

### **3. METODE PENELITIAN**

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

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Penyakit Tumbuhan, Jurusan Hama dan Penyakit Tumbuhan, Fakultas Pertanian, Universitas Brawijaya Malang mulai bulan Januari 2017 sampai dengan April 2017.

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

Alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain timbangan analitik, kompor, autoklaf *type* HL – 36 Ae Hirayama, *microwave oven type* R – 380IN (S) SHARP, cawan Petri, pisau, jarum ose, tabung reaksi, mikroskop kamera OLYMPUS SZX7 *series*, kamera, bunsen, pinset, botol media, gelas ukur, jarum suntik, gelas obyek, *cover glass*, *glass* L, *sprayer*, pipet tetes, gunting, *cutter*, mikropipeter Vitlab dig 100-1000  $\mu$ l, *Laminar Air Flow Cabinet* (LAFC) *type*: H.S. 079S, *tray*, jangka sorong dan *Spektrofotometer*.

Bahan yang digunakan adalah media *Nutrient Agar* (NA), aquades steril, media Oksidatif-Fermentatif, media *Yeast Dextrose Carbonat* (YDC), spirtus, plastik, *water agar*, alkohol 70%, kertas saring, KOH 3%, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, iodine, kristal violet, safranin, *malachite green*, tanaman tembakau, kertas lakmus, kloroform, gliserol, tissue steril, aluminium foil, streptomycin, dan clorox.

#### **3.3 Metode Penelitian**

Metode penelitian terdiri dari metode survei dan metode percobaan. Prosedur penelitian terdiri dari beberapa tahapan, yaitu (1) penelusuran budidaya pertanaman kubis PHT dan konvensional (2) eksplorasi bakteri rizosfer dari lahan kubis PHT dan konvensional; (3) isolasi bakteri *X. campestris* pv. *campestris*.; (4) seleksi bakteri antagonis dari rizosfer lahan kubis PHT dan konvensional terhadap bakteri *X. campestris* pv. *campestris*; (5) pengujian antagonis bakteri rizosfer dari lahan kubis PHT dan konvensional terhadap bakteri *X. campestris* pv. *campestris*; (6) karakterisasi dan identifikasi sampai tingkat genus bakteri rizosfer dari lahan kubis PHT dan konvensional terhadap bakteri *X. campestris* pv. *campestris*.

#### **3.4 Pelaksanaan Penelitian**

##### **3.4.1 Eksplorasi Bakteri Rizosfer**

##### **Pengambilan sampel bakteri rizosfer di sekitar perakaran tanaman kubis**

Sampel bakteri rizosfer kubis didapat dari lahan kubis PHT dan konvensional di Desa Junrejo, Kecamatan Junrejo, Kota Batu, Provinsi Jawa

Timur dengan mengambil tanah yang berada di sekitar perakaran tanaman kubis (rizosfer) pada lahan PHT dan konvensional. Pengambilan sampel tanah dilakukan dengan metode acak yaitu dengan memilih 5 titik pada lahan yang akan diambil sampelnya secara acak. Tanah diambil dengan kedalaman 5-10 cm di sekitar perakaran tanaman kubis hingga didapatkan masing-masing 5 sampel tanah pada setiap jenis lahan kubis yaitu lahan kubis berbasis PHT dan konvensional. Sampel tanah kemudian dimasukkan ke dalam plastik dan diberikan label, kemudian 5 sampel tanah pada masing-masing jenis lahan dikompositkan menjadi satu sehingga didapatkan dua sampel tanah komposit, yaitu sampel tanah pada jenis lahan pertanaman kubis PHT dan konvensional.

### **Isolasi bakteri rizosfer**

Isolasi bakteri menggunakan metode *dilution plate* atau disebut pengenceran bertingkat. Sampel tanah yang telah dikompositkan, selanjutnya diambil sebanyak 1 gram dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang sudah berisi aquades steril sebanyak 10 ml. Kemudian suspensi bakteri sebanyak 1 ml diambil dengan menggunakan mikropipet dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi berukuran 2 ml yang berisi aquades steril sebanyak 1 ml. Pengenceran dilakukan hingga pengenceran  $10^{-9}$ . Kemudian 1 ml larutan diambil dari masing-masing pengenceran  $10^{-7}$ ,  $10^{-8}$ , dan  $10^{-9}$  dan dimasukkan ke dalam cawan Petri yang sudah berisi media NA dan kemudian larutan tersebut diratakan dengan *glass L* yang sudah steril. Media NA tersebut kemudian diinkubasi selama 24-48 jam pada suhu ruang. Bakteri yang tumbuh dipurifikasi hingga didapatkan bakteri dengan koloni tunggal.

