

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

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

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Bioteknologi Fakultas Pertanian Universitas Lampung sejak Juli sampai dengan September 2015. Pengambilan sampel tanaman sakit dilakukan di perkebunan PT Nusantara Tropical Farm (NTF) di Kecamatan Way Jepara, Kabupaten Lampung Timur.

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

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah akuades, Media *nutrient agar* (NA), *yeast peptone agar* (YPA), *potato peptone glucose agar* (PPGA), media oksidatif/fermentatif, minyak parafin, gliserol, KOH 3%, telur, NaCl 0,9%, alkohol, air steril, umbi kentang, buncis, kacang panjang, tomat, bawang bombai, bawang daun, seledri, selada, tanaman nanas sehat, dan tanaman nanas yang mengalami penyakit busuk lunak.

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah cawan petri, autoklaf, jarum ose, bunsen burner, korek api, nampan plastik, tabung erlenmeyer, tabung eppendorf 1,5 ml, tusuk gigi, kapas, plastik wrap, gelas ukur, tabung reaksi, timbangan digital, pinset, mikropipet, *laminar air flow*, penggaris, kertas label, pisau, skapel, aluminium foil dan alat tulis.

### 3.3 Metode Penelitian

Pelaksanaan penelitian ini terdiri dari dua tahap, yaitu tahap pertama berupa isolasi dan karakterisasi bakteri penyebab penyakit busuk lunak tanaman nanas. Isolasi bakteri penyebab penyakit busuk lunak dilakukan untuk mendapatkan isolat murni dari patogen yang selanjutnya dilakukan karakterisasi. Isolasi tersebut dilakukan pada media *nutrient agar* (NA), *yeast peptone agar* (YPA), dan *potato peptone glucose agar* (PPGA). Selanjutnya, isolat murni yang telah diperoleh dikarakterisasi melalui beberapa pengujian, antara lain uji pembusukan pada umbi kentang, uji Gram dengan menggunakan KOH 3%, uji oksidatif/fermentatif (O/F), uji lechitinase, dan uji patogenisitas pada daun nanas. Tahap kedua dalam penelitian ini adalah uji kisaran inang dengan menggunakan beberapa jenis tanaman sayuran. Uji kisaran inang antara lain dilakukan pada buncis, kacang panjang, tomat, bawang bombai, bawang daun, seledri, dan selada.

### 3.4 Persiapan Penelitian

Persiapan penelitian terdiri atas pembuatan media NA, YPA, PPGA, O/F, dan media uji lecithinase. Adapun prosedur kerja yang dilakukan adalah sebagai berikut:

#### 3.4.1 Pembuatan media *nutrient agar* (NA)

Media NA dibuat dengan mencampurkan bubuk NA dengan akuades. Bubuk NA yang sudah ditimbang sebanyak 28 g dimasukkan ke dalam tabung erlenmeyer dan kemudian ditambahkan akuades sebanyak 1.000 ml dan diaduk rata menggunakan spatula dan kemudian direbus sampai mendidih. Tabung

erlenmeyer ditutup dengan aluminium foil dan diikat dengan karet gelang. Setelah itu, tabung erlenmeyer yang berisi media dimasukkan ke dalam plastik tahan panas dan diautoklaf selama 10 menit pada suhu 121°C dan tekanan 1 atm. Selanjutnya, media dikeluarkan dari dalam autoklaf, ditunggu sampai agak dingin dan dituangkan ke dalam cawan petri secara aseptik di dalam *laminar air flow*.

#### **3.4.2 Pembuatan media yeast peptone agar (YPA)**

Media YPA dibuat dengan mencampurkan bubuk *yeast*, *peptone*, dan agar dengan akuades. Bubuk *yeast* ditimbang sebanyak 5 g, *peptone* 10 g dan kemudian dimasukkan ke dalam gelas beaker. Setelah itu, ke dalam gelas beaker yang berisi bubuk *yeast* dan *peptone* ditambahkan akuades sebanyak 1.000 ml dan kemudian pH diukur dan disesuaikan untuk mendapatkan pH 6,8. Selanjutnya, media tersebut ditambah bubuk agar sebanyak 20 g lalu direbus sampai mendidih dan semua bahan melarut. Gelas beaker diangkat dan ditutup menggunakan aluminium foil, kemudian diikat dengan karet gelang. Media dimasukan ke dalam plastik tahan panas dan diautoklaf selama 10 menit pada suhu 121°C dan tekanan 1 atm. Selanjutnya, media diambil dari dalam autoklaf dan dituangkan ke dalam cawan petri secara aseptik di dalam *laminar air flow*.

