

### III. METODOLOGI

#### 3.1 Tempat dan Waktu

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Bakteriologi Jurusan Hama dan Penyakit Tumbuhan Fakultas Pertanian Universitas Brawijaya Malang mulai bulan Februari 2014 – November 2014.

#### 3.2 Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian antara lain timbangan analitik, panci, kompor listrik, autoklaf *type* HL – 36Ae Hirayama, *microwave oven type* R-380IN(S) SHARP, scalpel, cawan petri diameter 9 cm, jarum ose, mikroskop kamera OLYMPUS SZX7 *series*, kamera, bunsen, tabung reaksi, pinset, botol media, *water bath*, gelas ukur, jarum suntik, gunting, *ependorf*, gelas obyek, *cover glass*, *syringe driven filter unit*, pipet Vitlab dig 100-1000  $\mu$ l, dan *Laminar Air Flow Cabinet* (LAFC) *type*: H.S. 079S.

Bahan yang digunakan adalah media nutrient agar (NA), aquadest steril, biakan murni *R. solanacearum*, media dehidrolase arginin, media oksidatif-fermentatif, media King's B, media *tetrazolium clorida* (TZC), spirtus, minyak parafin, alkohol 96%, media D1M agar, media *yeast extract dextrose carbonat* (YDC), media basal (anaerob), KOH 3%, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3%, *tissue* steril, kertas saring, kristal violet, iodine, *malachite green*, safranin, tanaman tembakau, 8 isolat bakteri endofit koleksi HPT, dan media nutrient broth (NB).

#### 3.3 Metode Penelitian

Penelitian ini terdiri dari beberapa tahapan: isolasi patogen dari tanaman kentang yang terserang penyakit layu *R. solanacearum*, identifikasi patogen dari tanaman kentang yang terserang penyakit layu *R. solanacearum*, perbanyakkan bakteri endofit tanaman kentang, pengujian bakteri endofit dalam cawan petri (*in vitro*) terhadap *R. solanacearum* dengan Rancangan Acak Lengkap (RAL) yang terdiri dari 9 perlakuan dan 4 ulangan, serta karakterisasi dan identifikasi sampai tingkat genus bakteri endofit yang bersifat antagonis terhadap patogen *R. solanacearum*.

### 3.4 Pelaksanaan Penelitian

#### 1. Isolasi Patogen dari Tanaman Kentang yang Terserang Penyakit Layu *R. solanacearum*.

Bakteri *R. solanacearum* diisolasi dari batang tanaman kentang yang terserang penyakit layu, dengan gejala adanya salah satu pucuk daun yang layu diikuti dengan daun bagian bawah serta akar dan pangkal batang membusuk. Jika batang dibelah akan nampak berkas pembuluh jaringan berwarna coklat dan apabila dimasukkan kedalam air jernih selama beberapa menit maka akan keluar massa bakteri yang berwarna putih susu. Sampel tanaman diambil dari Cangar, kecamatan Bumiaji.

Selanjutnya batang tanaman kentang yang diduga terserang patogen *R. solanacearum* diisolasi dengan cara mencuci batang tanaman kentang yang terserang patogen *R. solanacearum* dengan air mengalir agar sisa tanahnya hilang. Potong-potong bagian batang yang akan diisolasi setengah sakit dan setengah sehat sekitar 1-2 cm, direndam pada NaOCl 2% kemudian dicuci dengan alkohol 70% selama 1 menit, kemudian dibilas dengan aquades steril sebanyak 2 kali selama 1 menit dan dikeringkan dengan *tissue* steril. Potongan bagian batang tersebut lalu ditanam pada media TZC dan diinkubasikan selama 24-48 jam pada kondisi ruang.

#### Uji Hipersensitif

Reaksi hipersensitif merupakan uji yang dilakukan untuk mengetahui sifat patogenik bakteri uji. Pengujian ini dilakukan dengan mencampurkan biakan murni bakteri *R. solanacearum* berumur 24 jam pada aquades steril. Pengujian reaksi hipersensitif dilakukan dengan menyuntikkan suspensi bakteri ke dalam daun tembakau (Klement *et al.*, 1990). Perkembangan gejala nekrosis dan layu daun tembakau diamati sampai 7 hari.

