

## BAB III. BAHAN DAN METODE

### 3.1 Waktu dan Tempat Pelaksanaan Penelitian

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Penyakit Tumbuhan Jurusan Hama dan Penyakit Tumbuhan Fakultas Pertanian Universitas Brawijaya, Malang. Penelitian ini dilaksanakan mulai bulan Maret sampai November 2017.

### 3.2 Alat dan Bahan

Alat yang digunakan selama penelitian antara lain timbangan, panci, kompor listrik, autoklaf, oven, scalpel, cawan petri, jarum ose, mikroskop, pemanas bunsen, mikropipet, penggaris, kain hitam, gunting, timbangan analitik, tabung reaksi, pinset, pisau, *orbital shaker*, botol media, gelas ukur, jarum suntik, gunting, gelas obyek, *sprayer*, *coverglass*, pipet, spektrofotometer, sentrifuge, tabung *ependorf*, *Laminar Air Flow Cabinet* (LAFC), EC meter.

Bahan yang digunakan adalah NaCl, NaOCl, alkohol, etanol, kertas saring, kertas merang, spirtus, akuades, media *Nutrient Agar* (NA), akuades steril, media *Nutrient Broth* (NB), streptomycin, kloroform, benih tomat varietas Tymoti, isolat bakteri *Ralstonia solanacearum* dan 9 isolat bakteri toleran salin hasil eksplorasi di lahan salin Lamongan, Jawa Timur.

### 3.3 Metode Penelitian

Penelitian ini terdiri dari beberapa tahap, yaitu: 1) Seleksi 9 isolat bakteri toleran salin terhadap peningkatan pertumbuhan benih tomat dibawah cekaman salin (uji kecambah). 2) Seleksi kemampuan antagonis 9 isolat bakteri toleran salin terhadap *Ralstonia solanacearum* secara *in vitro*. 3) Identifikasi bakteri toleran salin.

Tahap uji antagonis menggunakan rancangan acak lengkap (RAL) dengan 11 perlakuan dan 4 ulangan, sedangkan tahap seleksi bakteri melalui uji kecambah menggunakan rancangan acak lengkap faktorial dengan 2 faktor perlakuan, yaitu bakteri dan kadar salinitas. Perlakuan diulang sebanyak tiga kali.

### **3.4 Pelaksanaan Penelitian**

#### **3.4.1 Perbanyakkan Bakteri Patogen *Ralstonia solanacearum***

Isolat bakteri berasal dari koleksi Laboratorium Penyakit Tumbuhan Fakultas Pertanian Universitas Brawijaya, Malang. Isolat bakteri tersebut dibiakkan pada media selektif TTC (*Triphenyl tetrazolium chloride*) dan diinkubasi pada suhu ruang selama 2 x 24 jam. Setelah koloni bakteri tumbuh dilakukan proses peremajaan dan perbanyakkan.

#### **3.4.2 Perbanyakkan Bakteri Toleran Salin**

Sembilan isolat bakteri toleran salin yang digunakan berasal dari hasil eksplorasi yang telah dilakukan oleh Cahyaty (2017) di daerah pesisir Lamongan, Jawa Timur. Eksplorasi dilakukan untuk mendapatkan sample bakteri yang berasal langsung dari daerah salin. Sample ditentukan secara acak di lahan pesisir Kabupaten Lamongan yang memiliki kadar salin 5 dS/m, dimana sample yang diambil berupa tanaman dan tanah disekitar perakaran tanaman. Setelah itu dilakukan isolasi untuk mendapatkan isolat murni bakteri endemik lahan salin. Isolasi bakteri dilakukan menggunakan media nutrient agar salin 5%. Hasil eksplorasi yang telah dilakukan menghasilkan 29 isolat bakteri murni endemik lahan salin. Kemudian dilakukan seleksi bakteri terhadap cekaman salin 10%. Hasil yang diperoleh menunjukkan sembilan isolat, yaitu SN1, SN2, SN6, SN7, SN13, SN15, SN22, SN23, dan SN26 toleran terhadap kadar salin 10%.

