

**PENGENDALIAN PENYAKIT BUSUK LUNAK UMBI KENTANG  
(*Erwinia carotovora*) DENGAN MEMANFAATKAN AGENS HAYATI  
*Bacillus subtilis* DAN *Pseudomonas fluorescens***

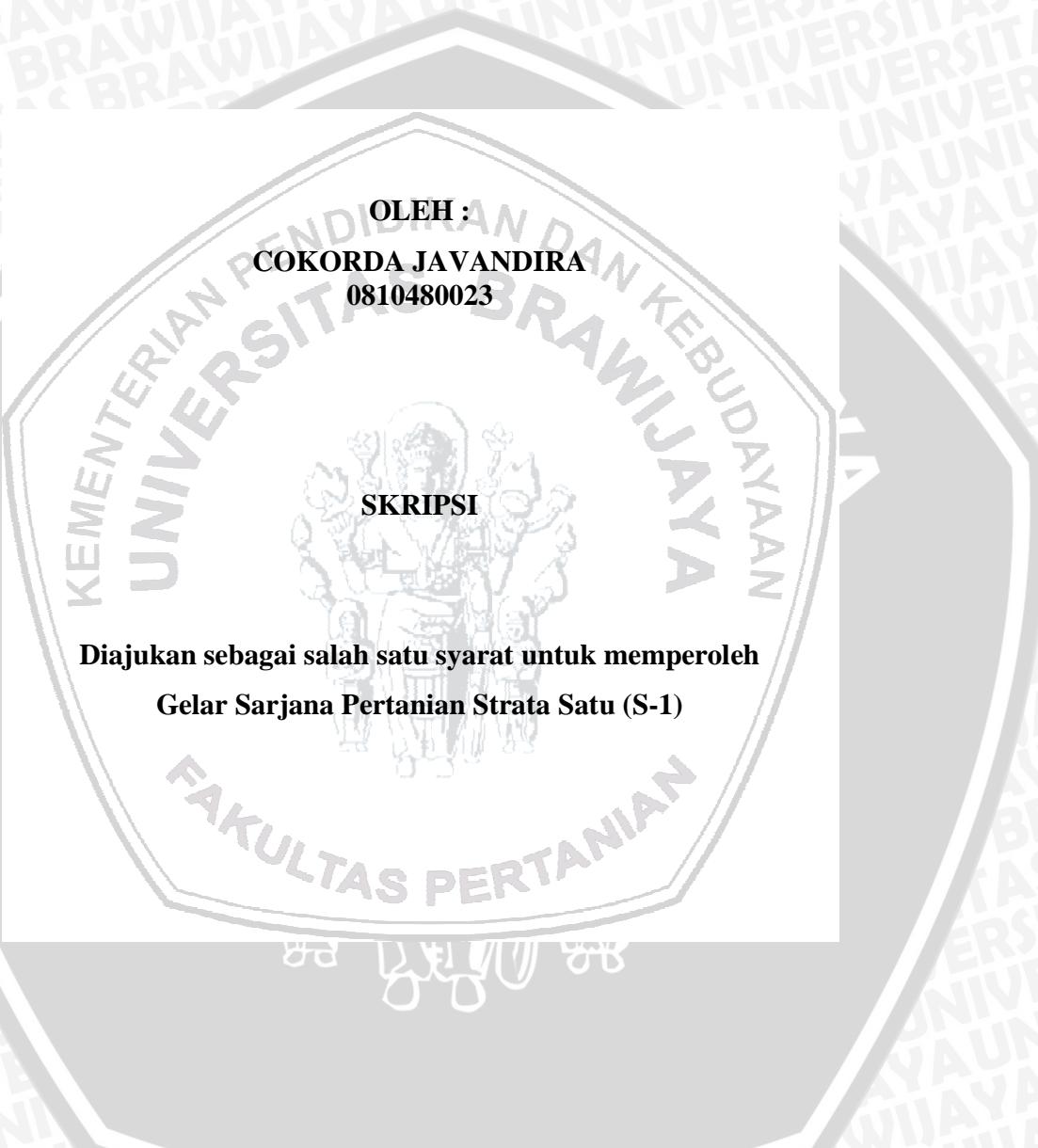
OLEH :

**COKORDA JAVANDIRA  
0810480023**



**UNIVERSITAS BRAWIJAYA  
FAKULTAS PERTANIAN  
JURUSAN HAMA DAN PENYAKIT TUMBUHAN  
PROGRAM STUDI AGROEKOTEKNOLOGI  
MALANG  
2012**

**PENGENDALIAN PENYAKIT BUSUK LUNAK UMBI KENTANG  
(*Erwinia carotovora*) DENGAN MEMANFAATKAN AGENS HAYATI  
*Bacillus subtilis* DAN *Pseudomonas fluorescens***



**UNIVERSITAS BRAWIJAYA  
FAKULTAS PERTANIAN  
JURUSAN HAMA DAN PENYAKIT TUMBUHAN  
PROGRAM STUDI AGROEKOTEKNOLOGI  
MALANG  
2012**



## LEMBAR PERSETUJUAN

Judul Skripsi : Pengendalian Penyakit Busuk Lunak Umbi Kentang (*Erwinia carotovora*) dengan Memanfaatkan Agens Hayati *Bacillus subtilis* dan *Pseudomonas fluorescens*

Nama : Cokorda Javandira

NIM : 0810480023

Program Studi : Agroekoteknologi

Jurusan : Hama dan Penyakit Tumbuhan

Disetujui Oleh :

Pembimbing Utama

Pembimbing Pendamping

Prof. Dr. Ir. Abdul Latief Abadi, MS.  
NIP. 19550821 198002 1 002

Luqman Qurata Aini, SP., M.Si., Ph.D  
NIP. 19720919 199802 1 001

Mengetahui,  
Ketua Jurusan Hama dan Penyakit Tumbuhan

Dr. Ir. Bambang Tri Rahardjo, SU.  
NIP. 19550403 198303 1 003

Tanggal lulus :



Mengesahkan,

**MAJELIS PENGUJI**

Penguji I

Penguji II

Prof. Dr. Ir. Abdul Latief Abadi, MS  
NIP. 19550821 198002 1 002

Luqman Qurata Aini, SP., M.Si., Ph.D.  
NIP. 19720919 199802 1 001

Penguji III

Penguji IV

Dr. Ir. Bambang Tri Rahardjo, SU.  
NIP. 19550403 198303 1 003

Dr. H. Anton Muhibuddin, SP., MP.  
NIP. 19771130 200501 1 002

Tanggal lulus :

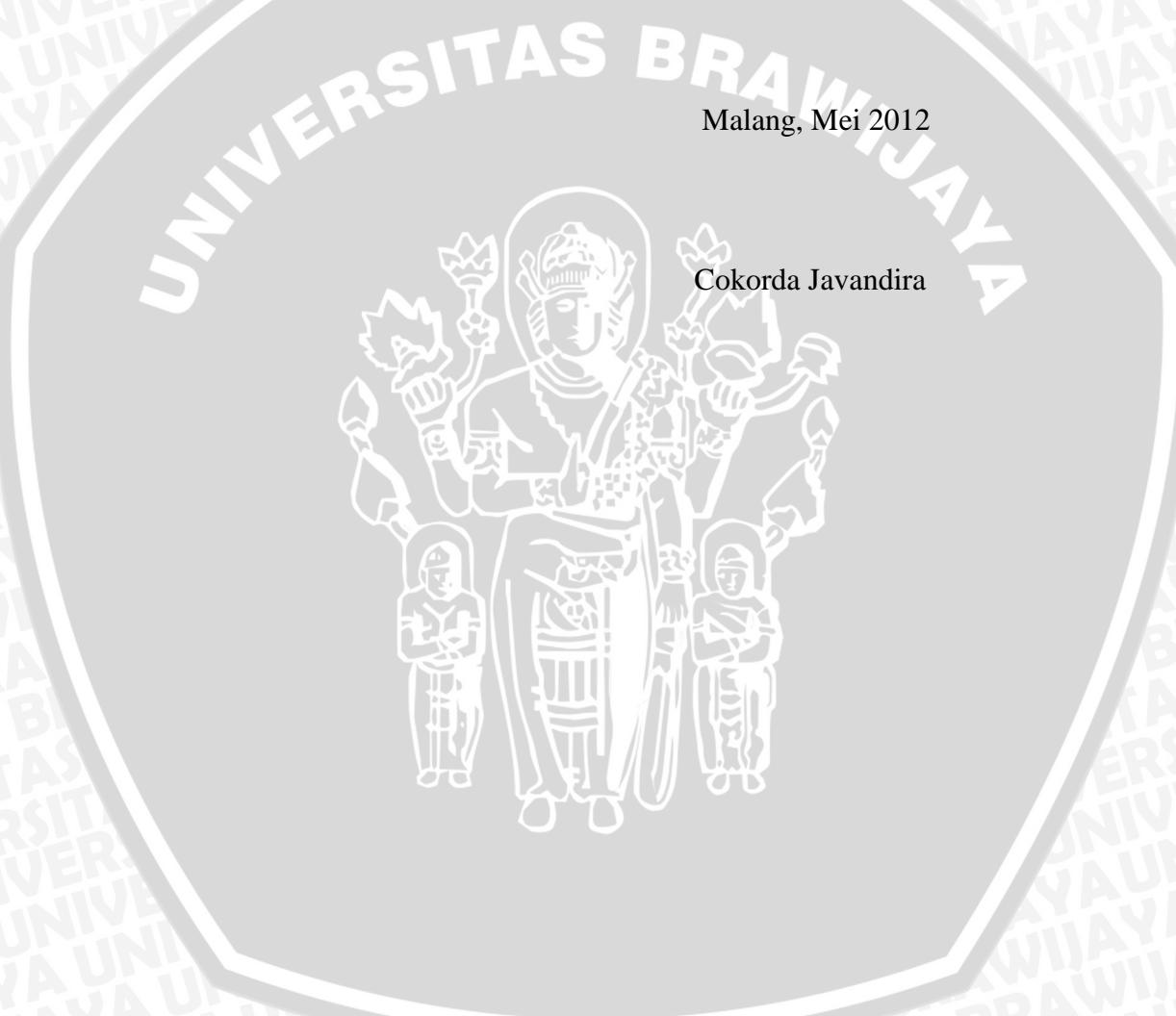


## PERNYATAAN

Saya menyatakan bahwa segala pernyataan dalam skripsi ini merupakan gagasan atau hasil penelitian saya sendiri, dengan bimbingan komisi pembimbing. Skripsi ini tidak pernah diajukan untuk memperoleh gelar kesarjanaan di perguruan tinggi manapun, dan sepanjang pengetahuan saya juga tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain, kecuali yang dengan jelas ditunjukkan rujukannya dalam daftar pustaka.

Malang, Mei 2012

Cokorda Javandira



## RINGKASAN

Cokorda Javandira. 0810480023. **Pengendalian Penyakit Busuk Lunak Umbi Kentang (*Erwinia carotovora*) dengan Memanfaatkan Agens Hayati *Bacillus subtilis* dan *Pseudomonas fluorescens*.** Dibawah bimbingan Prof. Dr. Ir. Abdul Latief Abadi, MS. sebagai pembimbing utama dan Luqman Qurata Aini, SP., M.Si., Ph.D. sebagai pembimbing pendamping.

Kentang (*Solanum tuberosum* L.) merupakan salah satu komoditas hortikultura potensial dan mempunyai arti penting dalam perekonomian Indonesia. Salah satu kendala produksi kentang adalah serangan penyakit busuk lunak yang disebabkan oleh bakteri *Erwinia carotovora* subs *carotovora* (*syn. Pectobacterium carotovorum*) sehingga perlu dikendalikan. Salah satu pengendalian alternatif yaitu menggunakan agens hayati bakteri *Bacillus subtilis* dan *Pseudomonas fluorescens*. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui potensi bakteri *B. subtilis* dan *P. fluorescens* dalam mengendalikan penyakit busuk lunak pada umbi kentang (*E. carotovora*).

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Bakteriologi Fakultas Pertanian Universitas Brawijaya mulai bulan Mei 2011 – Februari 2012. Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Kelompok, dengan 17 perlakuan. Terdapat 2 eksperimen yaitu uji antagonisme pada cawan petri menggunakan metode pengkabutan (spray) dengan pengamatan selama 2 hari kemudian variabel pengamatan yaitu diameter zona bening yang dihasilkan oleh agens hayati dan eksperimen kedua uji antogisme pada umbi kentang menggunakan metode inokulasi dengan pengamatan selama 7 hari kemudian variabel pengamatan yaitu massa busuk pada jaringan umbi kentang. Seluruh data dianalisa dengan analisis ragam dan uji jarak berganda Duncan pada taraf nyata 5%, kemudian penyajian data dilakukan secara statistik deskriptif.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa agens hayati *B. subtilis* dan *P. fluorescens* maupun gabungan dari keduanya (P3 sampai P17) menunjukkan potensi menghambat pertumbuhan patogen *E. carotovora* dengan menghasilkan zona bening. Agens hayati memberikan pengaruh yang hampir sama jika dibanding dengan bakterisida Agrept (P2). Berdasarkan hasil analisis statistik bahwa pada perlakuan ke-11 dan perlakuan ke-14 menunjukkan zona bening yang lebih luas dibanding dengan perlakuan bakterisida Agrept (P2). Perlakuan ke-11 merupakan bakteri agens hayati *B. subtilis* ( $10^9$  cfu/ml) dan bakteri agens hayati *P. fluorescens* ( $10^5$  cfu/ml), sedangkan perlakuan ke-14 merupakan bakteri agens hayati *B. subtilis* ( $10^7$  cfu/ml) dan bakteri agens hayati *P. fluorescens* ( $10^5$  cfu/ml). Demikian juga dengan hasil pengujian massa busuk pada jaringan umbi kentang, semua perlakuan tidak menunjukkan perbedaan yang nyata dalam menghambat massa busuk pada umbi kentang yang dihasilkan oleh patogen *E. carotovora*.



