

### **III. METODOLOGI**

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

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Penyakit Tumbuhan Jurusan Hama dan Penyakit Tumbuhan, Fakultas Pertanian Universitas Brawijaya. Sasaran penelitian adalah beberapa produsen Agens Hayati diluar PPAH yang berada di sekitar wilayah Malang raya, Jawa Timur. Penelitian ini dilaksanakan pada Bulan April hingga Oktober 2017.

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

Alat dan bahan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi, mikropipet, pipet ukur 10 ml, *Erlenmeyer*, cawan petri, *cover glass*, *object glass*, mikroskop, *Haemocytometer*, autoklaf, LAFC, *hand counter*, tabung reaksi, gelas ukur, botol putih 100 ml, kompor, tisu, plastik *wrapping*, *aluminium foil*, plastik tahan panas, bunsen, kertas label, dan kamera. Sedangkan bahan yang digunakan dalam penelitian ini ialah, isolat produk agens hayati dari produsen Agens Hayati diluar PPAH, aquades, spirtus, kentang, kloramfenikol, dextrose, pepton, NA, alkohol.

#### **3.3 Metode Penelitian**

Penelitian yang dilakukan bersifat observasi dan penggalian informasi melalui wawancara secara langsung dengan responden yang telah ditentukan, maupun informasi sekunder.

#### **3.4 Pemilihan Responden**

Pemilihan responden dilakukan dengan menggunakan pendekatan *non-probability sampling* (Dwiastuti, 2012). Responden yang dipilih ialah petani pengguna agens hayati sebanyak  $\pm 5$  orang dan produsen agens hayati diluar PPAH sebanyak  $\pm 5$  orang . Pemilihan petani responden menggunakan teknik sampling bola salju (Nurdiani, 2014). Jumlah keseluruhan responden sebanyak  $\pm 10$  responden.

#### **3.5 Metode Pengumpulan Data**

Wawancara dan Observasi

Teknik pengumpulan data dilakukan dengan cara wawancara kepada beberapa responden yang telah dipilih dengan mengajukan beberapa pertanyaan.

Serta melakukan pengamatan secara langsung kondisi Laboratorium dan tempat perbanyakan agens hayati di tiap produsen Agens Hayati.

#### Pengambilan Sampel Agens Hayati

Pengambilan sampel dilakukan dengan cara mengambil produk pada masing-masing produsen agens hayati diluar PPAH, kemudian kemasan asli dimasukkan ke dalam kantong plastik dan diberi segel.

#### Pengujian sampel

##### 1. Uji Mutu Bakteri

Perhitungan mikroorganisme yang hidup seperti bakteri, dapat diketahui menggunakan TPC (*Total Plate Count*). Berikut cara perhitungan bakteri menggunakan metode tersebut:

###### a. Pengenceran

Dalam kegiatan pengenceran, sampel bakteri yang telah diperoleh dihomogenkan dan diambil sebanyak 1 ml kemudian memasukkan sampel tersebut ke dalam tabung yang berisi 9 ml akuades menggunakan pipet. Tabung pertama tersebut merupakan pengenceran  $10^{-1}$ , selanjutnya pada tabung pertama dilakukan pengambilan sampel 1 ml kemudian mencampurkan ke dalam 9 ml akuades di tabung ke- 2, sampel kedua merupakan pengenceran  $10^{-2}$  dan seterusnya hingga mendapatkan pengenceran  $10^{-9}$  (Sunardi, 2001).

###### b. Kultur Bakteri Menggunakan *Pour Plate*

Setelah diperoleh hasil pengenceran  $10^{-1}$  hingga  $10^{-9}$ , selanjutnya melakukan inokulasi pada pengenceran  $10^{-7}$ ,  $10^{-8}$  dan  $10^{-9}$  sebanyak 3 kali ulangan yang menggunakan metode tuang. Cara inokulasi tersebut ialah mengambil setiap sampel pengenceran sebanyak 1 ml menggunakan pipet. Kemudian memasukkan sampel tersebut ke dalam cawan petri yang berisi media NA cair sebanyak 15-20 ml yang masih hangat dan belum memadat, kemudian cawan yang telah berisi sampel diputar mengikuti pola angka delapan. Setelah media dingin, cawan petri dapat ditutup, kegiatan tersebut dilakukan di setiap sampel pengenceran yang diinokulasi. Selanjutnya sampel yang telah diinokulasi tersebut diinkubasi pada suhu  $35-37^{\circ}\text{C}$  selama 24 jam (Sunardi, 2001).