Sembilan isolat bakteri yang berasal dari lahan salin Lamongan Jawa Timur tersebut dibiakkan dan diperbanyak pada media NA dan diinkubasi pada suhu ruang selama 2 x 24 jam.

#### **3.4.3 Identifikasi bakteri toleran salin**

Identifikasi bakteri dilakukan dengan berpedoman pada buku Bergey's Determinative Bacteriology (Holt *et al.*, 1994) dan Schaad *et al.* (2001). Tahapan uji identifikasi bakteri toleran salin hingga ke tingkat genus dapat dilakukan berdasarkan diagram Schaad dan Bergey's seperti pada Gambar 3. Beberapa metode yang digunakan adalah:

1. Reaksi Gram
  - a. Pengujian reaksi dengan KOH

Biakan murni bakteri berumur 24 jam disuspensikan diatas gelas objek yang sebelumnya telah ditetesi dengan KOH 3%. Kemudian diaduk menggunakan jarum ose. Jarum ose diangkat dengan cepat berkali-kali dari

permukaan suspensi, suspensi bakteri lengket yang terangkat seperti benang bersama jarum ose dan membentuk lendir maka bakteri termasuk gram negatif. Apabila suspensi tetap encer atau tidak terangkat dengan jarum ose berarti bakteri gram positif

b. Pewarnaan Gram

Bakteri berumur 24 jam dibuat suspensi dengan akuades steril diatas gelas objek yang telah disterilkan dan dikeringkan diatas pemanas bunsen. Kemudian dilakukan pengecatan dengan Kristal violet 5% sebanyak 2-3 tetes, didiamkan satu menit. Kemudian zat warna dibuang lalu cuci dengan air mengalir, keringanginkan, lalu bakteri diberi larutan iodin 1-2 tetes dan dibiarkan 1 menit. Setelah itu dicuci dengan air mengalir dan dikeringanginkan. Selanjutnya suspensi bakteri dicuci dengan alkohol 70%, dibiarkan 20 detik kemudian dicuci dengan air mengalir dan keringanginkan. Langkah selanjutnya dituangkan larutan safranin dan dibiarkan 20 detik, lalu dicuci dengan air mengalir dan dikeringanginkan, dan diamati dibawah mikroskop. Sel bakteri Gram negatif berwarna merah, sedangkan positif berwarna ungu.

c. Pewarnaan spora

Bakteri berumur 24 jam dibuat suspensi dengan akuades steril diatas gelas objek yang telah disterilkan dan dikeringkan diatas pemanas bunsen. Setelah itu *malacite green* diteteskan ke suspensi bakteri kemudian diletakkan diatas pemanas bunsen selama 2-3 menit dan dijaga agar pewarna tidak menguap dan mendidih, setelah itu didinginkan, dicuci air mengalir dan dikeringanginkan. Suspensi yang telah dingin ditetei larutan safranin selama 30 detik, lalu dicuci dan keringanginkan. Kemudian suspensi diamati dibawah mikroskop dengan perbesaran 1000x menggunakan minyak emersi. Spora bakteri akan tampak berwarna kehijauan sedangkan sel bakteri tanpa spora akan berwarna merah.

2. Uji oksidatif-fermentatif (anaerob)

Uji oksidatif dan fermentatif (OF)/ pertumbuhan anaerob dilakukan untuk mengidentifikasi isolat bakteri termasuk dalam kategori bakteri aerob atau bakteri anaerob. Bahan yang dibutuhkan dalam 1 liter media: pepton 2,0 gram; NaCl 3 gram;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,3 gram; agar 3 gram dan bromotymol blue (1%) 3 ml. Bahan-bahan dilarutkan dan diatur pada pH 7,1 kemudian media dituang kedalam tabung reaksi sebanyak 4,5 ml per tabung. Media

