

### III. METODE PENELITIAN

#### 3.1 Tempat dan Waktu

Penelitian dilaksanakan di laboratorium Bakteriologi jurusan Hama Penyakit Tumbuhan Fakultas Pertanian Universitas Brawijaya, Malang. Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Mei 2014 sampai Desember 2014.

#### 3.2 Alat dan Bahan

Alat yang digunakan adalah autoklaf, *Laminar air flow cabinet* (L AFC), mikroskop kamera *SZX7 series*, shaker, spektrofotometer, *water bath*, pH meter, cawan petri diameter 9 cm, bunsen, mortar, jarum ose, stik L, *beaker glass*, tabung reaksi, mikropipet, timbangan analitik, jarum inokulasi.

Bahan yang digunakan adalah umbi porang bergejala busuk lunak sebagai sampel penelitian, kentang, tanaman tembakau, akuades, media nutrient agar (NA), media nutrient broth (NB), media *yeast extract dextrose carbonat* (YDC), media basal (anaerob), eritromisin, media uji produksi asam dari sukrosa, media bacto pepton, sorbitol, laktosa, glukosa, HCl 1%, NaOH 10%, NaCl, KOH 3%, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3%, streptomisin, kloramfenikol, tetrasiklin, kertas saring diameter 5 mm.

#### 3.3 Metode

##### 3.3.1 Pengambilan sampel

Sampel umbi yang bergejala busuk lunak diambil dari sentra produksi porang di Desa Sumber Bendo, Kecamatan Saradan, Kabupaten Madiun. Gejala yang ditemukan berupa busuk lunak di permukaan umbi disertai bau tidak sedap.

##### 3.3.2 Isolasi bakteri

Isolasi mengacu pada Schaad dkk. (2001). Sampel umbi yang bergejala dipotong kecil-kecil, lalu direndam dalam alkohol 70% selama 1 menit kemudian dibilas menggunakan akuades sebanyak 2 kali. Setelah itu, potongan-potongan sampel tersebut ditiriskan di atas tisu steril. Selanjutnya potongan sampel tersebut dicacah dan dihomogenkan dengan akuades steril. Isolasi bakteri dilakukan dengan cara pengenceran bertingkat. Sebanyak 100 larutan diambil dari hasil pengenceran lalu disebar pada media NA dan diratakan dengan stik L.

### 3.3.3 Uji patogenisitas dan hipersensitif

#### 1. Uji busuk lunak pada kentang

Metode uji busuk lunak yaitu isolat bakteri berumur 24 jam dipanen menggunakan jarum ose kemudian ditumbuhkan pada media NB dan diinkubasi selama 48 jam. Kemudian suspensi bakteri diinokulasi ke umbi kentang menggunakan mikro pipet. Selanjutnya umbi diinkubasi di wadah yang lembab dan diamati hingga umbi kentang bergejala busuk lunak.

#### 2. Uji hipersensitif

Metode untuk uji hipersensitif mengacu pada Schaad dkk. (2001). Bakteri ditumbuhkan pada media NA dan diinkubasi selama 24 jam. Bakteri dipanen dengan akuades steril kemudian suspensi bakteri kemudian diinokulasi ke bagian tulang daun tembakau menggunakan jarum inokulasi yang telah dilepas jarumnya. Perlakuan kontrol menggunakan akuades steril. Reaksi hipersensitif yaitu daun tembakau mengalami nekrosis pada 1-4 hari setelah inokulasi.

#### 1. Uji patogenisitas

Metode uji patogenisitas berdasarkan Schaad dkk. (2001). Isolat bakteri berumur 48 jam dipanen dengan menambahkan akuades ke biakan bakteri kemudian suspensi tersebut diinokulasikan ke umbi porang yang telah dicuci dan disterikan dengan alkohol 70% dan dibilas menggunakan akuades steril. Inokulasi dilakukan dengan jarum inokulasi atau menggunakan mikropipet. Suspensi bakteri yang diinokulasikan ke umbi porang sekitar  $10^{-2}$ - $10^{-8}$  CFU. Setelah itu, luka inokulasi tersebut ditutup dengan minyak parafin. Selanjutnya umbi diinkubasi di wadah yang lembab dan diamati hingga umbi bergejala.