#### 2. Identifikasi Patogen dari Tanaman Kentang yang Terserang Penyakit Layu *R. solanacearum*

Berdasarkan Schaad *et al.*, (2001), isolat bakteri patogen diuji secara biokimia dan fisiologi melalui serangkaian uji yang meliputi :

a. Uji Gram

a) Uji Gram dengan KOH 3%

Biakan murni bakteri patogen umur 24 jam disuspensikan pada gelas obyek yang sebelumnya telah ditetesi dengan KOH 3%. Kemudian suspensi bakteri patogen ditarik-tarik ke atas dengan menggunakan jarum ose. Reaksi positif terjadi jika suspensi bakteri tidak membentuk benang dan reaksi negatif terjadi jika suspensi bakteri membentuk benang atau akan tampak lengket.

b) Uji Gram dengan Pengecatan Gram

Satu lup jarum ose biakan murni bakteri patogen umur 24 jam dibuat suspensi dengan aquades steril diatas gelas obyek yang telah disterilkan dan difiksasi diatas bunsen. Kemudian dilakukan pengecatan dengan kristal violet sebanyak 2-3 tetes selama 20 detik, lalu dicuci dengan air mengalir dan dikeringanginkan (dikeringkan diatas bunsen). Selanjutnya ditetesi dengan larutan iodine selama 1 menit kemudian dicuci dengan air mengalir dan dikeringanginkan. Pengecatan selanjutnya menggunakan safranin selama 20 detik dan dicuci dengan air mengalir. Kemudian dikeringanginkan dan diamati di bawah mikroskop. Bakteri gram positif akan menunjukkan warna ungu sedangkan bakteri gram negatif akan berwarna merah.

b. Pertumbuhan Anaerob

Pengujian dilakukan dengan menggunakan 2 tabung reaksi yang masing-masing diisi dengan 5 ml media selektif (media OF). Media basal terdiri atas: Pepton 2 gr; NaCl 5 gr;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,3 gr; Agar 3 gr; Bromothymolblue (1%) 3 ml. Bahan-bahan tersebut dilarutkan dalam aquades dan diukur pH 7,1. Media disterilkan pada  $121^\circ\text{C}$  selama 25 menit. Setelah disterilisasi, setiap tabung ditambahkan dengan 0,5 ml larutan glukosa 10%.

Selanjutnya isolat bakteri uji berumur 24 jam ditusukkan kedalam media pada kedua tabung tersebut. Salah satu tabung ditutup dengan minyak parafin cair steril sebanyak 2 ml dan tabung lainnya dibiarkan terbuka (tanpa minyak parafin cair). Kemudian kedua tabung diinkubasikan selama 7-14 hari.

Reaksi bersifat fermentatif apabila terjadi perubahan warna media dari biru menjadi kuning pada kedua tabung. Hal ini menunjukkan bahwa bakteri dapat

tumbuh secara anaerob (fermentasi). Sedangkan reaksi oksidatif ditunjukkan apabila pada media yang ditutup parafin cair steril tidak terjadi perubahan warna dan pada media yang tidak ditutup parafin cair steril terjadi perubahan warna menjadi kuning.

c. Pigmen Flourescent pada Media King's B

Media King's B terdiri dari Pepton 20 g;  $K_2HPO_4$  1,5 g;  $MgSPO_4.7H_2O$  1,5 g; gliserol 15 ml; aquades 1 L; dan agar 15 g. Media disterilisasi pada  $121^\circ C$  selama 25 menit. Biakan bakteri uji ditumbuhkan pada media King's B yang sudah disterilisasi kemudian diinkubasikan selama 24-48 jam. Selanjutnya biakan tersebut diamati di bawah sinar UV apakah berpendar atau tidak. Reaksi positif ditunjukkan dengan terbentuknya pigmen flourescent yang berwarna biru atau hijau.