disterilisasi pada 121°C selama 20 menit. Setelah disterilisasi, setiap tabung ditambahkan larutan glukosa 10% sebanyak 0,5 ml. Bakteri diinokulasi dengan cara ditusuk jarum ose pada media. Inokulasi pada dua tabung, salah satu tabung ditambahkan parafin 1 ml untuk menciptakan kondisi anaerob, sedangkan tabung yang lain dibiarkan dalam kondisi aerob (tanpa parafin). Setelah itu diinkubasi pada suhu ruang dan diamati perubahan warna yang akan menentukan kategori bakteri tersebut. Apabila terjadi perubahan warna dari biru menjadi kuning pada tabung mengindikasikan positif untuk pertumbuhan anaerob dan sebaliknya.

### 3. Uji katalase

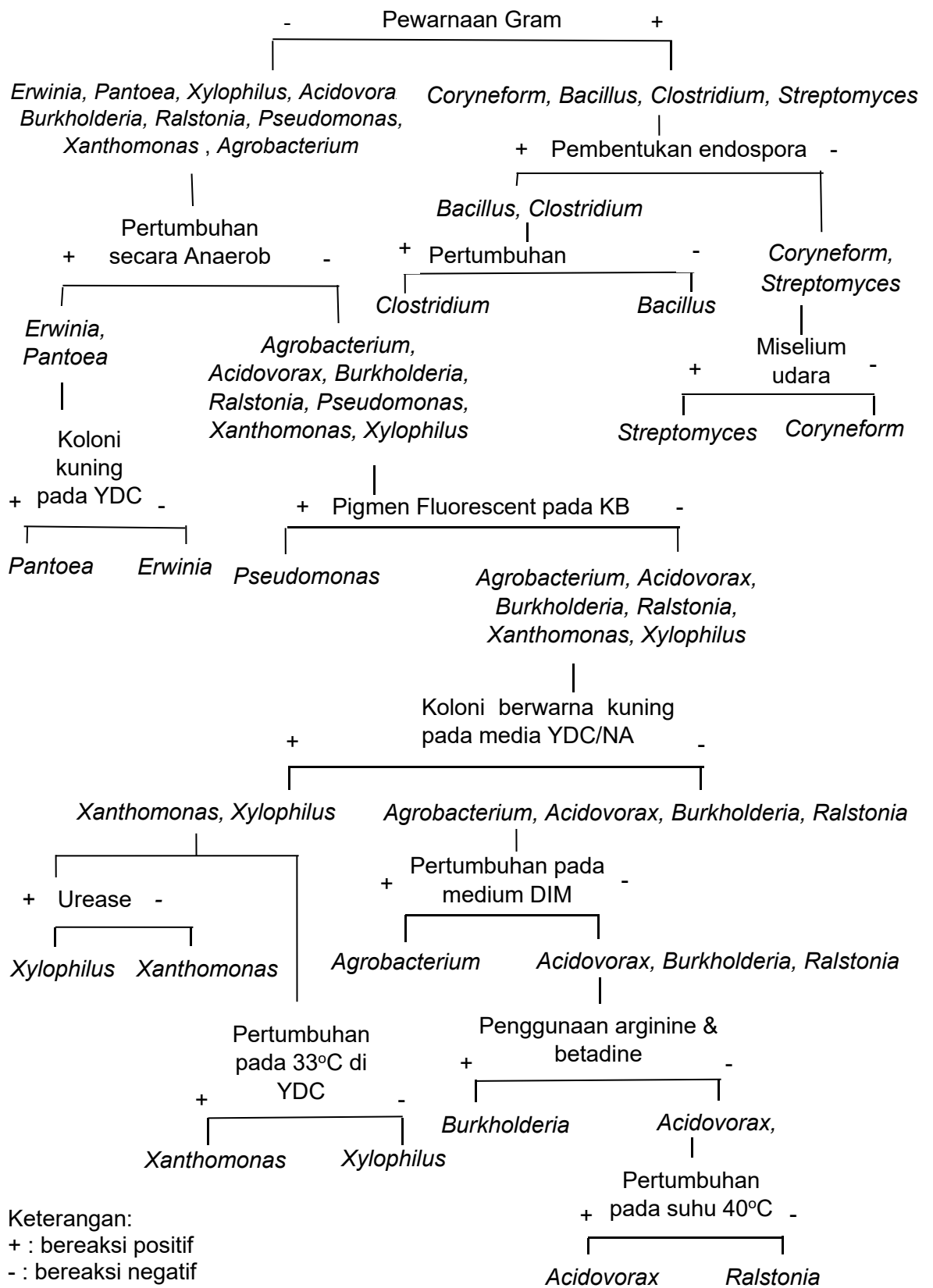
Uji katalase digunakan untuk mengetahui aktivitas katalase pada bakteri yang diuji. Uji katalase dilakukan dengan meletakkan satu ose koloni bakteri pada kaca objek. Kemudian koloni bakteri ditetesi dengan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3%. Apabila hasil yang diamati menunjukkan gelembung maka hasilnya positif.