## SUMMARY

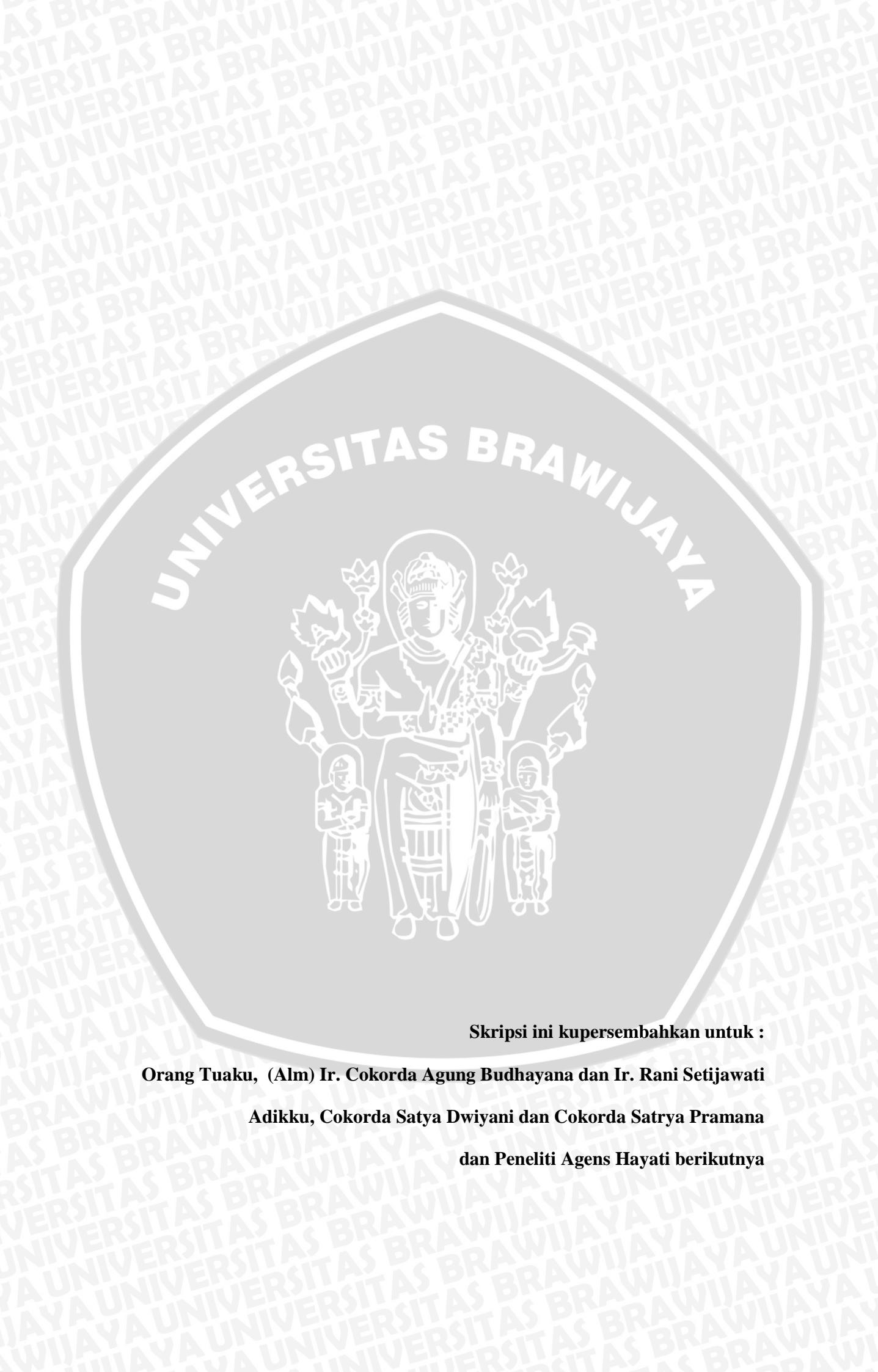
Cokorda Javandira. 0810480023. **Biological Control of Potato Soft Rot Diseases (*Erwinia carotovora*) using *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas fluorescens*.** Supervised by Prof. Dr. Ir. Abdul Latief Abadi, MS. and Luqman Qurata Aini, SP., M.Si., Ph.D.

Potato (*Solanum tuberosum* L.) is one of the potential horticultural commodities in Indonesia's. One of the constraints of potato production is soft rot disease caused by *Erwinia carotovora* subs *carotovora* (syn. *Pectobacterium carotovorum*) which is need to be controlled. One alternative control measures is the used of bacteria *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas fluorescens* for biological control. The purpose of this research is to know the potential of *B. subtilis* and *P. fluorescens* in single and in combination to inhibit potato soft rot diseases caused by *E. carotovora*.

The research was done in the Bacteriology Laboratory, Faculty of Agriculture, Brawijaya University, from May 2011 up to February 2012. Randomized Completely Block Design was used in this study, consists of 17 treatments. Two experiment were done in this study. First, antagonistic assays on petridish using spray inoculation methods. The experiment was done in 2 days, and the observation was done by measuring the clear zone diameter. Second experiment was done in potato tuber by inoculation methods. After the challenge in 7 days incubation, the observation was done by measuring mass of potato soft rot in potato tuber. All data were analyzed with ANOVA and by DMRT at 5% level. The presentation of the data was done in descriptive statistics.

The results showed that biological control agents *B. subtilis* and *P. fluorescens* in single or in combination both of them (T17 to T3) have potential in inhibiting the growth of pathogenic *E. carotovora* by showing the clear zone. Biological agents provides nearly the same effect if compared with the bactericide Agrept (T2). Based on the results of the statistical analysis, the treatment 11<sup>th</sup> and treatment 14<sup>th</sup> showed a clear zone wider than the Agrept treatment (T2). The treatment 11<sup>th</sup> contain combination of biological agents *B. subtilis* ( $10^9$  cfu/ml) and *P. fluorescens* ( $10^5$  cfu/ml), while the treatment 14<sup>th</sup> contain combination of biological agents *B. subtilis* ( $10^7$  cfu/ml) and *P. fluorescens* ( $10^5$  cfu/ml). Thus the result of soft rot mass on potato tuber, all the treatment did not significantly inhibit potato soft rot caused by *E. carotovora*.





UNIVERSITAS BRAWIJAYA



Skripsi ini kupersembahkan untuk :

**Orang Tuaku, (Alm) Ir. Cokorda Agung Budhayana dan Ir. Rani Setijawati**

**Adikku, Cokorda Satya Dwiyani dan Cokorda Satrya Pramana**

**dan Peneliti Agens Hayati berikutnya**



## KATA PENGANTAR

Puji syukur penulis panjatkan kehadirat Ida Sang Hyang Widhi Wasa, atas berkah dan karuniaNya penulis dapat menyelesaikan Skripsi yang berjudul “ Pengendalian Penyakit Busuk Lunak Umbi Kentang (*Erwinia carotovora*) dengan Memanfaatkan Agens Hayati *Bacillus subtilis* dan *Pseudomonas fluorescens* ”.

Pada kesempatan ini penulis menyampaikan ucapan terima kasih kepada Prof. Dr. Ir. Abdul Latief Abadi, MS dan Luqman Qurata Aini, SP., M.Si., Ph.D selaku dosen pembimbing atas segala kesabaran, nasihat, arahan dan bimbingannya kepada penulis. Ucapan terima kasih juga penulis sampaikan kepada Ketua Jurusan Dr. Ir. Bambang Tri Rahardjo SU. atas segala nasehat dan bimbingannya kepada penulis beserta seluruh dosen dan karyawan Jurusan Hama dan Penyakit Tumbuhan, Fakultas Pertanian, Universitas Brawijaya atas fasilitas dan bantuan yang diberikan. Penulis pula mengucapkan terima kasih kepada PT. Indofood Sukses Makmur, Tbk atas Program Indofood Riset Nugraha yang telah membantu penulis untuk melaksanakan penelitian ini.

Penghargaan yang tulus penulis berikan kepada orangtua, paman dan bude serta adik atas cinta, kasih sayang, dukungan, semangat, dan doanya yang diberikan kepada penulis. Juga kepada rekan-rekan Agroekoteknologi angkatan 2008 atas bantuan, dukungan dan kebersamaan serta Anak Agung Ketut Aryawan, SP. dan Imam Habibi, SP. yang membantu mengajari penulis tentang analisis data.

Penulis berharap semoga hasil dari penelitian ini dapat bermanfaat bagi banyak pihak, dan memberikan sumbangan pemikiran dalam kemajuan ilmu pengetahuan.

Malang, Mei 2012

Penulis

## RIWAYAT HIDUP

Penulis dilahirkan di Denpasar, pada tanggal 11 April 1990 sebagai anak pertama dari tiga bersaudara dari ayah (Alm) Ir. Cokorda Agung Budhayana dan Ir. Rani Setijawati.

Pendidikan sekolah dasar penulis tempuh di SD 2 Saraswati Denpasar pada tahun 1996 sampai tahun 2002. Penulis melanjutkan ke SMPN 8 Denpasar pada tahun 2002 sampai tahun 2005. Pada tahun 2005 sampai tahun 2008 penulis menyelesaikan studi di SMAN 1 Denpasar. Pada tahun 2008 penulis terdaftar sebagai mahasiswa Strata satu, Program Studi Agroekoteknologi Fakultas Pertanian Universitas Brawijaya Malang, Jawa Timur, melalui jalur Penerimaan Siswa Berprestasi (PSB).

Selama menjadi mahasiswa penulis pernah menjadi Asisten Praktikum dan Asisten Tutorial yaitu sebagai asisten praktikum dan tutorial mata kuliah Dasar Ilmu Tanah, Dasar Perlindungan Tanaman, Manajemen Agroekosistem, Teknologi Produksi Tanaman, Teknologi Pupuk dan Pemupukan, dan Bakteriologi Pertanian. Selain itu penulis juga aktif mengikuti perlombaan dan memperoleh beberapa prestasi seperti 1. Juara II PKM-GT Fakultas Pertanian UB (2009), 2. Finalis PKM-GT Universitas Brawijaya (2009), 3. Finalis Youth National Science & Technology Kemenegpora RI (2009), 4. Terbaik Juara III Young Entrepreneur Award Kategori Business Idea Commonwealth Bank dan Bisnis Indonesia (Ciputra Group) (2009), 5. Juara III LKTIM Pekan Ilmiah Mahasiswa Ilmu Tanah Nasional FOKUSHIMITI (2009), 6. Juara Harapan I Lomba Karya Inovatif Mahasiswa Dispendikbud Provinsi Jawa Timur (2009), 7. Finalis Program Kreativitas Mahasiswa Kewirausahaan (PKM-K) Pekan Ilmiah Mahasiswa Nasional (PIMNAS) XXIII Dirjen DIKTI (2010), 8. Penyaji Nasional pada Pekan Ilmiah Mahasiswa Tingkat Nasional (PIMNAS) XXIII Dirjen DIKTI (2010), 9. Juara I LKTIM Forum Komunikasi dan Studi Ilmiah Mahasiswa Perlindungan Tanaman Indonesia HMPTI (2010), 10. Finalis Kompetisi Inovasi Agroteknologi FORCES IPB (2010), 11. Juara Harapan I Lomba Karya Inovatif Mahasiswa Dispendikbud Provinsi Jawa Timur (2011), 12. Peraih Program Mahasiswa Wirausaha Dirjen DIKTI (2011) dan 13. Peraih Program Penelitian Indofood Riset Nugraha (2011).



**DAFTAR ISI**

Halaman

RINGKASAN .....	i
SUMMARY .....	ii
KATA PENGANTAR .....	iii
RIWAYAT HIDUP .....	iv
DAFTAR ISI.....	v
DAFTAR TABEL.....	vi
DAFTAR GAMBAR .....	vii
I. PENDAHULUAN .....	1
1.1 Latar Belakang .....	1
1.2 Perumusan Masalah .....	3
1.3 Tujuan Penelitian .....	3
1.4 Hipotesis Penelitian .....	3
1.5 Manfaat Penelitian .....	3
II. TINJAUAN PUSTAKA.....	4
2.1 Tanaman Kentang .....	4
2.2 Penyakit Busuk Lunak Kentang .....	4
2.3 Agens Hayati.....	7
2.4 Bakteri <i>Bacillus subtilis</i> .....	8
2.5 Bakteri <i>Pseudomonas fluorescens</i> .....	9
III. METODOLOGI .....	10
3.1 Tempat dan Waktu Penelitian .....	10
3.2 Alat dan Bahan Penelitian.....	10
3.3 Metode Penelitian .....	10
3.4 Pelaksanaan Penelitian.....	14
3.5 Variabel Pengamatan : .....	16
3.6 Analisis Statistik .....	18
IV. HASIL DAN PEMBAHASAN .....	19
4.1 Isolasi Bakteri Patogen .....	19
4.2 Identifikasi Bakteri .....	20
4.3 Uji Antagonis Agens Hayati <i>Bacillus subtilis</i> dan <i>Pseudomonas fluorescens</i> terhadap Bakteri Patogen <i>Erwinia carotovora</i> di Cawan Petri.....	22
4.4 Uji Antagonis Agens Hayati <i>Bacillus subtilis</i> dan <i>Pseudomonas fluorescens</i> terhadap Bakteri Patogen <i>Erwinia carotovora</i> di Umbi Kentang .....	25
V. PENUTUP.....	29
5.1 Kesimpulan .....	29
5.2 Saran .....	29
5.3 Ucapan Terima Kasih .....	29
DAFTAR PUSTAKA .....	30
LAMPIRAN.....	33

**DAFTAR TABEL**

Nomor	Teks	Halaman
1.	Karakteristik bakteri <i>B. subtilis</i> .....	8
2.	Rancangan perlakuan penelitian pada cawan petri.....	11
3.	Rancangan perlakuan penelitian pada umbi kentang .....	13
4.	Ciri-ciri morfologi isolat bakteri patogen penyebab penyakit busuk lunak yang diduga bakteri <i>Erwinia carotovora</i> .....	20
5.	Hasil uji fisiologi dan biokimia isolat bakteri yang diduga <i>E. carotovora</i> .....	22

**DAFTAR TABEL LAMPIRAN**

Nomor	Teks	Halaman
1.	Analisis Deskriptif Uji Antagonis Agens Hayati <i>Bacillus subtilis</i> dan <i>Pseudomonas fluorescens</i> terhadap Bakteri Patogen <i>Erwinia carotovora</i> di Cawan Petri .....	33
2.	Analisis Deskriptif Uji Antagonis Agens Hayati <i>Bacillus subtilis</i> dan <i>Pseudomonas fluorescens</i> terhadap Bakteri Patogen <i>Erwinia carotovora</i> di Umbi Kentang .....	36
3.	Analisis Ragam Uji Antagonis Agens Hayati <i>Bacillus subtilis</i> dan <i>Pseudomonas fluorescens</i> terhadap Bakteri Patogen <i>Erwinia carotovora</i> di Cawan Petri .....	39
4.	Analisis Ragam Uji Antagonis Agens Hayati <i>Bacillus subtilis</i> dan <i>Pseudomonas fluorescens</i> terhadap Bakteri Patogen <i>Erwinia carotovora</i> di Umbi Kentang .....	39



**DAFTAR GAMBAR**

Nomor	Teks	Halaman
1.	Gejala umbi kentang yang terserang <i>E. carotovora</i> .....	6
2.	Gejala tanaman kentang yang terserang <i>E. carotovora</i> di lapang .....	6
3.	Pengujian pada cawan petri dan pengukuran zona bening .....	17
4 a.	Biakan murni isolat Ec 1 .....	19
	b. Koloni tunggal isolat Ec 1.....	19
5 a.	Biakan murni isolat Ec 2 .....	20
	b. Koloni tunggal isolat Ec 2.....	20
6 a.	Biakan murni isolat Ec 3 .....	20
	b. Koloni tunggal isolat Ec 3.....	20
7.	Hasil Uji Patogenesitas pada Umbi Kentang .....	22
8.	Hasil Uji Hipersensitif pada Daun Tanaman Tembakau .....	22
9.	Hasil Uji Antagonis pada Cawan Petri .....	23
10.	Zona bening yang dihasilkan perlakuan ke-11 (bakteri agens hayati <i>B. subtilis</i> $10^9$ cfu/ml dan <i>P. fluorescens</i> $10^5$ cfu/ml)).....	24
11.	Zona bening yang dihasilkan perlakuan ke-14 (bakteri agens hayati <i>B. subtilis</i> $10^7$ cfu/ml dan <i>P. fluorescens</i> $10^5$ cfu/ml).....	25
12.	Hasil Uji Antagonis pada Umbi Kentang .....	26

## I. PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Kentang (*Solanum tuberosum* L.) merupakan salah satu komoditas hortikultura dari kelompok tanaman sayuran umbi yang sangat potensial sebagai sumber karbohidrat dan mempunyai arti penting dalam perekonomian di Indonesia. Salah satu kendala penting produksi kentang adalah serangan penyakit. Salah satu penyakit penting pada kentang adalah penyakit busuk lunak yang disebabkan oleh bakteri *Erwinia carotovora* subs *carotovora* (*syn. Pectobacterium carotovorum*) baik ketika masih di lapangan maupun di gudang penyimpanan (Addy, 2007). Serangan patogen tersebut dapat menyebabkan perubahan fisik, fisiologi dan kimia pada umbi kentang sehingga berpengaruh terhadap kuantitas dan kualitas produksi umbi kentang.

Pada kondisi lingkungan yang mendukung perkembangan patogen, kerusakan umbi kentang oleh *E. carotovora* dapat mencapai 15-100%. Hal ini pernah dialami oleh New Zealand (Vanneste, 1996) . Penyakit busuk lunak pada umbi tanaman kentang ini ditemukan hampir di setiap daerah budidaya kentang, dan cara pengendalian yang efektif belum diketahui secara pasti. Menurut Addy (2007) berbagai varietas kentang yang dibudidayakan seperti varietas Granola, Patrones, Alpha, Cosima, Eigenheimer, Timate, dan Diamant tidak tahan terhadap serangan penyakit busuk lunak kentang.