d. Pertumbuhan pada Media YDC

Pengujian pertumbuhan pada media YDC bertujuan untuk mengetahui apakah koloni berwarna kuning yang merupakan bakteri dari genus *Xylophilus* sp. dan *Xanthomonas* sp. Media YDC terdiri dari yeast ekstrak 10 gr, glukosa 20 gr,  $CaCO_3$  20 gr, dan agar 15 gr. Selanjutnya semua bahan dicampur dan dilarutkan dengan aquades 1 liter lalu di didihkan. Media tersebut disterilkan pada  $121^\circ C$  selama 30 menit. Goreskan bakteri pada media agar YDC dan inkubasikan pada suhu  $30^\circ C$ . Setelah 24-48 jam lakukan pengamatan apakah koloni bakteri berwarna kuning atau tidak. Reaksi positif apabila terbentuk koloni berwarna kuning yang merupakan bakteri dari genus *Xylophilus* sp. Dan *Xanthomonas* sp. Genus *Ralstonia*, *Agrobacterium*, *Acidovorax* dan *Burkholderia* koloni bakteri tidak berwarna kuning pada media YDC.

e. Pertumbuhan pada Agar D1M

Mencampur dan melarutkan semua bahan (*Cellobiose* 5 gram,  $NH_4Cl$  1 gram,  $NaH_2PO_4$  1 gram,  $K_2HPO_4$  1 gram,  $MgSO_4.7H_2O$  3 gram, *Malachite green* 10 gram dan Agar 15 gram). Atur derajat keasaman pH 7,0 (media berwarna biru), sterilisasi dengan autoklaf pada temperatur  $121^\circ C$  selama 25 menit. Tuangkan media D1M pada cawan petri, biarkan media dingin dan mengeras. Pada media D1M digoreskan bakteri yang akan diuji dan inkubasikan pada suhu  $30^\circ C$  selama 24-48 jam. Bakteri

yang dapat tumbuh pada media ini menunjukkan hasil positif (+). D1M ini merupakan media semiselektif untuk pertumbuhan bakteri *Agrobacterium* sp.

f. Pengujian pada Media Arginin

Pengujian pada media arginin bertujuan untuk membedakan bakteri genus *Ralstonia* dengan genus *Burkholderia*. Media arginin terdiri dari: Pepton 1 g; NaCl 5 g; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,3 g; L-arginin HCl 10 g; Phenol red 0,01 g; agar 3 g dan aquades pH 7,2-7,4 1000 ml. Media selektif arginin dituangkan kedalam tabung reaksi sebanyak 5 ml, selanjutnya disterilisasi di autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit. Biakan murni bakteri patogen yang diuji ditusukkan ke dalam media kemudian ditutup dengan parafin steril dan diinkubasikan selama 4-7 hari. Reaksi positif (bakteri mampu menghidrolisa-arginin) apabila terjadi perubahan warna menjadi merah pada media.

g. Pertumbuhan pada Suhu 40°C

Pertumbuhan pada suhu 40°C bertujuan untuk membedakan bakteri genus *Acidovorax*. Bakteri ditumbuhkan dalam media nutrient broth (NB) cair sebanyak 5 ml dalam tabung reaksi, kemudian diinkubasi pada suhu 40°C. Pertumbuhan dicatat pada 24 jam. Reaksi positif terjadi jika bakteri uji tidak mampu tumbuh pada perlakuan suhu 40°C.

### 3. Perbanyak Bakteri Endofit Tanaman Kentang

Dari penelitian sebelumnya yang berjudul “Pengembangan Teknologi Konsorsium Mikroba Berbasis Bakteriofag dan Bakteri Endofit Sebagai Pengendali Hayati Penyakit Layu Bakteri Untuk Mendukung Pengembangan Tanaman Kentang di Dataran Menengah”, telah diperoleh bakteri endofit akar tanaman kentang sebanyak 130 isolat. Dari 130 isolat yang ditemukan tersebut telah dilakukan pengujian antibiosis terhadap *R. solanacearum* pada cawan petri, sehingga diperoleh 8 isolat bakteri endofit yang lolos seleksi yang bersifat antagonis terhadap *R. solanacearum*.

Media nutrient agar (NA) dipilih sebagai media untuk perbanyak bakteri endofit. Metode perbanyak bakteri endofit yang digunakan yaitu penggosan

(*streak plate*). Isolat bakteri digoreskan pada media NA di cawan petri dan diinkubasikan selama 24 jam pada suhu ruang.

