

**IDENTIFIKASI DAN UJI KISARAN INANG PENYEBAB PENYAKIT  
BUSUK LUNAK TANAMAN COCOR BEBEK (*Kalanchoe* spp.)**

**(Skripsi)**

**Oleh**

**UMAR BAGUS PRASOJO**



**FAKULTAS PERTANIAN  
UNIVERSITAS LAMPUNG  
BANDAR LAMPUNG  
2022**

## ABSTRAK

### IDENTIFIKASI DAN UJI KISARAN INANG PENYEBAB PENYAKIT BUSUK LUNAK TANAMAN COCOR BEBEK (*Kalanchoe* spp.)

Oleh

UMAR BAGUS PRASOJO

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui identitas dan karakter penyebab penyakit busuk lunak pada tanaman cocor bebek. Penelitian dilaksanakan pada September 2021 sampai Maret 2022 di Laboratorium Bioteknologi dan Laboratorium Ilmu Penyakit Tumbuhan, Fakultas Pertanian, Universitas Lampung. Sebanyak 4 isolat bakteri yang diduga menjadi penyebab busuk lunak pada cocor bebek digunakan dalam penelitian ini. Identifikasi dilakukan berdasarkan hasil uji biokimia dan analisa sekuens *recA*. Uji kisaran inang dilakukan pada berbagai macam spesies tanaman. Hasil uji biokimia memperlihatkan bahwa isolat bakteri merupakan kelompok Gram negatif, bersifat fermentatif, *lechitinase* positif, *soft rot* positif, hipersensitif positif, fluoresensi pada media King's B negatif, *arginine dihydrolase* negatif, casein positif, dan mampu tumbuh pada suhu 39 °C dan 40 °C serta mampu menggunakan *Inulin*, *Lactose*, *D-raffinose*, *5-ketogluconate*, *Mannitol*, *Myo-inositol*, dan *Glycerol* sebagai sumber karbonnya. Hasil identifikasi molekuler menggunakan sekuens *recA* menunjukkan bahwa dari 4 isolat yang diuji berada dalam dua kelompok yang berbeda: *Pectobacterium brasiliense* dan *Dickeya dadantii* subsp. *dieffenbachiae*. Hasil uji kisaran inang menunjukkan bahwa isolat bakteri mampu menyebabkan gejala busuk pada bawang bombay, bawang merah, buncis, cabai, daun bawang, gambas, kacang panjang, kubis, lidah buaya, okra, pak coy, paprika, pare, sawi putih, terung, timun, tomat, dan wortel.

**Kata kunci** : Busuk lunak, identifikasi molekuler, *Kalanchoe* spp., *recA*, uji biokimia.

**IDENTIFIKASI DAN UJI KISARAN INANG PENYEBAB PENYAKIT  
BUSUK LUNAK TANAMAN COCOR BEBEK (*Kalanchoe* spp.)**

Oleh

UMAR BAGUS PRASOJO

Skripsi

**Sebagai Salah Satu Syarat untuk Mencapai Gelar  
SARJANA PERTANIAN**

Pada

**Jurusan Agroteknologi  
Fakultas Pertanian Universitas Lampung**



**FAKULTAS PERTANIAN  
UNIVERSITAS LAMPUNG  
BANDAR LAMPUNG  
2022**

Judul skripsi : **IDENTIFIKASI DAN UJI KISARAN INANG  
PENYEBAB PENYAKIT BUSUK LUNAK  
TANAMAN COCOR BEBEK (*Kalanchoe* spp.)**

Nama Mahasiswa : **Umar Bagus Prasajo**


Nomor Pokok Mahasiswa : **1814121030**


Jurusan : **Agroteknologi**

Fakultas : **Pertanian**




1. Komisi Pembimbing

  
**Radix Suharjo, S.P., M.Agr., Ph.D.**  
NIP 198106212005011003


  
**Ir. Rugayah, M.P.**  
NIP 196111071986032002

2. Ketua Jurusan Agroteknologi

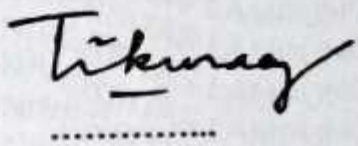
  
**Prof. Dr. Ir. Sri Yumnaini, M.Si.**  
NIP 196305081988112001

## MENGESAHKAN

### 1. Tim Penguji

Pembimbing Utama : **Radix Suharjo, S.P., M.Agr., Ph.D.** 

Sekretaris : **Ir. Rugayah, M.P.** 

Penguji  
Bukan Pembimbing : **Dr. Ir. Titik Nur Aeny, M.Sc.** 

### 2. Dekan Fakultas Pertanian



  
**Prof. Dr. Ir. Irwan Sukri Banuwa, M.Si.**  
NIP. 196110201986031002

Tanggal Lulus Ujian Skripsi : **09 Juni 2022**



## SURAT PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini, menyatakan bahwa skripsi yang berjudul **“Identifikasi dan Uji Kisaran Inang Penyebab Penyakit Busuk Lunak Tanaman Cocor Bebek (*Kalanchoe spp.*)”** merupakan hasil karya sendiri dan bukan hasil karya orang lain. Semua hasil yang tertuang dalam skripsi ini telah mengikuti kaidah penulisan karya ilmiah Universitas Lampung. Apabila di kemudian hari terbukti bahwa skripsi ini merupakan hasil salinan atau dibuat oleh orang lain, maka saya bersedia menerima sanksi sesuai dengan ketentuan akademik yang berlaku.

Bandar Lampung, Juni 2022  
Penulis,



Umar Bagus Prasojo  
NPM 1814121030

## **RIWAYAT HIDUP**

Penulis dilahirkan di Desa Bandar Sakti, Kecamatan Terusan Nunyai, Kabupaten Lampung Tengah pada 30 Agustus 2000. Penulis merupakan anak tunggal dari pasangan Bapak Sumarsono dan Ibu Murniati. Penulis telah menyelesaikan pendidikan SD di SDN 3 Bandar Sakti Tahun 2012, SMPN 1 Terusan Nunyai pada tahun 2015, SMAN 1 Terusan Nunyai pada tahun 2018. Pada tahun yang sama, penulis diterima sebagai Mahasiswa Fakultas Pertanian, Universitas Lampung, Jurusan Agroteknologi melalui jalur Penerimaan Mahasiswa Perluasan Akses Pendidikan (PMPAP).

Pada tahun 2021 penulis telah melaksanakan Praktik Umum di Unit Produksi Benih Sayuran (UPBS) Kecamatan Sekincau, Kabupaten Lampung Barat. Pada tahun 2021 penulis telah melaksanakan Kuliah Kerja Nyata di Desa Bandar Sakti, Kecamatan Terusan Nunyai, Kabupaten Lampung Tengah. Selama menjadi mahasiswa, penulis pernah terpilih menjadi Beasiswa Kartu Petani Berjaya (KPB), terpilih untuk mengikuti kelas KMMI di Institut Pertanian Bogor (IPB), asisten praktikum mata kuliah Produksi Tanaman Pangan, Biologi II, Klinik Tanaman, Teknologi Pengendalian Gulma, dan Mikrobiologi Pertanian. Selain itu, penulis juga aktif dalam organisasi Persatuan Mahasiswa Agroteknologi (Perma AGT) sebagai anggota bidang Penelitian dan Pengembangan Keilmuan periode 2019/2020 dan kepala bidang Penelitian dan Pengembangan Keilmuan periode 2021.

## PERSEMBAHAN

Puji syukur ke hadirat Allah SWT yang telah memberikan kesehatan sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul **“Identifikasi dan Uji Kisaran Inang Penyebab Penyakit Busuk Lunak Tanaman Cocor Bebek (*Kalanchoe spp.*)”**

Dengan penuh rasa syukur karya ini ku persembahkan sebagai ucapan terima kasihku untuk :

1. Bapak dan Ibuku tersayang, Sumarsono dan Murniati yang senantiasa memberikan doa, dukungan, dan motivasi serta semangat yang selalu diberikan kepada penulis sehingga dapat menyelesaikan pendidikan.
2. Nenekku tersayang, Supinah yang berusaha memberikan saran terbaik kepada penulis dan terima kasih telah menjadi nenek sekaligus ibu selama penulis menempuh pendidikan.
4. Bapak Radix Suharjo, S.P., M.Agr., Ph.D. yang selalu memberikan bimbingan kepada penulis dalam menyelesaikan skripsi serta memfasilitasi seluruh kegiatan penelitian.
3. Keluarga besar Agroteknologi 2018 yang selalu memberikan cerita dan semangat kepada penulis selama pendidikan dan ucapan terima kasih kepada Adik-adik Jurusan Agroteknologi angkatan 2019, 2020, dan 2021 yang senantiasa memberikan dukungan serta almamaterku tercinta Universitas Lampung yang telah memberikan beasiswa penuh selama menempuh pendidikan.