### 4. Pigmen fluorescent pada media King's B

Pengujian pigmen fluorescent bertujuan untuk melihat kemampuan bakteri uji dalam memproduksi pigmen fluorescent. Pengujian pigmen fluorescent dilakukan dengan menumbuhkan bakteri uji pada media King's B dan diinkubasi selama 24 jam. Media King's B terdiri dari protease pepton 20 gram; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,5 gram; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 1,5 gram, gliserol 15 ml dan agar 15 gram. Selanjutnya bahan dicampur dan dilarutkan dengan akuades 1 liter. Media disterilisasi dengan autoklaf dengan suhu 121°C selama 20 menit. Bakteri uji hasil inkubasi selama 24-48 jam kemudian diamati dibawah sinar UV. Apabila bakteri tampak berpendar hijau kekuningan maka bakteri tersebut memproduksi pigmen fluorescent, dan apabila tidak berpendar hijau kekuningan maka hasilnya negatif.

### 5. Pertumbuhan pada media YDC

Pengujian pertumbuhan pada media YDC bertujuan untuk membedakan bakteri uji dari genus *Erwinia* atau *Pantoea*. Media YDC terdiri dari yeast ekstrak 10 gram; glukosa 20 gram; CaCO<sub>3</sub> 20 gram; agar 15 gram. Selanjutnya bahan dicampur dan dilarutkan dengan akuades 1 liter. Media disterilisasi dengan autoklaf dengan suhu 121°C selama 20 menit. Bakteri uji ditumbuhkan pada media YDC kemudian diinkubasi 24-48 jam. *Pantoea* sp. ditunjukkan tumbuhnya koloni bakteri berwarna kuning dan putih jika *Erwinia* sp.



Gambar 3. Identifikasi bakteri hingga tingkat genus (Schaad *et al.* (2001) dan Holt (1994))

### 3.4.4 Seleksi bakteri toleran salin terhadap peningkatan pertumbuhan benih tomat dibawah cekaman salin

Seleksi bakteri toleran salin terhadap peningkatan pertumbuhan benih tomat dibawah cekaman salin menggunakan metode berdasarkan International Seed Testing Association (2005) dalam Chookietwattana *et al.* (2012). Pada uji ini terdapat 2 perlakuan kadar salinitas yaitu 5 dS/m dan 7,5 dS/m. Perlakuan kadar salinitas 5 dS/m dan 7,5 dS/m dipilih berdasarkan pertimbangan untuk menyesuaikan kondisi lahan salin di Lamongan, Jawa Timur yang mengalami peningkatan kadar salinitas. Selain itu, kadar salinitas 5 dS/m dan 7,5 dS/m dipilih juga berdasarkan pertimbangan tidak menimbulkan penurunan persentase perkecambahan lebih dari 10%, dan tidak menimbulkan penurunan produksi lebih dari 30% (Cahyaty, 2015). Selain itu, bakteri yang diaplikasikan terdiri dari sembilan isolat. Berdasarkan 2 faktor perlakuan tersebut didapatkan total sebanyak 20 perlakuan uji, seperti yang tertera pada Tabel 1.