Media skim milk dipilih sebagai media penyimpanan bakteri endofit yang disimpan di lemari pendingin dengan suhu  $-4^{\circ}\text{C}$ . Masing-masing bakteri endofit ditumbuhkan pada media NA dan diinkubasikan selama 24 jam lalu dipanen. Cara pemanenan yaitu dengan mengambil biakan bakteri endofit tersebut dengan jarum ose kemudian dimasukkan pada tub yang berisi skim milk yang telah disterilkan. Tahapan selanjutnya yaitu menyimpan bakteri-bakteri endofit tersebut pada lemari pendingin dengan suhu  $-4^{\circ}\text{C}$ .

#### **Uji Hipersensitif**

Uji hipersensitif bertujuan untuk mengetahui apakah bakteri tersebut patogen bagi tanaman atau tidak. Untuk membuktikan bahwa bakteri endofit bukan patogen, maka perlu dilakukan uji hipersensitif. Biakan murni masing-masing bakteri endofit berumur 24 jam disuspensikan menggunakan aquades steril. Pengujian reaksi hipersensitif dilakukan dengan menyuntikkan suspensi bakteri endofit sebanyak 1 ml ke dalam daun tembakau (Klement *et al.*, 1990). Reaksi positif jika daun tembakau menunjukkan gejala nekrosis yang disertai layu pada jaringan yang diinokulasikan suspensi bakteri endofit. Pengamatan dilakukan 24 hingga 96 jam.

#### **4. Pengujian Antagonis Bakteri Endofit dalam Cawan Petri (*in vitro*) Terhadap *R. solanacearum*.**

Pengujian sifat antagonis bakteri endofit terhadap *R. solanacearum* dilakukan dengan metode *overlay*, yaitu bakteri antagonis yang telah diinkubasikan selama 24 jam diambil sebanyak dua lup jarum ose kemudian dibuat suspensi dalam 1 ml aquades steril. Selanjutnya kertas saring steril diameter 5 mm dimasukkan ke dalam suspensi bakteri endofit selama  $\pm 1$  menit dan ditiriskan selama 2 jam pada tissue steril. Kertas saring yang sudah kering kemudian di tanam di media NA pada cawan petri dengan diameter 9 cm dan diinkubasikan selama 2 hari. Setelah diinkubasi selama 2 hari, bakteri antagonis pada cawan petri di lapis (*dioverlay*) dengan suspensi bakteri patogen sebanyak 1 ml dan 13 ml media NA dengan suhu  $\pm 45^{\circ}\text{C}$ . Selanjutnya suspensi tersebut dituang kedalam cawan petri yang berisi bakteri

patogen (Wakimoto *et al.*, 1986). Hasil *overlay* tersebut diinkubasikan selama 24-48 jam dan daerah hambatan yang terbentuk diukur diameternya dengan jangka sorong (Hara dan Ono, 1991).

### **5. Karakterisasi dan Identifikasi Bakteri Endofit Kentang yang Bersifat Antagonis Terhadap Patogen *R. solanacearum*.**

Dalam penelitian ini dilakukan beberapa metode uji identifikasi bakteri endofit. Berdasarkan Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (1994) dan Schaad *et al.* (2001), isolat bakteri endofit diuji secara biokimia dan fisiologi melalui serangkaian uji yang meliputi :

#### **a. Uji Gram**

##### **a). Uji Gram dengan KOH 3%**

Biakan murni bakteri endofit umur 24 jam disuspensikan pada gelas obyek yang sebelumnya telah ditetesi dengan KOH 3%. Kemudian suspensi bakteri patogen ditarik-tarik ke atas dengan menggunakan jarum ose. Reaksi positif terjadi jika suspensi bakteri tidak membentuk benang dan reaksi negatif terjadi jika suspensi bakteri membentuk benang atau akan tampak lengket.