## **MOTTO**

“Kesulitan, keterbatasan, dan kekurangan merupakan bagian proses keberhasilan  
dalam hidup”

(Umar Bagus Prasojo, 2022)

## SANWACANA

Puji syukur kepada Allah SWT yang telah melimpahkan rahmat dan hidayah-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini yang berjudul **“Identifikasi dan Uji Kisaran Inang Penyebab Penyakit Busuk Lunak Tanaman Cocor Bebek (*Kalanchoe spp.*)”**. Shalawat serta salam senantiasa tercurah kepada Nabi Muhammad SAW beserta keluarga, sahabat dan pengikutnya hingga akhir zaman. Adapun tujuan dalam penulisan skripsi ini yaitu sebagai salah satu syarat mencapai gelar Sarjana Pertanian di Universitas Lampung. Tentunya penulis tidak lepas dari dukungan, doa dan motivasi dalam menyelesaikan skripsi ini. Maka dari itu penulis ingin mengucapkan terima kasih kepada semua pihak yang terlibat dalam pelaksanaan penelitian maupun penulisan skripsi, khususnya kepada :

1. Prof. Dr. Ir. Irwan Sukri Banuwa, M.Si. selaku Dekan Fakultas Pertanian Universitas Lampung yang memfasilitasi mahasiswa Fakultas Pertanian Universitas Lampung untuk melaksanakan penelitian.
2. Prof. Dr. Ir. Sri Yusnaini, M.Si. selaku Ketua Jurusan Agroteknologi yang telah memberikan saran, dukungan, dan doa.
3. Radix Suharjo, S.P., M.Agr., Ph.D. selaku Dosen Pembimbing Utama yang telah memberikan banyak masukan, saran motivasi serta semangat kepada penulis dalam menyelesaikan skripsi ini.
4. Ir. Rugayah, M.P. selaku Dosen Pembimbing Kedua yang telah memberikan banyak masukan, saran motivasi serta semangat kepada penulis dalam menyelesaikan skripsi ini.
5. Dr. Ir. Titik Nur Aeny, M.Sc. selaku Dosen Penguji yang telah memberikan banyak masukan, saran motivasi serta semangat kepada penulis dalam menyelesaikan skripsi ini.
6. Dr. Ir. Suskandini Ratih Dirmawati, M.S. sebagai Dosen Pembimbing Akademik yang senantiasa memberikan masukan, saran, materi dan

semangat selama penulis menempuh pendidikan.

7. Kedua orangtua Bapak Sumarsono dan Ibu Murniati yang telah memberikan banyak nasihat, doa dan dukungan yang membangun selama penulis menempuh pendidikan.
8. Tim penelitian penulis Erika Widya Putri dan Risa Fitria yang senantiasa berkenan mendengarkan keluh, kesah dan duka serta memberikan bantuan materi, dukungan dan semangat kepada penulis.
9. Teman-teman penelitian Tansya, Nur, Gede, Uswatun, Rosa, Indira, Violita, Indah, Juanda, Lady, Nurul, Salma, Wulan, Wilda, Ajeng, Anindiya, Fairuz, Putra, Sayu, dan Ari yang banyak memberikan dorongan semangat dan dukungan motivasi yang membangun.
10. Keluarga Besar Biotek mba Tari, mba Yeyen, bang Nando, mba Putu, bang Sony, mba Safira, mba Bella, mba Shakila, Cindy, Santi, Anggi, Anju, Dani, Rahmi, Reza, Ridho, Riski, Rohmi, Ta Nyoman, Thias, Hening, Wayan, bang Sem, mas Helmi, dan mas Jen, terima kasih atas saran dan bantuan selama penulis melaksanakan penelitian.
11. Keluarga besar Jurusan Agroteknologi angkatan 2018, keluarga besar Perma AGT, dan adik-adik Jurusan Agroteknologi angkatan 2019, 2020, dan 2021 yang selalu memberikan bantuan dan dukungan yang membangun.

Penulis mengucapkan banyak terima kasih atas saran, masukan dan keluangan waktu dalam membantu penelitian dan menyelesaikan skripsi. Semoga skripsi ini dapat memberikan manfaat kepada pembaca dan terkhusus kepada penulis.

Bandar Lampung, Juni 2022

Penulis

**Umar Bagus Prasojo**

## DAFTAR ISI

	Halaman
<b>DAFTAR ISI</b> .....	<b>i</b>
<b>DAFTAR TABEL</b> .....	<b>iii</b>
<b>DAFTAR GAMBAR</b> .....	<b>iv</b>
<b>I. PENDAHULUAN</b> .....	<b>1</b>
1.1 Latar Belakang .....	1
1.2 Tujuan .....	2
1.3 Kerangka Pemikiran.....	3
<b>II TINJAUAN PUSTAKA</b> .....	<b>5</b>
2.1 Tanaman Cocor Bebek ( <i>Kalanchoe</i> spp.) .....	5
2.1.1 Taksonomi dan morfologi tanaman cocor bebek.....	6
2.1.2 Habitat tumbuh cocor bebek .....	7
2.2 Penyakit Busuk Lunak Cocor Bebek .....	8
2.2.1 Gejala penyakit .....	8
2.2.2 Penyebab penyakit .....	8
2.2.3 Perkembangan penyakit .....	9
2.2.4 Kisaran inang .....	9
2.2.5 Pengendalian penyakit .....	9
<b>III. BAHAN DAN METODE</b> .....	<b>10</b>
3.1 Tempat dan Waktu Penelitian .....	10
3.2 Bahan dan Alat.....	10
3.3 Metode Penelitian .....	12
3.3.1 Uji patogenesis.....	12
3.3.2 Identifikasi penyebab penyakit.....	13
3.3.2.1 Uji biokimia .....	13
(a) Uji Gram.....	13
(b) Uji oksidatif/fermentatif (O/F).....	13
(c) Uji <i>lechitinase</i> .....	14
(d) Uji fluoresensi pada media King's B .....	14
(e) Uji <i>arginine dihydrolase</i> (Moeller media) .....	15
(f) Uji casein .....	15
(g) Uji <i>soft rot</i> .....	16

(h) Uji hipersensitif.....	16
(i) Uji kemampuan tumbuh pada beberapa suhu .....	16
(j) Uji Kemampuan untuk menggunakan beberapa jenis bahan organik.....	17
3.3.2.2 <i>Identifikasi molekuler</i> .....	17
(a) Ekstraksi DNA .....	18
(b) Amplifikasi DNA dengan PCR.....	19
(c) Elektroforesis dan visualisasi hasil PCR.....	19
(d) Sekuensing dan analisis hasilnya .....	20
3.3.3 Uji kisaran inang .....	20
<b>IV. HASIL DAN PEMBAHASAN.....</b>	<b>22</b>
4.1 Hasil Penelitian .....	22
4.1.1 Uji patogenesis .....	22
4.1.2 Karakterisasi dan Identifikasi Penyebab Penyakit .....	23
4.1.2.1 <i>Uji biokimia</i> .....	23
(a) Uji Gram.....	23
(b) Uji oksidatif/fermentatif (O/F).....	24
(c) Uji <i>lechinase</i> .....	24
(d) Uji fluoresensi pada media King's B .....	25
(e) Uji <i>arginine dihydrolase</i> (Moeller media) .....	26
(f) Uji casein .....	26
(g) Uji <i>soft rot</i> .....	27
(h) Uji hipersensitif.....	27
(i) Uji kemampuan tumbuh pada beberapa suhu .....	28
(j) Uji Kemampuan untuk menggunakan beberapa jenis bahan organik.....	28
4.1.2.2 <i>Identifikasi molekuler</i> .....	29
4.1.3 Uji kisaran inang .....	31
4.2 Pembahasan.....	36
<b>V. SIMPULAN DAN SARAN .....</b>	<b>42</b>
5.1 Simpulan .....	42
5.2 Saran .....	42
<b>DAFTAR PUSTAKA .....</b>	<b>43</b>

## DAFTAR TABEL

<b>Tabel</b>	<b>Halaman</b>
1 Jenis isolat cocor bebek yang digunakan dalam penelitian.....	12
2. Hasil uji kemampuan bakteri penyebab busuk lunak cocor bebek untuk menggunakan beberapa jenis bahan organik.....	29
3. Hasil uji kisaran inang busuk lunak cocor bebek.....	32



## DAFTAR GAMBAR

<b>Gambar</b>	<b>Halaman</b>
1. Tanaman cocor bebek .....	7
2. Gejala nekrotik pada daun dan batang tanaman cocor bebek (a) yang diinokulasi dengan bakteri isolat B131 (b), D221 (c), D112 (d), D211 (e). .....	22
3. Koloni bakteri berumur 24 jam setelah isolasi.....	22
4. Hasil <i>soft rot</i> pada umbi kentang 24 jam setelah inokulasi.....	23
5. Gejala busuk lunak tanaman cocor bebek dan daun yang bergejala busuk lunak.....	23
6. Terbentuknya lendir pada uji Gram setelah ditetesi KOH 3%.....	24
7. Perubahan warna media menjadi kuning pada uji O/F menunjukkan adanya sifat fermentatif .....	24
8. Warna putih buram di sekitar area goresan menunjukkan reaksi positif pada uji <i>lechitinase</i> .....	25
9. Tidak adanya sinar fluoresen menunjukkan reaksi negatif pada uji King's B.....	25
10. Perubahan warna media menjadi kuning menunjukkan reaksi negatif pada uji <i>arginine dihydrolase</i> .....	26
11. Zona bening pada area sekitar goresan menunjukkan reaksi positif pada uji casein.....	26
12. Pembusukan pada umbi kentang menunjukkan reaksi positif pada uji <i>soft rot</i> .....	27
13. Gejala nekrotik pada area daun yang diinokulasi isolat bakteri.....	27
14. Warna putih keruh pada media menunjukkan reaksi positif pada suhu 39 °C dan 40 °C.....	28
15. Perubahan warna media menjadi kuning menunjukkan reaksi positif pada uji kemampuan bakteri untuk menggunakan bahan organik.....	29

