

### **III. BAHAN DAN METODE**

#### **3.1 Tempat dan Waktu Penelitian**

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Juli sampai dengan Desember 2014.

Isolasi dan karakterisasi penyebab penyakit dilakukan di Laboratorium Penyakit Tanaman, Jurusan Agroteknologi Bidang Proteksi Tanaman, Fakultas Pertanian Universitas Lampung. Pengambilan sampel tanaman sakit dilakukan di perkebunan PT Nusantara Tropical Farm.

#### **3.2 Bahan dan Alat**

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah aquades, media *Potato Dextrose Agar* (PDA), *Nutrient Agar* (NA), *yeast extract peptone dextrose agar* (YPD), *Tetrazolium Chlorida* (TZC), media Oksidatif-Fermentatif, minyak parafin, gliserol,  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , KOH 3%, kristal violet, yodium, safranin, alkohol, air steril, buah atau *crowns* nanas yang sehat, umbi kentang dan buah serta *crowns* nanas yang mengalami penyakit busuk buah. Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah cawan petri, autoklaf, gelas preparat, erlenmeyer, tusuk gigi, gelas ukur, tabung reaksi, jarum ose, timbangan digital, bunsen, nampan plastik, mikropipet, *rotamixer*, *Laminar Air Flow Hood*, kertas label, aluminium foil dan alat tulis.

### **3.3 Metode Penelitian**

Pelaksanaan penelitian ini terdiri dari dua tahap, yaitu tahap pertama berupa isolasi bakteri yang diambil dari jaringan buah atau *crown* nanas yang sakit untuk mendapat isolat-isolat murni. Tahap kedua penelitian ini adalah melakukan beberapa pengujian, antara lain uji gram dengan menggunakan KOH 3%, uji gram dengan teknik pewarnaan, uji virulensi dengan media Tetrazolium Chlorida (TZC), uji pembusukan pada umbi kentang, uji Oksidatif Fermentatif (O/F), uji selektif menggunakan media NGM dan uji patogenisitas pada buah untuk mengetahui karakteristik isolat bakteri yang diperoleh.

### **3.4 Pelaksanaan Penelitian**

#### **3.4.1 Isolasi penyebab busuk buah**

Sampel buah nanas yang mengalami penyakit busuk buah diambil dari perkebunan PT Nusantara Tropical Farm yang terletak di Kabupaten Lampung Timur Provinsi Lampung. Buah nanas yang terinfeksi menunjukkan ciri-ciri berupa busuk lunak dan keluar banyak cairan, terjadi perubahan warna kulit buah dan pada bagian yang busuk tersebut berbau tidak sedap (anyir) serta keluar gelembung udara. Apabila buah tersebut dibelah, maka tampak bagian dalam buah mengalami busuk basah berwarna coklat dan daging buahnya berongga (Gambar 2).



Gambar 2. Buah nanas yang mengalami busuk buah

Untuk keperluan isolasi, bagian buah dan crown yang sakit dipotong kecil dengan ukuran 2 x 2 mm, bagian yang diambil adalah batas antara tanaman sakit dan sehat sebanyak  $\pm$  10 potongan. Selanjutnya, potongan tersebut dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang steril, ditambah 5 cc air steril, lalu ditutup menggunakan *aluminium foil*, dan dihomogenkan menggunakan *rotamixer* selama beberapa menit. Hasil suspensi tersebut selanjutnya digoreskan pada media PDA menggunakan jarum ose, dan diinkubasikan pada suhu ruang selama 24-48 jam. Beberapa koloni yang tumbuh diisolasi kembali menggunakan media yang sama tetapi dengan metode penggoresan kuadran.

Selain menggunakan media PDA, isolasi kembali (*reisolasi*) juga dilakukan dengan menggunakan media *Nutrient Agar (NA)* dan media *Yeast Extract Peptone Dextrose Agar (YPD)*, masing-masing digunakan untuk menumbuhkan bakteri dan *yeast* (ragi).

### **3.4.2 Uji Gram menggunakan KOH 3%**

Uji gram menggunakan KOH 3% dilakukan untuk mengetahui jenis bakteri yang dibiakkan termasuk dalam kategori gram positif atau gram negatif. Uji dilakukan dengan cara mengambil 1-2 ose bakteri dan meletakkannya di atas gelas preparat kemudian ditetesi KOH 3% sebanyak 1-2 tetes dan dicampur-ratakan. Setelah itu, tusuk gigi steril ditempelkan pada campuran tersebut dan diangkat secara perlahan. Apabila terbentuk benang lendir yang tidak terputus, maka bakteri yang dibiakkan merupakan kategori bakteri gram negatif, namun apabila tidak terbentuk, maka bakteri tersebut termasuk kategori bakteri gram positif (Ryu, 1938 dalam Suslow dkk., 1982).