##### **b). Uji Gram dengan Pengecatan Gram**

Satu lup jarum ose biakan murni bakteri endofit umur 24 jam dibuat suspensi dengan aquades steril diatas gelas obyek yang telah disterilkan dan difiksasi diatas bunsen. Kemudian dilakukan pengecatan dengan kristal violet sebanyak 2-3 tetes selama 20 detik, lalu dicuci dengan air mengalir dan dikeringanginkan (dikeringkan diatas bunsen). Selanjutnya ditetesi dengan larutan iodine selama 1 menit kemudian dicuci dengan air mengalir dan dikeringanginkan. Pengecatan selanjutnya menggunakan safranin selama 20 detik dan dicuci dengan air mengalir. Kemudian dikeringanginkan dan diamati di bawah mikroskop. Bakteri gram positif akan menunjukkan warna ungu sedangkan bakteri gram negatif akan berwarna merah.

b. Pengecatan Spora

Pengecatan spora bertujuan untuk mengetahui apakah bakteri membentuk spora atau tidak. Satu lup jarum ose biakan murni bakteri endofit umur 24 jam dibuat suspensi dengan aquades steril di atas gelas obyek yang telah disterilkan dan difiksasi di atas bunsen. Kemudian ditetesi dengan *malachit green* dan biarkan selama 15 menit kemudian cuci dengan air mengalir. Setelah dikeringkan di atas bunsen lalu ditetesi dengan safranin dan biarkan selama 1 menit, lalu cuci dengan air mengalir dan keringkan di atas bunsen. Selanjutnya amati dibawah mikroskop. Spora bakteri akan tampak berwarna kehijauan sedangkan sel vegetatifnya akan berwarna merah.

c. Pertumbuhan Anaerob

Bakteri gram negatif kemudian diuji pertumbuhannya secara anaerob dengan menginokulasikan bakteri dalam media basal sebanyak 5 ml. Media basal dalam 1 liter aquades terdiri dari pepton 2 gr, NaCl 5 gr,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,3 gr, Agar 3 gr, dan bromothymolblue (larutan 1%) 3 ml. Bahan-bahan dihomogenkan dalam aquades 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).

d. Uji Katalase

Biakan bakteri endofit umur 24-48 jam, koloninya diambil satu lup dengan jarum ose kemudian diletakkan di atas preparat lalu ditetesi dengan  $\text{H}_2\text{O}_2$  3%. Reaksi positif ditandai dengan adanya gelembung udara. Gelembung udara terbentuk apabila bakteri tersebut memiliki enzim katalase yang dapat mengubah  $\text{H}_2\text{O}_2$  menjadi air dan oksigen.

e. Uji Oksidatif

Pengujian dilakukan dengan menggunakan 2 tabung reaksi yang masing-masing diisi dengan 5 ml media selektif. Media basal terdiri atas: Pepton 2 gr; NaCl 5 gr;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,3 gr; Agar 3 gr; Bromothymolblue (1%) 3 ml. Bahan-bahan tersebut

dilarutkan dalam aquades dan diukur pH 7,1. Media disterilkan pada 121°C selama 25 menit. Setelah disterilisasi, setiap tabung ditambahkan dengan 0,5 ml larutan glukosa 10% secara aseptis.

Selanjutnya isolat bakteri endofit berumur 24 jam ditusukkan kedalam media pada kedua tabung tersebut. Salah satu tabung ditutup dengan parafin cair steril sebanyak 2 ml dan tabung lainnya dibiarkan terbuka (tanpa parafin cair). Kemudian kedua tabung diinkubasikan selama 7-14 hari.

Reaksi bersifat oksidatif ditunjukkan apabila pada media yang ditutup parafin cair steril tidak terjadi perubahan warna dan pada media yang tidak ditutup parafin cair steril terjadi perubahan warna menjadi kuning.

#### f. Fermentasi Glukosa

Media basal terdiri atas: Pepton 2 gr; NaCl 5 gr;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,3 gr; Agar 3 gr; Bromothymolblue (1%) 3 ml. Bahan-bahan tersebut dilarutkan dalam aquades dan diukur pH 7,1. Media disterilkan pada 121°C selama 25 menit. Setelah disterilisasi, setiap tabung ditambahkan dengan 0,5 ml larutan glukosa 10% secara aseptis. Pengujian dilakukan dengan menggunakan 2 tabung reaksi yang masing-masing diisi dengan 5 ml media selektif.

Selanjutnya isolat bakteri endofit berumur 24 jam ditusukkan kedalam media pada kedua tabung tersebut. Salah satu tabung ditutup dengan parafin cair steril sebanyak 2 ml dan tabung lainnya dibiarkan terbuka (tanpa parafin cair). Kemudian kedua tabung diinkubasikan selama 7-14 hari.