16. Pohon filogenik hasil analisis sekuen <i>recA</i> yang menunjukkan kode isolat D112 dan D221 memiliki tingkat kekerabatan paling dekat dengan <i>Pectobacterium brasiliense</i> .....	30
17. Pohon filogenik hasil analisis sekuen <i>recA</i> yang menunjukkan kode isolat D211 dan B131 memiliki tingkat kekerabatan paling dekat dengan <i>Dickeya dadantii</i> subsp. <i>dieffenbachiae</i> .....	30
18. Gejala beberapa spesies tanaman dari famili Apiaceae, Asphodelaceae, Brassicaceae, Cucurbitaceae, dan Fabaceae yang diinfeksi bakteri busuk lunak dengan kode isolat D112, D211, D221, dan B131.....	34
19. Gejala beberapa spesies tanaman dari famili Liliaceae, Solanaceae, Fabaceae, dan Malvaceae yang diinfeksi bakteri busuk lunak dengan kode isolat D112, D211, D221, dan B131.....	35

## I. PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Indonesia merupakan salah satu negara dengan keanekaragaman hayati yang beragam, baik tumbuhan, hewan maupun mikroorganisme. Salah satu jenis keragaman dari tanaman yang belum dimanfaatkan secara optimal adalah cocor bebek (*Kalanchoe* spp.). Cocor bebek merupakan tanaman sukulen dari famili Crassulaceae yang terdiri dari sekitar 140 spesies dan termasuk endemik asal Madagaskar dan Afrika Timur serta Afrika Selatan. Cocor bebek memiliki potensi untuk dikembangkan karena kontribusinya sebagai tanaman hias dan bahan baku pengobatan herbal baik dalam maupun luar. Seperti halnya pada genus Bryophyllum, beberapa spesies tanaman cocor bebek memiliki karakter yang bernilai komersial (Descoings, 2003; Currey and Erwin, 2011). Berdasarkan data Royal Flora Holland (2014), *Kalanchoe blossfeldiana* salah satu tanaman pot yang berkontribusi dalam roda perekonomian di Eropa. Pada tahun 2013, sebanyak 83 juta *K. blossfeldiana* terjual di Belanda. Pada tahun 2017 dilaporkan bahwa *K. piñata* berkontribusi dalam peningkatan perekonomian di Eropa dengan omset penjualan sebesar 69 juta (Royal Flora Holland, 2018).

Beberapa spesies cocor bebek dilaporkan memiliki potensi sebagai bahan pengobatan medis, baik pengobatan luar maupun dalam tubuh. Berdasarkan pengujian fitokimia menyebutkan bahwa cocor bebek mengandung beberapa senyawa kimia antara lain alkaloid, saponin, tanin, dan flavonoid yang memiliki potensi sebagai bahan pengobatan medis (Okwu and Nnamdi, 2011).

Cocor bebek juga dilaporkan bermanfaat sebagai anti-inflamasi dan anti-kanker (Kamboj *et al.*, 2013). Menurut Hasyim dkk. (2012), ekstrak etanol bagian daun cocor bebek menunjukkan efek penyembuhan luka bakar yang tidak berbeda nyata dengan kontrol positif (salep bioplacenton) pada konsentrasi 2,5%. Besarnya manfaat dari cocor bebek menyebabkan permintaan terhadap tanaman ini juga mengalami peningkatan. Namun, usaha peningkatan produksi tanaman ini dihadapkan dengan berbagai permasalahan, yang salah satunya berasal dari hama dan penyakit tanaman.

Penyakit busuk lunak yang disebabkan oleh *Pectobacterium carotovorum* (*Erwinia carotovora* pv. *carotovora*) (Engelhard *et al.*, 1986) menjadi salah satu tantangan dalam melakukan budidaya tanaman cocor bebek. Gejala umum yang ditimbulkan adalah terlihat adanya busuk lunak pada bagian tanaman yang terinfeksi. Menurut Engelhard *et al.* (1986), selama tahap awal pembusukan terlihat adanya perubahan warna cokelat tua sampai hitam pada jaringan tanaman karena klorosis yang terjadi pada daun, tangkai, batang dan akhirnya menyeluruh ke semua bagian tanaman. Hingga saat ini, belum ada laporan tentang identitas patogen busuk lunak pada tanaman cocor bebek di Indonesia serta jenis inang alternatifnya. Informasi tentang identitas suatu patogen tanaman dan kisaran inangnya sangat penting sebagai dasar untuk menentukan tindakan pengendaliannya. Oleh karena itu, perlu dilakukan penelitian untuk mengetahui karakter, identitas, dan kisaran inang penyebab penyakit busuk lunak cocor bebek di Indonesia.

## 1.2 Tujuan

Tujuan penelitian ini sebagai berikut:

1. Mengetahui karakteristik patogen penyebab busuk lunak pada tanaman cocor bebek.
2. Mengetahui identitas patogen penyebab busuk lunak pada tanaman cocor bebek.

3. Mengetahui kisaran inang patogen penyebab busuk lunak selain tanaman cocor bebek.

### 1.3 Kerangka Pemikiran

Bakteri yang termasuk dalam keluarga *Enterobacteriaceae* banyak yang sudah dikenal sebagai patogen tumbuhan dan hewan. Kelompok bakteri ini terdiri dari 6 genus antara lain *Brenneria*, *Dickeya*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Pantoea*, dan *Pectobacterium* (Hauben *et al.*, 1998; Samson *et al.*, 2004). *Dickeya* (= *Erwinia chrysanthemi*) dan *Pectobacterium* (= *Erwinia carotovora*) merupakan kelompok genus yang telah dilaporkan menginfeksi dan menyebabkan gejala busuk lunak pada berbagai jenis tanaman budidaya, termasuk tanaman hias cocor bebek (Ma *et al.*, 2007).

Menurut Engelhard *et al.* (1986), penyakit busuk lunak pada cocor bebek spesies *K. blossfeldiana* di Florida disebabkan oleh *P. carotovorum*. Samson *et al.* (2004) melaporkan bahwa penyakit busuk lunak pada *K. blossfeldiana* disebabkan oleh *Dickeya dianthicola* sp. nov. Menurut Suharjo *et al.* (2014), penyakit busuk lunak pada *Kalanchoe* sp. disebabkan oleh *D. dianthicola*. Menurut Ma *et al.* (2007), penyakit busuk lunak pada *K. blossfeldiana* Poelln. disebabkan oleh *Dickeya* spp. dan *Pectobacterium* spp.

Aminah (2020) menyebutkan bahwa penyakit busuk batang jagung di Indonesia disebabkan oleh *Dickeya zea* memiliki karakter pada hasil uji biokimia antara lain bersifat Gram negatif, fermentatif, *lechinase* positif, *arginine dihydrolase* negatif, fluoresensi negatif, casein positif, dan *softrot* positif. Menurut Sadinda (2021), penyakit busuk batang tanaman pisang disebabkan oleh *Dickeya fangzhongdai* memiliki karakter pada hasil uji biokimia antara lain bersifat Gram negatif, fermentatif, *lechinase* positif, fluoresensi negatif, *arginine dihydrolase* negatif, casein positif, dan *softrot* positif. Menurut Samson (2004), *Pectobacterium cypripedii* bersifat *arginine dihydrolase* negatif. Menurut Nazerian *et al.* (2011), penyakit busuk lunak pada tanaman okra disebabkan oleh

*P. carotovorum* memiliki karakter pada uji biokimia antara lain Gram negatif, bersifat fakultatif, dan reaksi positif pada uji hipersensitif.

Berdasarkan potensi tanaman cocor bebek sebagai bahan baku pengobatan medis, bernilai ekonomi yang cukup tinggi, serta sebagai tanaman hias, menjadi dasar pemikiran bahwa pentingnya mencegah busuk lunak pada tanaman cocor bebek dan kekhawatiran bakteri penyebab busuk lunak tanaman cocor bebek dapat menginfeksi tanaman lain. Akan tetapi masih belum banyak informasi terhadap penyebab penyakit busuk lunak tanaman cocor bebek di Indonesia. Oleh karena itu, perlu adanya identifikasi lebih lanjut menggunakan beberapa metode yang sudah diterapkan peneliti terdahulu diantaranya uji biokimia, identifikasi molekuler serta mengetahui kisaran inang agar dapat meminimalisir penyebaran patogen penyebab busuk lunak pada beberapa tanaman lain yang memiliki nilai komersial dan dibutuhkan masyarakat sebagai salah satu sumber gizi bagi tubuh antara lain bawang bombay, bawang merah, buncis, cabai, daun bawang, gambas, kacang panjang, kubis, lidah buaya, okra, pak coy, paprika, pare, sawi putih, terung, timun, tomat, dan wortel.



## II TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Tanaman Cocor Bebek (*Kalanchoe* spp.)

Tanaman cocor bebek merupakan tanaman sukulen yang hampir seluruh bagian tanaman mengandung air yang tinggi. Cocor bebek termasuk tanaman yang tumbuh tegak dengan tinggi 1-1,5 m dan umumnya batang berlubang membentuk empat sudut serta bercabang (Jaiswal and Sawhney, 2006).