Tabel 1. Seleksi 9 isolat bakteri toleran salin terhadap peningkatan pertumbuhan benih tomat dibawah cekaman salinitas

Perlakuan	Keterangan
S1B0	Kadar salinitas 5 dS/m tanpa bakteri (kontrol)
S1B1	Kadar salinitas 5 dS/m dengan perlakuan isolat SN13
S1B2	Kadar salinitas 5 dS/m dengan perlakuan isolat SN1
S1B3	Kadar salinitas 5 dS/m dengan perlakuan isolat SN15
S1B4	Kadar salinitas 5 dS/m dengan perlakuan isolat SN7
S1B5	Kadar salinitas 5 dS/m dengan perlakuan isolat SN26
S1B6	Kadar salinitas 5 dS/m dengan perlakuan isolat SN2
S1B7	Kadar salinitas 5 dS/m dengan perlakuan isolat SN23
S1B8	Kadar salinitas 5 dS/m dengan perlakuan isolat SN6
S1B9	Kadar salinitas 5 dS/m dengan perlakuan isolat SN22
S2B0	Kadar salinitas 7,5 dS/m tanpa bakteri (kontrol)
S2B1	Kadar salinitas 7,5 dS/m dengan perlakuan isolat SN13
S2B2	Kadar salinitas 7,5 dS/m dengan perlakuan isolat SN1
S2B3	Kadar salinitas 7,5 dS/m dengan perlakuan isolat SN15
S2B4	Kadar salinitas 7,5 dS/m dengan perlakuan isolat SN7
S2B5	Kadar salinitas 7,5 dS/m dengan perlakuan isolat SN26
S2B6	Kadar salinitas 7,5 dS/m dengan perlakuan isolat SN2
S2B7	Kadar salinitas 7,5 dS/m dengan perlakuan isolat SN23
S2B8	Kadar salinitas 7,5 dS/m dengan perlakuan isolat SN6
S2B9	Kadar salinitas 7,5 dS/m dengan perlakuan isolat SN22

Langkah awal yang dilakukan adalah dengan merendam benih tomat varietas Tymoti dengan etanol 70% selama 1 menit, kemudian direndam dengan NaOCl 0,9% selama 15 menit. Hal ini dilakukan untuk menghilangkan sisa pestisida yang menempel. Benih dibilas tiga kali dengan akuades setelah itu direndam air hangat (35°C) selama 30 menit. Setelah itu disiapkan larutan NaCl 5 dan 7,5 dS/m. Untuk membuat larutan NaCl 5 dS/m dilakukan dengan cara melarutkan NaCl sebanyak 4 gram ke dalam 1 liter akuades, sedangkan larutan NaCl 7,5 dS/m dilakukan dengan cara melarutkan 6 gram NaCl ke dalam 1 liter akuades. Setelah itu kedua larutan diukur kadar salinitasnya dengan *Electrical Conductivity* (EC) meter.

Benih yang sudah dicuci direndam kedalam suspensi bakteri toleran salin ( $10^8$  cfu/ml) selama satu jam. Benih yang sudah direndam bakteri disemai kedalam cawan petri yang sebelumnya sudah dilapisi 3 lembar kertas merang. Masing- masing cawan petri kemudian disiram dengan larutan NaCl 5 dan 7,5 dS/m sebanyak 1,5 ml hingga kondisi lembab. Tiap perlakuan diulang 3 kali dan masing-masing cawan diisi dengan 25 benih tomat. Perlakuan kontrol yaitu benih disemai di media salin tanpa perlakuan bakteri. Setelah benih tomat disemai, selanjutnya cawan petri ditutup untuk mempertahankan kelembaban dan memacu perkecambahan, lalu disimpan di tempat gelap. Setelah empat hari, tutup cawan dibuka untuk memacu pertumbuhan, kemudian disimpan kembali di tempat gelap. Penyiraman dilakukan setiap hari. Pada saat 14 hari setelah semai dilakukan pengukuran untuk parameter presentase perkecambahan, panjang akar, dan panjang hipokotil.