Reaksi fermentatif apabila terjadi perubahan warna media dari biru menjadi kuning pada kedua tabung atau hanya pada tabung yang ditutup dengan minyak parafin. Hal ini menunjukkan hasil positif, artinya bakteri tersebut mampu memfermentasi glukosa.

#### g. Pigmen Flourescent pada Media King's B

Media King's B terdiri dari Pepton 20 g;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  1,5 g;  $\text{MgSPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  1,5 g; gliserol 15 ml; aquades 1 L; dan agar 15 g. Media disterilisasi pada 121°C selama 25 menit. Biakan bakteri uji ditumbuhkan pada media King's B yang sudah disterilisasi kemudian diinkubasikan selama 24-48 jam. Selanjutnya biakan tersebut diamati di

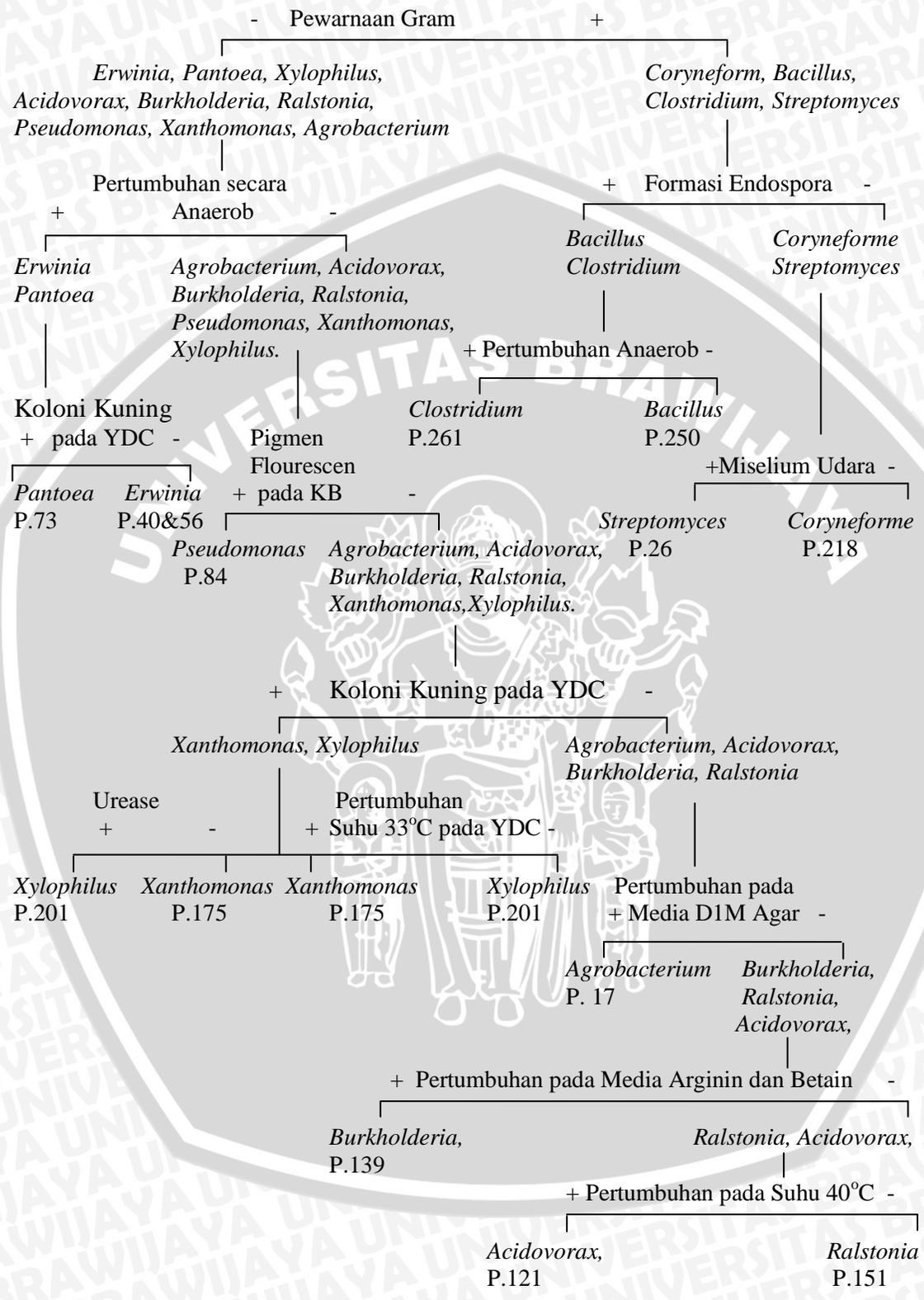
bawah sinar UV apakah berpendar atau tidak. Reaksi positif ditunjukkan dengan terbentuknya pigmen fluorescent yang berwarna biru atau hijau.