*E. carotovora* merupakan salah satu spesies bakteri yang umumnya menyebabkan gejala busuk lunak pada beberapa tanaman hortikultura (Schaad *et al.*, 2001). Bakteri ini memiliki kisaran inang yang sangat luas dan dapat menginfeksi tanaman dalam penyimpanan. Dampak yang disebabkan oleh bakteri patogen tersebut sangat serius (Semangun, 1994). Bakteri ini merupakan patogen terbawa tanah yang sulit dikendalikan secara kimiawi dan penyebarannya sangat cepat. Kondisi di atas memberikan gagasan untuk melakukan pengendalian secara biologi dengan memanfaatkan agensi pengendali hayati karena dapat lebih efektif dan ramah lingkungan.

Bakteri rizosfer seperti *Bacillus subtilis* dan *Pseudomonas fluorescens* telah banyak digunakan sebagai agensi pengendali hayati patogen tumbuhan (Habazar dan Yaherwandi, 2006). Pemanfaatan bakteri *B. subtilis* sebagai agensi pengendali hayati dilakukan karena kemampuan bakteri ini dalam menghasilkan senyawa antimikroba terhadap patogen tumbuhan.

*B. subtilis* adalah bakteri antagonis yang ditemukan di air, tanah, udara, dan residu tanaman yang telah membusuk. Jika *B. subtilis* dibalutkan pada biji atau benih tanaman maka bakteri tersebut akan berkembang pada sistem perakaran tanaman. Selanjutnya bakteri akan berkompetisi dan menekan cendawan tular tanah seperti *Erwinia sp.*, *Rhizoctonia sp.*, *Fusarium sp.*, dan *Aspergillus sp.*. Bakteri tersebut terus hidup pada sistem perakaran dan melindungi tanaman sepanjang musim tanam (Muis, 2007). Kemampuan *B. subtilis* berkembang pada perakaran tanaman telah diteliti oleh Kilian *et al.* (2000) dengan menanam biji tomat yang telah diperlakukan dengan suspensi *B. subtilis* pada media *Gelrite-Murashige* dan *Skoog*. Hasil penelitian menunjukkan bahwa *B. subtilis* mampu tumbuh dan berkembang pada perakaran tomat dengan ketebalan berkisar antara 0,40–0,80 mm. Selain itu, sistem perakaran menjadi lebih besar dan sehat dari serangan patogen penyakit sehingga meningkatkan pengambilan air dan unsur hara dari dalam tanah dan produktivitasnya pun meningkat.

Kemampuan *P. fluorescens* sebagai agensi pengendalian hayati berkaitan dengan kemampuannya bersaing untuk mendapatkan zat makanan atau karena menghasilkan senyawa-senyawa metabolit seperti siderofor, antibiotik atau enzim ekstraseluler. Senyawa tersebut bersifat antagonis yaitu menghambat atau berkompetisi dengan patogen tular tanah di sekitarnya (Habazar dan Yaherwandi, 2006).

Berdasarkan latar belakang di atas, penelitian ini dilakukan untuk mengetahui potensi *B. subtilis* dan *P. fluorescens* sebagai agensi hayati untuk mengendalikan penyakit busuk lunak pada umbi kentang (*E. carotovora*).

## 1.2 Perumusan Masalah

Apakah bakteri *B. subtilis* dan *P. fluorescens* secara tunggal dan kombinasi keduanya berpotensi mengendalikan penyakit busuk lunak pada umbi kentang (*E. carotovora*).

## 1.3 Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui potensi bakteri *B. subtilis* dan *P. fluorescens* secara tunggal dan kombinasi keduanya dalam mengendalikan penyakit busuk lunak pada umbi kentang (*E. carotovora*).

## 1.4 Hipotesis Penelitian

Bakteri *B. subtilis* dan *P. fluorescens* secara tunggal dan kombinasi keduanya berpotensi dalam mengendalikan penyakit busuk lunak pada umbi kentang (*E. carotovora*).

## 1.5 Manfaat Penelitian

Hasil penelitian ini dapat memberikan informasi mengenai potensi dari agens hidup *B. subtilis* dan *P. fluorescens* secara tunggal dan kombinasi keduanya dalam mengendalikan penyakit busuk lunak pada umbi kentang (*E. carotovora*).



## II. TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Tanaman Kentang

Tanaman kentang dapat tumbuh baik di dataran tinggi antara 500-3000 meter di atas permukaan laut, dengan curah hujan antara 200-300 m tiap bulan atau rata-rata 1000 mm selama masa pertumbuhan dengan kelembaban udara sekitar 80-90%, membutuhkan suhu ideal berkisar antara 15-18°C pada malam hari dan 24-30°C pada siang hari serta intensitas sinar matahari yang cukup (Asandhi dan Gunandi, 1989). Naungan pada tanaman kentang dapat mendorong pertumbuhan awal (munculnya tunas di permukaan tanah) pada musim kemarau.

Tanaman kentang dapat tumbuh dengan baik pada tanah-tanah subur, mempunyai drainase yang baik, tanah liat yang gembur, debu atau debu berpasir dengan kadar air tanah pada kedalaman 15 cm tidak boleh kurang dari 50 % kapasitas lapang dan pH berkisar 5-6,5 (Asandhi dan Gunandi, 1989). Namun derajat keasaman tanah (pH tanah) yang sesuai untuk kentang bervariasi, tergantung dari varietasnya.

### 2.2 Penyakit Busuk Lunak Kentang

#### 2.2.1 Klasifikasi bakteri *Erwinia carotovora*

Goto (1990), mengklasifikasikan bakteri penyebab busuk lunak pada tanaman kentang *E. carotovora*, sebagai berikut:

Kingdom	:	Procyotae
Divisio	:	Gracilicutes
Kelas	:	Proteobacteria
Famili	:	Enterobacteriaceae
Genus	:	Erwinia
Spesies	:	<i>Erwinia carotovora</i>

#### 2.2.2 Fisiologi dan Morfologi Bakteri *Erwinia carotovora*

*Erwinia carotovora*, seperti anggota Enterobacteriaceae lainnya bersifat anaerobik fakultatif, berbentuk batang dengan ukuran 0,5 x 1,0-3 µm, bersifat gram negatif dan bergerak dengan flagela peritrik. Bakteri tersebut bersifat

katalase positif, fermentatif, menghasilkan asam dari glukosa, mereduksi nitrat, menghasilkan  $\beta$ -galaktosidase dan  $H_2S$ , L-arabinose, D-galaktose, D-glukose, glyserol, D-mannose, D-ribose dan sucrose tapi tidak menghasilkan urease dan tidak menghasilkan asam dari adonitol. Beberapa strain menghidrolisa L-rhamnose dan D-mannitol tapi tidak dekstrin. Suhu optimum bagi pertumbuhan bakteri *E. carotovora* antara 27-30°C, suhu maksimum bervariasi dari 32°C sampai 40°C. *E. carotovora* bersifat patogenik pada beberapa tanaman (Schaad *et al.*, 2001).

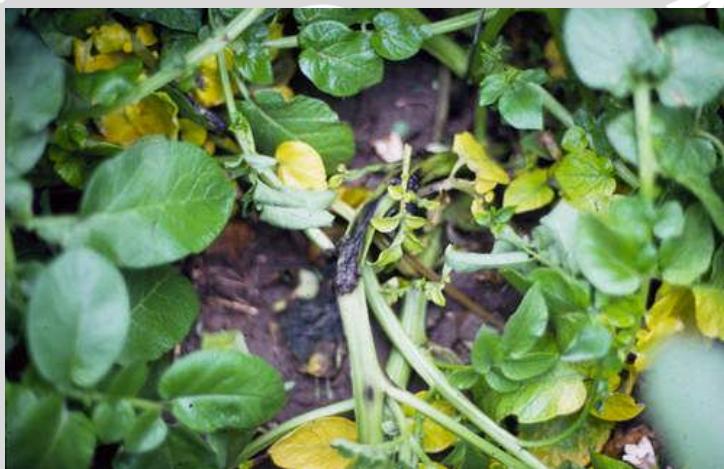
### 2.2.3 Gejala Penyakit Busuk Lunak *Erwinia carotovora*

Pada awal infeksi umbi terlihat seperti bintik yang berwarna krem sampai coklat kemerahan, busuk dan lunak, kemudian jika kondisi lingkungan lembab, bintik tersebut akan meluas dengan cepat dan bagian jaringan umbi hingga umbi bagian dalam. Jika umbi dipotong, bagian umbi dalam akan terlihat basah, seperti bubur, berwarna krem sampai coklat kemerahan dengan dibatasi oleh warna hitam antara bagian umbi yang terserang dengan umbi yang masih sehat. Jaringan yang membusuk sangat lunak dan kental, pembusukan tersebut akan meluas hingga hampir ke sebagian besar umbi kentang (Chailani, 2010). Pada awalnya umbi yang membusuk tidak mengeluarkan bau, kemudian mengeluarkan bau busuk ketika pembusukan berkembang merata ke seluruh bagian umbi. Jika kondisi lingkungan kering maka bagian umbi tersebut akan menjadi seperti berkapur berwarna pucat sampai putih. Sedangkan infeksi pada tanaman menyebabkan daun menjadi layu, menguning, kadang daun terlihat menggulung keatas. Batang yang terinfeksi berwarna coklat muda, kadang tidak berwarna namun juga tidak berwarna hitam, dan batang yang terinfeksi akan busuk dan menjadi lunak.





Gambar 1. Gejala umbi kentang yang terserang *E. carotovora* (Kleinschmidt, 2002).



Gambar 2. Gejala tanaman kentang yang terserang *E. carotovora* di lapang (Hamm dan Ocamb, 2002).

#### **2.2.4 Penyebaran Penyakit**

Bakteri *E. carotovora* hidup dalam tanah, air tanah dan sisa-sisa tanaman, terutama pada kelembaban dan suhu yang tinggi. Bakteri ini tersebar luas di Indonesia, seperti terdapat di Sumatera Utara, Sumatera Selatan, Lampung, Jawa Timur, Jawa Tengah, Bali, Sulawesi Selatan dan Nusa Tenggara Timur. Bakteri *E. carotovora* menginfeksi umbi kentang melalui lentisel, luka pada umbi kentang maupun luka karena serangga, kemudian menyebar ke bagian umbi yang lain. Bakteri ini dapat menyerang bersama dengan patogen yang lain. Faktor yang mempengaruhi infeksi dan perkembangan patogen tersebut adalah umbi yang

masih muda, terdapat luka pada umbi, kekurangan cahaya atau sinar, kelembaban pada tanah yang tinggi dan kekurangan oksigen ketika umbi di penyimpanan (Chailani, 2010).

### 2.3 Agens Hayati

Pemanfaatan agens hayati untuk mengendalikan patogen masih populer dan memberikan harapan, baik di dalam negeri maupun manca negara. Pengertian agens hayati menurut Supriadi (2006) adalah setiap organisme yang meliputi spesies, subspecies, varietas, semua jenis serangga, nematoda, protozoa, cendawan (fungi), bakteri, virus, mikoplasma, serta organisme lainnya dalam semua tahap perkembangannya yang dapat dipergunakan untuk keperluan pengendalian hama dan penyakit atau organisme pengganggu, proses produksi, pengolahan hasil pertanian, dan berbagai keperluan lainnya.

Pada umumnya bakteri agens hayati mengendalikan patogen tumbuhan dengan cara ; pertama, melakukan kompetisi dalam mendapatkan zat makanan; kedua, melakukan parasitasi terhadap patogen tumbuhan; dan ketiga, menghasilkan senyawa-senyawa antimikroba dan metabolit seperti siderofor atau enzim ekstraseluler. Menurut Habazar dan Yaherwandi (2006) bakteri rhizosfer seperti *B. subtilis* dan *P. fluorescens* telah banyak digunakan sebagai agensi pengendali hayati patogen tumbuhan, karena kedua bakteri ini mampu menghasilkan senyawa antimikroba terhadap patogen tumbuhan. Menurut Muis (2007) jika *B. subtilis* dibalutkan pada biji atau benih tanaman maka bakteri tersebut akan berkembang pada sistem perakaran tanaman. Selanjutnya bakteri akan berkompetisi dan menekan cendawan tular tanah seperti *Erwinia sp.*, *Rhizoctonia sp.*, *Fusarium sp.*, dan *Aspergillus sp.*. Bakteri tersebut terus hidup pada sistem perakaran dan melindungi tanaman sepanjang musim tanam.



## 2.4 Bakteri *Bacillus subtilis*

### 2.4.1 Klasifikasi bakteri *B. subtilis*

Agrios (2005), mengklasifikasikan bakteri agens hayati *B. subtilis*., sebagai berikut:

Kingdom	:	Procyotae
Divisio	:	Firmicutes
Kelas	:	Firmibacteria
Famili	:	Bacillaceae
Genus	:	Bacillus
Spesies	:	<i>Bacillus subtilis</i> .

### 2.4.2 Karakteristik bakteri *B. subtilis*

*B. subtilis* diketahui secara luas sebagai bakteri saprofit, tidak menyebabkan penyakit pada tanaman, dapat hidup dalam kondisi anaerob (tanpa oksigen), bersifat Gram positif, dan membentuk spora, serta menghasilkan beberapa jenis senyawa antimikroba seperti basitrasin, basilin, basilomisin B, difisidin, oksidifisidin, lesitinase, dan subtilisin (Supriadi, 2006).

Tabel 1. Karakteristik bakteri *B. subtilis* (Supriadi, 2006)

Pengujian	Reaksi
Sifat Gram	+
Flagela	+
Endospora (sentral)	+
Pembengkakan sel berspora	-
Tumbuh pada suhu 45°C	+
Tumbuh pada pH 5,70	+
Tumbuh pada kandungan NaCl 1%	+
Penggunaan sitrat	+
Hidup dalam medium glukosa pada kondisi tanpa oksigen	-
Produksi asam dari karbon: arabinosa, manitol dan xylosa	+
VP test	+
Hidrolisis pati	+

## 2.5 Bakteri *Pseudomonas fluorescens*

### 2.5.1 Klasifikasi bakteri *P. fluorescens*

Agrios (2005), mengklasifikasikan bakteri agens hayati *P. fluorescens*., sebagai berikut:

- Kingdom : Procyotae
- Divisio : Gracilicutes
- Kelas : Proteobacteria
- Famili : Pseudomonadaceae
- Genus : Pseudomonas
- Spesies : *Pseudomonas fluorescens*.

### 2.5.2 Karakteristik bakteri *P. fluorescens*

*P. fluorescens* termasuk ke dalam bakteri yang dapat ditemukan di mana saja (*ubiquitous*), sering kali ditemukan pada bagian tanaman (permukaan daun dan akar) dan sisa tanaman yang membusuk, tanah dan air, sisa-sisa makanan yang membusuk, serta kotoran hewan. Ciri yang mencolok dan mudah dilihat dari *P. fluorescens* adalah kemampuannya menghasilkan pigmen pyoverdin dan atau fenazin pada medium King' B sehingga terlihat berpijar bila terkena sinar UV. *P. fluorescens* telah dimanfaatkan sebagai agens hayati untuk beberapa jamur dan bakteri patogen tanaman. Kemampuan *P. fluorescens* menekan populasi patogen diasosiasikan dengan kemampuan untuk melindungi akar dari infeksi patogen tanah dengan cara mengkolonisasi permukaan akar, menghasilkan senyawa kimia seperti anti jamur dan antibiotik, serta kompetisi dalam penyerapan kation Fe (Supriadi, 2006).



### III. METODOLOGI

#### 3.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Bakteriologi Jurusan Hama dan Penyakit Tumbuhan Fakultas Pertanian Universitas Brawijaya mulai bulan Mei 2011 – Februari 2012.