#### **3.4.5 Seleksi kemampuan antagonis isolat bakteri toleran salin terhadap *Ralstonia solanacearum* secara *in vitro***

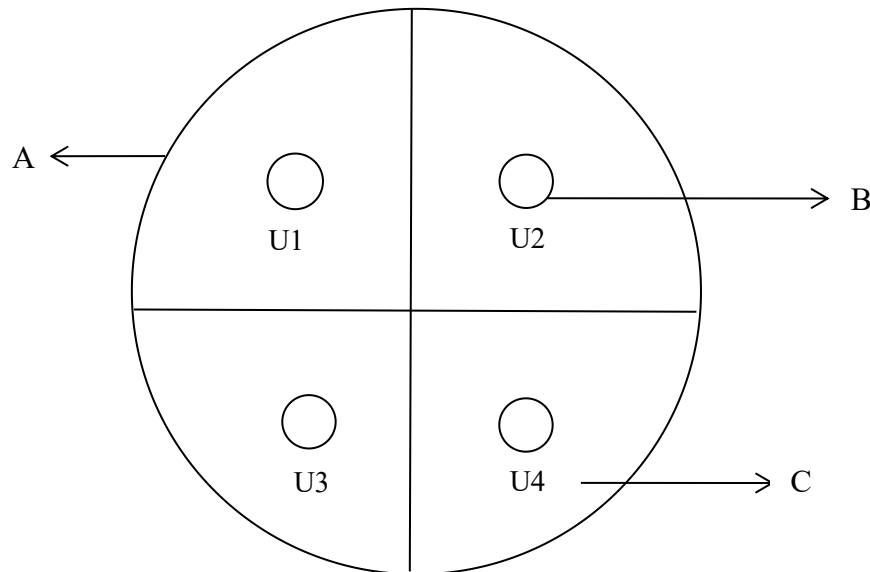
Uji antagonis dilakukan di laboratorium dengan menggunakan metode *spray* (pengkabutan) dari Kawaguchi *et al.* (2008). Seleksi antagonis dilakukan sebanyak 11 perlakuan termasuk kontrol, seperti pada Tabel 2.

Tabel 2. Uji antagonis bakteri toleran salin terhadap patogen *Ralstonia solanacearum* secara *in vitro*

Perlakuan	<i>Ralstonia solanacearum</i> (CFU/ml)	Bakteri toleran salin (CFU/ml)	Bakterisida (ml)
P0 <sup>+</sup> (kontrol positif)	10 <sup>9</sup>	0	0,5
P0 <sup>-</sup> (kontrol negatif)	10 <sup>9</sup>	0	0
P1 (SN 13)	10 <sup>9</sup>	10 <sup>9</sup>	0
P2 (SN 1)	10 <sup>9</sup>	10 <sup>9</sup>	0
P3 (SN 15)	10 <sup>9</sup>	10 <sup>9</sup>	0
P4 (SN 7)	10 <sup>9</sup>	10 <sup>9</sup>	0
P5 (SN 26)	10 <sup>9</sup>	10 <sup>9</sup>	0
P6 (SN 2)	10 <sup>9</sup>	10 <sup>9</sup>	0
P7 (SN 23)	10 <sup>9</sup>	10 <sup>9</sup>	0
P8 (SN 6)	10 <sup>9</sup>	10 <sup>9</sup>	0
P9 (SN 22)	10 <sup>9</sup>	10 <sup>9</sup>	0

