakteri). Jika terlihat massa bakteri keluar, batang tanaman tomat dibersihkan bagian perakarannya dan dipotong pada bagian pangkal batang.

Potongan tersebut dicuci dengan alkohol 70% lalu dilanjutkan dengan direndam dalam aquades steril sebanyak 3 kali. Potongan tersebut dikering anginkan dan dicacah. Dalam cacahan tersebut ditambahkan aquades steril secukupnya ± 10 ml dan didiamkan selama ± 30 menit.

Suspensi yang mengandung bakteri *R. solanacearum* kemudian digoreskan dengan jarum ose pada media selektif 2,3,5 *Triphenyl Tetrazolium Chlorida* (TTC) dan diinkubasikan selama 1x24 jam pada suhu ruang ± 27 °C. Ciri-ciri koloni bakteri yang tumbuh di media selektif TTC ialah berbentuk bulat cembung, pinggir rata, berwarna putih susu kebasah-basahan dan tengahnya berwarna merah muda sampai merah.

Isolat murni yang diperoleh dari media TTC kemudian diambil koloni tunggal yang berwarna merah muda dengan tepi berwarna putih. Isolat bakteri pada media TTC yang virulen berbentuk bulat tidak teratur, fluidal, dan berwarna merah muda. Bakteri virulen kemudian diperbanyak pada media NA yang diinkubasikan pada suhu ruang selama 2x24 jam.

3.5.3 Identifikasi Bakteri *R. solanacearum*

Bakteri *R. solanacearum* yang telah diisolasi kemudian diidentifikasi. Uji yang dapat dilakukan yaitu dengan uji mikroskopis dan uji sifat fisiologi. Untuk mikroskopis dilakukan dengan pengecatan Gram, sedangkan untuk uji sifat fisiologi meliputi uji gram, uji Levan, uji pektinase, uji pigmen fluorescens, uji hipersensitif, dan uji patogenesis (Mulyati, 2007).

3.5.4 Aplikasi Pupuk Cair

Pemberian pupuk cair dengan konsentrasi 0,2% dan 2% dilakukan sehari sebelum tanaman diinokulasi dengan suspensi bakteri *R. solanacearum*. Pupuk cair yang diaplikasikan pada daun dilakukan dengan metode semprot menggunakan sprayer sebanyak 15 ml per tanaman, sedangkan pupuk cair yang diaolikasi mealui media tanam diaplikasi menggunakan metode siram sebanyak 30 ml per tanaman.

3.5.5 Inokulasi Tanaman Tomat

Bakteri *R. solanacearum* yang telah diinkubasikan selama 2x24 jam diambil dengan jarum ose ke dalam 10 ml aquades steril lalu dikocok dan diukur dengan

alat spektrofotometer diukur OD 600 = 1. Suspensi bakteri steril kemudian diencerkan pada kerapatan 10^{10} CFU ml⁻¹.

Selanjutnya tanaman tomat yang diinokulasi berumur 6 minggu setelah tanam dan tanah disekitar tanaman tomat dipotong 3 sisi untuk melukai akar tanaman, setelah itu cawan petri yang telah diisi dengan suspensi bakteri *R. solanacearum* ditempatkan dibawah pot dengan volume suspensi 20 ml. Penempatan cawan petri yang berisi larutan patogen dibawah pot agar patogen *R. solanacearum* bisa terserap dari bawah langsung melalui akar tanaman.

3.5.6 Pemeliharaan Tanaman

Pemeliharaan tanaman meliputi kegiatan pemupukan, penyiraman, pengendalian gulma serta pemberantasan hama dan penyakit.

1. Pemupukan dasar

Pemupukan dasar dilakukan untuk mendapatkan bibit yang baik, pemupukan dasar dilakukan saat tanam. Pupuk yang diberikan ialah pupuk urea. Pupuk urea dengan dosis 50 kg ha⁻¹ diberikan pada tanaman tomat sebanyak 2 kali. Pupuk urea sebanyak ½ dosis diberikan pada saat tanam dan ½ dosisnya lagi diberikan saat tanaman tomat berumur 21 hst.

2. Penyiraman

Penyiraman dilakukan dengan menggunakan gembor, dilakukan setiap pagi dan sore hari.

3. Pengendalian gulma

Pengendalian gulma dilakukan dengan mencabut gulma yang tumbuh di sekitar tanaman tomat.

4. Pengendalian hama dan penyakit

Pengendalian hama dan penyakit dilakukan dengan cara kimiawi yang disesuaikan dengan jenis hama dan penyakit yang menyerang.

3.5.7 Metode Perhitungan Kerapatan Bakteri *R. solanacearum*

Sampel tanah setiap perlakuan diambil @ 5 gram



Ditambahkan aquades steril 5 ml



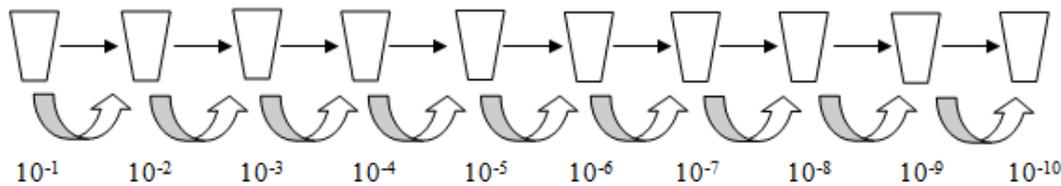
Diaduk tanah yang telah berisi aquades steril hingga rata



Diambil 100 μ L larutan tanah yang telah tercampur aquades steril



Dilakukan pengenceran 100 μ L larutan tanah dengan ditambahkan aquades steril pada cuvet hingga volume air dalam cuvet menjadi 1ml



Setelah dilakukan pengenceran kemudian diplatting di dalam LAFC pada media TTC dengan 2x ulangan menggunakan 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} dan 10^{-10} lalu direkatkan dengan menggunakan plastik wrap disekitar cawan petri



Diinkubasikan pada suhu ruang 2x24 jam



Dihitung koloni bakteri *R. solanacearum*

3.6 Analisis Data

Data pengamatan yang diperoleh dianalisis dengan menggunakan analisis ragam (uji F) pada taraf 5%. Bila hasil pengujian diperoleh perbedaan yang nyata maka dilanjutkan dengan uji perbandingan antar perlakuan dengan menggunakan uji Duncan pada taraf 5%.