#### 3.2 Alat dan Bahan Penelitian

Alat yang digunakan selama penelitian antara lain timbangan, panci, kompor listrik, autoklaf, oven, scalpel, cawan petri, jarum ose, mikroskop, bunsen, mikropipet, timbangan analitik, tabung reaksi, pinset, pisau, botol media, gelas ukur, jarum suntik, gunting, gelas obyek, jarum suntik, sprayer, cover glass, pipet, mikropipet, kotak plastik, spektrofotometer dan laminar flow.

Bahan yang digunakan adalah media NA, aquadest steril, biakan murni bakteri *E. carotovora*, *B. subtilis* dan *P. fluorescens*, kentang varietas Granola, bakterisida Agrept 20 WP, spritus, alkohol 70%, alkohol 90%, air aquades steril, sodium hipoklorit, khloroform, tanaman tembakau, gliserol, media oksidatif – fermentatif, media produksi asam dari beberapa sumber karbon, water agar, media hidrolisa gelatin, media Kings’B, media NA, media CPG, media NBNaCl 5%, streptomycin, mankozebmedia uji mortalitas, dan media produksi nitrat serta reagen untuk beberapa uji biokimia diantaranya kristal violet, iodine, safranin, KOH 3%,  $H_2O_2$ , reagen A dan B reduksi nitrat, glukosa 5%, gliserol 5%, galaktosa 5%, mannitol 5%, arabinosa 5%, maltosa 5%, sukrose 5%, laktosa 5%.

#### 3.3 Metode Penelitian

Metode penelitian yang digunakan adalah percobaan dengan Rancangan Acak Kelompok (RAK) yang dilakukan di cawan petri dan pada umbi kentang. Pada cawan petri uji antagonisme dengan metode pengkabutan (spray) sedangkan pada umbi kentang uji antagonisme dengan metode inokulasi. Untuk perlakuan pada cawan petri dilakukan pengamatan



selama 2 hari. Untuk perlakuan pada umbi kentang dilakukan pengamatan selama 7 hari.

Tabel 2. Rancangan perlakuan penelitian pada cawan petri

Perlakuan	Kontrol	Bakteri Agens Hayati <i>B. subtilis</i>	Bakteri Agens Hayati <i>P. fluorescens</i>	Bakteri Patogen <i>E. carotovora</i>
P1	Aquades Steril	0	0	$10^9$ cfu/ml
P2	Bakterisida Agrept 20WP	0	0	$10^9$ cfu/ml
P3	0	$10^9$ cfu/ml	0	$10^9$ cfu/ml
P4	0	$10^7$ cfu/ml	0	$10^9$ cfu/ml
P5	0	$10^5$ cfu/ml	0	$10^9$ cfu/ml
P6	0	0	$10^9$ cfu/ml	$10^9$ cfu/ml
P7	0	0	$10^7$ cfu/ml	$10^9$ cfu/ml
P8	0	0	$10^5$ cfu/ml	$10^9$ cfu/ml
P9	0	$10^9$ cfu/ml	$10^9$ cfu/ml	$10^9$ cfu/ml
P10	0	$10^9$ cfu/ml	$10^7$ cfu/ml	$10^9$ cfu/ml
P11	0	$10^9$ cfu/ml	$10^5$ cfu/ml	$10^9$ cfu/ml
P12	0	$10^7$ cfu/ml	$10^9$ cfu/ml	$10^9$ cfu/ml
P13	0	$10^7$ cfu/ml	$10^7$ cfu/ml	$10^9$ cfu/ml
P14	0	$10^7$ cfu/ml	$10^5$ cfu/ml	$10^9$ cfu/ml
P15	0	$10^5$ cfu/ml	$10^9$ cfu/ml	$10^9$ cfu/ml
P16	0	$10^5$ cfu/ml	$10^7$ cfu/ml	$10^9$ cfu/ml
P17	0	$10^5$ cfu/ml	$10^5$ cfu/ml	$10^9$ cfu/ml

Perlakuan selengkapnya adalah sebagai berikut :

P1 = Media dalam cawan petri diinokulasi aquades steril dan bakteri patogen *E. carotovora* ( $10^9$  cfu/ml).

P2 = Media dalam cawan petri diinokulasi bakterisida Agrept 20 WP dan bakteri patogen *E. carotovora* ( $10^9$  cfu/ml).

P3 = Media dalam cawan petri diinokulasi bakteri agens hayati *B. subtilis* ( $10^9$  cfu/ml) dan bakteri patogen *E. carotovora* ( $10^9$  cfu/ml).

P4 = Media dalam cawan petri diinokulasi bakteri agens hayati *B. subtilis* ( $10^7$  cfu/ml) dan bakteri patogen *E. carotovora* ( $10^9$  cfu/ml).



- P5 = Media dalam cawan petri diinokulasi bakteri agens hayati *B. subtilis* ( $10^5$  cfu/ml) dan bakteri patogen *E. carotovora* ( $10^9$  cfu/ml).
- P6 = Media dalam cawan petri diinokulasi bakteri agens hayati *P. fluorescens* ( $10^9$  cfu/ml) dan bakteri patogen *E. carotovora* ( $10^9$  cfu/ml).
- P7 = Media dalam cawan petri diinokulasi bakteri agens hayati *P. fluorescens* ( $10^7$  cfu/ml) dan bakteri patogen *E. carotovora* ( $10^9$  cfu/ml).
- P8 = Media dalam cawan petri diinokulasi bakteri agens hayati *P. fluorescens* ( $10^5$  cfu/ml) dan bakteri patogen *E. carotovora* ( $10^9$  cfu/ml).
- P9 = Media dalam cawan petri diinokulasi bakteri agens hayati *B. subtilis* ( $10^9$  cfu/ml), bakteri agens hayati *P. fluorescens* ( $10^9$  cfu/ml) dan bakteri patogen *E. carotovora* ( $10^9$  cfu/ml).
- P10 = Media dalam cawan petri diinokulasi bakteri agens hayati *B. subtilis* ( $10^9$  cfu/ml), bakteri agens hayati *P. fluorescens* ( $10^7$  cfu/ml) dan bakteri patogen *E. carotovora* ( $10^9$  cfu/ml).
- P11 = Media dalam cawan petri diinokulasi bakteri agens hayati *B. subtilis* ( $10^9$  cfu/ml), bakteri agens hayati *P. fluorescens* ( $10^5$  cfu/ml) dan bakteri patogen *E. carotovora* ( $10^9$  cfu/ml).
- P12 = Media dalam cawan petri diinokulasi bakteri agens hayati *B. subtilis* ( $10^7$  cfu/ml), bakteri agens hayati *P. fluorescens* ( $10^9$  cfu/ml) dan bakteri patogen *E. carotovora* ( $10^9$  cfu/ml).
- P13 = Media dalam cawan petri diinokulasi bakteri agens hayati *B. subtilis* ( $10^7$  cfu/ml), bakteri agens hayati *P. fluorescens* ( $10^7$  cfu/ml) dan bakteri patogen *E. carotovora* ( $10^9$  cfu/ml).
- P14 = Media dalam cawan petri diinokulasi bakteri agens hayati *B. subtilis* ( $10^7$  cfu/ml), bakteri agens hayati *P. fluorescens* ( $10^5$  cfu/ml) dan bakteri patogen *E. carotovora* ( $10^9$  cfu/ml).
- P15 = Media dalam cawan petri diinokulasi bakteri agens hayati *B. subtilis* ( $10^5$  cfu/ml), bakteri agens hayati *P. fluorescens* ( $10^9$  cfu/ml) dan bakteri patogen *E. carotovora* ( $10^9$  cfu/ml).
- P16 = Media dalam cawan petri diinokulasi bakteri agens hayati *B. subtilis* ( $10^5$  cfu/ml), bakteri agens hayati *P. fluorescens* ( $10^7$  cfu/ml) dan bakteri patogen *E. carotovora* ( $10^9$  cfu/ml).
- P17 = Media dalam cawan petri diinokulasi bakteri agens hayati *B. subtilis* ( $10^5$  cfu/ml), bakteri agens hayati *P. fluorescens* ( $10^5$  cfu/ml) dan bakteri patogen *E. carotovora* ( $10^9$  cfu/ml).



Tabel 3. Rancangan perlakuan penelitian pada umbi kentang

Perlakuan	Kontrol	Bakteri Agens Hayati <i>B. subtilis</i>	Bakteri Agens Hayati <i>P. fluorescens</i>	Bakteri Patogen <i>E. carotovora</i>
P1	Aquades Steril	0	0	$10^9$ cfu/ml
P2	Bakterisida Agrept 20WP	0	0	$10^9$ cfu/ml
P3	0	$10^9$ cfu/ml	0	$10^9$ cfu/ml
P4	0	$10^7$ cfu/ml	0	$10^9$ cfu/ml
P5	0	$10^5$ cfu/ml	0	$10^9$ cfu/ml
P6	0	0	$10^9$ cfu/ml	$10^9$ cfu/ml
P7	0	0	$10^7$ cfu/ml	$10^9$ cfu/ml
P8	0	0	$10^5$ cfu/ml	$10^9$ cfu/ml
P9	0	$10^9$ cfu/ml	$10^9$ cfu/ml	$10^9$ cfu/ml
P10	0	$10^9$ cfu/ml	$10^7$ cfu/ml	$10^9$ cfu/ml
P11	0	$10^9$ cfu/ml	$10^5$ cfu/ml	$10^9$ cfu/ml
P12	0	$10^7$ cfu/ml	$10^9$ cfu/ml	$10^9$ cfu/ml
P13	0	$10^7$ cfu/ml	$10^7$ cfu/ml	$10^9$ cfu/ml
P14	0	$10^7$ cfu/ml	$10^5$ cfu/ml	$10^9$ cfu/ml
P15	0	$10^5$ cfu/ml	$10^9$ cfu/ml	$10^9$ cfu/ml
P16	0	$10^5$ cfu/ml	$10^7$ cfu/ml	$10^9$ cfu/ml
P17	0	$10^5$ cfu/ml	$10^5$ cfu/ml	$10^9$ cfu/ml

Perlakuan selengkapnya adalah sebagai berikut :

P1 = Umbi kentang diinokulasi aquades steril dan bakteri patogen *E. carotovora* ( $10^9$  cfu/ml )

P2 = Umbi kentang diinokulasi bakterisida Agrept 20 WP dan bakteri patogen *E. carotovora* ( $10^9$  cfu/ml )

P3 = Umbi kentang diinokulasi bakteri agens hayati *B. subtilis* ( $10^9$  cfu/ml) dan bakteri patogen *E. carotovora* ( $10^9$  cfu/ml )

P4 = Umbi kentang diinokulasi bakteri agens hayati *B. subtilis* ( $10^7$  cfu/ml) dan bakteri patogen *E. carotovora* ( $10^9$  cfu/ml )

P5 = Umbi kentang diinokulasi bakteri agens hayati *B. subtilis* ( $10^5$  cfu/ml) dan bakteri patogen *E. carotovora* ( $10^9$  cfu/ml )

P6 = Umbi kentang diinokulasi bakteri agens hayati *P. fluorescens* ( $10^9$  cfu/ml) dan bakteri patogen *E. carotovora* ( $10^9$  cfu/ml )



- P7 = Umbi kentang diinokulasi bakteri agens hayati *P. fluorescens* ( $10^7$  cfu/ml) dan bakteri patogen *E. carotovora* ( $10^9$  cfu/ml)
- P8 = Umbi kentang diinokulasi bakteri agens hayati *P. fluorescens* ( $10^5$  cfu/ml) dan bakteri patogen *E. carotovora* ( $10^9$  cfu/ml)
- P9 = Umbi kentang diinokulasi bakteri agens hayati *B. subtilis* ( $10^9$  cfu/ml), bakteri agens hayati *P. fluorescens* ( $10^9$  cfu/ml) dan bakteri patogen *E. carotovora* ( $10^9$  cfu/ml)
- P10 = Umbi kentang diinokulasi bakteri agens hayati *B. subtilis* ( $10^9$  cfu/ml), bakteri agens hayati *P. fluorescens* ( $10^7$  cfu/ml) dan bakteri patogen *E. carotovora* ( $10^9$  cfu/ml)
- P11 = Umbi kentang diinokulasi bakteri agens hayati *B. subtilis* ( $10^9$  cfu/ml), bakteri agens hayati *P. fluorescens* ( $10^5$  cfu/ml) dan bakteri patogen *E. carotovora* ( $10^9$  cfu/ml)
- P12 = Umbi kentang diinokulasi bakteri agens hayati *B. subtilis* ( $10^7$  cfu/ml), bakteri agens hayati *P. fluorescens* ( $10^9$  cfu/ml) dan bakteri patogen *E. carotovora* ( $10^9$  cfu/ml)
- P13 = Umbi kentang diinokulasi bakteri agens hayati *B. subtilis* ( $10^7$  cfu/ml), bakteri agens hayati *P. fluorescens* ( $10^7$  cfu/ml) dan bakteri patogen *E. carotovora* ( $10^9$  cfu/ml)
- P14 = Umbi kentang diinokulasi bakteri agens hayati *B. subtilis* ( $10^7$  cfu/ml), bakteri agens hayati *P. fluorescens* ( $10^5$  cfu/ml) dan bakteri patogen *E. carotovora* ( $10^9$  cfu/ml)
- P15 = Umbi kentang diinokulasi bakteri agens hayati *B. subtilis* ( $10^5$  cfu/ml), bakteri agens hayati *P. fluorescens* ( $10^9$  cfu/ml) dan bakteri patogen *E. carotovora* ( $10^9$  cfu/ml)
- P16 = Umbi kentang diinokulasi bakteri agens hayati *B. subtilis* ( $10^5$  cfu/ml), bakteri agens hayati *P. fluorescens* ( $10^7$  cfu/ml) dan bakteri patogen *E. carotovora* ( $10^9$  cfu/ml)
- P17 = Umbi kentang diinokulasi bakteri agens hayati *B. subtilis* ( $10^5$  cfu/ml), bakteri agens hayati *P. fluorescens* ( $10^5$  cfu/ml) dan bakteri patogen *E. carotovora* ( $10^9$  cfu/ml)

### 3.4 Pelaksanaan Penelitian

#### 3.4.1 Isolasi dan identifikasi Bakteri Patogen *Erwinia carotovora*

Bakteri *E. carotovora* di isolasi dari umbi tanaman kentang yang terserang penyakit busuk lunak, dengan gejala adanya bagian jaringan umbi yang mengalami busuk, terlihat basah dan berwarna krem sampai coklat serta lunak. Jika umbi dipotong, tampak adanya jaringan busuk lunak berwarna krem sampai coklat, sedang pada lingkaran berkas pembuluh umbi terdapat lendir yang berwarna krem.

Selanjutnya umbi yang terserang patogen *E. carotovora* diisolasi dengan cara umbi tanaman kentang yang terserang dicuci dengan air bersih dipotong bagian yang akan diisolasi, potongan kentang kemudian dicuci dengan alkohol 70 % selama 2-3 menit, dibilas dengan aquadest steril sebanyak 3 kali dan dikeringkan dengan tisu steril kemudian dibuat suspensi dengan cara di cacah atau di potong kecil-kecil lalu diberi sedikit aquadest steril dan didiamkan selama ± 15 menit. Suspensi umbi kentang yang sakit tersebut diambil dengan jarum ose dan digoreskan pada media NA dan di inkubasikan selama 48-72 jam pada kondisi ruang.

Bakteri patogen yang telah diisolasi kemudian diidentifikasi sampai tingkat genus dan spesies menurut Schaad *et al.* (2001) meliputi, uji hipersensitif, uji reaksi gram dengan KOH 3%, uji reaksi gram dengan pengecatan gram, hidrolisa gelatin, uji oksidatif-fermentatif, dan uji katalase, uji busuk lunak, hidrolisa arginin, reduksi nitrat, uji produksi asam dari berbagai sumber karbon, uji sensitivitas terhadap Erythromycin, uji Egg Yolk atau Lecithinase, kemampuan pertumbuhan pada 5% NB NaCl dan pertumbuhan pada suhu 37°C.

