

Uji Metode Inokulasi dan Kerapatan Populasi *Blood Disease Bacterium* pada Tanaman Pisang

Rustam

Balai Pengkajian Teknologi Pertanian Riau, Jl. Kaharuddin Nasution 341 Pekanbaru, Riau 28284
Naskah diterima tanggal 20 Desember 2006 dan disetujui untuk diterbitkan tanggal 6 September 2007

ABSTRAK. Penelitian ini bertujuan menguji beberapa metode inokulasi dan kerapatan populasi *blood disease bacterium* (BDB) dalam menimbulkan penyakit darah pada tanaman pisang. Metode inokulasi yang diuji adalah pelukaan akar, tanpa pelukaan akar, injeksi bonggol, dan masing-masing dengan kontrol. Sementara itu, kerapatan populasi BDB yang diuji adalah 10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 cfu/ml, dan kontrol. Hasil penelitian metode inokulasi BDB menunjukkan bahwa metode inokulasi injeksi dan metode inokulasi pelukaan akar mampu menimbulkan insidensi penyakit 100%. Metode inokulasi injeksi bonggol dapat menimbulkan gejala penyakit darah dengan masa inkubasi lebih cepat dibandingkan dengan metode inokulasi pelukaan akar. Hasil penelitian kerapatan populasi BDB menunjukkan bahwa kerapatan populasi BDB 10^4 - 10^7 mampu menimbulkan gejala penyakit darah dengan insidensi penyakit 20, 40, 60, dan 100% masing-masing untuk kerapatan populasi BDB 10^4 , 10^5 , 10^6 , dan 10^7 cfu/ml.

Katakunci: *Musa* sp.; *Blood disease bacterium*; Metode inokulasi; Kerapatan populasi.

ABSTRACT. Rustam. 2007. **Inoculation Methods and Inoculum Densities Tests of Blood Disease Bacterium on Banana.** An experiment was conducted to test of inoculation methods and inoculum densities of blood disease bacterium (BDB) on banana under a glasshouse condition. Inoculation methods of BDB tested were root wounding, root without wounding, corm injection, and control. Inoculum densities of BDB tested were 10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 cfu/ml and control. The results showed that corm injection and root wounding were gave similar disease incidence (100%). The incubation phase was faster for corm injection method than root wounding method. Inoculum densities of 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 cfu/ml of BDB could develop disease incidence of 20, 40, 60, and 100% , respectively.

Keywords: *Musa* sp.; Blood disease bacterium; Inoculation methods; Inoculum densities.

Tanaman pisang berpotensi dikembangkan dalam memenuhi kebutuhan konsumsi dalam negeri ataupun ekspor. Tanaman pisang dapat tumbuh dan berkembang pada berbagai kondisi agroekologi dari dataran rendah beriklim basah seperti di Sumatera dan Kalimantan, sampai ke dataran tinggi beriklim lebih kering di daerah-daerah Indonesia bagian timur.

Menurut Sequeira (1998), pengembangan tanaman pisang menghadapi bahaya dari penyakit darah lebih besar dibandingkan dengan penyakit pisang lainnya, seperti penyakit layu fusarium yang disebabkan oleh cendawan *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* dan penyakit sigatoka yang disebabkan oleh *Mycospharella fijiensis*. Hal tersebut disebabkan (i) semua jenis tanaman pisang yang dibudidayakan saat ini rentan terhadap patogen tersebut dan sumber-sumber ketahanan yang ada pada tanaman pisang tipe liar sangat terbatas, (ii) tingginya potensi penularan oleh serangga vektor, dan (iii) biaya pengendaliannya relatif mahal serta hanya dapat diimplementasikan dalam areal kerja yang luas.

Penyakit darah pada tanaman pisang disebabkan oleh *blood disease bacterium* (BDB) (Eden-Green dan Sastraatmadja 1990). Nama latin dari BDB masih belum ada kesepakatan, kadang-kadang disebut *Ralstonia solanacearum* (EF Smith) Yabuuchi *et al.* ras 2, walaupun nama ini tidak dianjurkan (Centre in Agricultural and Biological Institute 2003). Penyakit tersebut sejak tahun 1980-an hingga sekarang masih mewabah hampir di seluruh daerah sentra produksi pisang di Indonesia (Arwiyanto 1988, Eden-Green *et al.* 1988, Sumardiono *et al.* 1997, Kusumoto *et al.* 2004, dan Supriadi 2005). Pada tahun 2004, jumlah tanaman pisang yang terserang dilaporkan mencapai 2.116.829 rumpun (Departemen Pertanian 2005).