### **Penghitungan koloni bakteri rizosfer**

Penghitungan populasi bakteri rizosfer yang telah diisolasi dilakukan dengan menggunakan metode hitung cawan. Prinsip dari metode hitung cawan adalah menumbuhkan sel-sel mikroba yang masih hidup pada suatu media sehingga sel tersebut berkembang biak dan membentuk koloni-koloni yang dapat dilihat langsung dengan mata telanjang tanpa menggunakan mikroskop (Yunita *et al.*, 2015).

Hasil isolasi bakteri rizosfer pada media NA yang telah diinkubasi selama 24 jam pada suhu ruang kemudian dihitung jumlah seluruh koloni bakteri yang muncul pada media NA secara manual dan dihitung pula jumlah masing-masing populasi jenis bakteri berbeda yang tumbuh pada media NA. Total koloni yang

dapat dihitung pada media NA adalah koloni dengan jumlah 30-300. Perhitungan jumlah koloni menggunakan rumus Damongilala (2009) sebagai berikut,

$$\text{Total bakteri} = \sum \text{koloni bakteri} \times 1/\text{Pengenceran}$$

### 3.4.3 Isolasi Bakteri *X. campestris* pv. *campestris*

Bakteri *X. campestris* pv. *campestris* diisolasi dari tanaman kubis yang memiliki gejala penyakit busuk hitam, yaitu terdapat bercak kuning berbentuk huruf V pada daun kubis dan di sekitar bercak kuning tersebut terdapat perubahan warna daun menjadi warna coklat. Tanaman kubis bergejala busuk hitam diperoleh dari lahan kubis di Desa Junrejo, Kecamatan Junrejo, Kota Batu, Provinsi Jawa Timur.

Tanaman kubis yang terserang bakteri penyebab penyakit busuk hitam diisolasi dengan mencuci daun kubis tersebut terlebih dahulu dengan air mengalir. Bagian daun tanaman kubis yang terserang bakteri penyebab penyakit busuk hitam dipotong setengah bagian daun sakit dan setengah bagian daun sehat dengan lebar masing-masing 1 cm dan disterilisasi permukaannya dengan menggunakan clorox selama 1 menit kemudian dibilas dengan alkohol 70% selama 1 menit, selanjutnya dibilas dengan aquades sebanyak 3 kali dan pada masing-masing aquades direndam selama 1 menit kemudian dibilas serta dicacah pada aquades steril. Hasil larutan dari cacahan daun kubis bergejala pada aquades steril tersebut diambil sebanyak 1 ml dan ditanam di cawan Petri yang sudah berisi media NA, kemudian diratakan dengan *glass* L yang sudah disterilkan sebelumnya. Media yang telah berisi isolat tersebut diinkubasi selama 24-48 jam pada suhu ruang.

Koloni bakteri *X. campestris* pv. *campestris* yang tumbuh kemudian dilakukan purifikasi untuk mendapatkan koloni tunggal dari bakteri tersebut. Isolat bakteri patogen hasil isolasi kemudian diidentifikasi hingga tingkat genus menurut Schaad *et al.*(2001) dengan beberapa tahapan pengujian yang meliputi uji hipersensitif, uji reaksi gram dengan KOH 3%, uji reaksi gram dengan pengecatan gram, uji oksidaif-fermentatif (OF) dan uji pertumbuhan media YDC.

#### Uji Postulat Koch

Uji Postulat Koch bertujuan untuk memastikan bahwa bakteri patogen yang telah diisolasi dari tanaman bergejala merupakan bakteri *X. campestris* pv. *campestris* atau bukan. Uji Postula Kotch dilakukan pada lahan kubis yang berlokasi di Desa Kedung alus, Kecamatan Tukur, Kabupaten Pasuruan, Jawa

Timur. Pada uji ini, sebanyak 10 ml suspensi bakteri patogen yang berumur 24-48 jam diinokulasikan dengan cara menyuntikkan jarum suntik yang sudah berisi suspensi bakteri patogen pada bagian daun tanaman kubis yang sehat. Tanaman kubis yang telah diinfiltrasi kemudian diamati setiap hari untuk mengetahui masa inkubasi penyakit busuk hitam pada tanaman kubis yang disebabkan oleh bakteri *X. campestris* pv. *campestris*. Apabila gejala yang muncul sama dengan tanaman kubis yang terserang busuk hitam saat ditemukan dilapang, maka dapat dipastikan bahwa yang menyebabkan gejala tersebut adalah patogen yang sama yaitu bakteri *X. campestris* pv. *campestris*.