c. Perhitungan Jumlah Koloni Bakteri

Menghitung jumlah koloni yang telah tumbuh di media, selanjutnya memilih pengenceran yang memiliki jumlah koloni 30-300. Setelah ditemukan pengenceran yang memiliki jumlah koloni antara 30-300, dirata-rata kemudian hasil dari rata-rata dimasukkan kedalam rumus, Dwidjoseputro (2005) menjelaskan bahwa rumus perhitungan jumlah koloni bakteri yaitu:

$$\text{Jumlah koloni per ml} = \text{Jumlah koloni per cawan} \times \frac{1}{\text{Faktor pengenceran}}$$

d. Identifikasi Bakteri

Identifikasi bakteri patogen dapat dilakukan dalam beberapa metode dari konvensional hingga mutakhir, misalnya morfologi, fisiologi, biokimia, serologi dan molekuler. Untuk genus-genus penting identifikasi dapat dilakukan berdasarkan skema yang ditemukan oleh Schaad (2001) (Gambar 1).



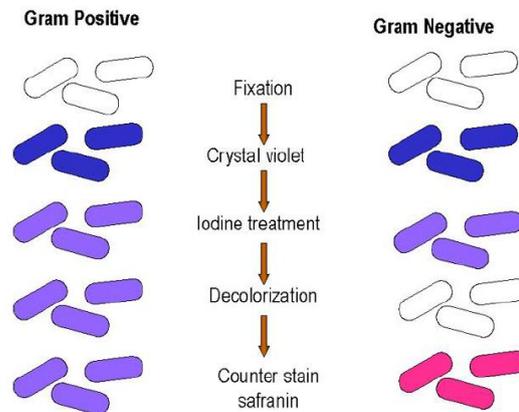
Gambar 1. Diagram alur Schaad untuk identifikasi Bakteri (Schaad, 2001)

- Reaksi Gram

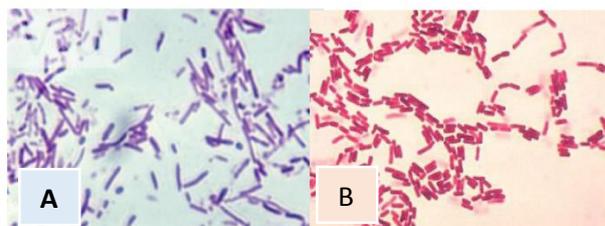
Pengujian reaksi Gram merupakan tahap awal dalam mengidentifikasi bakteri patogen tanaman pengujian dilakukan untuk membedakan bakteri kedalam dua kelompok besar berdasarkan struktur dinding sel bakteri yaitu bakteri Gram positif dan bakteri Gram negatif. Pengujian reaksi gram dilakukan dengan metode pewarnaan gram, dimana dalam metode ini selain dapat diketahui reaksi Gram dari biakan bakteri juga dapat diamati bentuk dan ukuran sel. Sebagai alternatif, uji reaksi Gram dapat dilakukan dengan uji solubilitas KOH (Potassium Hidroksida).

- Pewarnaan Gram

Pengujian Gram dimaksudkan untuk membedakan bakteri tergolong Gram positif atau Gram negatif. Bakteri Gram positif berwarna ungu, sedangkan Gram negatif berwarna merah, setelah itu diamati dibawah mikroskop dengan 1000x perbesaran (Gambar 3). Langkah kerja pewarnaan Gram seperti pada diagram berikut ini (Gambar 2):