Salah satu manfaat tanaman cocor bebek adalah sebagai bahan dasar pengobatan medis dan bahan insektisida alami, dengan mengambil senyawa metabolit sekunder pada bagian tanaman. Pengujian fitokimia menunjukkan bahwa cocor bebek mengandung beberapa senyawa kimia antara lain alkaloid, saponin, tanin, dan flavonoid yang memiliki potensi sebagai bahan pengobatan medis. Metabolit sekunder pada tanaman cocor bebek dilaporkan memiliki banyak potensi dalam mengobati luka luar maupun dalam (Okwu and Nnamdi, 2011). Menurut Kamboj *et al.* (2013), cocor bebek juga bermanfaat sebagai anti-inflamasi dan anti-kanker. Ekstrak etanol bagian daun cocor bebek menunjukkan efek penyembuhan luka bakar yang tidak berbeda nyata dengan kontrol positif (salep bioplacenton) pada konsentrasi 2,5% (Hasyim dkk., 2012).

### 2.1.1 Taksonomi dan morfologi tanaman cocor bebek

Taksonomi tanaman cocor bebek diklasifikasikan oleh Jaiswal and Sawhney (2006), sebagai berikut:

Kingdom	: Plantae
Divisi	: Magnoliophyta
Kelas	: Magnoliopsida
Ordo	: Saxifragales
Famili	: Crassulaceae
Genus	: <i>Kalanchoe</i>
Species	: <i>Kalanchoe</i> spp.

Tanaman cocor bebek memiliki filotaksis daun yang alternate, sukulen atau berdaging dan panjang kurang lebih 10-20 cm (Jaiswal and Sawhney, 2006). Ukuran lebar daun kurang lebih 6-8 cm (Kirtikar and Basu, 2003). Daun yang berdaging memiliki kadar air yang tinggi dengan warna hijau gelap yang khas dan beberapa spesies berwarna merah (Jaiswal and Sawhney, 2006). Daun berbentuk bulat telur atau elips dengan tepi daun bergerigi yang kadang muncul tunas vegetatif (*rooting*) atau tunas yang sudah dilengkapi dengan akar, batang, dan daun (Kirtikar and Basu, 2003).

Tanaman cocor bebek memiliki batang yang tegak dan tumpul membentuk empat sudut. Batang yang lebih tua memiliki warna cenderung terang, sedangkan bagian batang yang lebih muda memiliki warna yang lebih kemerahan serta terdapat bintik-bintik putih. Pada umumnya batang mengandung kadar air yang tinggi baik batang muda maupun batang tua (Kirtikar and Basu, 2003).

Bunga tanaman cocor bebek pada umumnya berbentuk liontin dan memiliki warna merah (Voorst and Arends, 1982) serta akan muncul berlawanan pada cabang batang. Bagian sepal biasanya berwarna merah lurik dengan warna hijau di dasar dan warna hijau pucat pada bagian atas. Kelopak bunga berwarna ungu kemerahan dan pada bagian pangkal berwarna hijau. Pada filamen berwarna hijau

di pangkal dan merah muda di bagian dasar. Bagian pedikel berbentuk ramping dengan warna hijau tua (Nagaratna and Prakash, 2015; Quazi, 2011). Contoh tanaman cocor bebek sebagai tanaman hias pot dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Tanaman cocor bebek (Pinterest, 2019)

Buah tanaman cocor bebek berbentuk polong dengan empat septa dan banyak terdapat biji di dalamnya. Biji berukuran kecil lonjong dan permukannya yang halus dan hampir tidak memiliki corak. Buah tersebut tertutup dan umumnya akan berbunga pada musim penghujan atau sekitar bulan November sampai Maret, sedangkan pada buah biasanya terjadi di bulan April. Cita rasa buah yang asam manis memiliki efek samping panas pada perut (Paranjpe, 2005; Jaiswal and Sawhney, 2006; Marriage and Wilson, 1971; Quazi, 2011).

### **2.1.2 Habitat tumbuh cocor bebek**

Cocor bebek termasuk genus yang beragam yakni terdiri dari 140 spesies. Cocor bebek pertama kali ditemukan di daerah Madagaskar lalu meluas sampai Arab dan Asia Tenggara. Beberapa diantaranya terdapat spesies baru di berbagai daerah tropis (Descoings, 2003). Pada umumnya cocor bebek termasuk tanaman yang mengandung banyak air dan dapat beradaptasi secara baik pada lingkungan ekstrem. Madagaskar merupakan salah satu pusat daerah yang memiliki beberapa

spesies cocor bebek dengan berbagai keragaman morfologi (Boiteau and Allorge-Boiteau, 1995).

## **2.2 Penyakit Busuk Lunak Cocor Bebek**

### **2.2.1 Gejala penyakit**

Gejala busuk lunak pada tanaman cocor bebek akan sangat tinggi tingkat keparahan penyakitnya ketika musim panas sekitar bulan April dan Mei, sedangkan pada musim dingin tingkat keparahannya cenderung rendah. Gejala busuk timbul pada organ vegetatif daun yang diinokulasi. Gejala layu akan menyebar dari daun sampai batang. Selanjutnya, urat utama dan jaringan laminar yang berdekatan pada daun menjadi klorosis dan atau cokelat tua sampai hitam. Setelah itu tangkai daun akan berubah warna cokelat tua sampai hitam. Infeksi akan menyebar dengan cepat yang ditandai bagian terminal dan batang yang berubah warna dari cokelat tua sampai hitam dan akhirnya nekrosis menyebar ke seluruh tanaman. Sekumpulan bakteri akan keluar dari cincin pembuluh darah ketika batang yang layu dipotong (Engelhard *et al.*, 1986).

### **2.2.2 Penyebab penyakit**

Gejala busuk lunak pada umumnya menginfeksi beberapa bagian tanaman antara lain batang, daun, dan atau tangkai daun. Menurut Engelhard *et al.* (1986), patogen penyebab penyakit busuk lunak pada *K. blossfeldiana* yakni *P. carotovorum* (*E. carotovora* pv. *carotovora*). Menurut Janse and Ruissen (1988), busuk lunak tanaman cocor bebek disebabkan *E. chrysanthemi* dan digolongkan sebagai biovar 7. Menurut Suharjo *et al.* (2014), penyakit busuk lunak pada *Kalanchoe* sp. disebabkan oleh *D. dianthicola*.

### 2.2.3 Perkembangan penyakit

Busuk lunak tanaman cocor bebek yang disebabkan oleh *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* mempunyai rentang pertumbuhan dengan suhu optimal kurang lebih 28-30 °C atau 82-86 °F akan tetapi dapat tumbuh hingga 37-42 °C atau 98-108 °F; sedangkan *D. chrysanthemi* memiliki suhu optimal dalam pertumbuhan kurang lebih 34-37 °C atau 93-98 °F. Beberapa strain dapat tumbuh di atas suhu 40 °C atau 104 °F (Daughtrey *et al.*, 1995). Menurut Engelhard *et al.* (1986), tingkat keparahan penyakit busuk lunak *P. carotovorum* (*E. carotovora* pv. *carotovora*) tanaman cocor bebek pada suhu dingin cenderung rendah, akan tetapi pada musim panas keparahan penyakit justru lebih tinggi.

### 2.2.4 Kisaran inang

Patogen penyebab busuk lunak pada tanaman cocor bebek sudah dilaporkan keberadaannya yakni *Pectobacterium* spp. (= *E. carotovora*) dan dapat menginfeksi beberapa tanaman. Menurut Gardan *et al.* (2003), terdapat tiga subspecies *P. carotovorum* antara lain subsp. *atrosepticum*, *betavascularum* dan *wasabiae* yang menginfeksi beberapa tanaman yakni kentang, tomat, dan wasabi. Busuk lunak pada beberapa komoditas pertanian yang disebabkan oleh *Dickeya* spp. (= *E. chrysanthemi*) antara lain busuk lunak umbi kentang (Haerani *et al.*, 2015), busuk lunak pada nanas (Aeny *et al.*, 2020), dan busuk lunak pada anggrek (Fu and Huang, 2011).

### 2.2.5 Pengendalian penyakit

Pengendalian busuk lunak yang dilakukan secara hayati dapat dilakukan dengan konsep pencegahan. Kegiatan perbanyakan seperti stek tidak dianjurkan untuk mengambil bagian tanaman sakit atau terlihat sudah terinfeksi oleh bakteri serta peralatan yang sudah dibersihkan setiap pemakaian dari tanaman satu ke tanaman yang lain. Jika pada bagian area propagasi, terjadi *soft rotting* maka perlu

dilakukan eradikasi dan dilakukan disinfektan semua permukaan dengan senyawa amonium kuarterner atau produk lainnya (Daughtrey *et al.*, 1995).



### III. BAHAN DAN METODE

#### 3.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Bioteknologi Pertanian dan Laboratorium Ilmu Penyakit Tumbuhan, Fakultas Pertanian, Universitas Lampung. Penelitian ini dilaksanakan mulai September 2021 hingga Maret 2022.