Gejala penyakit darah pada tanaman pisang biasanya ditunjukkan oleh pelepah daun melemah (*flaccid*) kemudian patah pada bagian pangkalnya sehingga daun terlihat patah menggantung. Warna daun menjadi kuning kemudian nekrosis dan kering. Kulit buah sering tampak normal, kadang-kadang ada yang tampak kuning terlalu awal dan menghitam. Kalau buah dipotong, bagian dalam

buah kelihatan berwarna merah kecoklatan atau menjadi busuk berlendir (Tjahjono dan Eden-Green 1988, Satari dan Sumarauw 1990, Eden-Green dan Sastraatmadja 1990).

Pengetahuan metode inokulasi dan kerapatan populasi BDB dalam menimbulkan penyakit pada tanaman pisang adalah cukup penting untuk pemulia tanaman dan ilmuwan penyakit tanaman. Untuk pemulia tanaman, pengetahuan tersebut berguna dalam menyeleksi (*screening*) ketahanan tanaman pisang terhadap BDB kemudian bagi ilmuwan penyakit tanaman berguna dalam mengetahui karakteristik patogenitasnya.

Tujuan penelitian adalah menguji beberapa metode inokulasi dan kerapatan populasi BDB dalam menimbulkan gejala penyakit darah pada tanaman pisang.

BAHAN DAN METODE

Penelitian dilakukan di Laboratorium Penyakit Tanaman Balai Penelitian Tanaman Obat dan Rempah Bogor, Laboratorium Bakteriologi Tumbuhan, dan Rumah Kaca Departemen Proteksi Tanaman, Fakultas Pertanian, Institut Pertanian Bogor. Penelitian berlangsung dari bulan Agustus 2004 sampai Juni 2005.

Sumber inokulum bakteri penyebab penyakit darah (BDB) pada tanaman pisang diisolasi dari tanaman pisang kepok yang menunjukkan gejala penyakit darah di daerah Bogor. Isolasi BDB dari contoh tandan pisang dilakukan dengan metode gores pada media sukrosa pepton agar, yang mengandung antibiotik polimiksin B-sulfat, kristal violet, dan tripenil tetrazolium klorida.

Isolat BDB yang diperoleh dimurnikan, diperbanyak, dan disimpan dalam akuades steril untuk digunakan dalam pengujian-pengujian berikutnya. Untuk memastikan bahwa isolat tersebut adalah BDB maka dilakukan karakterisasi berdasarkan beberapa pengujian, di antaranya: uji karakter kultur pada media SPA (Supriadi 1999) dan media TZC (Baharuddin 1994), uji reaksi Gram (Schaad *et al.* 2001), uji pembentukan pigmen fluoresens, reaksi oksidatif/fermentatif, hidrolisis arginin (Kerr 1980), uji reaksi hipersensitif, uji pembentukan bakteriofag (Supriadi 1997, 2003), dan uji patogenisitas (Supriadi 1999).

Metode Inokulasi

Penelitian metode inokulasi BDB yang dapat menyebabkan gejala penyakit darah pada tanaman pisang disusun menurut rancangan acak lengkap dengan 6 perlakuan dan 4 ulangan. Setiap ulangan terdiri atas 4 tanaman pisang. Macam perlakuannya adalah:

- A = Pelukaan akar dan penyiraman 25 ml suspensi BDB ke tanah di sekeliling perakaran
- B = Tanpa pelukaan akar dan penyiraman 25 ml suspensi BDB ke tanah di sekeliling perakaran
- C = Penginjeksian 2,5 ml suspensi BDB ke bonggol tanaman pisang
- KA = Pelukaan akar dan penyiraman 25 ml akuades steril ke tanah di sekeliling perakaran
- KB = Tanpa pelukaan akar dan penyiraman 25 ml akuades steril ke tanah di sekeliling perakaran
- KC = Penginjeksian 2,5 ml akuades steril ke bonggol tanaman pisang

Pelukaan akar dilakukan dengan cara memotong beberapa akar tanaman pisang pada dua sisi berlawanan di sekeliling perakaran kemudian suspensi BDB disiramkan di sekeliling perakaran tanaman pisang hingga membasahi bekas akar yang telah dilukai. Kerapatan populasi suspensi BDB yang diinokulasikan adalah 10^7 cfu/ml yang diperoleh dari hasil pengenceran suspensi BDB 10^8 cfu/ml ($OD_{600} = 0,1$).