#### **3.4.4 Seleksi Bakteri Antagonis dari Rizosfer Perakaran Kubis Terhadap Bakteri *X. campestris* pv. *campestris***

Uji antagonis dilakukan dengan menggunakan metode *spray* atau pengkabutan (Kawaguchi *et al.*, 2008). Bakteri dari rizosfer perakaran kubis yang telah diinkubasi selama 48 jam diambil dengan menggunakan jarum ose kemudian dibuat suspensi dalam aquades steril. Selanjutnya kertas saring steril dengan diameter 5 mm dimasukkan ke dalam suspensi selama  $\pm 1$  menit dan ditiriskan di atas tisu steril selama 2 jam. Kemudian kertas saring ditanam di media NA yang berada pada cawan Petri dan diinkubasi selama 24 jam. Setelah diinkubasi, bakteri antagonis dimatikan dengan pemberian klorofom pada tutup cawan Petri dalam keadaan terbalik selama 1 jam. Setelah menguap, biakkan bakteri tersebut disemprot dengan suspensi bakteri patogen pada kerapatan  $10^9$  CFU/ml. Hasil perlakuan diinkubasi selama 24 jam dan daerah hambatan atau zona bening yang terbentuk diukur dengan menggunakan jangka sorong.

#### **3.4.5 Uji Antagonis Bakteri Rizosfer Terhadap Bakteri *X. campestris* pv. *campestris***

Metode uji antagonis yang digunakan sama seperti metode seleksi bakteri antagonis yaitu menggunakan metode *Spray* (Kawaguchi *et al.*, 2008). Enam isolat terbaik dari hasil seleksi selanjutnya diuji antagonis dengan menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan 8 perlakuan dan 4 ulangan pada masing-masing jenis tanah yang digunakan. Kerapatan suspensi isolat bakteri yang digunakan pada uji ini yaitu  $10^9$  CFU/ml. Masing-masing perlakuan diinkubasi selama 24 jam dan diukur zona bening yang terbentuk. Perlakuan yang diberikan yaitu:

1. Isolat bakteri tanah kode P-A1 dan *X. campestris* pv. *campestris*

2. Isolat bakteri tanah kode P-A2 dan *X. campestris* pv. *campestris*
3. Isolat bakteri tanah kode P-A5 dan *X. campestris* pv. *campestris*
4. Isolat bakteri tanah kode P-B1 dan *X. campestris* pv. *campestris*
5. Isolat bakteri tanah kode P-C2 dan *X. campestris* pv. *campestris*
6. Isolat bakteri tanah kode K-D dan *X. campestris* pv. *campestris*
7. Kontrol positif (Bakterisida Streptomycin dan *X. campestris* pv. *campestris*)
8. Kontrol negatif (aquades dan *X. campestris* pv. *campestris*)

#### **3.4.7 Karakterisasi dan Identifikasi Bakteri Antagonis dari Rizosfer Perakaran Kubis pada Lahan Berbasis PHT dan Konvensional**

Identifikasi bakteri dilakukan dengan berpedoman pada buku *Bergery's Determinative Bacteriology* (Holt *et al.*, 1994) dan Schaad *et al.* (2001). Enam isolat yang memiliki zona bening atau zona hambat paling tinggi dipilih kemudian dikarakterisasi dan diidentifikasi di Laboratorium Penyakit Tumbuhan. Beberapa metode yang digunakan adalah sebagai berikut,

##### **a. Uji hipersensitif**

Uji hipersensitif merupakan pengujian yang dilakukan untuk mengetahui isolat bakteri yang diuji merupakan bakteri patogen atau bukan. Pengujian dilakukan dengan cara menginokulasikan suspensi bakteri pada daun tanaman tembakau. Reaksi positif akan ditunjukkan dengan reaksi nekrosis pada bagian daun tembakau yang diinokulasikan bakteri tersebut.