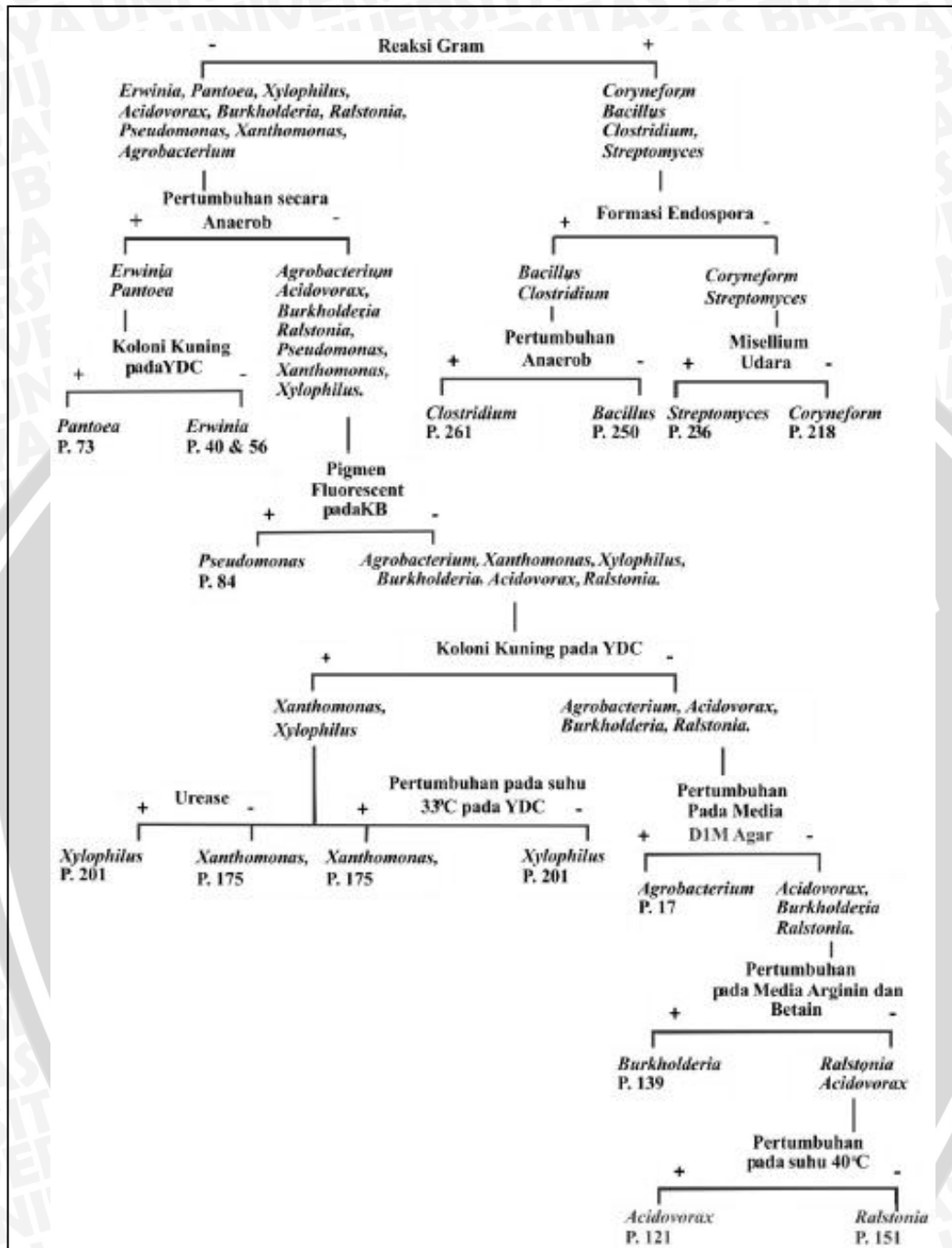
### 3.3.4 Karakterisasi bakteri penyebab busuk lunak

#### 1. Karakterisasi morfologi

Sifat morfologi yang diamati meliputi morfologi koloni dan morfologi sel bakteri, serta dari pewarnaan Gram.

#### 2. Karakterisasi fisiologi dan biokimia

Pengujian isolat bakteri secara biokimia dan fisiologi mengacu pada Schaad dkk. (2001). Pengujian bakteri hingga tingkat genus berdasarkan Schaad dkk. (2001) disajikan pada Gambar 3.