h. Pertumbuhan pada Media YDC

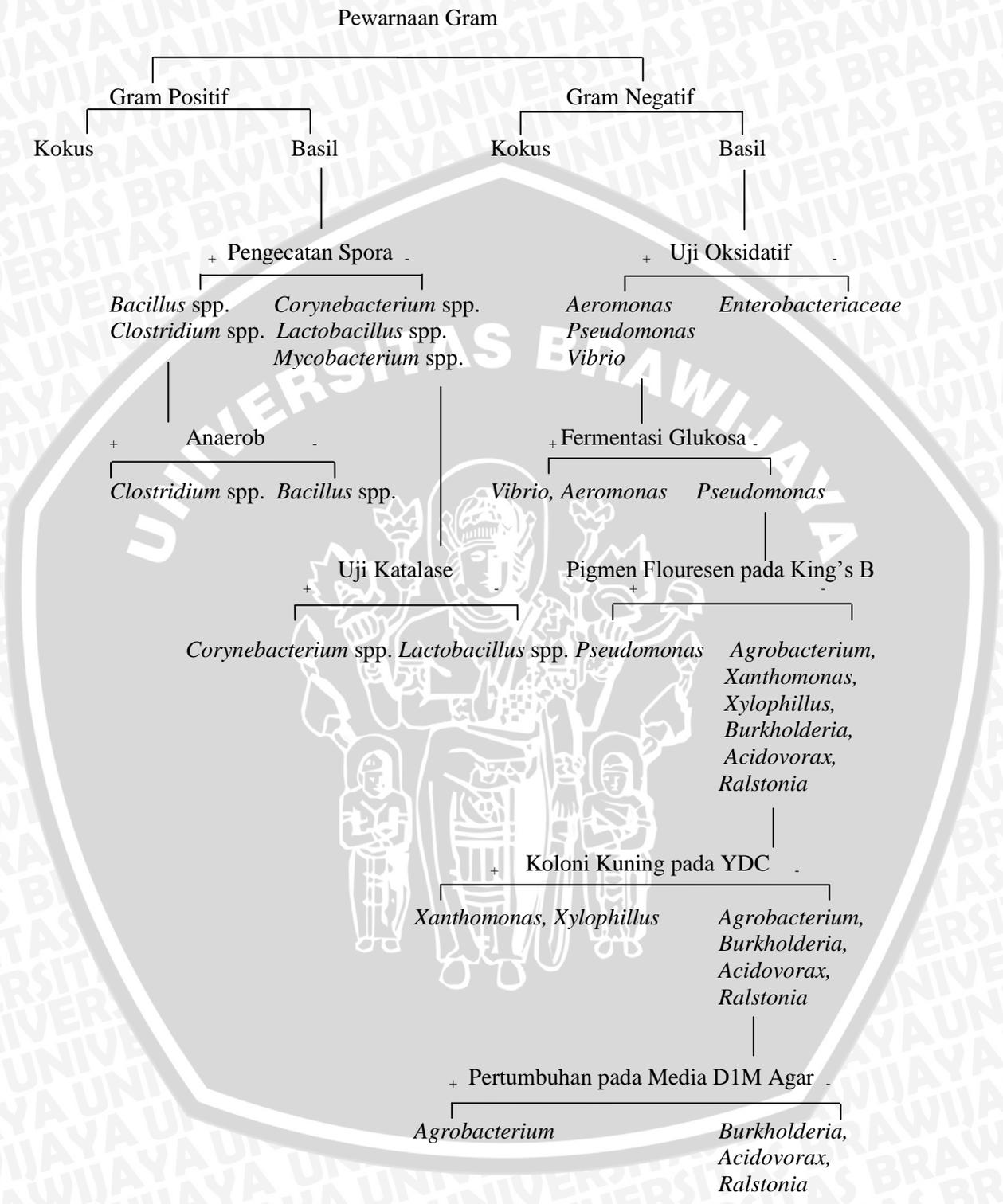
Media YDC terdiri dari yeast ekstrak 10 gr, glukosa 20 gr,  $\text{CaCO}_3$  20 gr, dan agar 15 gr. Selanjutnya semua bahan dicampur dan dilarutkan dengan aquades 1 liter lalu di didihkan. Media tersebut disterilkan pada  $121^\circ\text{C}$  selama 30 menit. Goreskan bakteri pada media agar YDC dan inkubasikan pada suhu  $30^\circ\text{C}$ . Setelah 48 jam lakukan pengamatan apakah berwarna kuning atau tidak. Reaksi positif apabila terbentuk koloni berwarna kuning yang merupakan bakteri dari genus *Xylophilus* sp. dan *Xanthomonas* sp. Genus *Ralstonia*, *Agrobacterium*, *Acidovorax* dan *Burkholderia* koloni bakteri tidak berwarna kuning pada media YDC.