#### **3.4.2 Uji Antagonisme Agens Hayati *B. subtilis* dan *P. fluorescens* terhadap Patogen *E. carotovora* pada Cawan Petri**

Pengujian sifat antagonis bakteri *B. subtilis* dan *P. fluorescens* terhadap bakteri patogen *E. carotovora* dilakukan secara metode spray (pengkabutan) (Kawaguchi *et al.*, 2008). Bakteri agens hayati *B. subtilis* dan *P. fluorescens* yang telah diinkubasikan selama 48 jam diambi dengan jarum ose dibuat suspensi dalam 12 ml aquades steril dan diukur OD 660 nm = 1 dengan spektrofotometer (Spectronic 21, Milton Roy Company) lalu sesuaikan sampai konsentrasi yang ditentukan.

Selanjutnya kertas saring steril dengan diameter 5 mm dimasukkan ke dalam suspensi selama ± 1 menit dan ditiriskan selama 2 jam. Kemudian kertas saring yang sudah kering di tanam ditengah-tengah media NA pada petridish yang berdiameter 9 cm dan diinkubasikan selama 2 hari. Setelah diinkubasi selama 2 hari, bakteri antagonis dimatikan dengan pemberian uap khloroform dengan menambahkan khloroform pada tutup biakan cawan petri dalam keadaan terbalik selama 1 jam. Setelah itu biakan dikabutkan (spray) dengan suspensi bakteri



patogen pada konsentrasi  $10^9$  cfu/ml. Perlakuan tersebut diinkubasi selama 2 hari dan daerah hambatan (zona bening) yang terbentuk diukur diameternya dengan penggaris.

### **3.4.3 Uji Antagonisme Agens Hayati *B. subtilis* dan *P. fluorescens* terhadap Patogen *E. carotovora* pada Umbi Kentang**

Umbi kentang varietas Granola disterilisasi permukaannya dengan perendaman dalam sodium hipoklorit 1% selama 10 menit, dicuci dengan aquades steril tiga kali dan dikering anginkan. Bakteri agens hayati *B. subtilis* dan *P. fluorescens* yang telah diinkubasikan selama 48 jam diambil dengan jarum ose dibuat suspensi dalam 12 ml aquades steril dan diukur OD 660 nm = 1 dengan spektrofotometer (Spectronic 21, Milton Roy Company) lalu sesuaikan sampai konsentrasi yang ditentukan. Kentang dilubangi dengan menggunakan ujung mikropipet tip, lalu diinokulasi dengan agens hayati masing-masing sebanyak 50  $\mu$ l kemudian dibiarkan selama 1-2 jam sampai kering. Setelah itu pada lubang yang sama diinokulasi suspensi bakteri patogen pada konsentrasi  $10^9$  cfu/ml sebanyak 50  $\mu$ l. Masing-masing perlakuan diulang tiga kali. Umbi kentang diinkubasi dalam wadah lembab pada suhu kamar selama 7 hari.

Lima puluh satu umbi kentang kemudian diiris dua bagian dan jaringan busuk yang dihasilkan oleh masing-masing agens hayati dan bakteri patogen dikorek keluar dan ditimbang dengan timbangan analitik (Haque *et.al*, 2009).

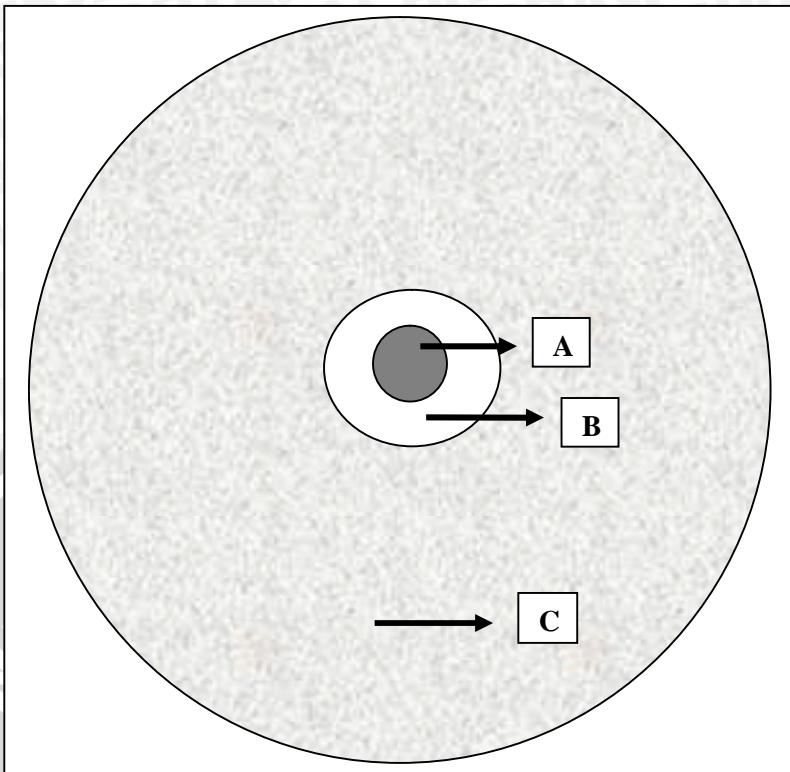
## **3.5 Variabel Pengamatan :**

### **3.5.1 Variabel pengamatan percobaan pada cawan petri**

1. Intensitas hambatan agens hayati terhadap patogen penyebab penyakit busuk lunak pada cawan petri.

Pengamatan dilakukan terhadap pembentukan daerah bening atau zona penghambatan yang dihasilkan oleh isolat bakteri agens hayati. Dihitung dengan rumus menurut Sugiyono, *et al* (2008).





Gambar 3. Pengujian pada cawan petri dan pengukuran zona bening  
(A. Agens Hayati, B. Zona Bening dan C. Patogen)

Indeks zona bening dihitung dengan rumus menurut Sugiyono *et al.* (2008) berikut :

$$I = \frac{\text{Diameter Zona Bening}}{\text{Diameter Koloni Agens Hayati}}$$

2. Foto zona bening hambatan agens hayati terhadap patogen penyebab penyakit busuk lunak pada cawan petri.

Merupakan variabel kualitatif dipergunakan sebagai bukti tingkat kemampuan hambatan bakteri agens hayati terhadap bakteri patogen. Dilakukan pengambilan gambar setelah inkubasi selama 2 hari.

### **3.5.2 Variabel pengamatan percobaan pada umbi kentang**

#### **1. Massa busuk lunak pada jaringan umbi kentang**

Pengamatan dilakukan terhadap jaringan yang busuk pada umbi kentang yang dihasilkan oleh isolat bakteri agens hayati dan bakteri patogen penyebab busuk lunak. Selanjutnya umbi kentang kemudian diiris dua, dan jaringan busuk yang dihasilkan oleh masing-masing isolat setiap perlakuan dikorek keluar dan ditimbang dengan timbangan analitik (Haque *et.al.*, 2009).

#### **2. Foto hambatan agens hayati terhadap patogen penyebab penyakit busuk lunak pada umbi kentang**

Merupakan variabel kualitatif dipergunakan sebagai bukti tingkat kemampuan hambatan bakteri agens hayati terhadap bakteri patogen. Dilakukan pengambilan gambar setelah inkubasi selama 7 hari.

### **3.6 Analisis Statistik :**

#### **3.6.1. Analisis statistik untuk pengukuran zona bening pada cawan petri**

Data yang diperoleh dari pengamatan zona bening pada cawan petri dianalisa lebih lanjut dengan analisis ragam dan uji jarak berganda Duncan pada taraf nyata 5%, kemudian penyajian data dilakukan secara analisis deskriptif (Microsoft Excel).

#### **3.6.2. Analisis statistik untuk massa busuk lunak pada jaringan umbi kentang**

Data yang diperoleh dari pengamatan zona bening pada cawan petri dianalisa lebih lanjut dengan analisis ragam dan uji jarak berganda Duncan pada taraf nyata 5%, kemudian penyajian data dilakukan secara analisis deskriptif (Microsoft Excel).

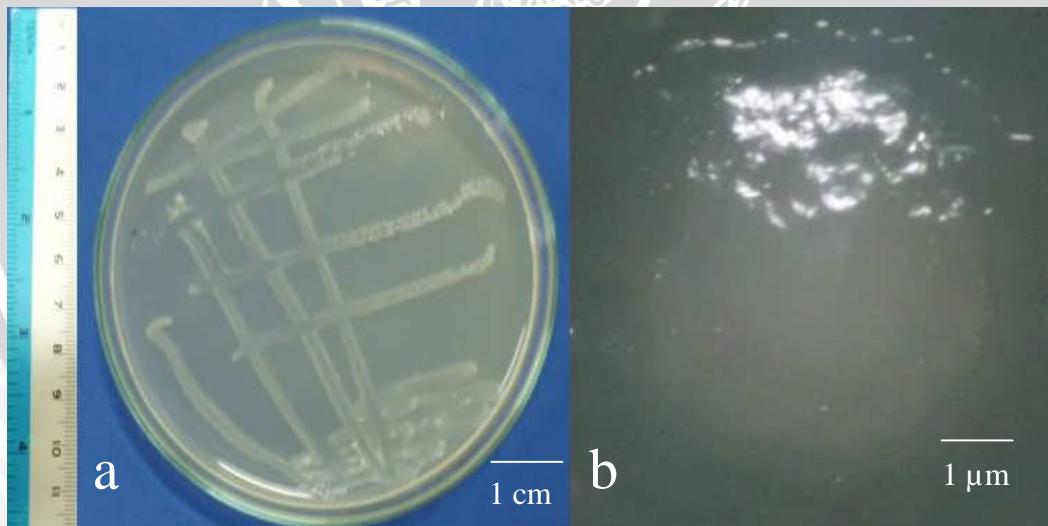
## IV. HASIL DAN PEMBAHASAN

### 4.1 Isolasi Bakteri Patogen

Hasil isolasi umbi tanaman kentang yang diduga terserang penyakit busuk lunak akibat patogen *Erwinia carotovora* yang diambil dari gudang kentang daerah sekitar Desa Sumberbrantas, Kota Batu diperoleh 3 isolat bakteri yaitu isolat Ec 1, Ec 2 dan Ec 3. Ciri-ciri morfologi dari ketiga isolat jika ditumbuhkan pada media NA dapat dilihat pada tabel 4. Untuk biakan murni isolat dan koloni tunggalnya dapat dilihat pada gambar 4 sampai 6.

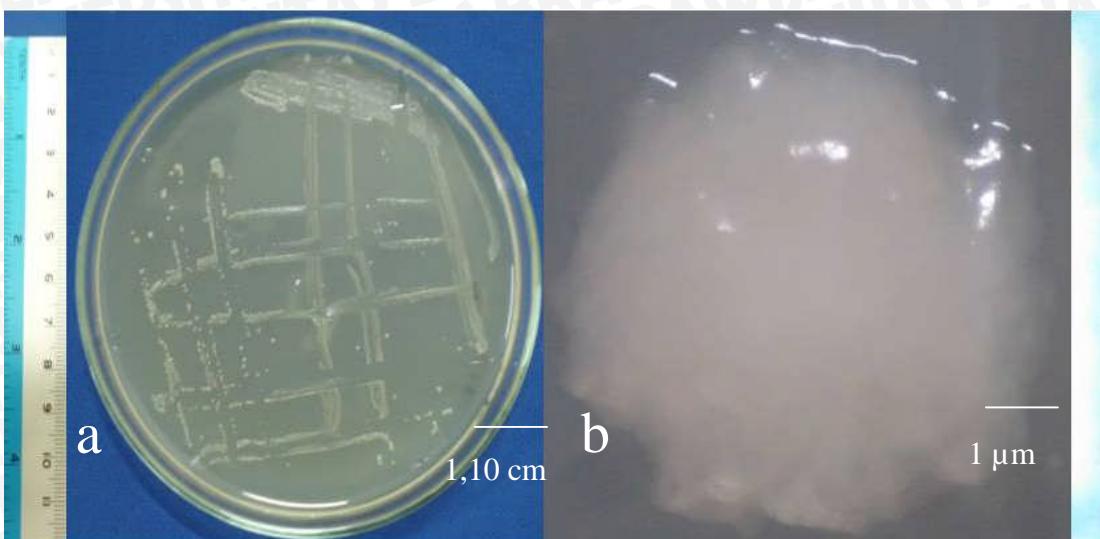
Tabel 4. Ciri-ciri morfologi isolat bakteri patogen penyebab penyakit busuk lunak yang diduga bakteri *Erwinia carotovora*

Isolat	Bentuk	Permukaan	Warna	Tepi
Ec 1	Bulat	Cembung	Putih keruh	Berombak
Ec 2	Bulat	Cembung	Putih keruh	Berombak
Ec 3	Bulat	Cembung	Putih keruh	Berombak



Gambar 4 a. Biakan murni isolat Ec 1

b. Koloni tunggal isolat Ec 1 (Perbesaran 240 X)



Gambar 5 a. Biakan murni isolat Ec 2  
b. Koloni tunggal isolat Ec 2 (Perbesaran 240 X)



Gambar 6 a. Biakan murni isolat Ec 3  
b. Koloni tunggal isolat Ec 3 (Perbesaran 240 X)

#### 4.2 Identifikasi Bakteri

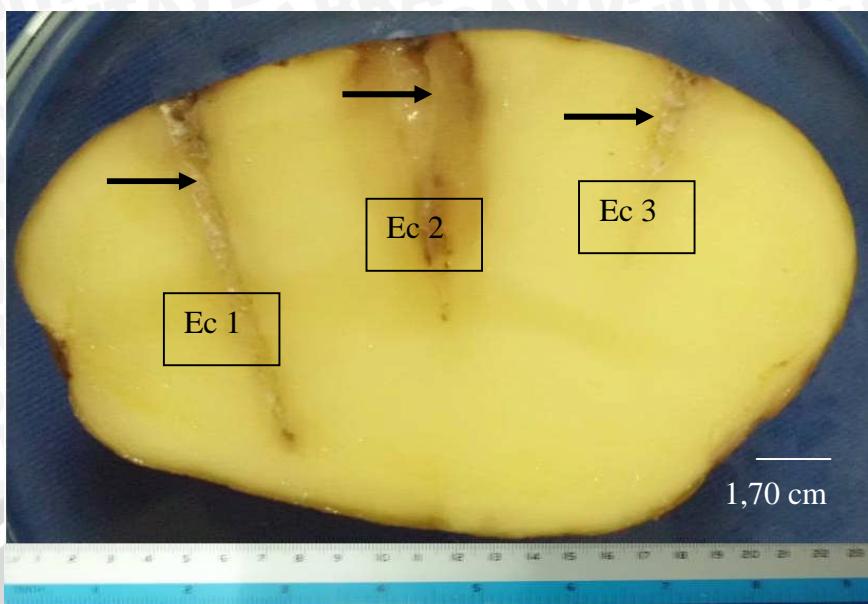
Bakteri yang diperoleh dari hasil isolasi diatas kemudian diidentifikasi sampai tingkat spesies yang meliputi : uji hipersensitif, uji patogenesitas, uji busuk lunak, pengamatan morfologi koloni, uji fisiologi dan uji biokomia mengikuti petunjuk identifikasi menurut Schaad *et al.* (2001). Hasil pengujian fisiologi dan biokimia dapat dilihat pada tabel 5. Kemudian hasil pengujian patogenesitas pada umbi kentang pada gambar 7 dan hasil pengujian hipersensitif dapat dilihat dapat dilihat pada gambar 8.