Kerapatan Populasi

Penelitian kerapatan populasi suspensi BDB yang dapat menyebabkan gejala penyakit darah pada tanaman pisang disusun menurut RAL dengan 6 perlakuan dan 5 ulangan. Setiap ulangan terdiri atas 4 tanaman pisang. Perlakuan yang diberikan adalah kerapatan populasi suspensi BDB 10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 cfu/ml, dan kontrol. Masing-masing kerapatan populasi perlakuan diperoleh dengan cara mengencerkan (1/10) suspensi BDB 10^8 cfu/ml ($OD_{600} = 0,1$) secara berseri. Tanaman diinokulasi dengan cara melukai akar kemudian 25 ml suspensi BDB disiramkan di sekeliling perakaran tanaman pisang.

Penelitian metode inokulasi dan kerapatan populasi patogen menggunakan bibit pisang Cavendis hasil kultur jaringan, umur 2,5 bulan

setelah aklimatisasi yang diproduksi oleh Seameo-Biotrop Bogor. Tanaman pisang ditanam dalam pot yang telah diisi tanah dan pupuk kasting (3:1 = v/v). Penelitian dilakukan pada kondisi rumah kaca.

Pengamatan perkembangan gejala penyakit dilakukan pada bagian daun tanaman setiap hari, dengan mengamati saat munculnya gejala mengkerut, layu, penguningan, dan nekrosis. Setelah pengamatan perkembangan gejala penyakit selesai dilakukan, kemudian pengamatan insidensi penyakit dilakukan dengan menghitung jumlah tanaman pisang yang menunjukkan gejala penyakit darah. Tingkat kejadian penyakit dihitung menggunakan rumus :

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

P = insidensi penyakit layu (%)

a = jumlah tanaman yang menunjukkan gejala penyakit darah

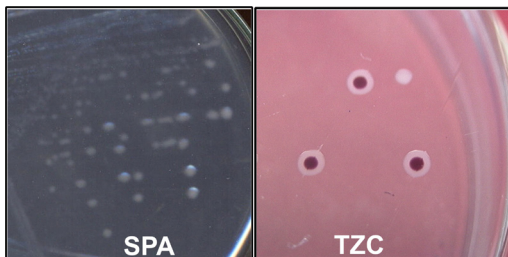
b = jumlah tanaman yang diamati

Data pengamatan dianalisis dengan sidik ragam dan uji selang ganda Duncan pada taraf 5%.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Karakterisasi Isolat BDB

Karakter koloni isolat BDB, seperti pada Gambar 1 dan Tabel 1, sesuai dengan karakter BDB yang dilaporkan peneliti sebelumnya, di antaranya koloni tumbuh lambat, berbentuk



Gambar 1. Performans koloni BDB pada media SPA dan TZC (Performance of BDB colony on SPA and TZC media)

bulat dengan ukuran kecil-kecil (0,5-3 mm), non-fluidal, agak lengket (*viscid*) (Baharuddin 1994 Supriadi 1999, Eden-Green dan Sastraatmadja 1990). Bakteri bersifat gram negatif, tidak berfluoresens pada media KBA, bersifat oksidatif, tidak menghidrolisis arginin, dan reaksi hipersensitifnya positif (Baharuddin 1994 dan Centre in Agricultural and Biological Institute 2003).

Hasil pengujian bakteriofag menunjukkan bahwa isolat BDB mengalami lisogenik yang ditandai oleh adanya zona bening dengan pinggiran tidak rata. Hasil ini mengindikasikan bahwa bakteri yang diisolasi dari contoh tanaman pisang adalah BDB. Supriadi (1997, 2003) melaporkan bahwa lisogenik merupakan sifat spesifik BDB yang dapat digunakan untuk mendeteksi isolat BDB dengan tingkat akurasi 90%. Sifat tersebut juga dapat digunakan untuk membedakan antara isolat BDB dan *R. solanacearum* yang pada media TZC menunjukkan performans koloni hampir mirip, yakni bagian tengah koloni berwarna merah dengan pinggiran berwarna putih.

Hasil pengujian patogenisitas isolat BDB terhadap tanaman pisang ternyata juga mampu menimbulkan gejala layu 18 hari setelah inokulasi (HSI). Hasil ini membuktikan bahwa isolat yang diisolasi dari contoh tanaman pisang adalah penyebab penyakit darah.