##### **b. Uji Gram**

###### **Pewarnaan Gram**

Bakteri yang berumur 24 jam dibuat suspensi dalam aquades steril dan diletakkan di atas gelas objek yang telah disterilisasi dan dikeringkan di atas pemanas Bunsen. Pengecatan gram bakteri selanjutnya dilakukan dengan memberikan kristal violet (5%) sebanyak 2-3 tetes selama satu menit dicuci dengan air mengalir dan dikering anginkan, selanjutnya ditetesi dengan iodine sebanyak 1-2 tetes dan dibiarkan selama 1 menit dan dicuci dengan air mengalir dan dikering anginkan, kemudian dicuci dengan alkohol 70% dan dibiarkan hingga 20 detik, kemudian cuci dengan air mengalir dan keringkan. Tahapan selanjutnya yaitu tetesi dengan safranin 0,1% dan diamkan selama 20 detik lalu cuci dengan air mengalir, kering anginkan dan kemudian diamati dibawah

mikroskop. Sel bakteri dari Gram negatif akan menunjukkan warna merah, sedangkan sel bakteri Gram positif akan menunjukkan warna ungu.

### **Uji KOH**

Biakkan murni bakteri berumur 24 jam disuspensikan di atas gelas objek yang sebelumnya telah ditetesi KOH 3%, kemudian diaduk menggunakan jarum ose. Angkat jarum ose dari permukaan kaca preparat secara cepat dan berkali-kali. Bakteri Gram negatif ditunjukkan oleh suspensi bakteri yang lengket dan terangkat seperti benang bersama dengan jarum ose serta akan membentuk lendir, sedangkan apabila suspensi bakteri tersebut tetap encer atau tidak terangkat dengan ose, berarti suspensi bakteri tersebut merupakan bakteri Gram positif.

### **c. Pewarnaan spora**

Bakteri berumur 24 jam dibuat suspensi dengan aquades steril di atas gelas obyek yang telah disterilkan dan dikeringkan di atas pemanas Bunsen, kemudian genangi olesan bakteri dengan *malachite green* yang diletakkan di atas pemanas selama 2-3 menit dan dijaga agar pewarna tidak menguap dan mendidih, setelah itu didinginkan dan dicuci dengan menggunakan aquades steril dan dikeringkan. Tahapan selanjutnya yaitu tetesi suspensi bakteri dengan safranin selama 30 detik dan dibilas dengan aquades steril dan dikeringkan. Pengamatan dilakukan dengan menggunakan mikroskop perbesaran 1000x ditambah minyak emersi. Jika bakteri mampu membentuk spora maka akan nampak spora yang berwarna hijau.

### **d. Uji oksidatif-fermentatif (OF)**

Uji ini dilakukan untuk mengetahui pertumbuhan isolat bakteri apakah bersifat aerob atau anaerob. Bahan yang digunakan untuk 1 L media uji ini yaitu, pepton 2 g, NaCl 5 g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,3 g, agar 3 g dan bromotymol blue 1% 3 ml. Bahan-bahan tersebut selanjutnya dilarutkan dan diatur pada pH 7,1 dan dituang kedalam tabung reaksi berdiameter 13 mm sebanyak 4,5 ml pertabung. Media tersebut selanjutnya disterilisasi pada suhu 121°C selama 20 menit. Media yang telah steril kemudian ditambahkan larutan glukosa 10% sebanyak 0,5 ml pada setiap tabungnya.

Inokulasi bakteri dilakukan dengan cara menusukkan bakteri dengan jarum ose pada media. Inokulasi dilakukan pada dua tabung, tabung pertama ditambahkan paraffin sebanyak 1 ml sebagai penutup yang diumpamakan sebagai kondisi anaerob dan tabung kedua dibiarkan tanpa penambahan paraffin

yang diumpamakan sebagai kondisi aerob. Kedua tabung tersebut diinkubasi pada suhu ruang dan pengamatan dilakukan pada perubahan warna yang terjadi. Apabila terjadi perubahan warna dari biru menjadi kuning pada tabung mengindikasikan positif untuk pertumbuhan anaerob dan sebaliknya.

