

III. BAHAN DAN METODE

3.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Pengambilan sampel tanaman nanas dilakukan di lahan perkebunan PT. Great Giant Pineapple (GGP) di Lampung Timur dan PT. Nusantara Tropical Farm, Lampung Tengah. Isolasi dan karakterisasi isolat bakteri dari daun tanaman nanas dilakukan di Laboratorium Ilmu Penyakit Tumbuhan Fakultas Pertanian Universitas Lampung. Pengujian pengaruh bakteri endofit terhadap pertumbuhan tanaman dilakukan di Rumah Kaca Fakultas Pertanian Universitas Lampung. Penelitian dimulai pada bulan Juni sampai dengan Oktober 2015.

3.2 Bahan dan Alat

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah sampel daun dari tanaman nanas yang sehat, media *Nutrient Agar* (NA), KOH 3%, larutan NaOCl, media Oksidatif-Fermentatif, minyak paraffin, alkohol 70%, air, dan aquades.

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah cawan petri, tabung erlenmeyer, tabung reaksi, lampu bunsen, *laminar air flow*, penggaris, jarum ose, ependorf, jarum, pipet tetes, aluminium foil, tusuk gigi, plastik *wrap*, kertas label, nampan, plastik tahan panas, otoklaf, polibag, alat pemotong, kertas merang, Klorofilmeter merk dagang Konika Minolta, timbangan dan alat tulis.

3.3 Metode Penelitian

Penelitian ini terdiri dari dua tahap percobaan. Tahap pertama adalah isolasi bakteri endofit yang diambil dari jaringan daun nanas yang sehat. Tahap kedua yaitu melakukan beberapa uji fisiologi dan biokimia untuk mengetahui karakteristik bakteri endofit.

3.4 Pelaksanaan Penelitian

3.4.1 Isolasi Bakteri Endofit Daun Nanas

Sampel daun nanas yang digunakan sebagai sumber isolasi berasal dari tanaman nanas berumur 3 bulan baik dari tanaman yang sehat maupun tanaman yang sakit (bergejala). Dari setiap sampel diambil beberapa potong jaringan bagian dalam daun dengan ukuran $\pm 1 \times 1$ cm, kemudian direndam dalam larutan NaOCl 2% selama 1 menit dan dibilas dengan aquades sebanyak 3 kali. Selanjutnya potongan jaringan daun tersebut ditiriskan di atas tisu lalu dimasukkan dalam tabung ependorf berisi 1 ml dan ditumbuk sampai hancur. Setelah dibiarkan mengendap suspensi daun diambil dengan menggunakan jarum ose steril lalu diinokulasikan pada media NA dengan metode penggoresan kuadran. Inkubasi pada suhu ruang selama 24-48 jam. Koloni-koloni tunggal yang menunjukkan perbedaan penampilan pada media pertumbuhan, diisolasi dan ditumbuhkan pada media yang sama untuk memperoleh isolat murni yang akan digunakan dalam penelitian lebih lanjut.

3.4.2 Pengujian Isolat Bakteri Endofit

3.4.2.1 Uji Gram menggunakan KOH 3%

Uji dilakukan dengan cara mengambil 1-2 ose bakteri dan meletakkannya di atas gelas preparat kemudian ditetesi KOH 3% sebanyak 1-2 tetes dan dicampurkan. Setelah itu, tusuk gigi steril ditempelkan pada campuran tersebut dan diangkat secara perlahan. Apabila terbentuk benang lendir yang tidak terputus sepanjang kurang lebih 1 cm, maka bakteri yang dibiakkan merupakan kelompok bakteri gram negatif, namun apabila tidak terbentuk, maka bakteri tersebut merupakan kelompok bakteri gram positif (Arthi dkk., 2003).

3.4.2.2 Uji Oksidatif Fermentatif (O/F)

Uji ini dilakukan untuk mengetahui sifat aerob dan anaerob dari bakteri. Masing-masing bakteri diinokulasikan pada media Oksidatif-Fermentatif sebanyak 5 ml dalam 2 tabung reaksi untuk setiap isolat. Satu ose bakteri ditusukkan pada 2 media tersebut, kemudian pada tabung 1 ditutupi dengan minyak parafin sebanyak 1 ml, sedangkan pada tabung 2 tidak ditutupi dengan minyak parafin. Semua tabung diinkubasikan selama 7-14 hari dan diamati ada tidaknya perubahan warna media dari hijau menjadi kuning pada masing-masing tabung. Apabila terjadi perubahan warna menjadi kuning pada kedua media baik yang ditambahkan dan tidak ditambahkan minyak parafin, hal ini menunjukkan bahwa bakteri tersebut bersifat fermentatif. Sebaliknya jika terjadi perubahan warna menjadi 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).

3.4.2.3 Uji Hipovirulensi

Uji hipovirulensi dilakukan dengan menggunakan kecambah mentimun sebagai tanaman indikator, dengan pertimbangan tanaman ini bersifat sangat peka terhadap serangan patogen sehingga mudah dan cepat dalam pengamatannya (Worosuryani dkk., 2005). Pengujian hipovirulensi menggunakan metode menurut Ichielevich-Auster dkk. (1985 dalam Worosuryani dkk., 2005) yaitu mula-mula benih mentimun didesinfeksi dengan *etanol* 70%, selanjutnya direndam dalam *sodium hypochlorite* 2% selama 30 menit, lalu dicuci dengan menggunakan aquades sebanyak 3 kali.