#### 3.2 Bahan dan Alat

Bahan yang digunakan pada penelitian ini antara lain akuades, air steril, umbi kentang, minyak parafin, kuning telur, KOH 3%, alkohol 70%, ethidium bromide (EtBr), 5% NaCl, MyTaq<sup>TM</sup> *Red Mix*, DNA primer (RS1 dan RS2), *marker DNA ladder*, *loading dye*, *buffer TE*, Bromthymol blue (BTB) 2%, agarose, tanaman cocor bebek, dan tembakau. Bahan organik yang digunakan adalah *Lactose*, *Ascorbic Acid*, *Myo-inositol*, *Mannitol*, *Innulin*, *5-Ketogluconate*, *D-raffinose*, dan *Glycerol*. Media biakan yang digunakan yaitu *Yeast Peptone Agar* (YPA) dan *Potato Peptone Glucose Agar* (PPGA). Media yang digunakan untuk pengujian adalah King's B, Oksidatif/Fermentatif (O/F), dan *Yeast Peptone* (YP).

Alat yang digunakan pada penelitian ini *Laminar Air Flow* (LAF), *autoclave*, *rotamixer*, *microwave*, *shaker*, *water bath*, *magnetic bar*, *magnetic stirrer*, *freezer*, jarum preparat, jarum ose, pinset, mikro pipet, tabung *eppendorf* 1,5 mL, tabung reaksi, erlenmeyer, bunsen, gelas objek, gelas ukur, dan cawan petri.

Alat yang digunakan untuk identifikasi molekuler adalah mesin PCR, alat elektroforesis, *gel documentation system*, *microsentrifuge*, cetakan gel 20x16x1 cm<sup>3</sup> mikro pipet 0-1000 µl, pipet tip 0-1000 µ, dan tabung *eppendorf* 100 µl. Alat lain yang digunakan yaitu nampan plastik, plastik tahan panas, spidol, penggaris, kertas label, pisau, aluminium foil, *plastic wrap*, karet gelang, korek api, kapas, dan tisu.

### 3.3 Metode Penelitian

Isolat bakteri yang digunakan pada penelitian ini sebanyak 4 jenis. Isolat tersebut merupakan koleksi Laboratorium Bioteknologi Pertanian, Fakultas Pertanian, Universitas Lampung. Informasi secara detail tentang jenis isolat tersebut dapat dilihat dalam Tabel 1.

Tabel 1. Jenis isolat cocor bebek yang digunakan dalam penelitian

No	Kode Isolat	Inang	Tahun Isolasi
1.	D112		
2.	D221	Daun	2021
3.	D211		
4.	B131	Batang	2021

#### 3.3.1 Uji Patogenesitas

Uji patogenesitas bertujuan untuk mengkonfirmasi bakteri yang didapatkan benar merupakan bakteri patogen penyebab busuk lunak tanaman cocor bebek.

Pengujian dilakukan dengan menyiapkan tanaman cocor bebek dan suspensi bakteri. Persiapan suspensi bakteri dilakukan dengan mengambil 2 ose bakteri berumur 24 jam, selanjutnya dimasukkan ke dalam tabung *eppendorf* 1,5 mL yang sudah berisi air steril sebanyak 1 mL. Kemudian suspensi bakteri dihomogenkan menggunakan *rotamixer*. Pengujian ini dilakukan dengan cara menyuntikkan 1 mL suspensi bakteri pada bagian tanaman cocor bebek. Kemudian dilakukan pengamatan selama 7 hari setelah inokulasi.

### **3.3.2 Identifikasi penyebab penyakit**

Identifikasi penyebab penyakit busuk lunak pada cocor bebek ini dilakukan melalui beberapa jenis pengujian, diantaranya:

#### **3.3.2.1 Uji biokimia**

##### **(a) Uji Gram**

Uji Gram bertujuan untuk mengetahui isolat bakteri termasuk Gram positif atau Gram negatif. Pengujian dilakukan dengan mengambil satu ose isolat bakteri yang berumur 24 jam. Satu ose bakteri diletakkan pada kaca preparat dan setelah itu ditetaskan KOH 3% dan diratakan pada kaca tersebut menggunakan jarum ose. Lalu jarum ose diangkat perlahan hingga tinggi kurang lebih 1 cm. Apabila terbentuk lendir dan mengental saat diangkat maka menunjukkan bahwa reaksi KOH dikatakan positif yang atau dapat diartikan isolat bakteri tersebut adalah Gram negatif. Apabila ketika diangkat tidak membentuk lendir dan mengental maka reaksi KOH dikatakan negatif yang artinya bakteri tersebut adalah Gram positif (Powers, 1995).

##### **(b) Uji oksidatif/fermentatif (O/F)**

Uji oksidatif/ fermentatif bertujuan untuk mengetahui sifat isolat bakteri termasuk aerob atau anaerob. Pengujian bakteri dilakukan menggunakan media O/F (Basal medium). Media tersebut dibuat dari 98 g bubuk media O/F dan 1000 mL akuades. Setelah itu media dituang sebanyak 4 mL pada tabung reaksi dan disterilisasi. Selanjutnya diambil isolat bakteri yang berumur 24 jam menggunakan jarum preparat dan setelah itu ditusukkan sampai dasar tabung pada media O/F. Lalu dua tabung dengan isolat bakteri yang sama salah satunya diberi minyak parafin steril dan salah satunya lagi tidak diberi minyak parafin. Setelah itu bakteri diinkubasi pada suhu 28 °C selama 1-7 hari dan diamati perubahan warna yang terjadi pada media O/F. Apabila terjadi perubahan warna hijau

menjadi warna kuning pada media O/F yang diberi minyak parafin maupun tidak maka reaksi ini menunjukkan bahwa bakteri tersebut bersifat fermentatif. Sebaliknya, apabila terjadi perubahan warna hijau menjadi warna kuning pada media yang tidak diberi minyak parafin maka reaksi ini menunjukkan bahwa bakteri tersebut bersifat oksidatif (Tito, 2014).

### **(c) Uji *lechitinase***

Uji *lechitinase* bertujuan untuk mengetahui kemampuan isolat bakteri dalam menggunakan *lechitin*. Pengujian ini dilakukan dengan menggunakan media berbahan dasar YPA dan *egg yolk*. Bahan yang digunakan untuk membuat media YPA antara lain 10 g pepton, 5 g *yeast*, 20 g agar, dan 1000 mL akuades. Pengujian dilakukan dengan memasukkan 0,5 mL *egg yolk* ke dalam cawan petri setelah itu ditambahkan 10 mL media YPA kemudian dihomogenkan sampai merata dan ditunggu sampai media menjadi dingin. Selanjutnya diambil isolat bakteri yang sudah berumur 24 jam sebanyak satu ose dan digoreskan pada media *lechitinase*. Setelah itu bakteri diinkubasi pada suhu 28 °C dan diamati selama 1-7 hari. Apabila pada area goresan terdapat zona putih buram yang menyebar disekitar koloni bakteri maka isolat tersebut menunjukkan *lechitinase* positif. Sebaliknya apabila tidak menunjukkan zona buram pada area goresan maka dikatakan sebagai *lechitinase* negatif (Desnidasari, 2015).

### **(d) Uji fluoresensi pada media King's B**

Uji fluoresensi dilakukan untuk mengetahui kemampuan bakteri dalam menghasilkan fluoresen. Pengujian dilakukan pada cawan petri yang sudah terdapat media King's B. Bahan media yang digunakan yaitu 20 g pepton, 1,5 g  $K_2HPO_4$ , 15 mL gliserol, 15 g agar, dan 1000 mL akuades. Pengujian dilakukan dengan mengambil satu ose bakteri berumur 24 jam selanjutnya digoreskan pada media King's B. setelah itu diinkubasi dalam suhu ruang selama 24-48 jam. Apabila bakteri memproduksi pigmen fluoresen maka reaksi ini akan terlihat

ketika biakan bakteri disinari ultra violet (UV) menghasilkan warna hijau berpendar sehingga digolongkan sebagai bakteri fluoresen (Schaad *et al.*, 2001).

**(e) Uji *arginine dihydrolase* (Moeller media)**

Uji *arginine dihydrolase* dilakukan untuk mengetahui kemampuan pertumbuhan bakteri pada kondisi anaerob dalam media yang mengandung bahan kimia arginin. Pengujian dilakukan dengan menggunakan media moeller 21 g dan 1000 mL akuades, kemudian dihomogenkan. Setelah itu media dipanaskan menggunakan *microwave* dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi, selanjutnya disterilisasi menggunakan *autoclave*. Pengujian dilakukan dengan mengambil bakteri yang sudah berumur 24 jam menggunakan jarum preparat untuk ditusukkan pada media moeller sampai dasar tabung dan setelah itu ditambahkan minyak parafin steril. Selanjutnya media moller diinkubasi pada suhu 28 °C dan dilakukan pengamatan selama 7-14 hari. Pengamatan dilakukan untuk melihat perubahan warna yang terjadi, apabila terdapat perubahan warna pada media dari merah kecokelatan menjadi warna ungu maka reaksi ini menunjukkan reaksi positif, sedangkan reaksi negatif ditandai dengan adanya perubahan warna media menjadi warna kuning (Suharjo, 2013).

**(f) Uji casein**

Uji casein bertujuan untuk mengetahui kemampuan bakteri dalam menghidrolisis protein. Pengujian dilakukan dengan menggunakan media *Skim Milk Agar*. Bahan yang digunakan yaitu 5,1 g *Skim Milk Agar*, 1,5 agar batang, dan 100 mL akuades. Pengujian dilakukan dengan mengambil satu ose bakteri berumur 24 jam. Selanjutnya digoreskan pada cawan petri yang sudah berisi media *Skim Milk Agar*. Setelah itu bakteri diinkubasi selama 24-48 jam hari dalam keadaan suhu 28 °C. Apabila terdapat zona bening di sekitar goresan bakteri maka reaksi ini menunjukkan reaksi positif, sedangkan jika tidak terdapat zona bening maka reaksi ini menunjukkan reaksi negatif (Fardiaz, 1992).