Gambar 3. Pengujian bakteri hingga tingkat genus (Schaad dkk., 2001).

- a. Uji Gram
- KOH

Uji ini dilakukan untuk mengetahui apakah bakteri bersifat Gram negatif atau Gram positif. Pengujian dilakukan dengan mencampurkan satu lup bakteri uji pada preparat steril yang telah ditetesi KOH 3% menggunakan jarum ose. Apabila



suspensi ditarik ke atas terdapat lendir seperti benang maka bakteri tersebut termasuk Gram negatif. Apabila suspensi ditarik ke atas tidak terdapat lendir maka bakteri tersebut termasuk bakteri Gram positif.

- Pewarnaan Gram

Satu lup bakteri digoreskan di atas preparat steril lalu ditambah akuades steril lalu ditambah akuades steril dan diratakan. Fiksasi bakteri dilakukan dengan melewati bagian bawah preparat di atas bunsen hingga semua permukaan preparat kering. Kemudian ditetesi larutan kristal violet dan diratakan di atas permukaan preparat selama 1 menit. preparat dicuci dengan air mengalir selama beberapa detik, lalu dikeringanginkan. Setelah itu, preparat ditetesi dengan larutan iodine dan diratakan di atas preparat selama 1 menit. Preparat kemudian dicuci dengan air mengalir selama beberapa detik, lalu dikeringanginkan. Pewarnaan kembali dengan etil alkohol kurang lebih selama 30 detik. Preparat lalu dicuci dengan air mengalir kurang lebih 2 detik kemudian dikeringanginkan. Selanjutnya preparat ditetesi larutan safranin dan diratakan di atas preparat selama 10 detik. Terakhir, cuci preparat dengan cepat dengan air mengalir kemudian dikeringanginkan. Bakteri Gram negatif mempunyai sel warna merah, sedangkan bakteri Gram positif mempunyai sel warna ungu.

b. Pertumbuhan anaerob

Bakteri Gram negatif kemudian diuji pertumbuhannya secara anaerob dengan menginokulasikan bakteri dalam media basal sebanyak 5 ml. Media basal dalam 1 liter akuades terdiri dari pepton 2 gr, NaCl 5 gr,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,3 gr, Agar 3 gr, dan bromothymol blue (larutan 1%) 3 ml. Bahan-bahan dihomogenkan dalam akuades dan diatur pada pH 7,1 kemudian disterilkan pada suhu  $121^\circ\text{C}$  selama 20 menit. setelah itu tambahkan 0,5 ml larutan glukosa steril secara aseptis. Setelah itu, inokulasikan bakteri ke dalam dua tabung reaksi yang berisi media basal lalu satu tabung ditutup parafin cair dan satu tabung lainnya tidak ditambah parafin. Perubahan warna dari biru menjadi kuning di media yang ditutup parafin menunjukkan hasil yang positif, artinya dia mampu tumbuh secara anaerob (fermentatif).

c. Pertumbuhan pada media *yeast dextrose carbonat* (YDC)

Bakteri yang dapat tumbuh secara anaerob selanjutnya diuji pada media YDC. Bakteri digoreskan pada media YDC lalu diinkubasi selama 24-48 jam. Amati warna koloni yang tumbuh. Apabila berwarna putih maka ia merupakan genus *Erwinia*. Komposisi media YDC terdiri dari ekstrak yeast 10 gr, glukosa 20 gr, CaCO<sub>3</sub> 20 gr, agar 15 gr dalam 1 liter akuades. media disterilisasi pada 121°C selama 15 menit.

d. Fermentasi glukosa

Untuk mengetahui fermentasi glukosa, bakteri diuji pertumbuhannya secara anaerob dengan menginokulasikan bakteri dalam media basal (Hugh and Leifson) sebanyak 5 ml. Media basal dalam 1 liter akuades terdiri dari pepton 2 gr, NaCl 5 gr, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,3 gr, agar 3 gr, dan larutan *bromothymol blue* 1% sebanyak 3 ml. Bahan-bahan dihomogenkan dalam akuades dan diatur pada pH 7,1 kemudian disterilkan pada suhu 121°C selama 20 menit. Setelah itu ditambahkan 0,5 ml larutan glukosa steril secara aseptis. Setelah itu, inokulasikan bakteri ke dalam dua tabung reaksi yang berisi media basal lalu satu tabung ditutup parafin cair dan satu tabung lainnya tidak ditambah parafin. Perubahan warna dari biru menjadi kuning pada media yang ditutup parafin menunjukkan hasil yang positif, yaitu mampu memfermentasi glukosa.