Bakteri toleran salin yang telah diinkubasi selama 24 jam diambil masing-masing 1-2 goresan jarum ose, kemudian dimasukkan dalam tabung dan ditambah akuades steril sebanyak 1 ml. Kertas saring steril yang telah dipotong dengan diameter 5 mm dimasukkan pada tabung yang berisi bakteri toleran salin, dan direndam selama  $\pm 1$  menit kemudian ditiriskan selama  $\pm 6$  jam. Setelah ditiriskan, kertas saring diletakkan pada permukaan media NA padat pada cawan petri, kemudian diinkubasikan selama 24 jam. Setelah itu, dalam posisi terbalik, cawan petri yang berisi media NA dan kertas saring dibuka, lalu larutan khloroform diteteskan kemudian langsung ditutup. Media ditunggu sekitar 1 jam hingga larutan khloroform menguap sempurna. Bakteri *Ralstonia solanacearum* yang telah ditumbuhkan pada media NA diambil 1-2 goresan jarum ose dan dimasukkan pada *sprayer* yang telah diisi aquadest steril 10 ml. Suspensi bakteri *Ralstonia solanacearum* tersebut disemprotkan pada cawan petri yang sebelumnya telah diberi kertas saring yang mengandung bakteri toleran salin. Setelah itu diinkubasikan kembali selama 24-48 jam, kemudian diamati dan diukur zona bening atau zona hambat yang dihasilkan oleh bakteri antagonis terhadap bakteri patogen.





Gambar 4. Pola pengujian antagonis bakteri toleran salin dengan bakteri patogen secara *in vitro* untuk setiap perlakuan. A= Cawan petri, B= Kertas saring yang berisi bakteri toleran salin, C= Media NA yang dicampur dengan bakteri patogen *Ralstonia solanacearum*

### 3.5 Variabel Pengamatan

#### 3.5.1 Seleksi bakteri toleran salin terhadap peningkatan pertumbuhan benih tomat dibawah cekaman salin

Variabel pengamatan yang digunakan untuk uji kecambah benih tomat yaitu persentase perkecambahan, panjang hipokotil, panjang akar perkecambahan. Persentase perkecambahan diukur menggunakan rumus:

$$DK = (\Sigma \text{ benih berkecambah} / \Sigma \text{ benih keseluruhan}) \times 100\%$$

Keterangan:

DK : Persentase daya kecambah benih (%)

#### 3.5.2 Seleksi antagonis isolat bakteri toleran salin terhadap *Ralstonia solanacearum* secara *in vitro*

Variabel pengamatan yang digunakan saat pengujian *in vitro*, yaitu dengan mengukur indeks penghambatan. Indeks penghambatan dapat ditentukan dengan mengukur zona bening terlebih dahulu. Zona bening atau zona hambat yang terbentuk disekeliling kertas saring diukur dengan menggunakan jangka sorong secara vertikal dan horizontal. Zona bening atau zona hambat yang terbentuk dihitung menggunakan rumus:

$$DH = \frac{V + H}{2}$$

Keterangan:

DH : Diameter daya hambat (cm)

V : Diameter vertikal (cm)

H : Diameter horizontal (cm)

Kemudian dilanjutkan mengukur Indeks penghambatan dengan rumus:

$$IP = \frac{DH - 0,5}{DH}$$

Keterangan:

IP : Indeks penghambatan

DH : Diameter daya hambat (cm)

0,5 : diameter kertas saring yang berisi agens hayati (cm)

### 3.6 Analisis Data

Data pengamatan pada variabel uji kecambah dianalisis dengan menggunakan analisis ragam uji F ANOVA Rancangan Acak Lengkap Faktorial pada taraf 5%. Pada variabel uji antagonis menggunakan analisis ragam uji F ANOVA Rancangan Acak Lengkap ada taraf 5%. Bila hasil pengujian terdapat perbedaan nyata maka dilanjutkan dengan uji DMRT taraf 5%. Analisis ragam menggunakan *software* DSAASTAT Adins Excel 2010.