**(g) Uji *soft rot***

Uji *soft rot* dilakukan untuk mengetahui isolat bakteri yang menyebabkan busuk lunak pada tanaman cocor bebek termasuk ke dalam bakteri penyebab busuk lunak atau tidak. Pengujian dilakukan dengan memotong umbi kentang setebal kurang lebih 1 cm, selanjutnya umbi diletakkan pada gelas beaker dan direndam air dengan keadaan air keran yang mengalir selama 30 menit. Setelah itu umbi kentang ditiriskan dan masing-masing irisan kentang diletakkan pada cawan petri yang diberi tisu dan sudah dilembabkan dengan aquades. Setelah itu diambil 1 ose isolat bakteri yang berumur 24 jam kemudian digoreskan pada bagian tengah permukaan kentang. Kemudian umbi kentang diinkubasi selama 24-48 jam dan dilakukan pengamatan. Tanda positif ditunjukkan oleh adanya pembusukan dan lendir pada umbi kentang (Lelliot and Stead, 1987).

**(h) Uji hipersensitif**

Uji hipersensitif bertujuan untuk mengetahui respon tanaman tembakau setelah diinokulasi dengan isolat bakteri. Pengujian dilakukan dengan mengambil satu ose bakteri yang sudah berumur 24 jam dan disuspensikan menggunakan 1 mL air steril setelah itu dimasukkan ke dalam tabung *ependorf* 1,5 mL. Selanjutnya suspensi dihomogenkan menggunakan *rotamixer*. Setelah itu diambil 1 mL suspensi bakteri dan disuntikkan pada daun tembakau lebih tepatnya diantara kedua epidermis daun tembakau menggunakan jarum suntik. Bagian area suntikan diberikan label dan diinkubasi selama 24-48 jam. Apabila setelah diinkubasi terbentuk gejala nekrotik pada area inokulasi maka reaksi ini menunjukkan reaksi positif, sedangkan tidak adanya gejala nekrotik maka reaksi ini menunjukkan reaksi negatif (Baroroh dkk., 2014).

**(i) Uji kemampuan tumbuh pada beberapa suhu**

Uji ini dilakukan untuk mengetahui kemampuan isolat bakteri apakah dapat tumbuh pada suhu 39 °C dan 40 °C. Pengujian dilakukan pada media *Yeast Pepton*

(YP) dengan bahan yaitu 10 g pepton, 5 g *yeast*, dan 1000 mL akuades. Selanjutnya diambil satu ose bakteri yang sudah berumur 24 jam dan disuspensikan ke dalam tabung *eppendorf* 1,5 mL yang telah berisi 1 mL air steril. Setelah itu suspensi dihomogenkan menggunakan *rotamixer*. Setelah itu suspensi diambil menggunakan jarum ose dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang sudah berisi media YP. Setelah itu bakteri diinkubasi di dalam *waterbath* selama 3-7 hari yang dilakukan secara bergantian pada suhu 39 °C dan 40 °C. Apabila setelah dilakukan inkubasi dan terjadi perubahan warna media dari warna kuning keruh menjadi putih keruh maka reaksi ini menunjukkan reaksi positif (Oktaviana, 2018).

#### **(j) Uji Kemampuan untuk menggunakan beberapa jenis bahan organik**

Uji pertumbuhan bertujuan untuk mengetahui kemampuan tumbuh bakteri pada bahan organik tertentu. Media yang digunakan adalah media Ayer's dengan komposisi  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$  1 g, KCl 0,2 g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,2 g, Bromthymol Blue (BTB) 2%, dan air akuades sebanyak 1000 mL. Bakteri diuji dengan beberapa bahan organik yang berbeda, yaitu *Inulin*, *Lactose*, *D-raffinose*, *5-ketogluconate*, *Mannitol*, *Myo-inositol*, dan *Glycerol*. Pengujian dilakukan dengan mengambil satu ose bakteri berumur 24 jam dan dimasukkan ke dalam tabung *eppendorf* 1,5 mL yang berisi 1 mL air steril. Selanjutnya dihomogenkan menggunakan *rotamixer*. Setelah itu bakteri diambil menggunakan jarum preparat dan ditusukkan pada media Ayer's sampai dasar tabung. Setelah itu diinkubasi pada suhu 28 °C dan dilakukan pengamatan selama 21 hari. Apabila reaksi positif maka terjadi perubahan warna media dari hijau menjadi kuning atau biru dengan menyesuaikan bahan organik yang digunakan, reaksi ini menunjukkan bahwa bakteri mampu menggunakan bahan organik tersebut (Suharjo, 2013).

#### **3.3.2.2 Identifikasi molekuler**

Identifikasi secara molekul merupakan identifikasi yang dilakukan melalui beberapa tahapan yaitu ekstraksi DNA, amplifikasi menggunakan mesin PCR,

elektroforesis, dan visualisasi hasil PCR, sekuensing DNA, dan analisis hasilnya. Sebanyak empat isolat bakteri digunakan sebagai representasi isolat yang diidentifikasi lebih lanjut secara molekuler.

#### **(a) Ekstraksi DNA**

Ekstraksi bakteri dilakukan secara manual. Bakteri yang berumur 24 jam diambil sebanyak satu ose dari media PPGA dan dipindahkan ke dalam tabung yang sudah berisi media *Yeast Peptone Broth* dan diinkubasi selama 24 jam di dalam shaker dengan kecepatan 180 rpm. Kemudian media *Yeast Peptone Broth* dipindahkan ke dalam tabung mikrosentrifus kemudian sentrifus pada 14.000 rpm selama 1 menit dan diulang sampai media *Yeast Peptone Broth* habis. Setelah itu ditambah 567  $\mu$ l TE menggunakan mikropipet, selanjutnya ditambah 30  $\mu$ l SDS 10% + 3  $\mu$ l proteinase K dan dihomogenkan. Tube yang sudah berisi bakteri diinkubasi di dalam *waterbath* pada suhu 37 °C selama 1 jam dan ditambahkan 100  $\mu$ l NaCl 5M, lalu dihomogenkan secara perlahan. Kemudian ditambah 80  $\mu$ l CTAB 2%. Diinkubasi kembali pada suhu 65 °C selama 10 menit di dalam *waterbath*, setelah diinkubasi, selanjutnya ditambahkan 720  $\mu$ l *Chloroform Isoamyl Alcohol* (CI) (24:1) dan dihomogenkan dengan kuat menggunakan tangan dan disentrifuse 14.000 rpm selama 5 menit.

Sebanyak 600  $\mu$ l supernatan diambil dan dipindahkan ke dalam tube 1.5 mL yang baru, kemudian ditambah *Phenol Chloroform Isoamylalcohol* (PCI) (25:24:1) dengan volume yang sama dengan supernatan, lalu dihomogenkan dengan kuat menggunakan tangan dan disentrifuse 14.000 rpm selama 5 menit, setelah disentrifuse supernatan diambil sebanyak 400  $\mu$ l dan dipindahkan ke dalam tube 1,5 mL yang baru, ditambahkan isopropanol 60% pada volume yang sama dengan supernatan, dihomogenkan secara perlahan dan diinkubasi di dalam refrigerator selama 10 menit. Hasil inkubasi disentrifuse 14.000 rpm selama 15 menit. Setelah sentrifuse selesai, supernatan dibuang dan ditambahkan ethanol 70% dingin sebanyak 400  $\mu$ l, lalu disentrifuse kembali selama 5 menit dengan kecepatan 14.000 rpm. Setelah itu ethanol dibuang dan pelet diinkubasi selama 1 hari pada



suhu ruang. Setelah kering tube berisi pelet ditambahkan 20  $\mu\text{l}$  TE. Untuk mengidentifikasi ada tidaknya DNA dilakukan elektroforesis dan divisualisasikan menggunakan *Digidoc Imaging System*.

### **(b) Amplifikasi DNA dengan PCR**

Amplifikasi DNA dilakukan menggunakan mesin PCR dengan cara memasukkan *Master Mix (Red Mix)* sebanyak 12,5  $\mu\text{l}$  ke dalam tabung *ependorf* 100  $\mu\text{l}$ , lalu ditambahkan primer *RecA* yaitu RS1 dan RS2 masing masing sebanyak 1  $\mu\text{l}$ , larutan ekstrak DNA bakteri sebanyak 1  $\mu\text{l}$  dan akuades steril 9,5  $\mu\text{l}$ . Larutan yang sudah dibuat selanjutnya diamplifikasi menggunakan mesin PCR. Ada lima tahapan dalam menggunakan PCR, yaitu inisiasi, denaturasi, annealing, ekstensi, dan elongasi. Tahapan inisiasi merupakan tahapan yang dilakukan pada suhu 95  $^{\circ}\text{C}$  selama 5 menit dan hanya dalam 1 kali siklus, dilanjutkan dengan 30 siklus tahap denaturasi pada suhu 95  $^{\circ}\text{C}$  selama 1 menit, selanjutnya yaitu annealing pada suhu 55  $^{\circ}\text{C}$  selama 1 menit, dan ekstensi pada suhu 72  $^{\circ}\text{C}$  selama 1 menit serta tahap terakhir yaitu elongasi pada suhu 72  $^{\circ}\text{C}$  selama 5 menit dalam 1 kali siklus (Suharjo, 2014).