e. Uji katalase

Bakteri yang berumur 24-48 jam dicampur dengan 1 tetes larutan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3% di atas preparat. Terbentuknya gelembung udara merupakan indikator reaksi positif.

f. Pertumbuhan pada suhu 37°C

Bakteri ditumbuhkan pada media NB sebanyak 5 ml dalam tabung reaksi pada suhu 37°C selama 3 hari. Setelah 3 hari diamati pertumbuhan bakteri. Hasil positif ditunjukkan oleh adanya pertumbuhan bakteri.

g. Sensitivitas terhadap eritromisin

Bakteri ditumbuhkan pada media NA dengan menuang 6 ml NA cair yang telah didinginkan hingga 50°C dan diinokulasi dengan 100 µl suspensi bakteri di atas lapisan dasar pada media. Setelah media mengeras, diletakkan kertas saring

steril yang telah mengandung 15 µg eritromisin pada permukaan media. Inkubasi selama 48 jam pada suhu 23-27°C. Zona hambat di sekitar kertas saring merupakan indikator hasil positif untuk sensitivitas.

#### h. Produksi asam dari karbohidrat

Media 1% *pepton broth* dan *bromcresol purple* 10-30 mg/l disiapkan sebagai indikator. Karbohidrat ditambahkan untuk mendapatkan konsentrasi akhir 1% yang akan diujikan, kemudian pH diatur pada pH 7. Kemudian karbohidrat disterilisasi secara filter, dan dituang ke tabung uji steril. Setelah itu, bakteri yang berumur 48 jam ditumbuhkan di media dan diinkubasi selama 48 jam pada suhu 23-27°C. Perubahan warna menjadi warna kuning merupakan indikator produksi asam.

### 1.3.5 Uji perlakuan fisik

#### 1. pH

Pengujian pH untuk pertumbuhan bakteri dilakukan dengan menambahkan larutan HCl atau NaOH untuk mengatur pH. Media yang digunakan dalam pengujian pH adalah media NB. Bakteri diisolasi lalu inkubasi selama 48 jam pada suhu 23-27°C. Pertumbuhan bakteri kemudian diamati setelah inkubasi.

#### 2. Suhu

Pengujian suhu untuk pertumbuhan bakteri dilakukan pada media NB. Bakteri diisolasi lalu inkubasi selama 48 jam pada suhu < 10°C dan suhu >27°C sampai pada suhu bakteri tidak mampu tumbuh. Pertumbuhan bakteri kemudian diamati setelah inkubasi selama 48 jam.

#### 3. Kadar garam (salinitas)

Metode pengujian kadar garam mengacu pada Perombelon dan Wolf (2002). Percobaan pertumbuhan bakteri menggunakan tingkat konsentrasi tertentu yaitu 0%, 3%, 6%, 9%, dan 12% NaCl, media yang digunakan terdiri dari *bacto pepton* 10 g, NaCl 50 g, dan akuades steril 1000 ml. Media diatur pada pH 7,3 kemudian setiap tabung reaksi dituang 3 ml media *bacto pepton* dan disterilisasi pada suhu 120°C selama 15 menit. Bakteri yang dikembangkan pada media NA yang berumur 48 jam diambil menggunakan jarum ose kemudian diinokulasikan ke

media *bacto pepton* yang sudah ditambahkan NaCl sesuai dengan perlakuan dan diinkubasi pada suhu 27°C selama 24-48 jam. Media yang keruh merupakan indikator hasil positif.

#### 4. Sensitivitas terhadap antibakteri

Bakteri ditumbuhkan pada media NA dengan menuang 6 ml NA cair yang telah didinginkan hingga 50°C kemudian bakteri diinokulasi dengan 100 µl suspensi bakteri di atas lapisan dasar pada media. Setelah media mengeras, kertas saring steril yang mengandung 15 µg antibakteri diletakkan pada permukaan media dan diinkubasi selama 48 jam pada suhu 23-27°C. Zona hambat di sekitar kertas saring merupakan indikator hasil positif untuk sensitivitas.