#### **e. Uji katalase**

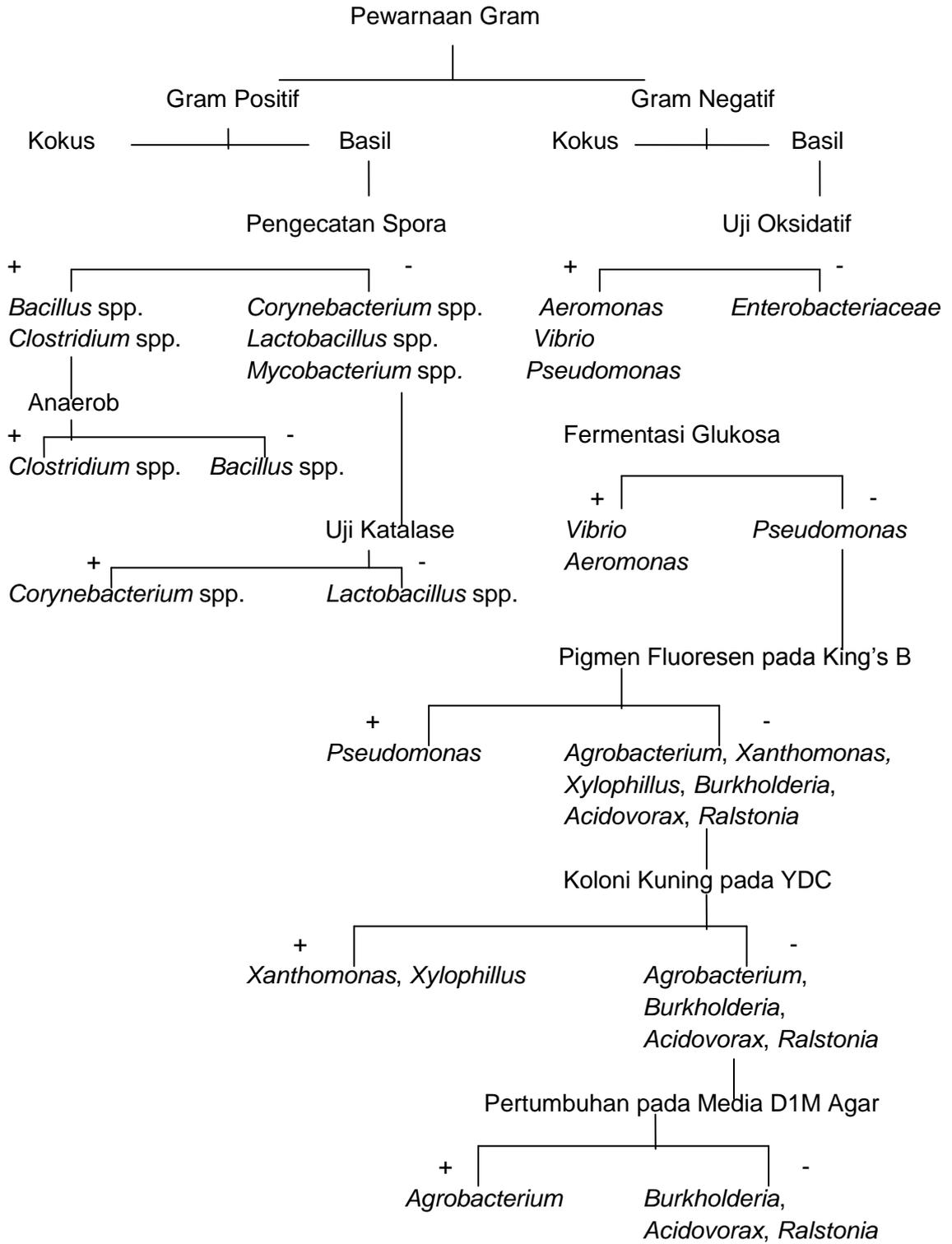
Uji katalase digunakan untuk mengetahui aktivitas katalase pada bakteri yang diuji. Uji katalase dilakukan dengan meletakkan satu ose koloni bakteri pada objek glass, kemudian koloni bakteri ditetesi dengan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3%. Apabila hasil pengamatan yang diamati menunjukkan gelembung maka hasilnya positif dan sebaliknya.