### **(c) Elektroforesis dan visualisasi hasil PCR**

Elektroforesis dilakukan dengan pembuatan gel agarose 0,5% yang sudah ditambah 1  $\mu\text{l}$  ethidium bromide (ETBr 10 mg/mL), setelah itu dituangkan pada cetakan gel 20x16x1  $\text{cm}^3$  dengan sisir. *Gel agarose* dimasukkan ke dalam alat elektroforesis yang berisi larutan TBE. Pada sumur pertama dalam agarose dimasukkan 3  $\mu\text{l}$  Marker DNA *ladder*. Pada sumur berikutnya diisi oleh 1  $\mu\text{l}$  hasil PCR yang sudah dihomogenkan dengan 1  $\mu\text{l}$  *loading dye*, selanjutnya dilakukan elektroforesis selama 45-70 menit dengan tegangan 50 volt. Hasil PCR ditunggu hingga DNA bergerak kebawah hingga ditengah-tengah baris 3 dan 4 dari ujung lawan. Hasil elektroforesis dapat dilihat dengan *digidoc imaging system* yang hasilnya disimpan dalam komputer dan keberadaan profil DNA antar lokus gen dapat terlihat berupa pita terang (Oktaviana, 2018).

#### **(d) Sekuensing dan analisis hasilnya**

Hasil PCR yang diperoleh dikirim ke PT Genetika Science Jakarta untuk dilakukan sekuensing. Hasil sekuensing yang sudah diperoleh selanjutnya dianalisis menggunakan program MEGA 6 (Kumar *et al.*, 2016).

#### **3.3.3 Uji kisaran inang**

Pengujian ini dilakukan untuk mengetahui kisaran inang penyebab busuk lunak selain tanaman cocor bebek. Pengujian dilakukan dengan mengambil satu ose bakteri yang berumur 24 jam, setelah itu disuspensikan dengan memasukkan bakteri dalam tabung *eppendorf* 1,5 mL yang berisi air steril 1 mL. setelah itu suspensi bakteri dihomogenkan dengan menggunakan *rotamixer*. Selanjutnya bakteri disuntikkan pada tanaman uji yang sebelumnya sudah didisinfektan menggunakan tisu yang diberi aquades. Jika bagian tanaman yang disuntik menunjukkan gejala busuk sebelum atau pada inkubasi hari ke 7 maka reaksi ini menunjukkan bahwa isolat bakteri dapat menginfeksi busuk lunak pada inang tersebut.

Pengujian pada bagian batang diinokulasi pada jenis tanaman di antaranya daun bawang, brokoli, pak coy, kubis, dan sawi putih. Pengujian pada bagian daun diinokulasi pada tanaman lidah buaya. Pengujian pada bagian buah diinokulasi pada jenis tanaman diantaranya terung, cabai, daun seledri, paprika, timun, kacang panjang, buncis, labu siam, okra, gambas, pare, dan tomat. Pengujian pada bagian umbi diinokulasi pada jenis tanaman wortel, bawang merah, bawang putih, dan bawang bombay.

## V. SIMPULAN DAN SARAN

### 5.1 Simpulan

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan dapat disimpulkan bahwa:

1. Bakteri penyebab busuk lunak tanaman cocor bebek memiliki karakteristik antara lain Gram negatif, bersifat fermentatif, *lechitinase* positif, *soft rot* positif, hipersensitif positif, tidak berpendar pada media King's B negatif, *arginine dihydrolase* negatif, casein positif, dan mampu tumbuh pada suhu 39 °C dan 40 °C serta mampu menggunakan *Inulin*, *Lactose*, *D-raffinose*, *5-ketogluconate*, *Mannitol*, *Myo-inositol*, dan *Glycerol* sebagai sumber karbonnya.
2. Bakteri busuk lunak pada tanaman cocor bebek yang ditemukan disebabkan oleh *Pectobacterium brasiliense* (kode isolat D112 dan D221) dan *Dickeya dadantii* subsp. *dieffenbachiae* (kode isolat D211 dan B131).
3. Bakteri penyebab busuk lunak cocor bebek mampu menginfeksi beberapa jenis tanaman yaitu bawang bombay, bawang merah, buncis, cabai, daun bawang, gambas, kacang panjang, kubis, lidah buaya, okra, pak coy, paprika, pare, sawi putih, terung, timun, tomat, dan wortel.

### 5.2 Saran

Berdasarkan hasil penelitian yang didapatkan, perlu dilakukan pengujian lebih lanjut tentang tingkat ketahanan beberapa jenis kultivar cocor bebek terhadap *Pectobacterium brasiliense* dan *Dickeya dadantii* subsp. *dieffenbachiae* serta dilakukan uji kisaran inang pada beberapa tanaman hias.

## DAFTAR PUSTAKA

- Aeny, T. N., Suharjo, R., Ginting, C., Hapsoro, D. dan Niswati, A. 2020. Characterization and host range assessment of *Dickeya zea* associated with pineapple soft rot disease in East Lampung, Indonesia. *Biodiversitas*. 21(2): 587-595.
- Aminah, D. I. 2020. Karakter Fenotipe, Identitas, dan Patogenesitas *Dickeya zea* Penyebab Penyakit Busuk Batang Jagung di Indonesia. *Skripsi*. Universitas Lampung. Bandar Lampung.
- Arriani, I. F., Abadi, A. L., dan Aini, L. Q. 2020. Karakterisasi bakteri patogen penyebab layu pada tanaman bawang merah (*Allium ascalonicum* L.). *Journal Viabel Pertanian*. 14(1): 69-75.
- Baroroh, H. F. L. Q., Aini, A. L., dan Abadi. 2014. Uji efektivitas antibakteri ekstrak daun dan duah mengkudu (*Morinda citrifolia* L.) terhadap blood disease bacterium. *Jurnal Hama dan Penyakit Tumbuhan*. 2(2): 87-97.
- Boiteau, P. and Allorge-Boiteau, L. 1995. *Kalanchoe (Crassulacées) de Madagascar: Systématique, Ecophysiologie et Phytochimie*. Karthala Editions. Paris.
- Currey, C. and Erwin, J. 2011. Photoperiodic flower induction of several *Kalanchoe* species and ornamental characteristics of the flowering species. *Horticultural Science*. 46(1): 35-40.
- Danaatmadja, Y., Subandiyah, S., Joko, T., dan Sari, C. U. 2009. Isolasi dan karakterisasi *Ralstonia syzygii*. *Jurnal Perlindungan Tanaman Indonesia*. 15(1): 7-12.
- Daughtrey, M. L., Wick, R. L., and Peterson, J. L. 1995. *Compendium of flowering potted plant diseases*. APS Press, St. Paul.

- Descoings, B. 2003. *Kalanchoe in Eggle U. Hartmann HEK (eds) Illustrated handbook of succulent plants Crassulaceae*. Springer Verlag, New York, pp. 143-181.
- Desnidasari. 2015. Karakterisasi dan Uji Kisaran Inang Bakteri Penyebab Penyakit Busuk Lunak pada Tanaman Nanas (*Ananas comosus* L., Merr.). *Skripsi*. Universitas Lampung. Bandar Lampung.
- Engelhard, A. W., Mcguire, R. G., and Jones, J. B. 1986. *Erwinia carotovora* pv. *carotovora*, a pathogen of *Kalanchoe blossfeldiana*. *Plant Disease*. 70(6): 575-577.
- Esselman, M. T. and Liu, P. V. 1961. *Lechitinase* production by Gram negative bacteria. *Journal Bacteriology*. 81(6): 939-945.
- Fardiaz, S. 1992. *Mikrobiologi Pangan I*. PT Gramedia Pustaka Utama. Jakarta.
- Fu, S. F. and Huang, H. J. 2011. Molecular characterization of the early response of orchid *Phalaenopsis amabilis* to *Erwinia chrysanthemi* infection. *Orchid Biotech II*. Department of Life Sciences, National Cheng-Kung University. Taiwan.
- Funakubo, T., Watauchi, K., Murakami, Y., and Takikawa, Y. 2010. *Erwinia chrysanthemi* isolated from peach sudden death syndrome (Abstract in Japanese). *Annu Rep Kanto-Tosan Plant Prot Soc*. 57: 41-43.
- Gardan, L., Gouy, C., Christen, R., and Samson, R. 2003. Elevation of three subspecies of *Pectobacterium carotovorum* to species level: *Pectobacterium atrosepticum* sp. nov., *Pectobacterium betavascularum* sp. nov. and *Pectobacterium wasabiae* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 53: 381-391.
- Haerani, Nawangsih, A. A., dan Damayanti, T. A. 2015. Deteksi dan identifikasi *Dickeya* sp. sebagai organisme pengganggu tumbuhan karantina A2 pada tanaman kentang di Jawa. *Jurnal Fitopatologi Indonesia*. 11(4): 106-107.
- Hardiansyah, M. Y., Musa, Y., dan Jaya, A. M. 2020. Identifikasi plant growth promoting rhizobacteria pada rizosfer bambu duri dengan Gram KOH 3%. *Agrotechnology Research Journal*. 4(1): 41-46.
- Hasyim, Nursiah, Kristian, L. P., Iradah, J., dan Ajeng, K. 2012. Formulasi dan uji efektivitas gel luka bakar ekstrak daun cocor bebek (*Kalanchoe pinnata*) pada kelinci (*Oryctolagus cuniculus*). *Majalah Farmasi dan Farmakologi*. 16(2): 89-94.