i. Pertumbuhan pada D1M Agar

Mencampur dan melarutkan semua bahan (*Cellobiose* 5 gram,  $\text{NH}_4\text{Cl}$  1 gram,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  1 gram,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  1 gram,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  3 gram, *Malachite green* 10 gram dan Agar 15 gram). Atur derajat keasaman pH 7,0 (media berwarna biru), autoklaf pada temperatur  $121^\circ\text{C}$  selama 25 menit. Tuangkan media D1M pada cawan petri, biarkan media dingin dan mengeras. Pada media D1M digoreskan bakteri endofit yang akan diuji dan inkubasikan pada suhu  $30^\circ\text{C}$  selama 24-48 jam. Bakteri yang dapat tumbuh pada media ini menunjukkan hasil positif (+). D1M ini merupakan media semiselektif untuk pertumbuhan bakteri *Agrobacterium* sp.



Gambar 1. Identifikasi bakteri patogen hingga tingkat genus (Schaad et al., 2001).



Gambar 2. Identifikasi bakteri endofit hingga tingkat genus (Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 1994 dan Schaad *et al.*, 2001).



### 3.5 Variabel Pengamatan Pengujian pada Cawan Petri

#### 1. Hambatan bakteri endofit terhadap patogen *Ralstonia solanacearum* penyebab penyakit layu pada cawan petri.

Variabel pengamatan pada pengujian ini merupakan data kuantitatif. Pada uji antagonis bakteri endofit pengamatan masa inkubasi dilakukan setiap hari dihitung 24 jam setelah inokulasi. Pengamatan dilakukan sebanyak tiga kali selama 3 hari. Indeks zona hambat dihitung dengan rumus menurut Sugiyono *et.al.* (2008). Bakteri endofit yang paling potensial dapat ditunjukkan dengan adanya penampakan zona bening terbesar menggunakan jangka sorong secara vertikal dan horizontal. Selanjutnya dirata-rata dalam millimeter sehingga diperoleh data kuantitatif zona hambat bakteri endofit. Untuk menghitung indeks zona hambat menggunakan rumus :

$$I = \frac{B-A}{B}$$

Dimana :

I = Indeks zona bening

A = Diameter koloni agens hayati

B = Diameter zona bening

#### 2. Dokumentasi luas hambatan agens hayati terhadap patogen penyebab penyakit layu pada cawan petri.

Dokumentasi tersebut merupakan variabel kualitatif yang dipergunakan sebagai bukti tingkat daya hambat bakteri endofit terhadap bakteri patogen. Dokumentasi dilakukan setelah inkubasi selama 24 jam.

### 3.6 Analisis Data

Data yang diperoleh dari pengamatan percobaan pada cawan petri dianalisis dengan sidik ragam (ANOVA) dan apabila berbeda nyata maka dilanjutkan dengan uji Duncan pada taraf kesalahan 5%.