### **3.4.3 Uji gram dengan teknik pewarnaan**

Uji gram dengan teknik pewarnaan merupakan suatu uji yang digunakan untuk memastikan kelompok bakteri yang diamati merupakan kelompok bakteri gram positif atau gram negatif yang didasari oleh sifat kimia dan fisik dinding sel bakteri. Pewarnaan Gram dilakukan dengan meletakkan isolat bakteri menggunakan jarum ose pada gelas obyek, kemudian diberi dengan larutan kristal violet dan yodium secara bergantian selama beberapa menit dan dicuci dengan aquades, selanjutnya dicuci dengan alkohol dan ditetesi dengan larutan cat penutup safranin. Pengamatan dilakukan dengan menggunakan mikroskop, bakteri Gram positif akan nampak berwarna ungu, sedangkan Gram negatif berwarna merah (Cappuccino dan Sherman, 1983 dalam Purwohadisantoso dkk., 2009).

#### **3.4.4 Uji virulensi dengan media Tetrazolium Chlorida (TZC)**

Uji dengan media TZC digunakan untuk melihat pertumbuhan bakteri baik yang virulen maupun avirulen. Untuk membedakan koloni bakteri, dibuat suspensi dari 1 ose biakan bakteri yang dimasukkan ke dalam 5 ml air steril dan diencerkan sampai pengenceran  $10^{-8}$ , kemudian sebanyak 10  $\mu$ l suspensi bakteri ditebar ke media TZC dan diinkubasi pada suhu 28°C selama minimal 48 jam dan diamati bentuk koloninya (Kaneshiro dkk., 2008). Bakteri yang virulen koloninya berwarna putih dengan pusat/bagian tengahnya berwarna merah. Sebaliknya, bakteri yang avirulen memiliki ciri koloni tidak berlendir, berwarna merah (Gunawan, 2006).

#### **3.4.5 Uji pembusukan pada umbi kentang**

Masing-masing isolat bakteri diinokulasikan dengan cara digoreskan menggunakan jarum ose pada bagian tengah umbi kentang yang telah dicuci di air mengalir selama 35 menit untuk menghilangkan residu bahan kimia pada umbi kentang. Selanjutnya kentang tersebut diletakkan dalam cawan petri yang kemudian diberi air steril sebanyak 1 ml dan diinkubasi selama 2-3 hari. Reaksi positif ditunjukkan dengan terjadinya pembusukan pada bagian tengah kentang yang digores (Lelliot dan Stead, 1987 dalam Masnilah dkk., 2013).

#### **3.4.6 Uji Oksidatif Fermentatif (O/F)**

Uji ini dilakukan untuk mengetahui sifat aerob atau anaerob dari bakteri. Masing-masing bakteri diinokulasikan pada 5 ml media oksidatif-fermentatif sebanyak 2 tabung reaksi untuk setiap isolat. Satu ose bakteri ditusukkan pada

masing-masing media tersebut, pada tabung 1 ditutupi dengan minyak parafin sebanyak 1 ml, sedangkan pada tabung 2 tidak ditutupi dengan minyak parafin. Setelah diinkubasi selama 7-14 hari dilakukan pengamatan terhadap perubahan warna media dari hijau menjadi kuning pada masing-masing tabung. Apabila terjadi perubahan warna dari hijau menjadi kuning pada kedua media (dengan atau tanpa parafin), hal ini menunjukkan bahwa bakteri tersebut bersifat oksidatif dan fermentatif. Jika perubahan warna menjadi kuning hanya pada tabung yang diberi minyak parafin maka bakteri tersebut bersifat fermentatif. Sebaliknya jika terjadi perubahan warna kuning hanya pada tabung yang tidak diberi minyak parafin, hal ini menunjukkan bahwa bakteri tersebut bersifat oksidatif (Lelliot dan Stead, 1987 dalam Masnilah dkk., 2013).

#### **3.4.7 Uji selektif menggunakan media NGM**

Menurut An Lee dan Pin Yu (2006), media NGM merupakan media yang dikembangkan untuk membedakan bakteri *E. chrysanthemi* penyebab penyakit busuk buah nanas dari *Erwinia* spp. lainnya berdasarkan produksi pigmen biru Indigoidine. Media ini terdiri dari Nutrient Agar ditambah 1% Gliserol yang akan menginduksi produksi pigmen dan 2 mM  $MnCl_2 \cdot 4H_2O$  yang akan meningkatkan pengembangan warna. Biakan *E. chrysanthemi* yang tumbuh pada media NGM dicirikan dengan koloni yang berwarna coklat gelap sampai biru.

#### **3.4.8 Uji patogenesis pada buah nanas**

Uji ini dilakukan untuk mengetahui sifat isolat bakteri, apakah bersifat patogen atau tidak dengan cara menginokulasikan biakan bakteri tersebut pada tanaman

inang yang sehat. Inokulasi dilakukan dengan cara menyuntikkan suspensi biakan bakteri ke buah nanas yang sehat sebanyak 10 ml. Hasil uji patogenisitas dinyatakan positif apabila di sekitar area bekas suntikan pada buah nanas ditemukan gejala busuk buah bakteri seperti yang ditemukan pada buah nanas yang mengalami penyakit busuk buah bakteri di lapang sebelumnya.