Tabel 5. Hasil uji fisiologi dan biokimia isolat bakteri *E. carotovora*

No	Uji Fisiologi dan Biokimia	Isolat Bakteri	Literatur
		Ec 2	Schaad <i>et al.</i> (2001)
1	Uji Busuk Lunak	+	+
2	Uji Patogenesitas	+	+
3	Uji Hipersensitif	+	+
4	Pertumbuhan Medium CPG	+	+
5	Uji Reaksi Gram		
	a. KOH 3%	-	-
	b. Pengecatan Gram	-	-
6	Uji Katalase	+	+
7	Pertumbuhan pada NB NaCl 5%	+	+
8	Uji Hidrolisa Gelatin	+	+
9	Uji Oksidatif-Fermentatif	Fermentatif	Fermentatif
10	Uji Mortalitas	+	+
11	Uji Pertumbuhan 37°C	+	+
12	Sensitivitas terhadap Mankozeb	-	-
13	Pertumbuhan di Medium Kings'B	+	+
14	Pigmen Fluorescens di Medium Kings'B	-	-
15	Sensitivitas terhadap Streptomycin	+	+
16	Produksi Asam dari berbagai sumber karbon :		
	a. Gliserol	+	+
	b. Maltosa	+	+
	c. Laktosa	-	+
	d. Arabinosa	+	+
	e. Sukrosa	+	+
	f. Galaktosa	-	-
	g. Sorbitol	+	-
	h. Manitol	+	+
17	Uji Reduksi Nitrat	+	+

Berdasarkan pengamatan morfologi koloni, hasil uji hipersensitif, uji patogenesitas dan uji fisiologi serta uji biokimia untuk mengetahui genus dan spesies, isolat bakteri tersebut termasuk dalam genus Erwinia, kemudian termasuk ke dalam spesies *Erwinia carotovora*.





Gambar 7. Hasil uji patogenesitas pada umbi kentang. Panah menunjukkan gejala busuk lunak pada umbi kentang

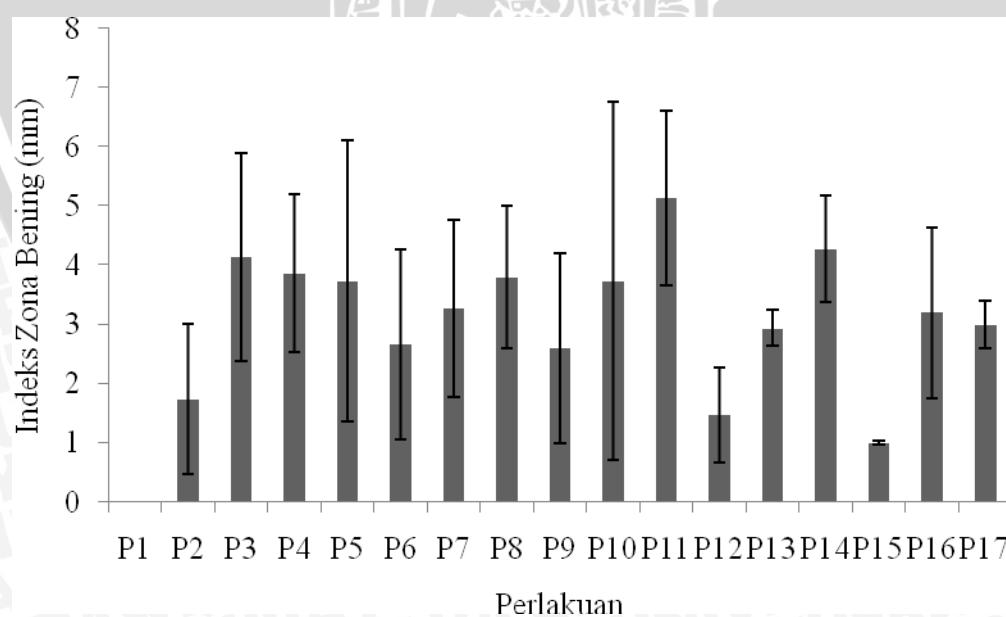


Gambar 8. Hasil uji hipersensitif pada daun tanaman tembakau. Panah menunjukkan gejala nekrotik pada daun tembakau

#### 4.3 Uji Antagonisme Agens Hayati *Bacillus subtilis* dan *Pseudomonas fluorescens* terhadap Bakteri Patogen *Erwinia carotovora* di Cawan Petri

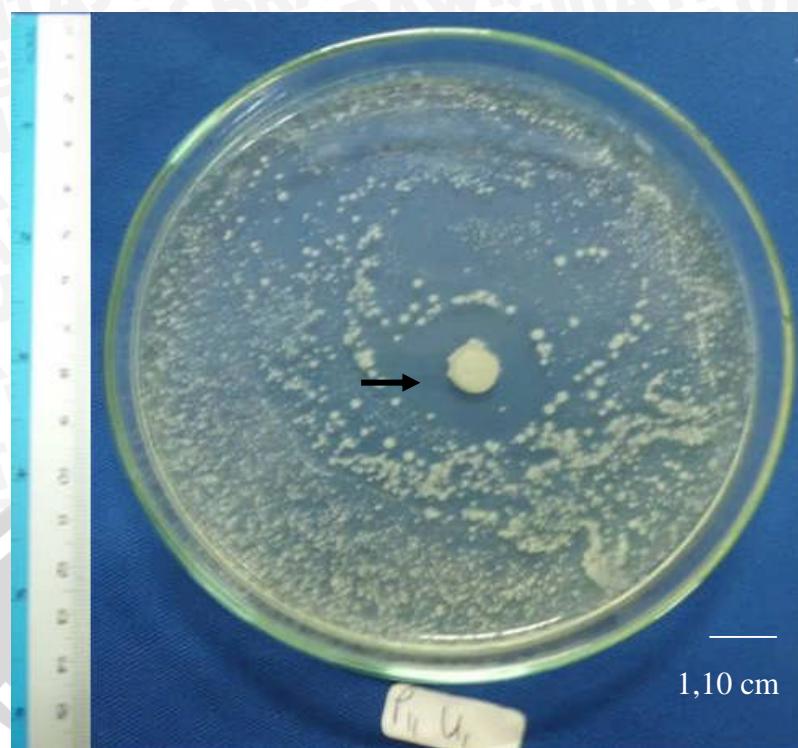
Setelah dilakukan identifikasi terhadap patogen penyebab penyakit busuk lunak maka selanjutnya dilakukan pengujian antagonis dengan agens hayati *Bacillus subtilis* dan *Pseudomonas fluorescens*. Pengujian antagonis ini dilakukan

pada media *Nutrient Agar* (NA) dalam cawan petri. Variabel yang digunakan sebagai indikator bakteri agens hayati mampu mengendalikan bakteri patogen adalah terbentuknya zona bening disekitar kertas saring. Berdasarkan hasil uji antagonisme pada cawan petri (Gambar 9) semua perlakuan memberikan pengaruh dalam menghambat perkembangan patogen *E. carotovora*. Pada perlakuan kontrol (P1) merupakan media NA yang ditambahkan patogen *E. carotovora*, terlihat tidak terdapat zona bening. Penggunaan bakterisida Agrept 20 WP yang berbahan aktif Streptomycin sulfat memberikan pengaruh menghambat pertumbuhan patogen *E. carotovora* (P2). Agens hayati *B. subtilis* dan *P. fluorescens* maupun gabungan dari kedua agens tersebut (P3 sampai P17) menunjukkan potensi menghambat pertumbuhan patogen *E. carotovora* dengan menghasilkan zona bening. Agens hayati memberikan pengaruh yang hampir sama jika dibanding dengan bakterisida Agrept. Berdasarkan hasil analisis statistik bahwa pada perlakuan ke-11 dan perlakuan ke-14 menunjukkan zona bening yang lebih luas dibanding dengan perlakuan bakterisida Agrept (P2). Perlakuan ke-11 (Gambar 10) merupakan bakteri agens hayati *B. subtilis* ( $10^9$  cfu/ml) dan bakteri agens hayati *P. fluorescens* ( $10^5$  cfu/ml), sedangkan perlakuan ke-14 (Gambar 11) merupakan bakteri agens hayati *B. subtilis* ( $10^7$  cfu/ml) dan bakteri agens hayati *P. fluorescens* ( $10^5$  cfu/ml).



Gambar 9. Hasil uji antagonisme pada cawan petri. *Error bars* menunjukkan indikator standar deviasi



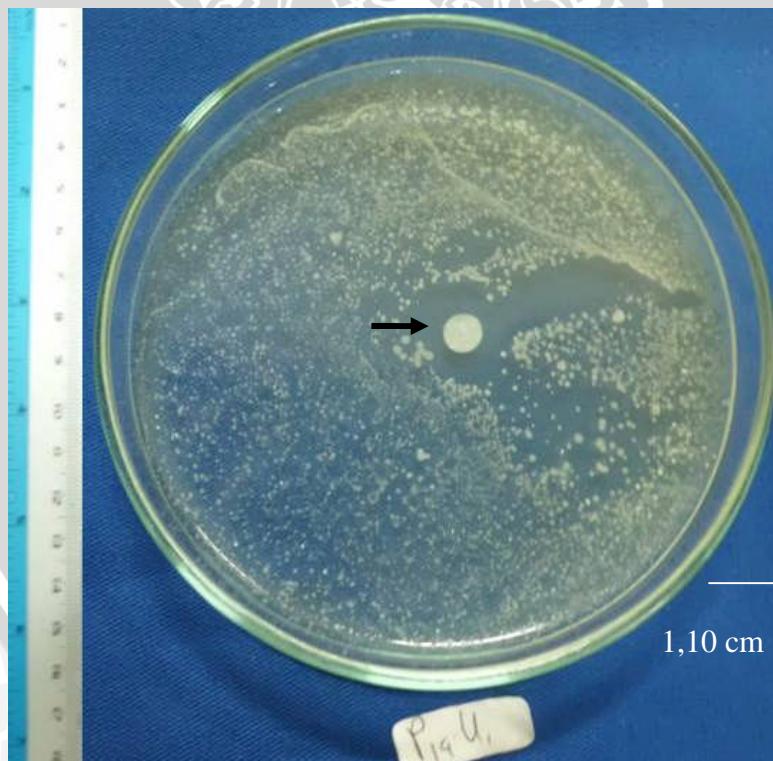


Gambar 10. Zona bening yang dihasilkan perlakuan ke-11 (bakteri agens hayati *B. subtilis*  $10^9$  cfu/ml dan *P. fluorescens*  $10^5$  cfu/ml). Panah menunjukkan diameter zona bening

Kemampuan bakterisida Agrept 20 WP mampu menghambat pertumbuhan patogen *E. carotovora*, karena bakterisida tersebut memiliki bahan aktif senyawa streptomycin sulfat. Senyawa streptomycin sulfat tersebut merupakan bahan aktif yang dapat mengendalikan patogen penyebab penyakit yang disebabkan oleh bakteri *Erwinia amylovora* (Tsiantos dan Psallidas, 2002). Agens hayati *B. subtilis* dan *P. fluorescens* pada aktivitasnya ditemukan berbagai macam mekanisme pengendalian seperti senyawa kimia antibiotik dan enzim bakteriolitik (Sood *et al.*, 2007). Berdasarkan hasil pengujian antagonisme tersebut diketahui bakteri agens hayati *B. subtilis* dan *P. fluorescens* yang diaplikasikan secara tunggal dan kombinasi keduanya memiliki potensi mengendalikan patogen *E. carotovora*. Bakteri agens hayati *B. subtilis* dan *P. fluorescens* mampu mengendalikan bakteri patogen *E. carotovora* dengan menghasilkan senyawa antibiotik. Senyawa antibiotik merupakan hasil dari metabolisme sekunder bakteri. Menurut Supriadi (2006) bakteri agens hayati *B. subtilis* ini menghasilkan beberapa senyawa antibiotik seperti basitrasin, basilin, basilomisin B, difisidin, oksidifisidin, lesitinase, dan subtilisin.

Menurut Addy (2007) bakteri agens hayati *P. fluorescens* menghasilkan senyawa pyoluteorin dan pyrrolnitrin yang bersifat antibiotik. Ditambah pula hasil

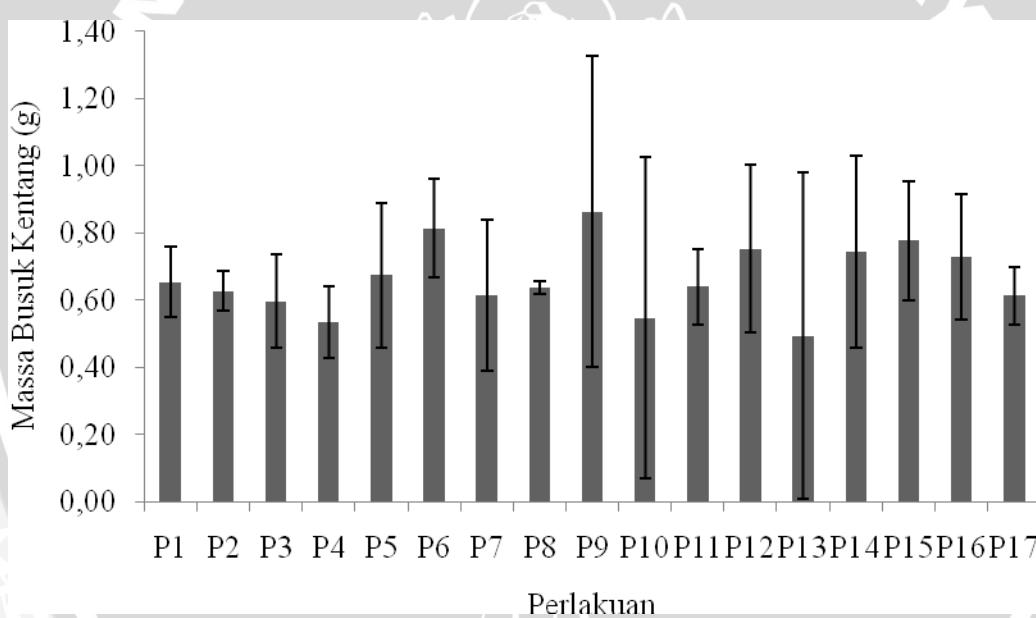
penelitian dari Sihombing (2009) bakteri agens hayati *P. fluorescens* memproduksi senyawa antibiotik pyoluteorin, oomycin, Penazine 1-carboxylic acid/ 2,4-diphloroglucinol. Berdasarkan hasil penelitian bakteri agens hayati mampu menghasilkan senyawa antimikroba yang dapat merusak fungsi perlindungan dari membran sel bakteri *E. carotovora*. Menurut Olivera *et al.* (2006) dengan kerusakan pada membran sel sehingga mengakibatkan penyusutan pada sel, sehingga sel bakteri *E. carotovora* akan kehilangan air dan mengalami plasmolisis. Hambatan tersebut dapat dilakukan dengan pengaruh senyawa antibiotik tersebut dalam untuk merusak dinding sel bakteri patogen. Sehingga aktifitas metabolisme bakteri patogen menjadi terganggu. Dengan demikian aktifitas metabolisme bakteri patogen terganggu dan menyebabkan sel bakteri patogen akan mati. Pengaruh senyawa antibiotik memiliki peran dalam proses sintesa protein sel. Sintesa protein sel dapat terhambat bila terkena senyawa antibiotik sehingga sel akan rusak dan tidak dapat melakukan sintesa protein.