Tabel 1. Karakter morfologi dan fisiologi isolat BDB tanaman pisang (Morphological and physiological characters of BDB isolate on banana)

Karakter (Characters)	BDB
Koloni	Tumbuh lambat, ukuran kecil-kecil (2-3 mm), non-fluidal, dan <i>viscid</i>
Gram	-
Pigmen fluoresens	-
Uji O/F	+/-
Hidrolisis arginin	-
Reaksi hipersensitif	+
Produksi bakteriofag	+
Patogenisitas	+

Tabel 2. Metode inokulasi BDB terhadap perkembangan gejala penyakit darah pada tanaman pisang (*BDB inoculation methods on blood disease on banana*)

Metode inokulasi (<i>Inoculation methods</i>)	Perkembangan gejala (<i>Symptom</i>), HSI (<i>DAI</i>)			
	Melemah (<i>Flaccid</i>)	Layu (<i>Wilting</i>)	Penguningan (<i>Yellowing</i>)	Nekrosis (<i>Necrosis</i>)
A	9,25a	10,50a	11,75a	13,25a
B	-	-	-	-
C	6,75b	7,75b	8,25b	9,75b
KA	-	-	-	-
KB	-	-	-	-
KC	-	-	-	-

- = tanaman tidak bergejala.

Berdasarkan karakter kultur, fag, dan hasil uji patogenitasnya maka dapat disimpulkan bahwa isolat bakteri yang diisolasi dari tanaman pisang tersebut adalah BDB.

Metode Inokulasi

Hasil pengujian menunjukkan bahwa metode inokulasi BDB sangat menentukan terjadinya gejala penyakit darah pada tanaman pisang. Metode inokulasi pelukaan akar (perlakuan A) dan injeksi (perlakuan C) mampu menimbulkan gejala penyakit darah yang diawali oleh gejala melemah (*flaccid*), layu, menguning, dan akhirnya nekrosis/mati.

Metode inokulasi injeksi (perlakuan C) lebih cepat menimbulkan gejala penyakit darah dibandingkan dengan metode inokulasi pelukaan akar (perlakuan A) (Tabel 2), namun demikian kedua metode inokulasi tersebut ternyata mampu menimbulkan insidensi penyakit 100%.

Pada metode inokulasi injeksi, patogen secara langsung diinjeksikan ke dalam jaringan bonggol tanaman pisang sehingga tidak melalui tahapan proses infeksi alami, sedangkan pada metode inokulasi pelukaan akar, suspensi patogen disiramkan di sekeliling perakaran tanaman sehingga patogen masih berada di luar permukaan tanaman dan harus melalui semua tahapan proses infeksi agar dapat menimbulkan gejala penyakit. Tahapan proses infeksi alami oleh bakteri patogen adalah perpindahan patogen ke jaringan tanaman, pengenalan, dan kontak

patogen dengan inang, penetrasi dan kolonisasi patogen dalam jaringan tanaman (Goodman *et al.* 1986). Di dalam jaringan pembuluh tanaman, massa bakteri dan faktor-faktor virulensinya dapat mengganggu translokasi air dan zat-zat makanan dari bagian akar (bawah) ke bagian atas tanaman. Pada kondisi yang parah dapat menimbulkan kelayuan dan kematian pada tanaman (Klement *et al.* 1990).

Kerapatan Populasi

Hasil pengujian menunjukkan bahwa kerapatan populasi BDB 10^7 - 10^4 mampu menimbulkan gejala penyakit darah pada tanaman pisang (Tabel 3), namun persentase insidensi penyakit tiap perlakuan kerapatan populasi adalah berbeda. Perlakuan kerapatan populasi BDB 10^7 mampu menimbulkan insidensi penyakit 100% sedangkan pada kerapatan populasi 10^6 , 10^5 , dan 10^4 hanya mampu menimbulkan insidensi penyakit masing-masing sebesar 60, 40, dan 20% (Gambar 2).