Gambar 2. Diagram langkah kerja reaksi uji pewarnaan Gram



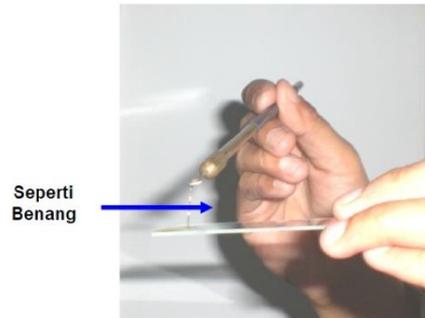
Gambar 3. Hasil pewarnaan Gram pada bakteri: (a) bakteri Gram positif, (b) bakteri Gram negatif (DPBKP, 2008)

Langkah pertama dalam pewarnaan Gram yaitu membuat olesan tipis suspensi dari koloni bakteri berumur 24 jam pada gelas objek yang bersih, kemudian kering-anginkan. Setelah kering, difiksasi dengan cara melewatkan bagian bawah gelas objek diatas api bunsen dua kali. Kemudian olesan bakteri digenangi dengan kristal violet selama 1 menit lalu dibilas dengan air kran selama beberapa detik dan dikering anginkan. Selanjutnya digenangi kembali dengan larutan iodine dan dibiarkan selama 1 menit kemudian dibilas kembali dengan air kran selama beberapa detik lalu dikering anginkan. Tahap berikutnya yaitu bilas dengan alkohol selama 30 detik, kemudian dikering anginkan. Pembilasan dengan alkohol (95%) tidak boleh terlalu lama, karena zat warna yang sudah terserap bakteri Gram positif mungkin akan tercuci. Setelah itu bilas kembali dengan air kran selama 2 detik kemudian digenangi dengan safranin selama 10 detik. Bilas kembali dengan air kran dengan cepat lalu dikering anginkan. Pengamatan hasil pewarnaan dilakukan di bawah mikroskop kompon dengan perbesaran 1000x menggunakan minyak emersi. Sel-sel bakteri Gram positif akan berwarna ungu hingga biru gelap sedangkan bakteri Gram negatif akan berwarna merah (DPBKP, 2008).

- Pengujian reaksi dengan KOH

Pengujian reaksi dengan KOH dilakukan dengan mencampurkan 1 loop biakan bakteri yang berumur antara 24-48 jam dengan 2 tetes KOH 3%, kemudian diaduk berulang kali dengan menggunakan jarum ose. Jarum ose diangkat dengan cepat berkali-kali dari permukaan suspensi, amati apakah terbentuk suspensi bakteri lengket yang terangkat seperti benang bersama jarum ose.

Apabila suspensi berubah menjadi berlendir, lengket dan terangkat seperti benang bersama jarum ose, reaksi tersebut menunjukkan bakteri termasuk dalam Gram negatif (-), sebaliknya apabila suspensi tetap encer tidak terangkat dengan jarum ose berarti bakteri termasuk dalam Gram positif (+) (Gambar 4).



Gambar 4. Uji KOH nampak lengket untuk Gram negatif (BBUSKP, 2008)

- Pewarnaan Spora

Metode pewarnaan spora dimaksudkan untuk mengetahui apakah bakteri membentuk spora atau tidak. Prosedur pewarnaan spora yang dilakukan terlebih dahulu adalah membuat olesan tipis suspensi dari koloni murni bakteri pada gelas objek yang bersih, kemudian kering-anginkan. Pengujian sebaiknya menggunakan biakan bakteri yang telah tua (berumur 72 jam).

Setelah olesan bakteri mengering, genangi dengan larutan malachite green 5,0% (w/v dan H<sub>2</sub>O) selama 10 menit. Cuci gelas objek dengan air keran yang mengalir, kemudian kering anginkan. Kemudian olesan bakteri digenangi dengan larutan safranin 0,5% (w/v dan H<sub>2</sub>O) selama 15 detik lalu dibilas dengan air keran yang mengalir kemudian kering anginkan.

Pengamatan sel-sel bakteri dilakukan dibawah mikroskop kompon dengan perbesaran 400x (Gambar 5). Spora bakteri akan tampak berwarna hijau sedangkan sel bakteri berwarna merah.



Spora *Bacillus* sp.  
(warna hijau tua)

Sel vegetatif  
(warna merah)

Gambar 5. Hasil pewarnaan spora pada *Bacillus* sp.