#### **3.4.3 Pembuatan media potato peptone glucose agar (PPGA)**

Media PPGA dibuat dengan mencampurkan ekstrak kentang, dengan *peptone*, *glucose*,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{NaCl}$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , dan agar kedalam akuades. Sebanyak 200 g kentang dipotong kecil  $\pm 1$  cm kemudian direbus dengan 1.000 ml akuades sampai kentang lunak. Ekstrak hasil rebusan disaring dan dimasukkan ke dalam gelas beaker yang berisi 5 g *peptone*, 3 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 3 g  $\text{NaCl}$ , 0,5 g

$\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 5 g *glucose* dan 20 g agar. Jika media belum mencapai 1.000 ml, maka ditambahkan akuades sampai volume tersebut. Setelah semua bahan homogen, media dituang ke dalam tabung reaksi sebanyak 5 ml/ tabung dan kemudian ditutup menggunakan kapas. Selanjutnya, semua media dalam tabung reaksi dimasukkan ke dalam plastik tahan panas dan diautoklaf selama 10 menit pada suhu  $121^\circ\text{C}$  dan tekanan 1atm. Selanjutnya, media diangkat dan dimiringkan dalam *laminar air flow* sampai media membeku.

#### **3.4.4 Pembuatan media oksidatif/fermentatif (O/F)**

Media O/F dibuat dengan mencampurkan *peptone*, NaCl,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , BTV (*bromthymol blue*), *glucose*, dan *bacteriological agar* ke dalam akuades.

Ditimbang 2 g *peptone*, 5 g NaCl, 0,3 g  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0,08 BTV, dan 2 g *glucose*, dan kemudian dimasukkan ke dalam gelas beker. Gelas beker yang berisi bahan-bahan tersebut diberi akuades sebanyak 1.000 ml dan kemudian pH diukur (7,2).

Selanjutnya, media tersebut ditambahkan *bacteriological agar* sebanyak 2 g dan kemudian direbus sampai mendidih. Setelah semua bahan homogen, media dituang ke dalam tabung reaksi sebanyak 5 ml/ tabung dan kemudian ditutup menggunakan kapas. Selanjutnya, semua media dalam tabung reaksi dimasukkan ke dalam plastik tahan panas dan diautoklaf selama 10 menit pada suhu  $121^\circ\text{C}$  dan tekanan 1atm. Selanjutnya, media diangkat dan didinginkan sampai media membeku.

#### **3.4.5 Pembuatan media uji lecithinase**

Pembuatan media uji lecithinase ialah dengan menambahkan media YPA dengan kuning telur dan NaCl 0,9%. Kuning telur didesinfektan menggunakan alkohol

70% dan dibiarkan selama 2 menit. Selanjutnya, kuning telur dimasukkan kedalam tabung reaksi sebanyak 2 ml dan ditambahkan 8 ml NaCl 0,9%. Suspensi kedua bahan tersebut dihomogenkan menggunakan *rotamixer* selama 1 menit. Media YPA yang hangat kuku dimasukkan kedalam cawan petri kemudian ditambahkan 1 ml suspensi kuning telur dan NaCl. Selanjutnya media dihomogenkan dengan cara memutar cawan dan kemudian media didiamkan.

### 3.5 Pelaksanaan Penelitian

#### 3.5.1 Isolasi dan Karakterisasi penyebab busuk lunak

Sampel tanaman nanas yang menunjukkan gejala penyakit busuk diambil dari perkebunan PT NTF Kecamatan Way Jepara, Kabupaten Lampung Timur. Daun nanas yang terinfeksi dari perkebunan PT NTF menunjukkan ciri berupa busuk lunak seperti melepuh tersiram minyak panas pada daunnya (*water soaking*) (Gambar 1).



Gambar 1. Sampel tanaman nanas dari perkebunan PT NTF dengan gejala busuk melepuh pada daun.

Bagian daun tanaman yang diambil untuk keperluan isolasi dipotong kecil dengan ukuran 2 x 2 cm dengan perbatasan  $\frac{1}{4}$  sakit dan  $\frac{3}{4}$  sehat. Selanjutnya, potongan tersebut direndam selama 1 menit dalam akuades kemudian diambil dan didesinfektan dalam 10% klorok selama 1 menit, kemudian direndam kembali dalam akuades selama 1 menit lalu angkat dan tiriskan. Setelah itu, potongan jaringan daun tersebut dimasukkan ke dalam tabung eppendorf 1,5 ml yang berisi air steril sebanyak 1ml, kemudian dihancurkan menggunakan pinset steril dan didiamkan selama 5 menit. Hasil suspensi tersebut selanjutnya digoreskan pada media NA menggunakan jarum ose kemudian diinkubasikan pada suhu ruang selama 24-48 jam. Beberapa koloni yang tumbuh diisolasi kembali (reisolasi) menggunakan media YPA dengan metode penggoresan kuadran. Setelah diperoleh koloni tunggal bakteri, isolat tersebut diisolasi kedalam media miring PPGA.