Benih mentimun yang dikecambahkan dalam cawan petri dengan lapisan kertas merang, terlebih dahulu direndam dalam aquades selama 2 hari pada suhu 27° C. Empat benih dipindahkan ke dalam setiap cawan petri berisi agar air 2% dan diinkubasi selama 2 hari pada suhu kamar. Setelah benih berkecambah, dilakukan inokulasi dengan cara meneteskan suspensi biakan murni bakteri yang berumur 2 hari pada bagian hipokotil sebanyak 10 μ . Setiap perlakuan dengan isolat bakteri tertentu diulang sebanyak 3 kali atau 3 cawan yang masing-masing berisi 4 kecambah timun. Pengamatan dilakukan selama 14 hari untuk mencatat pertumbuhan kecambah mentimun dan perkembangan gejala penyakit pada hipokotil maupun bagian kecambah yang lain. Pada akhir pengamatan dilakukan penghitungan Indeks keparahan penyakit (*Disease Severity Index = DSI*)

Indeks keparahan penyakit (DSI) ditentukan dengan rumus yang dikemukakan oleh Cadoso & Echandi (1987 dalam Worosuryani dkk., 2005), sebagai berikut :

$$DSI = \frac{\sum N}{Z}$$

Keterangan:

DSI = *Disease Severity Index* (Indeks keparahan penyakit)

N = Nilai tingkat keparahan penyakit pada masing-masing individu

Z = Jumlah individu yang diamati

Nilai tingkat keparahan penyakit (N):

0 = sehat, tidak ada infeksi pada hipokotil

1 = satu atau dua bercak coklat muda berukuran < 0,25 cm

2 = bercak coklat muda berukuran < 0,5 cm dan area kebasahan < 10% pada hipokotil

3 = bercak coklat muda sampai tua berukuran > 1,0 cm dan kemudian bergabung dengan bercak lainnya dan daerah kebasahan 10% <x< 100% pada hipokotil (daun belum layu dan hipokotil masih putih).

4 = bercak hitam pada hipokotil, daun layu dan bibit mati.

Apabila isolat tidak menunjukkan gejala penyakit atau gejala yang ditimbulkan pada kecambah mentimunakibat isolat tersebutnya sedikit (DSI < 2,0) maka isolat tersebut dikategorikan sebagai isolat yang hipovirulen.

3.4.2.4 Uji Kemampuan Isolat Bakteri Endofit sebagai Pemacu Pertumbuhan Tanaman

Setelah didapatkan isolate bakteri endofit yang hipovirulen, selanjutnya dilakukan uji *in planta* untuk mengetahui kemampuan isolat bakteri endofit sebagai pemacu pertumbuhan tanaman (PGPB) dengan menggunakan tanaman mentimun. Isolat bakteri endofit diremajakan terlebih dahulu dengan

menumbuhkannya pada media NA dalam agar miring dan diinkubasikan selama 2 hari. Selanjutnya isolat yang berada didalam tabung ditambah air steril sebanyak 5 ml kemudian diambil dan dimasukkan ke dalam air steril sebanyak 300 ml dan dihomogenkan.

Uji kemampuan isolat bakteri endofit sebagai pemacu pertumbuhan dilakukan dengan menggunakan tanaman mentimun sebagai bahan indikator. Perlakuan disusun dalam rancangan acak lengkap dengan tiga ulangan. Perlakuan terdiri atas isolat yang dinyatakan hipovirulen atau yang memiliki nilai DSI ≤ 2 . Benih mentimun didesinfeksi dengan *ethanol* 70% dan *sodium hypochlorite* 2%, selanjutnya disemai dalam cawan petri yang dilapisi kertas merang. Suspensi bakteri sebanyak 20 ml disebar-ratakan dengan 500 gram tanah steril dalam polibag. Setelah bibit mentimun berumur 2 hari dipindah-tanamkan dalam polibag tersebut dan ditumbuhkan selama 21 hari. Pengamatan dilakukan selama 21 hari. Peubah pengamatan meliputi tinggi tanaman dan jumlah daun yang diamati setiap 2 hari sekali, bobot basah akar dan tajuk serta bobot kering akar dan tajuk bobot basah tanaman, bobot kering tanaman, kehijauan daun serta panjang akar pada akhir pengamatan. Pengukuran tinggi tanaman diukur dari permukaan tanah sampai ujung daun tertinggi.

Kehijauan daun diukur dengan alat “klorofilmeter” dengan cara alat klorofilmeter tersebut dikalibrasi kemudian daun ketiga dari atas dimasukkan kedalam slot klorofilmeter. Pengukuran panjang akar dimulai dari pangkal akar sampai ujung akar. Selanjutnya data dianalisis ragam dan uji rerata dengan menggunakan BNT pada taraf $\alpha = 5\%$.