#### **f. Pigmen fluorescens pada media King's B**

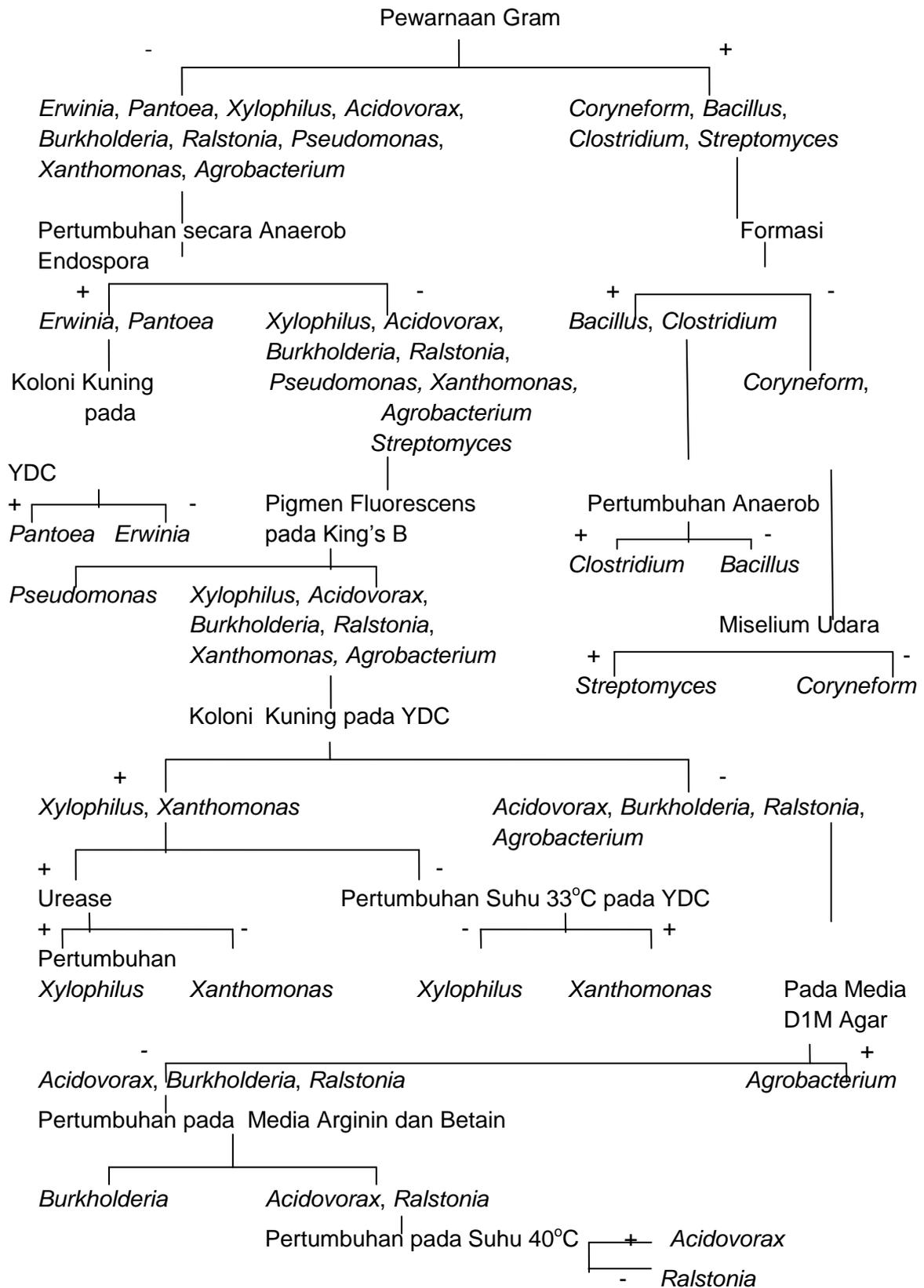
Pengujian ini dilakukan dengan menumbuhkan bakteri pada media selektif King's B dan diinkubasi selama 24-48 jam. Komposisi media King's B terdiri dari protease pepton 20 gram, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1,5 g, MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 1,5g, gliserol 15 ml dan agar 15 g. Bakteri yang telah ditumbuhkan diamati dibawah sinar UV. Jika bakteri nampak berpendar maka bakteri tersebut mampu memproduksi pigmen fluorescent dan sebaliknya. Pada koloni bakteri yang berpendar dapat dimasukkan pada genus *Pseudomonas*.