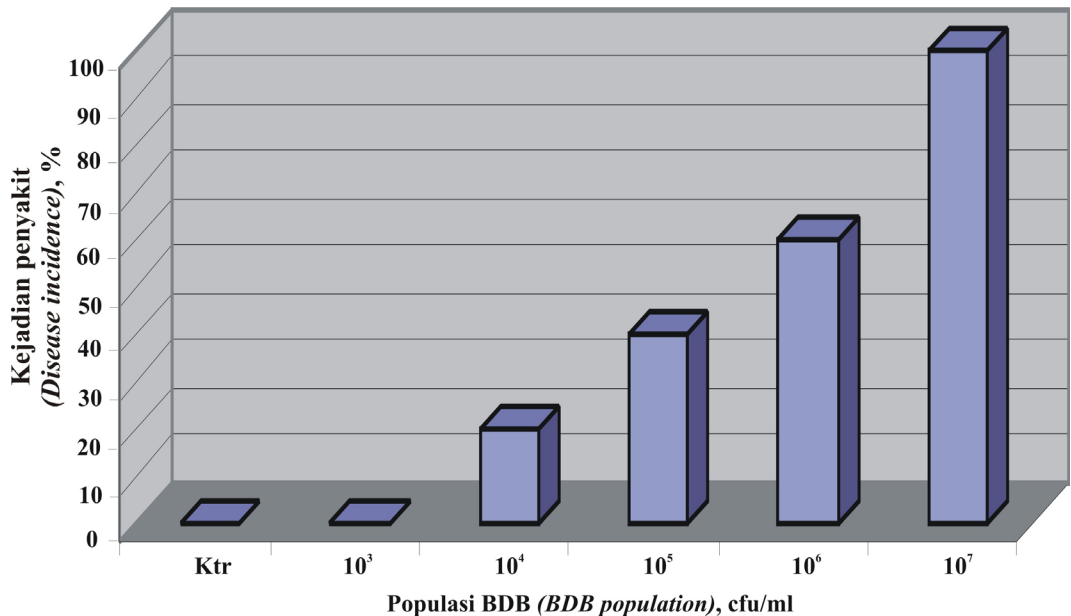
Munculnya gejala penyakit pada perlakuan kerapatan populasi 10^4 - 10^7 dalam penelitian ini ternyata sama dengan yang dilaporkan Baharuddin (1994), meskipun dengan metode inokulasi yang berbeda. Menurut Baharuddin (1994), bahwa inokulasi BDB dengan metode injeksi, kerapatan populasi 10^4 - 10^8 dapat menimbulkan gejala penyakit darah, sedangkan pada kisaran kerapatan populasi 10^0 - 10^3 tidak mampu menimbulkan gejala penyakit darah pada tanaman pisang.

Tabel 3. Kerapatan populasi BDB terhadap perkembangan gejala penyakit darah pada tanaman pisang (*BDB densities on blood disease on banana*)

Kerapatan populasi BDB (<i>BDB densities</i>)	Perkembangan gejala (<i>Symptom</i>), HSI (<i>DAI</i>)			
	Melemah (<i>Flaccid</i>)	Layu (<i>Wilting</i>)	Penguningan (<i>Yellowing</i>)	Nekrosis (<i>Necrosis</i>)
10 ⁷	8,2a	9,0a	10,2a	11,2a
10 ⁶	8,3a	9,0a	10,3a	12,3a
10 ⁵	9,0a	9,5a	10,5a	12,5a
10 ⁴	11,0a	12,0a	13,0a	14,0a
10 ³	-	-	-	-
Kontrol	-	-	-	-

Rerata selanjur yang diikuti oleh huruf yang sama tidak berbeda nyata (uji selang ganda Duncan, $\alpha = 0,05$)

- = tanaman tidak bergejala.



Gambar 2. Pengaruh kerapatan populasi BDB terhadap insidensi penyakit darah pada tanaman pisang (*Affects of BDB densities on blood disease incidence on banana*)

KESIMPULAN

1. Metode inokulasi injeksi dan metode inokulasi pelukaan akar mampu menimbulkan kejadian penyakit 100%. Metode inokulasi injeksi bonggol dapat menimbulkan gejala penyakit darah dengan masa inkubasi lebih cepat dibandingkan dengan metode inokulasi pelukaan akar.
2. Kerapatan populasi BDB 10⁴-10⁷ mampu menimbulkan gejala penyakit darah dengan kejadian penyakit 20, 40, 60, dan 100% masing-masing untuk kerapatan populasi BDB 10⁴, 10⁵, 10⁶, dan 10⁷ cfu/ml.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih disampaikan kepada Bapak DR. Ir. Budi Tjahjono, MAgr, DR. Ir. Supriadi, MSc, dan DR. Ir. Widodo, MS atas kontribusinya dalam penyusunan makalah ini.