- Hauben, L., Moore, E. R. B., Vauterin, L., Steenackers, M., Mergaert, J., Verdonck, L., and Swings, J. 1998. Phylogenetic position of phytopathogens within the *Enterobacteriaceae*. *Systematic and Applied Microbiology*. 21: 384-97.
- Jaiswal, S. and Sawhney, S. 2006. Correlation of epiphyllous bud differentiaton with foliar senescence in crassulacean succulent *Kalanchoe pinnata* as revealed by thidiazuron and ethrel application. *Journal of Plant Physiology*. 163: 717-722.
- Janse, J. D. and Ruissen, M. A. 1988. Characterization and classification of *Erwinia chrysanthemi* strains from several hosts in the Netherlands. *Phytopathology*. 78: 800-808.
- Kamboj, A., Rathour, A., and Kaur, M. 2013. Bufadienolides and their medicinal utility: a review. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 5: 20-27.
- Kirtikar, K. R. and Basu, B. D. 2003, Indian medicinal plants with illustrations. *Dictionary of Indian*. 5(2): 1394-1396.
- Kumar, A. M. S., Hunjan, H. Kaur, P. P., Singh and Kaur, R. 2016. Evaluation of management of bacterial stalk rot of maize (*Dickeya zaeae*) using bioagents and chemical agents. *Journal of Applied and Natural Science*. 8(3): 1146-1151.
- Lay, B. W. 1994. *Analisis Mikrobial di Laboratorium* . PT Grafindo Persada. Jakarta. 168.
- Lelliot, R. A. and Stead, D. E. 1987. *Methods for the Diagnosis of Bacterial Disease of Plants*. Blackwell Scientific Publications. Oxford.
- Ma, B., Hibbing, M. E., Kim, H. S., Reedy, R. M., Yedidia, I., Breuer, J., Breuer, J., Glasner, J. D., Perna, N. T., Kelman, A., and Charkowski, O. 2007. Host range and molecular phylogenies of the soft rot enterobacterial genera *Pectobacterium* and *Dickeya*. *Phytopathology*. 97: 1150-1163.
- Marriage, P. B. and Wilson, D. G. 1971. Analysis of the organic acids of *Bryophyllum pinnatum*. *Canadian Journal of Biochemistry*. 49: 282-295.
- Muharni, Juswardi, dan Prihandayani, I. 2013. Isolasi dan identifikasi bakteri termofilik penghasil protease dari sumber air panas Tanjung Sakti Lahat Sumatera selatan . *Jurnal FMIPA UNILA*. 1(1): 139-143.
- Miyahira, N., Takushi, T., Furuya, N., Kawano, S., Takeshita, M., and Tsuchiya, K. 2008. Bacterial shoot blight of mango (*Mangifera indica* L.) caused by *Erwinia chrysanthemi* (Abstract in Japanese). *Ann Phytopathol Society of Japan*. 74: 253-254.

- Nagaratna, A. and Prakash, L., H. 2015. A Comprehensive review on parnabeeja (*Brophyllum pinnatum* (Lam.) Oken). *Journal of Medical Plants Studies*. 3(5): 166-171.
- Nazerian, E., Sijam, K., Ahmad, Z. A. M., and Keshavarz, K. 2011. Characterization of *Pectobacterium carotovorum* causing a new soft rot disease on okra in Malaysia. *Journal General Plant Pathology*. 77: 292-294.
- Oktaviana, H. A. 2018. Identifikasi dan Uji Kisaran Inang Penyebab Penyakit Mati Pucuk Pada Tanaman Pepaya (*Carica papaya* L.). *Skripsi*. Universitas Lampung. Bandar Lampung.
- Okwu, D. E. and Nnamdi, F. U. 2011. Two novel flavanoid from *Brophyllum pinnatum* and their antimicrobial activity. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*. 3(2): 1-10.
- Onkendi, E. M. and Moleleki, L. N. 2014. Characterization of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* and *brasiliense* from diseased potatoes in Kenya. *European Journal of Plant Pathology*. 139(3): 557-566.
- Paranjpe, P. 2005. *Indian Medicinal Plants: Forgotten Healers*. Chaukhamba Sanskrit Pratisthan. 194-195.
- Pinterest. 2019. [https://www.Pretty Flowering Kalanchoe Interior Plants Nomes de flores, Jardim, Flor de maio \(pinterest.com\)](https://www.Pretty Flowering Kalanchoe Interior Plants Nomes de flores, Jardim, Flor de maio (pinterest.com)). Diakses tanggal 6 januari 2022.
- Powers, E. M. 1995. Efficacy of the ryu nonstaining KOH technique for rapidly determining gram reactions of foodborne and waterborne bacteria and yeasts. *Applied Environment Microbiology*. 61(10): 3756-3758.
- Quazi, M. A. A. U., Tatiya, Molvi, K., Sayyed, N., and Shaikh, S. 2011. The Miracle Plant (*Kalanchoe pinnata*): A phytochemical and pharmacological review. *International Journal of Research in Ayurverda and Pharmacy*. 2(5): 1478-1482.
- Royal Flora Holland. 2014. Flora Holland. *Facts and figures 2013*. <https://www.floraholland.com/media/2460310/Kengetallen-EN-2013.pdf>. Diakses tanggal 1 November 2021.
- Royal Flora Holland. 2018. *Annual report 2017*. <https://www.royalfloraholland.com/en>. Diakses tanggal 27 September 2021.
- Sadinda, B. F. 2021. Karakterisasi dan Identifikasi *Dickeya* sp. Penyebab Penyakit Busuk Batang Pada Tanaman Pisang Di Lampung. *Skripsi*. Universitas Lampung. Bandar Lampung.

- Sakai, K. 1997. Occurrence of bacterial wilt of *Kalanchoe blossfeldiana* caused by *Erwinia chrysanthemi* (in Japanese). *Proceedings Kanto-Tosan Plant Protection Society*. 44: 155-159.
- Samson, R., Legendre, J. B., Christen, R., Achouak, W., Gardan, L. 2004. Transfer of *Pectobacterium chrysanthemi* (Brenner Brenner, D., J., Steigerwalt, A., G., Miklos, G., V., and Fanning, G., R., 1973) Hauben, L., Moore, E., R., B., Vauterin, L., Steenackers, M., Mergaert, J., Verdonck, L., and Swings, J., 1998 and *Brenneria paradisiaca* to the genus *Dickeya* gen. nov. as *Dickeya chrysanthemi* comb. nov. and *Dickeya paradisiaca* comb. nov. and delineation of four novel species: *Dickeya dadantii* sp. nov., *Dickeya dianthicola* sp. nov., *Dickeya dieffenbachiae* sp. nov. and *Dickeya zea* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 55: 1415-27.
- Schaad, N. W. J. B., Jonesand, W., and Chun. 2001. *Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria*. Third Edition. APS Press. Amerika.
- Semangun, H. 2000. *Penyakit-penyakit Tanaman Perkebunan di Indonesia*. Gajah Mada University Press. Yogyakarta.
- Suada, I. K. dan Suniti, N. W. 2014. Isolasi dan identifikasi patogen getah kuning manggis melalui pendekatan Postulat Koch dan analisis secara molekuler. *Jurnal Hama dan Penyakit Tumbuhan Tropika*. 14(2): 142-151.
- Suharjo, R. 2013. Studies on the Taxonomy and Identification of *Dickeya* spp. and *Pectobacterium* spp. Isolated in Japan. PhD. *Thesis*. Shizuoka University. Jepang.
- Suharjo, R., Sawada, H. and Takikawa, Y. 2014. Phylogenetic study of Japanese *Dickeya* spp. and development of new rapid identification methods using PCR RFLP. *Journal of General Plant Pathology*. 80(3): 237-254.
- Suyama, K., Nasu, Y., Fujii, H., Umemoto, S., and Aono, N. 1987. The pathogenic bacteria of *Erwinia* rusty canker of Japanese pear (Abstract in Japanese). *Ann Phytopathol Society of Japan*. 53: 71.
- Tito, I. M. 2014. Isolasi dan Identifikasi Bakteri Kitinolitik yang Terdapat Pada Cangkang Lobster Air Tawar (*Cherax quadricarinatus*). *Skripsi*. Universitas Airlangga. Surabaya.
- Usman, W. S. 2015. Bakteri Asosiasi Karang Yang Terinfeksi Penyakit *Brown Band* (BRB) di Perairan Pulau Barrang Lompo Kota Makassar. *Skripsi*. Universitas Hasanuddin. Makassar.



- Voorst, A.V. and Arends J. C. 1982. The origin and chromosome numbers of cultivars of *Kalanchoe blossfeldiana* Von Poelln.: their history and evolution. *Euphytica*. 31: 573-584.
- Wahyudi, T. A., Meliah, S., dan Nawangsih, A. 2011. *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* bakteri penyebab penyakit hawar daun pada padi : isolasi, karakteristik, dan telaah mutagenesis dengan transposon. *Makar sains*. 15(1): 89-96.
- Yunasfi. 2008. Serangan Patogen dan Gangguan Terhadap Proses Fisiologis Pohon. *Karya Tulis*. Universitas Sumatera Utara. Medan.