Gambar 11. Zona bening yang dihasilkan perlakuan ke-14 (bakteri agens hayati *B. subtilis*  $10^7$  cfu/ml dan *P. fluorescens*  $10^5$  cfu/ml). Panah menunjukkan diameter zona bening

#### 4.4 Uji Antagonisme Agens Hayati *Bacillus subtilis* dan *Pseudomonas fluorescens* terhadap Bakteri Patogen *Erwinia carotovora* di Umbi Kentang

Hasil uji antagonisme agens hayati *Bacillus subtilis* dan *Pseudomonas fluorescens* secara tunggal dan kombinasi keduanya terhadap bakteri patogen *Erwinia carotovora* pada umbi kentang (Gambar 12) terlihat belum adanya perbedaan antar setiap perlakuan terhadap rendahnya massa busuk lunak pada umbi kentang uji. Berdasarkan hasil analisa statistik setiap perlakuan tidak menunjukkan perbedaan yang nyata terhadap massa busuk lunak yang dihasilkan oleh kontrol (P0). Agens hayati *B. subtilis* dan *P. fluorescens* secara tunggal dan kombinasi keduanya dan bakterisida Agrept yang diinokulasi belum dapat menghambat busuknya umbi kentang akibat patogen *E. carotovora*.



Gambar 12. Hasil uji antagonisme pada umbi kentang. *Error bars* menunjukkan indikator standar deviasi.

Bakteri patogen *E. carotovora* ini mengawali perkembangannya dengan mematikan sel inang, sehingga sel inang mengalami luka dan menjadi busuk (Sharga dan Lyon, 1998). Pada awal infeksi umbi terlihat seperti berwarna krem sampai coklat, bila ditekan agak lunak, kemudian mulai berkembang dan menimbulkan bau . Menurut Chailani (2010), beberapa faktor yang mempengaruhi infeksi dan perkembangan patogen tersebut adalah umbi yang masih muda, terdapat luka pada umbi, kekurangan cahaya atau sinar matahari, kelembaban pada tanah yang tinggi

dan kekurangan oksigen ketika umbi di penyimpanan. Bakteri patogen *E. carotovora* memproduksi enzim pektinase, enzim ini dapat mendegradasi kandungan pektin yang terdapat pada umbi kentang. Degradasi pektin ini dapat mengakibatkan lemahnya dinding sel atau pecahnya jaringan umbi kentang, sehingga patogen dapat melakukan infeksi. Enzim ini dapat memberikan nutrisi untuk perkembangan patogen (Abadi, 2003).

Ketika dilakukan uji antagonisme antara bakteri agens hayati dan bakterisida Agrept untuk mengendalikan bakteri patogen pada jaringan umbi kentang. Pada setiap perlakuan masih nampak umbi kentang busuk. Hal tersebut dapat disebabkan umbi kentang tersebut luka, luka tersebut karena akibat mekanis karena tertusuk oleh tip mikropipet. Akibat adanya luka tersebut, dimana luka merupakan salah satu jalan bagi patogen *E. carotovora* untuk melakukan infeksi.

Akibat adanya luka pada umbi kentang tersebut, bakteri *E. carotovora* melakukan infeksi dengan mendegradasi pektin pada dinding sel kentang. Walaupun bakteri agens hayati dan bakterisida terlebih dahulu diinokulasi ke dalam umbi kentang dengan selang waktu tertentu, hasilnya belum mampu mengendalikan patogen *E. carotovora*. Berdasarkan hasil uji ini dengan jeda waktu satu jam masih belum mampu mengurangi massa busuk pada umbi kentang. Hal ini mengindikasikan jeda waktu satu jam tersebut belum cukup memberikan kesempatan agens hayati untuk mengendalikan patogen, pada penelitian berikutnya dapat dilanjutkan dengan memberikan jeda waktu inokulasi yang lebih lama antara agens hayati dan patogen pada umbi kentang uji.

Dari hasil penelitian ini dapat diperoleh informasi bahwa, dengan adanya luka pada umbi kentang dapat memberikan jalan untuk patogen melakukan infeksi dan dapat menyebabkan umbi tersebut terserang penyakit busuk lunak. Sehingga umbi kentang baik yang terdapat di lapang dan di gudang diusahakan tidak terdapat luka. Luka baik akibat mekanis, akibat serangan serangga dan luka pada saat pengangkutan. Luka akibat metode suntik dapat mempercepat infeksi patogen *E. carotovora* pada umbi kentang Perombelon (1976 dalam Gunawan, 2006). Bakteri patogen *E. carotovora* menurut Agrios (2005), dapat bertahan dalam jaringan umbi kentang yang terinfeksi, pada tanah, pada alat-alat pertanian dan lingkungan disekitar gudang. Oleh karena hal tersebut perlu adanya untuk melakukan upaya pencegahan

terhadap patogen ini baik di lapang maupun di gudang, dengan melakukan sanitasi, menghindari luka, menjaga kelembaban gudang, menjaga serangan hama, melakukan praktik budidaya yang baik dan melakukan perlakuan tanaman.

Menurut Cook dan Baker (1996) bakteri agens hayati *B. subtilis* dan *P. fluorescens* memiliki potensi dalam mengendalikan patogen tumbuhan. Pada penelitian sebelumnya bakteri agens hayati tersebut diaplikasikan dengan metode penyeluman benih. Jadi kedua bakteri agens hayati tersebut diselumutkan pada benih sebelum tanam. Penyeluman benih ini memberikan respon pada peningkatan pertumbuhan tanaman dan mengurangi serangan patogen. Aplikasi bakteri *B. subtilis* dalam uji di cawan petri mampu mengendalikan patogen *Sclerotium rolfsii*, *Streptomyces scabies*, *Fusarium roseum* dan *Rhizoctonia solani* dengan menghasilkan senyawa antibiotik. Menurut Klopper *et al.* (1980 dalam Cook dan Baker, 1996) aplikasi penyeluman benih kentang dengan bakteri *P. fluorescens* dan *P. putida* mampu meningkatkan pertumbuhan dan produksi kentang sebesar 10-15% serta mampu menekan serangan dari beberapa patogen seperti *E. carotovora*, *E. atroseptica*, *Psudomonas syringae*, *P. marginalis*, *P. phaseolicola*, *Pythium ultimum*, *P. aphanidermatum* dan *P. debaryanum*.

Pengujian antagonisme di cawan petri dan di umbi kentang menunjukkan korelasi bahwa bakteri agens hayati *B. subtilis* dan *P. fluorescens* memiliki potensi dalam mengendalikan patogen *E. carotovora* penyebab penyakit busuk lunak umbi kentang. Bakteri agens hayati *B. subtilis* dan *P. fluorescens* mampu mengendalikan patogen *E. carotovora* di cawan petri dengan menghasilkan senyawa antibiotik yang ditunjukkan dengan terbentuknya zona bening di sekitar kertas saring, namun bakteri agens hayati belum mampu menghambat massa busuk lunak pada umbi kentang yang diinokulasi patogen *E. carotovora*. Hal tersebut karena pada umbi kentang tersebut terdapat luka. Dengan adanya luka pada umbi kentang tersebut ternyata dapat memberikan jalan untuk patogen melakukan infeksi dan dapat menyebabkan umbi tersebut terserang penyakit busuk lunak. Walaupun pada luka tersebut telah diinokulasi bakteri agens hayati seperti *B. subtilis* dan *P. fluorescens*. Diusahakan umbi kentang yang terdapat di lapang dan di gudang tidak terdapat luka.

## V. PENUTUP

### 5.1 Kesimpulan

Dari hasil penelitian ini dapat diperoleh kesimpulan sebagai berikut :

1. Dari hasil isolasi pada umbi kentang yang menunjukkan gejala busuk lunak diperoleh 3 isolat, selanjutnya dari 3 isolat tersebut yang menunjukkan reaksi patogenesitas dan hipersensitif adalah isolat Ec 2. Kemudian isolat Ec 2 dilanjutkan dengan uji fisiologi dan biokimia. Berdasarkan hasil pengujian patogenesitas, hipersensitif, fisiologi dan biokimia isolat Ec 2 adalah *Erwinia carotovora*.
2. Pada uji antagonisme di cawan petri bahwa agens hayati *Bacillus subtilis* dan *Pseudomonas fluorescens* yang diinokulasi secara tunggal dan kombinasi keduanya memiliki potensi dalam mengendalikan penyakit busuk lunak umbi kentang (*Erwinia carotovora*).
3. Pada uji antagonisme di umbi kentang bahwa agens hayati *Bacillus subtilis* dan *Pseudomonas fluorescens* yang diinokulasi secara tunggal dan kombinasi keduanya tidak menunjukkan kemampuan menghambat massa busuk lunak pada umbi kentang yang diinokulasi patogen *Erwinia carotovora*.

### 5.2 Saran

Perlu penelitian lebih lanjut mengenai telaah metode uji antagonisme bakteri agens hayati *Bacillus subtilis* dan *Pseudomonas fluorescens* secara tunggal dan kombinasi keduanya pada umbi kentang seperti mengusahakan tidak adanya luka pada umbi dan lama waktu jeda inkubasi untuk inokulasi dari agens hayati dan patogen *Erwinia carotovora*.

### 5.3 Ucapan Terima Kasih

Penulis mengucapkan ucapan terima kasih kepada PT. Indofood Sukses Makmur, Tbk. atas program Indofood Riset Nugraha (IRN) yang telah membantu penulis untuk menyelesaikan pelaksanaan penelitian dalam rangka penyelesaian tugas akhir (skripsi).



## DAFTAR PUSTAKA

- Abadi, A. L. 2003. Ilmu Penyakit Tumbuhan II. Penerbit Bayu Media. Malang. 145 hal.
- Addy, H. S. 2007. Pengaruh Sumber Mineral Terhadap Penekanan *Erwinia carotovora* oleh *Psudomonas pendar-fluor* Secara In Vitro. Jurnal HPT Tropika. Volume 7. No. 2.
- Agrios, G. N. 2005. Plant Pathology 5 Edition. Elsevier Academi Press. United State of America. Hal 616-686.
- Arwiyanto, T dan I. Hartana. 1999. Pengendalian Hayati Penyakit Layu Bakteri Tembakau. Percobaan di Rumah Kaca. Jurnal Perlindungan Tanaman Indonesia. Volume 5. No. 1.
- Asandhi, A. A. dan N. Gunadhi. 1989. Syarat Tumbuh Tanaman Kentang. *Dalam* Hidayati. E. N. 2004. Eksplorasi Bakteri Endofit Umbi Kentang Antagonistik terhadap *Erwinia carotovora* var. *carotovora* Patogen Penyebab Penyakit Busuk Lunak (*Soft Rot*) Pada Umbi Tanaman Kentang (*Solanum tuberosum* L.). Skripsi. Jurusan HPT. Fakultas Pertanian. Universitas Brawijaya. Malang.
- Chailani, S. R. 2010. Penyakit-Penyakit Pasca Panen Tanaman Pangan. UB Press. Malang. 152 Hal.
- Cook, R. J. dan K. F. Baker. 1996. The Nature and Practice of Biological Control of Plant Pathogens. The American Phytopathological Society Press. Unites State of America. 539 Hal.
- Goto, M. 1990. Fundamental of Bacterial Plant Pathology. Faculty of Agriculture Shizuoka, University Shizuoka. Academic Press, INC. Japan.
- Gunawan, O.S. 2006. Pengaruh Cahaya dan Tempat Penyimpanan Bibit Kentang di Gudang terhadap Pertunasan dan Serangan Hama Penyakit Gudang. Jurnal Hortikultura. Vol 16. Edisi 2. Hal 142-150.
- Habazar, T. dan Yaherwandi. 2006. Pengendalian Hayati Hama dan Penyakit Tumbuhan. Andalas University Press. Padang. hal 100-137.
- Hamm, P. dan C. M. Ocamb. 2002. Potato (*Solanum tuberosum*) Bacterial Rot and Blackleg. Oregon State University Extension. Oregon.
- Haque, M. M, M. S. Kabir, L. Q. Aini, H. Hirata dan S. Tsuyumu. 2009. SlyA, a MarR Family Transcriptional Regulator, Is Essential for Virulence in *Dickeya dadantii* 3937. Journal of Bacteriology. Vol. 191. No. 17.



- Hidayati. E. N. 2004. Eksplorasi Bakteri Endofit Umbi Kentang Antagonistik terhadap *Erwinia carotovora var.carotovora* Patogen Penyebab Penyakit Busuk Lunak (Soft Rot) Pada Umbi Tanaman Kentang (*Solanum tuberosum L.*). Skripsi. Jurusan HPT. Fakultas Pertanian. Universitas Brawijaya. Malang.
- Kawaguchi, A., K. Inoue dan Y. Ichinose. 2008. Biological Control of Crown Gall of Grapevine, Rose, Tomato by Nonpathogenic *Agrobacterium vitis* Strain VAR03-1. Journal Phytopathology. Vol. 98, No. 11.
- Kilian, M., U. Steiner, B. Krebs, H. Junge, G. Schmiedeknecht, dan R. Hain. 2000. FZB24(R) *Bacillus subtilis* - mode of action of a microbial agent enhancing plant vitality. Pflanzenschutz- Nachrichten Bayer. Pflanzenschutz. Dalam Muis, A. 2007. Pengelolaan Penyakit Busuk Pelelah (*Rhizoctonia solani* Kuhn) pada Tanaman Jagung. Jurnal Litbang Pertanian Vol. 26. Edisi 3.
- Kleinschmidt, G. 2002. Pest Management and Identification. University of California. California. Dalam Hidayati. E. N. 2004. Eksplorasi Bakteri Endofit Umbi Kentang Antagonistik terhadap *Erwinia carotovora var.carotovora* Patogen Penyebab Penyakit Busuk Lunak (Soft Rot) Pada Umbi Tanaman Kentang (*Solanum tuberosum L.*). Skripsi. Jurusan HPT. Fakultas Pertanian. Universitas Brawijaya. Malang.
- Kloepper, J. W., M. N. Schroth dan T. D. Miller. 1980. Effects of Rhizosphere Colonization by Plant Growth Promoting Rhizobacteria on Potato Plant Development and Yield. Dalam Cook, R. J. dan Kenneth F. Baker. 1996. The Nature and Practice of Biological Control of Plant Pathogens. The American Phytopathological Society Press. Unites State of America. 539 Hal.
- Muis, A. 2007. Pengelolaan Penyakit Busuk Pelelah (*Rhizoctonia solani* Kuhn) pada Tanaman Jagung. Jurnal Litbang Pertanian Vol. 26. Edisi 3.
- Olivera, F. C., R. C. Geruza, S. M. Amanda, A.S. Andre, dan B. Adriano. 2006. Bacteriocin-Like Substance Inhibits Potato Soft Rot caused by *Erwinia carotovora*. Canadian Journal of Microbiology. Vol. 56. Hal 533-539.
- Parker, C. A., A. D. Rovira, K. J. Moore, P. T. W. Wong dan J. F. Kollmorgen. 1985. Ecology and Management of Soilborne Plant Pathogens. The American Phytopathological Society Press. Unites State of America. 358 Hal.
- Perombelon, M. C. M. 1976. Effect of Environmental Factor during the Growing Season on The Level of Potato Tuber Contamination by *Erwinia carotovora*. Dalam Gunawan, O.S. 2006. Pengaruh Cahaya dan Tempat Penyimpanan Bibit Kentang di Gudang terhadap Pertunasan dan Serangan Hama Penyakit Gudang. Jurnal Hortikultura. Vol 16. Edisi 2. Hal 142-150.