#### **g. Pertumbuhan pada media selektif YDC**

Pengujian pertumbuhan pada media selektif YDC bertujuan untuk pertumbuhan selektif bakteri genus *Xylophilus* dan *Xanthomonas*. Komposisi media YDC yaitu yeast 10 g, glukosa 20g, CaCO<sub>3</sub> 20 g dan agar 15g. Pengamatan yang dilakukan yaitu pada warna koloni bakteri yang tumbuh, reaksi positif ditunjukkan apabila bakteri yang ditumbuhkan berwarna kuning.



Gambar 2. Bagan alir identifikasi bakteri hingga tingkat genus (Bergey's Manual of Determinative Bacteriology) (Holt et al. 1994)



Gambar 3. Bagian alir identifikasi bakteri patogen hingga tingkat genus (Schaad et al., 2001)

### 3.5 Variabel Pengamatan

#### 3.5.1 Kelimpahan Bakteri Rizosfer

Variabel pengamatan pada pengujian ini merupakan data kuantitatif. Total koloni bakteri dihitung setelah masa inkubasi bakteri pada media NA selama 48 jam pada suhu ruang. Sampel yang dihitung yaitu pada bakteri yang dibiakkan pada media NA dari hasil pengenceran  $10^{-7}$ ,  $10^{-8}$  dan  $10^{-9}$ . Total koloni yang dapat dihitung pada media NA adalah koloni dengan jumlah 30-300. Perhitungan total koloni dapat dilakukan menggunakan rumus:

$$\text{Kelimpahan bakteri (cfu/g)} = \frac{\sum \text{koloni terhitung} \times Y}{\text{Berat kering tanah (g)}}$$

Keterangan:

Y = Faktor pengenceran x volume sampel

#### 3.5.2 Keanekaragaman Bakteri Rizosfer

Jumlah bakteri yang berbeda atau yang sering disebut keanekaragaman bakteri pada penelitian ini menjadi variabel pengamatan. Keanekaragaman bakteri akan mempengaruhi biodiversitas suatu ekosistem tanah. Bakteri yang beragam akan menyeimbangkan rantai makanan biota tanah. Konsep ini merupakan konsep keanekaragaman yang relatif paling dikenal dan paling banyak digunakan (Magurran, 1998). Indeks keanekaragaman Shannon dihitung dengan formula berikut:

$$H' = -\sum_{i=1}^s (p_i) (\ln p_i)$$

Keterangan:

Pi =  $\sum ni/N$

H' = Indeks keragaman Shannon-Wiener

Pi = Jumlah individu suatu spesies/jumlah total seluruh spesies

ni = Jumlah individu spesies ke-i

N = Jumlah total individu

#### 3.5.3 Indeks Penghambatan Bakteri Antagonis Terhadap Bakteri *X. campestris* pv. *campestris*

Pembentukan zona bening atau zona penghambat yang dihasilkan oleh bakteri rizosfer dari tanah lahan kubis PHT dan konvensional diukur diameternya menggunakan jangka sorong. Indeks penghambatan tersebut menunjukkan potensi bakteri antagonis yang paling potensial dalam mengendalikan bakteri *X.*

*campestris* pv. *campestris*. Menurut Dias *et al.*, (2014) indeks penghambatan dihitung menggunakan rumus sebagai berikut,

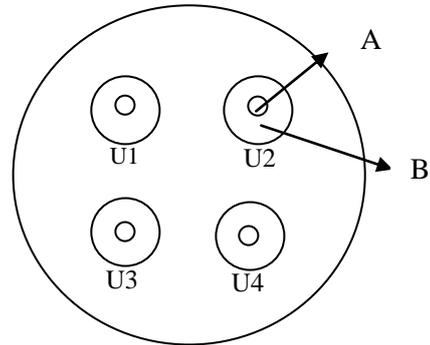
$$I = \frac{B - A}{B}$$

Keterangan:

I = Indeks zona hambat

A = Diameter koloni agens hayati

B = Diameter zona hambat



### 3.6 Analisis Data

Seluruh data hasil pengamatan dianalisis menggunakan *Analysis of Variance* (ANOVA) dengan taraf 5%. Apabila dari hasil analisis menunjukkan hasil berbeda nyata maka dilakukan uji lanjut dengan menggunakan Uji Duncan 5% untuk mengetahui pengaruh antar perlakuan.