(DPBKP, 2008)

- Uji Oksidatif dan Fermentatif (OF) / Aerob atau Anaerob

Pengujian OF dilakukan untuk mengidentifikasi isolat bakteri termasuk dalam kategori bakteri aerob atau anaerob. Perubahan warna terjadi pada media OF akan menentukan kategori bakteri tersebut. Apabila terjadi perubahan warna dari biru menjadi kuning pada tabung mengindikasikan positif untuk pertumbuhan anaerob (berarti terjadi fermentasi), begitupun sebaliknya.

Bahan yang dibutuhkan dalam 1 liter media terdiri dari 2 gram pepton; 3 gram NaCl; 0,3 gram  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 3 gram agar; 3 ml *Bromotymol bue* (1%).

Langkah awal yang dilakukan dalam pengujian OF yaitu melarutkan semua bahan yang telah disiapkan kemudian pH media disesuaikan hingga 7,1. Media dituan ke dalam tabung reaksi berdiameter 13 mm sebanyak 4,5 ml per tabung kemudian dimasukkan ke dalam autoclave untuk disetrilkan dengan menggunakan temperatur  $121^\circ\text{C}$  selama 20 menit. Setelah selesai disetrilkan, media didinginkan sampai suhu  $50^\circ\text{C}$  lalu ditambahkan ke dalam tiap-tiap tabung 0,5 ml larutan glukosa 10% yang disterilkan dengan cara filtrasi atau autoclave secara terpisah dari media.

Bakteri yang akan diidentifikasi diambil sedikit dengan jarum inokulasi, lalu jarum tersebut ditusukkan pada media. Inokulasi dilakukan dengan dua tabung. Pada salah satu tabung ditambahkan parafin atau vaselin steril setebal 1 cm untuk menciptakan kondisi anaerob, sedangkan tabung lainnya dibiarkan dalam kondisi aerob (tanpa parafin/vaselin). Bakteri diinkubasi selama 72 jam atau lebih pada suhu ruang.

Pengamatan dilakukan dengan cara mengamati perubahan warna pada media. Perubahan warna media menjadi kuning pada tabung yang tidak diberi parafin tetapi tidak berubah pada tabung yang diberi parafin, menunjukkan metabolisme oksidatif dari glukosa. Perubahan warna media menjadi kuning terjadi pada kedua tabung, menunjukkan metabolisme fermentatif (Gambar 6). Jika terdapat produksi gas, akan

terlihat pada tabung yang diberi parfin. Pada genus *Xanthomonas* sp., *Pseudomonas* sp. cenderung mempunyai metabolisme glukosa secara oksidatif, sedangkan *Erwinia* sp. cenderung bersifat fermentatif (Titi, 2008).



Gambar 6. Uji Aerob / Anaerob (Oksidatif dan Fermentatif) (BBUSKP,2008)

- Pertumbuhan pada media Yeast Extract Dextrose-CaCO<sub>3</sub> (YDC)

Pengujian pada media YDC dilakukan untuk mengidentifikasi apakah bakteri yang tumbuh pada media merupakan bakteri jenis genus *Erwinia* sp. atau *Pantoea* sp. Bahan yang digunakan untuk membuat media YDC yaitu 10 gr yeast extract; 20 gr dextrose (glucose); 20 gr calcium carbonate; 15 gr agar; dan 1000 ml aquadestilata.

Pengujian pada media YDC dilakukan dengan cara menggosokkan bakteri pada media YDC dan menginkubasikan bakteri pada suhu 30°C. Pengamatan dilakukan setelah 48 jam. Apabila terbentuk koloni berwarna kuning merupakan bakteri dari genus *Pantoea* sp. sedangkan apabila terbentuk koloni berwarna putih merupakan bakteri dari genus *Erwinia* sp. (Schaad *et al*, 2001) (Gambar 7).



Gambar 7. Koloni yang tumbuh pada media YDC (BBUSKP, 2008)

## 2. Uji Mutu Jamur

### a. Isolasi Jenis Jamur

Sebanyak satu mL dari masing-masing suspensi agens hayati dengan faktor pengenceran  $10^{-5}$  dituangkan ke dalam cawan petri steril yang telah diberi tanda. Kemudian, tuangkan sembilan mL medium PDA ke dalam masing-masing cawan dan goyangkan agar suspensi dan medium tercampur secara homogen. Biarkan dingin dan mengeras kemudian diamati proses pembiakan jamur tersebut.