- Schaad, N., J. Jones dan W. Chun. 2001. Laboratory Guide for the Identification of Plant Pathogenic Bacteria, 3<sup>rd</sup> Edition. APS Press. Amerika. Hal 1-71.
- Semangun, H. 1994. Penyakit-Penyakit Tanaman Hortikultura di Indonesia. Gadjah Mada University Press. Yogyakarta. Hal 160.
- Sharga, B. M. dan G. D. Lyon. 1998. *Bacillus subtilis* BS 107 as an Antagonist of Potato Blackleg and Soft Rot Bacteria. Canadian Journal of Microbiology. Vol. 44. Hal 777-783.
- Sihombing, D. 2009. Biopestisida Pengendali Hama dan Penyakit Tanaman Hias. Warta Penelitian dan Pengembangan Pertanian. Vol. 31. No. 3.
- Sood, A., Shivesh S., K. Viviek dan L. T. Ram. 2007. Antagonism of Dominant Bacteria in Tea Rhizosphere of Indian Himalayan Regions. Journal Appl. Science Environment Management. Vol. 11. Edisi 4. Hal 63-66.
- Sugiyono, A., J. L Rosita dan A. S. Reysia. 2008. Karakterisasi Protease Bakteri Termofil Mata Air Laut Panas Poso Sulawesi Tengah. Jurnal Penelitian Perikanan. Vol. II. No. 2.
- Supriadi. 2006. Analisis Resiko Agens Hayati untuk Pengendalian Patogen Pada Tanaman. Jurnal Litbang Pertanian. Volume 25. Nomor 3. Hal 23-29.
- Tsiantos, J. dan P. Psallidas. 2002. The Effect of Inoculum Concentration and Time of Application of Various Bactericides on the Control of Fire Blight (*Erwinia amylovora*) under Artificial Inoculation. Journal Phytopathology. Mediterania. Vol 41. Hal 246-251.
- Tweddell, R. J., R. Boulanger, dan J. Arul. 2003. Effect of Chlorine Atmospheres on Sprouting and Development of Dry Rot, Soft Rot and Silver Scurf on Potato Tubers. Postharvest Biol. Technol. *Dalam* Olivera, F. C., Geruza R. C., Amanda S. M., Andre A.S., dan Adriano B. 2006. Bacteriocin-Like Substance Inhibits Potato Soft Rot caused by *Erwinia carotovora*. Canadian Journal of Microbiology. Vol. 56. Hal 533-539.
- Vanneste, J. L. 1996. Biological Control of Soft Rot on Calla and Potatoes. The Horticulture and Food Research Institute of New Zealand. New Zealand. *Dalam* Hidayati. E. N. 2004. Eksplorasi Bakteri Endofit Umbi Kentang Antagonistik terhadap *Erwinia carotovora* var.*carotovora* Patogen Penyebab Penyakit Busuk Lunak (Soft Rot) Pada Umbi Tanaman Kentang (*Solanum tuberosum L.*). Skripsi. Jurusan HPT. Fakultas Pertanian. Universitas Brawijaya. Malang.

Tabel Lampiran 1. Analisis Deskriptif Uji Antagonis Agens Hayati *Bacillus subtilis* dan *Pseudomonas fluorescens* terhadap Bakteri Patogen *Erwinia carotovora* di Cawan Petri

Perlakuan 1		Perlakuan 2		Perlakuan 3	
Mean	0	Mean	1,73	Mean	4,13
Standard Error	0	Standard Error	0,73	Standard Error	1,01
Median	0	Median	1	Median	4,6
Standard Deviation	0	Standard Deviation	1,27	Standard Deviation	1,75
Sample Variance	0	Sample Variance	1,61	Sample Variance	3,05
Skewness	0	Skewness	1,73	Skewness	-1,12
Range	0	Range	2,2	Range	3,4
Minimum	0	Minimum	1	Minimum	2,2
Maximum	0	Maximum	3,2	Maximum	5,6
Sum	0	Sum	5,2	Sum	12,4
Count	3	Count	3	Count	3
Largest(1)	0	Largest(1)	3,2	Largest(1)	5,6
Smallest(1)	0	Smallest(1)	1	Smallest(1)	2,2
Confidence		Confidence		Confidence	
Level(95,0%)	0	Level(95,0%)	3,16	Level(95,0%)	4,34

Perlakuan 4		Perlakuan 5		Perlakuan 6	
Mean	3,87	Mean	3,73	Mean	2,67
Standard Error	0,77	Standard Error	1,37	Standard Error	0,93
Median	4,2	Median	5	Median	2,8
Standard		Standard		Standard Deviation	1,60
Deviation	1,33	Deviation	2,37	Sample Variance	2,57
Sample Variance	1,77	Sample Variance	5,61	-	
Skewness	-1,06	Skewness	-1,72	Skewness	0,37
Range	2,6	Range	4,2	Range	3,2
Minimum	2,4	Minimum	1	Minimum	1
Maximum	5	Maximum	5,2	Maximum	4,2
Sum	11,6	Sum	11,2	Sum	8
Count	3	Count	3	Count	3
Largest(1)	5	Largest(1)	5,2	Largest(1)	4,2
Smallest(1)	2,4	Smallest(1)	1	Smallest(1)	1
Confidence		Confidence		Confidence	
Level(95,0%)	3,31	Level(95,0%)	5,89	Level(95,0%)	3,98

Perlakuan 7		Perlakuan 8		Perlakuan 9	
Mean	3,27	Mean	3,8	Mean	2,6
Standard Error	0,87	Standard Error	0,69	Standard Error	0,92
Median	2,4	Median	3,8	Median	2,6
Standard Deviation	1,50	Standard Deviation	1,2	Standard Deviation	1,6
Sample Variance	2,25	Sample Variance	1,44	Sample Variance	2,56
Skewness	1,73	Skewness		Skewness	0
Range	2,6	Range	2,4	Range	3,2
Minimum	2,4	Minimum	2,6	Minimum	1
Maximum	5	Maximum	5	Maximum	4,2
Sum	9,8	Sum	11,4	Sum	7,8
Count	3	Count	3	Count	3
Largest(1)	5	Largest(1)	5	Largest(1)	4,2
Smallest(1)	2,4	Smallest(1)	2,6	Smallest(1)	1
Confidence Level(95,0%)	3,73	Confidence Level(95,0%)	2,980965	Confidence Level(95,0%)	3,97

Perlakuan 10		Perlakuan 11		Perlakuan 12	
Mean	3,73	Mean	5,13	Mean	1,47
Standard Error	1,75	Standard Error	0,85	Standard Error	0,47
Median	3,2	Median	4,6	Median	1
Standard Deviation	3,04	Standard Deviation	1,47	Standard Deviation	0,81
Sample Variance	9,21	Sample Variance	2,17	Sample Variance	0,65
Skewness	0,77	Skewness	1,41	Skewness	1,73
Range	6	Range	2,8	Range	1,4
Minimum	1	Minimum	4	Minimum	1
Maximum	7	Maximum	6,8	Maximum	2,4
Sum	11,2	Sum	15,4	Sum	4,4
Count	3	Count	3	Count	3
Largest(1)	7	Largest(1)	6,8	Largest(1)	2,4
Smallest(1)	1	Smallest(1)	4	Smallest(1)	1
Confidence Level(95,0%)	7,54	Confidence Level(95,0%)	3,66	Confidence Level(95,0%)	2,01

Perlakuan 13		Perlakuan 14		Perlakuan 15
Mean	2,93	Mean	4,27	Mean
Standard Error	0,18	Standard Error	0,52	Standard Error
Median	3	Median	4,2	Median
Standard Deviation	0,31	Standard Deviation	0,90	Standard Deviation
Sample Variance	0,09	Sample Variance	0,81	Sample Variance
Skewness	-0,94	Skewness	0,33	Skewness
Range	0,6	Range	1,8	Range
Minimum	2,6	Minimum	3,4	Minimum
Maximum	3,2	Maximum	5,2	Maximum
Sum	8,8	Sum	12,8	Sum
Count	3	Count	3	Count
Largest(1)	3,2	Largest(1)	5,2	Largest(1)
Smallest(1)	2,6	Smallest(1)	3,4	Smallest(1)
Confidence Level(95,0%)	0,76	Confidence Level(95,0%)	2,24	Confidence Level(95,0%)

Perlakuan 16		Perlakuan 17	
Mean	3,2	Mean	3
Standard Error	0,83	Standard Error	0,23
Median	2,8	Median	3
Standard Deviation	1,44	Standard Deviation	0,4
Sample Variance	2,08	Sample Variance	0,16
Skewness	1,15	Skewness	0
Range	2,8	Range	0,8
Minimum	2	Minimum	2,6
Maximum	4,8	Maximum	3,4
Sum	9,6	Sum	9
Count	3	Count	3
Largest(1)	4,8	Largest(1)	3,4
Smallest(1)	2	Smallest(1)	2,6
Confidence Level(95,0%)	3,58	Confidence Level(95,0%)	0,99

Tabel Lampiran 2. Analisis Deskriptif Uji Antagonis Agens Hayati *Bacillus subtilis* dan *Pseudomonas fluorescens* terhadap Bakteri Patogen *Erwinia carotovora* di Umbi Kentang

Perlakuan 1	Perlakuan 2	Perlakuan 3			
Mean	0,65	Mean	0,63	Mean	0,60
Standard Error	0,06	Standard Error	0,03	Standard Error	0,08
Median	0,65	Median	0,62	Median	0,61
Standard Deviation	0,11	Standard Deviation	0,06	Standard Deviation	0,14
Sample Variance	0,01	Sample Variance	0,00	Sample Variance	0,02
Skewness	0,14	Skewness	0,49	Skewness	-0,42
Range	0,21	Range	0,12	Range	0,28
Minimum	0,55	Minimum	0,57	Minimum	0,45
Maximum	0,76	Maximum	0,69	Maximum	0,73
Sum	1,96	Sum	1,88	Sum	1,79
Count	3	Count	3	Count	3
Largest(1)	0,76	Largest(1)	0,69	Largest(1)	0,73
Smallest(1)	0,55	Smallest(1)	0,57	Smallest(1)	0,45
Confidence Level(95,0%)	0,26	Confidence Level(95,0%)	0,15	Confidence Level(95,0%)	0,35

Perlakuan 4	Perlakuan 5	Perlakuan 6			
Mean	0,53	Mean	0,67	Mean	0,81
Standard Error	0,06	Standard Error	0,12	Standard Error	0,09
Median	0,59	Median	0,62	Median	0,76
Standard Deviation	0,11	Standard Deviation	0,22	Standard Deviation	0,15
Sample Variance	0,01	Sample Variance	0,05	Sample Variance	0,02
Skewness	-1,72	Skewness	1,05	Skewness	1,41
Range	0,19	Range	0,42	Range	0,28
Minimum	0,41	Minimum	0,49	Minimum	0,7
Maximum	0,6	Maximum	0,91	Maximum	0,98
Sum	1,6	Sum	2,02	Sum	2,44
Count	3	Count	3	Count	3
Largest(1)	0,6	Largest(1)	0,91	Largest(1)	0,98
Smallest(1)	0,41	Smallest(1)	0,49	Smallest(1)	0,7
Confidence Level(95,0%)	0,27	Confidence Level(95,0%)	0,53	Confidence Level(95,0%)	0,37

Perlakuan 7		Perlakuan 8		Perlakuan 9	
Mean	0,61	Mean	0,64	Mean	0,86
Standard Error	0,13	Standard Error	0,00	Standard Error	0,27
Median	0,66	Median	0,64	Median	0,68
Standard Deviation	0,22	Standard Deviation	0,01	Standard Deviation	0,46
Sample Variance	0,05	Sample Variance	0,00	Sample Variance	0,21
Skewness	-0,90	Skewness	-1,73	Skewness	1,50
Range	0,44	Range	0,01	Range	0,87
Minimum	0,37	Minimum	0,63	Minimum	0,52
Maximum	0,81	Maximum	0,64	Maximum	1,39
Sum	1,84	Sum	1,91	Sum	2,59
Count	3	Count	3	Count	3
Largest(1)	0,81	Largest(1)	0,64	Largest(1)	1,39
Smallest(1)	0,37	Smallest(1)	0,63	Smallest(1)	0,52
Confidence		Confidence		Confidence	
Level(95,0%)	0,56	Level(95,0%)	0,01	Level(95,0%)	1,15

Perlakuan 10		Perlakuan 11		Perlakuan 12	
Mean	0,55	Mean	0,64	Mean	0,75
Standard Error	0,28	Standard Error	0,07	Standard Error	0,14
Median	0,76	Median	0,58	Median	0,85
Standard Deviation	0,48	Standard Deviation	0,11	Standard Deviation	0,25
Sample Variance	0,23	Sample Variance	0,01	Sample Variance	0,06
Skewness	-1,61	Skewness	1,72	Skewness	-1,48
Range	0,88	Range	0,2	Range	0,47
Minimum	0	Minimum	0,57	Minimum	0,47
Maximum	0,88	Maximum	0,77	Maximum	0,94
Sum	1,64	Sum	1,92	Sum	2,26
Count	3	Count	3	Count	3
Largest(1)	0,88	Largest(1)	0,77	Largest(1)	0,94
Smallest(1)	0	Smallest(1)	0,57	Smallest(1)	0,47
Confidence		Confidence		Confidence	
Level(95,0%)	1,19	Level(95,0%)	0,28	Level(95,0%)	0,62

Perlakuan 13		Perlakuan 14		Perlakuan 15	
Mean	0,49	Mean	0,74	Mean	0,78
Standard Error	0,28	Standard Error	0,16	Standard Error	0,10
Median	0,51	Median	0,85	Median	0,83
Standard Deviation	0,49	Standard Deviation	0,29	Standard Deviation	0,18
Sample Variance	0,24	Sample Variance	0,08	Sample Variance	0,03
Skewness	-0,15	Skewness	-1,45	Skewness	-1,24
Range	0,97	Range	0,54	Range	0,34
Minimum	0	Minimum	0,42	Minimum	0,58
Maximum	0,97	Maximum	0,96	Maximum	0,92
Sum	1,48	Sum	2,23	Sum	2,33
Count	3	Count	3	Count	3
Largest(1)	0,97	Largest(1)	0,96	Largest(1)	0,92
Smallest(1)	0	Smallest(1)	0,42	Smallest(1)	0,58
Confidence		Confidence		Confidence	
Level(95,0%)	1,21	Level(95,0%)	0,71	Level(95,0%)	0,44

Perlakuan 16		Perlakuan 17	
Mean	0,73	Mean	0,61
Standard Error	0,11	Standard Error	0,05
Median	0,7	Median	0,63
Standard Deviation	0,19	Standard Deviation	0,09
Sample Variance	0,03	Sample Variance	0,01
Skewness	0,70	Skewness	-0,84
Range	0,37	Range	0,17
Minimum	0,56	Minimum	0,52
Maximum	0,93	Maximum	0,69
Sum	2,19	Sum	1,84
Count	3	Count	3
Largest(1)	0,93	Largest(1)	0,69
Smallest(1)	0,56	Smallest(1)	0,52
Confidence		Confidence	
Level(95,0%)	0,46	Level(95,0%)	0,21

Tabel Lampiran 3. Analisis Ragam Uji Antagonis Agens Hayati *Bacillus subtilis* dan *Pseudomonas fluorescens* terhadap Bakteri Patogen *Erwinia carotovora* di Cawan Petri

<b>Analisis Ragam Zona Bening</b>					
Sumber Keragaman	Derajat Bebas	Jumlah Kuadrat Tengah	Kuadrat Tengah	F Hitung	F Tabel 5 %
Perlakuan	16	7,86	0,49	3,16*	0,0027
Galat	32	4,98	0,16		
Total	51	177,1			

Keterangan : Data yang dianalisis merupakan data yang sudah ditransformasikan ke  $\sqrt{X+0,5}$  dan angka yang diikuti dengan tanda \* menandakan beda nyata pada Uji Jarak Berganda Duncan pada taraf 5%.

Tabel Lampiran 4. Analisis Ragam Uji Antagonis Agens Hayati *Bacillus subtilis* dan *Pseudomonas fluorescens* terhadap Bakteri Patogen *Erwinia carotovora* di Umbi Kentang

<b>Analisis Ragam Massa Busuk Umbi Kentang</b>					
Sumber Keragaman	Derajat Bebas	Jumlah Kuadrat Tengah	Kuadrat Tengah	F Hitung	F Tabel 5 %
Perlakuan	16	0,12	0,01	0,59*	0,87
Galat	32	0,40	0,01		
Total	51	59,42			

Keterangan : Data yang dianalisis merupakan data yang sudah ditransformasikan ke  $\sqrt{X+0,5}$  dan angka yang diikuti dengan tanda \* menandakan tidak beda nyata pada Uji Jarak Berganda Duncan pada taraf 5%.