PUSTAKA

1. Arwiyanto, T. 1988. Identifikasi Penyebab Penyakit Bakterial Pada Tanaman Pisang di Yogyakarta. *Prosiding Perhimpunan Fitopatologi Indonesia*; Jakarta, 29-31 Okt 1985. Jakarta: Perhimpunan Fitopatologi Indonesia.
2. Baharuddin. 1994. *Pathological, Biochemical and Serological Characterization of the Blood Disease Bacterium Affecting Banana and Plantain (Musa spp.) in Indonesia*, Ph.D dissertation. Gottingen: Cuvillier.

3. Centre in Agricultural and Biological Institute. 2003. *Crop Protection Compedium* [cd-rom]. London:CABI Publish.
4. Departemen Pertanian. 2005. *Luas Serangan OPT Utama Tanaman Pisang*. <http://www.deptan.go.id/ditlinhorti/> [22 April 2005].
5. Eden-Green, S.J., Supriadi, dan S.Y. Hartati. 1988. Characteristics of *Pseudomonas celebensis*, the Cause of Blood Disease of Bananas in Indonesia. *Proceedings of The 5th International Congress of Plant Pathology*; Kyoto, 20-27 August 1988.
6. _____ and A.H. Sastraatmadja. 1990. Blood Disease Bacterium Present in Java.
7. Goodman, R.N., Z. Kiraly, K.R., Wood. 1986. *The Biochemistry and Physiology of Plant Disease*. Missouri: University of Missouri Press. *FAO Buletin* 38:49-90.
8. Kerr, A. 1980. Bacteria and Mycoplasmas as Plant Parasites. In. J.F. Brown (Ed.). *A Course Manual in Plant Protection*. Brisbane: Australian Vice-chancellors' committee. p. 133-143.
9. Klement, Z., K. Rudolph, and D.C., Sands. 1990. Inoculation of Plant Tissues. In. Z. Klement, K. Rudolph, and D.C. Sands (Eds.). *Methods in Phytobacteriology*. Academiai kiado: Budapest.
10. Kusumoto, S., T.N., Aeny, S. Mujimu, C. Ginting T. Tsuge, S. Tsuyumu, and Y. Takikawa. 2004. Occurrence of Blood Disease of Banana in Sumatera, Indonesia. *J. Gens Plant Pathol* 70:45-49.
11. Satari, U.S. dan I.O., Sumarauw. 1990. Penyakit Layu Bakteri pada Pisang di Daerah Bogor dan Sekitarnya. *J. Fitopatol* 3 (1):53-55.
12. Schaad, N.W., J.B., Jones, and W. Chun. 2001. *Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria*. Ed ke-3. St Paul: APS Press.
13. Sequeira, L. 1998. Bacterial wilt: the Missing Element in International Banana Improvement Programs. In. P.H. Prior, C. Allen, and J.E. Elphinstone, (Eds.). *Bacterial Wilt Disease, Molecular and Ecological Aspects*. Gosier, 22-27 Jun 1997. Berlin: INRA. p. 6-14.
14. Sumardiono, C., S. Subandiyah, S. Sulandari, dan T. Martoredjo. 1997. Peningkatan Ketahanan terhadap Penyakit Layu Bakteri (*Pseudomonas solanacearum*) Pisang dengan Radiasi Kultur Jaringan. *Prosiding Perhimpunan Fitopatologi Indonesia*; Palembang, 27-29 Okt 1997. Palembang: Perhimpunan Fitopatologi Indonesia.
15. Supriadi. 1997. Bacteriophage Typing of *Ralstonia solanacearum*, *Pseudomonas syzygii*, and Blood Disease Bacterium of Banana. *Hayati* 4(3):72-76.
16. _____. 1999. Karakterisasi Kultur dan Patogenisitas Isolat *Pseudomonas celebensis* Penyebab Penyakit Darah pada Tanaman Pisang. *J. Hort.* 9(2):129-136.
17. _____. 2003. A Simple Methode for Distinguishing Isolates of Blood Disease Bacterium (BDB) from *Ralstonia solanacearum* Through Detection of Bacteriophage Production. *Austral Plant Pathol* 32:429-431.
18. _____. 2005. Present Status of Blood Disease in Indonesia. In. C. Allen, P. Prior, A.C. Hayward (Eds.). *Bacterial Wilt Disease and The Ralstonia solanacearum Species Complex*. St Paul: APS Press. p. 395-404.
19. Tjahjono, B. and S.J. Eden-Green. 1988. Blood Disease of Bananas in Indonesia, Abstrak. dalam: *Proceedings of the 5th International Congress of Plant Pathology*, Kyoto, 20-27 August 1988.