#### ***3.5.1.1 Uji Pembusukan pada Umbi Kentang***

Umbi kentang yang akan digunakan dalam pengujian ini dikupas dan diiris setebal 2 cm, kemudian dicuci dengan air mengalir selama 35 menit untuk menghilangkan residu bahan kimia pada umbi kentang. Selanjutnya irisan kentang tersebut diletakkan di dalam cawan steril, kemudian isolat bakteri dalam media miring PPGA diambil sebanyak 1 jarum ose penuh dan digoreskan pada bagian tengah umbi kentang. Reaksi positif ditunjukkan dengan adanya pembusukan pada kentang dan terdapat lendir setelah diinkubasi selama 24-48 jam (Lelliot & Stead, 1987 dalam Ferfinia, 2010).

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

Pengujian ini bertujuan untuk mendeteksi apakah bakteri yang diuji bersifat oksidatif ataukah fermentatif. Pengujian dilakukan dengan menumbuhkan bakteri uji pada media oksidatif/fermentatif (pH 7.2) pada tabung reaksi. Masing-masing bakteri uji diinokulasikan pada 2 tabung reaksi. Bakteri uji diinokulasikan pada media dengan cara menusukkannya pada kedalaman 0,5 cm, kemudian ditutup dengan minyak parafin steril pada salah satu tabung, sedangkan tabung yang satunya tanpa diberi minyak parafin. Kontrol pada pengujian ini berupa media uji tanpa bakteri. Pengamatan dilakukan selama 7- 14 hari. Jika terjadi perubahan warna dari hijau menjadi kuning hanya pada media uji tanpa minyak parafin berarti bakteri tersebut bersifat oksidatif, sedangkan bakteri bersifat fermentatif jika mampu menyebabkan perubahan warna hijau menjadi kuning pada media yang ditutup dengan minyak parafin maupun yang tanpa minyak parafin (Lelliot & Stead, 1987 dalam Masnilah *et al.*, 2013).

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

Pengujian ini bertujuan untuk mengetahui kelompok isolat bakteri yang diuji.

Isolat bakteri diambil dengan menggunakan tusuk gigi dan diletakkan pada kaca preparat yang telah ditetesi KOH 3% lalu dicampurkan secara merata.

Selanjutnya ujung tusuk gigi disatukan pada campuran bakteri dan KOH 3%.

Apabila terbentuk lendir dan terasa lengket serta membentuk benang ketika tusuk gigi diangkat maka hal ini menunjukkan bahwa bakteri tersebut merupakan bakteri golongan Gram negatif dan sebaliknya jika tidak terbentuk benang maka

bakteri tersebut adalah bakteri golongan Gram positif (Abegaz, 2007 dalam Purwohadisantoso *et al.*, 2009).

#### **3.5.1.4 Uji Lecithinase**

Pengujian ini dilakukan untuk membedakan antara bakteri *Pectobacterium* dengan *Erwinia chrysanthemi* (*Dickeya* spp.). Pengujian dilakukan dengan menggosokkan isolat bakteri pada media YPA yang ditambahkan kuning telur dan NaCl 0,9%.. Jika pengujian menghasilkan zona putih buram yang menyebar di luar tepi koloni maka isolat tersebut lecithinase positif dan ini merupakan ciri bakteri *Erwinia chrysanthemi* (*Dickeya* spp.). Berdasarkan hasil penelitian yang dilakukan Esselman & Liu (1960), bakteri yang dapat memproduksi lecithinase tidak hanya kelompok bakteri Gram positif, namun kelompok bakteri Gram negatif juga memproduksi lecithinase. Kelompok bakteri Gram positif sebagian besar produsen lecithinase adalah anaerob, sedangkan kelompok bakteri Gram negatif sebagian besar produsen lecithinase adalah aerob.

#### **3.5.1.5 Uji Patogenisitas pada Daun Nanas**

Pengujian ini dilakukan untuk memastikan bahwa bakteri penyebab penyakit yang diisolasi benar-benar bakteri yang sama dengan penyebab penyakit pada tanaman nanas di PT NTF. Pengujian ini dilakukan dengan cara menginokulasikan isolat murni bakteri tersebut pada tanaman inang yang sehat. Inokulasi dilakukan dengan cara memberikan suspensi isolat bakteri ke daun nanas yang sehat dengan cara disuntikan suspensi sebanyak 0,25 ml dengan kedalaman suntik 2 cm. Hasil uji patogenisitas dinyatakan positif apabila di sekitar area bekas suntik pada daun



nanas ditemukan gejala busuk bakteri seperti yang ditemukan pada sampel tanaman nanas yang digunakan.

### ***3.5.2 Uji Kisaran Inang***

Pengujian ini dilakukan untuk mengetahui apakah isolat bakteri dapat menyebabkan infeksi pada tanaman lainnya. Tanaman yang digunakan dalam uji kisaran inang adalah dari beberapa jenis tanaman sayuran diantaranya buncis, kacang panjang, tomat, bawang bombai, bawang daun, seledri, dan selada. Inokulasi dilakukan dengan *stab* isolat bakteri ketanaman tersebut. Apabila tanaman yang diinokulasikan busuk berarti isolat bakteri yang diperoleh dapat menginfeksi tanaman tersebut.