Pembiakan dari masing-masing sample dilakukan dua kali dan di dekat api. Masing-masing cawan diinkubasi selama 5-7 hari dalam suhu ruang. Selanjutnya, dilakukan pengamatan secara morfologis dan isolat dengan ciri berbeda dipisahkan (Sanjaya, 2010).

### b. Pengamatan dan Identifikasi Jenis Jamur

Untuk pengidentifikasian, secara makroskopis diamati bentuk koloni, warna koloni, permukaan koloni dan bentuk spora. Sedangkan secara mikroskopis diamati bentuk, warna, jumlah (satu atau banyak) dan posisi dari konidiofor atau sporangiofor. Selanjutnya dibandingkan dengan data pada buku acuan Tsuneo Watanabe. 2002. *Pictorial Atlas of Soil and Seed Fungi* (Second Edition). CRC Press, Florida.

### c. Kerapatan

Menghomogenkan produk agens hayati yang diperoleh kemudian mengencerkan dan menghomogenkan kembali. Selanjutnya meneteskan suspensi sebanyak 100  $\mu$ l menggunakan mikropipet di atas bidang hitung *haemocytometer* lalu menutupnya dengan kaca penutup. Selanjutnya menghitung kerapatan konidia di bawah mikroskop binokuler dengan perbesaran 400x pada 5 bidang pandang dalam bidang hitung 1 dan 2 (Direktorat Perlindungan Perkebunan, 2014). Perhitungan kerapatan konidia tersebut dapat dilakukan di setiap bidang hitung menggunakan rumus Syaifuddin (1992) dalam Khairani (2007), hasil dari perhitungan setiap bidang hitung tersebut kemudian di rata-rata, rumus perhitungan tersebut ialah:

$$C = \frac{t \times d}{0.25 \times n} \times 10^6$$

**C** ialah kerapatan spora per ml larutan, **t** ialah jumlah total spora dalam kotak sampel yang diamati, **d** ialah faktor pengenceran yang dilakukan, **n** ialah jumlah kotak sampel (5 kotak besar x 16 kotak kecil), dan 0.25 ialah faktor koreksi penggunaan kotak sampel skala kecil pada *haemocytometer*.

d. Viabilitas

Sampel yang akan diuji viabilitasnya dihomogenkan kemudian diencerkan hingga  $10^{-6}$  dan dihomogenkan kembali (Direktorat Perlindungan Perkebunan, 2014). Selanjutnya menyiapkan media EKD, kemudian meneteskan media EKD dan suspensi sampel sebanyak satu tetes di atas *object glass*, lalu menutupnya menggunakan *cover glass*. Kegiatan tersebut dilakukan sebanyak 3 kali ulangan. Setelah itu, menyiapkan cawan petri yang telah diisi tisu lembab. Kemudian meletakkan *object glass* di atas tisu yang lembab di dalam cawan petri dan ditutup, diinkubasi selama 24 jam pada suhu kamar. *Object glass* yang telah diinkubasi diamati di bawah mikroskop dengan perbesaran 400x. Kemudian jumlah konidia yang telah berkecambah dan tidak berkecambah dapat dihitung menggunakan rumus Gabriel dan Riyanto (1989). Pengamatan dan perhitungan jumlah konidia yang telah berkecambah diulang pada *object glass* ke-2 dan 3. Kemudian menghitung hasil rata-rata dari ketiga preparat tersebut. Berikut rumus Gabriel dan Riyanto (1989),

$$V = \frac{g}{g + u} \times 100\%$$

**V** ialah perkecambahan spora, **g** ialah jumlah spora yang berkecambah, dan **u** ialah jumlah spora yang tidak berkecambah.

### 3.6 Teknik Analisa Data

Analisa data penelitian kualitatif dilakukan secara deskriptif dari hasil yang telah diperoleh selama wawancara, observasi lapang dan data hasil laboratorium (Saefudin *et al.*, 2009 dalam Sunandi, 2013). Data yang telah diperoleh dibandingkan dengan literatur.