

III. MATERI DAN METODE

3.1. Waktu dan Tempat

Penelitian ini telah dilaksanakan di Laboratorium *Plant Protection Development* PT. Arara Abadi, Desa Pinang Sebatang, Kecamatan Tualang, Kabupaten Siak, Provinsi Riau. Penelitian ini berlangsung pada Bulan April s/d Juni 2017.

3.2. Bahan dan Alat

Bahan yang digunakan untuk pelaksanaan penelitian ini adalah tanah beserta akar diambil dari bibit *Eucalyptus pellita*, NaCl, FeCl, beef ekstrak, glukosa, $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_3$, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, KCl, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, ekstrak khamir, MnSO_4 , FeSO_4 , agar-agar, FeCl_3 , HClO_4 , kentang, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, HCl, HDTMA, KH_2PO_4 , NaCl, NH_4Cl , NaOH, casamino acid, 8-hidroxyquinoline, choloroform, PIPES, kertas saring, isolat *Cylindrocladium* sp., isolat *Raistonia solanacearum*, bibit *E. pellita*, dan Aquabides.

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah kantong plastik, *petridish*, *laminar air flow*, *shaker*, *sentrifuge*, *incubator*, *autoclave*, timbangan, tabung reaksi, Erlenmeyer, mikropipet, *hot plate*, *strirrer*, kamera, alat tulis, dan spektrofotometer.

3.3. Metode Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian deskriptif. Sampel dari sumber inokulum di lapangan yaitu dari tanah beserta akar bibit *E. pellita*, kemudian dari sampel yang didapat dilakukan isolasi dan uji. Uji bakteri berupa penghasil IAA, pelarut fosfat, bakteri antagonis dan produksi siderofor.

3.4. Pelaksanaan Penelitian

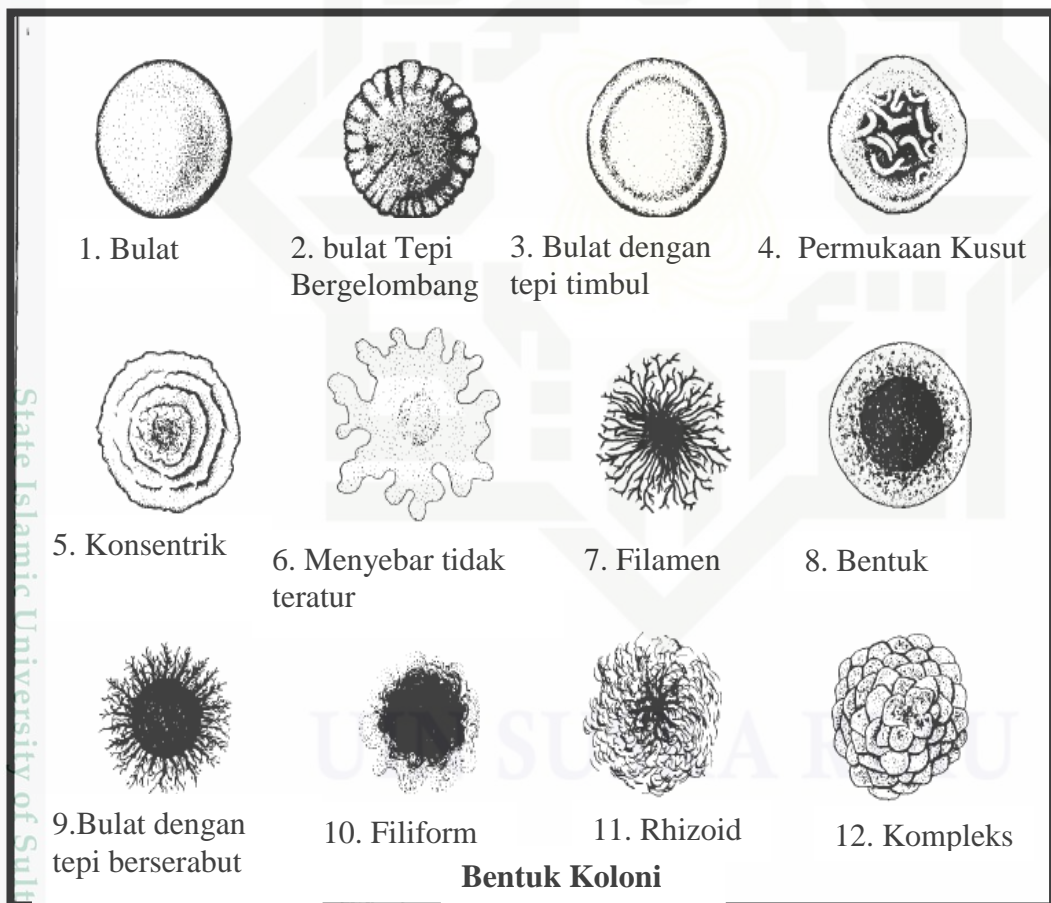
3.4.1. Pengambilan sampel

Sampel tanah beserta akar di ambil dari 5 bibit *E. pellita* berumur 2 bulan yang di tanam menggunakan *pottray*, pengambilan sampel dari setiap tray dipilih satu tanaman yang subur, kemudian kelima sampel tanah beserta akar dari pot seluruhnya dimasukan menjadi satu pada kantong plastik dan dihomogenkan.

3.4.2. Isolasi dan Enumerasi

Tanah dan akar sebanyak 20 gram dilarutkan ke dalam 180 ml larutan air steril, *shaker* selama 20 menit dengan kecepatan 200 rpm, kemudian dilakukan pengenceran serial, sehingga didapat pengenceran 10^{-1} . Pengenceran dilakukan sampai pada pengenceran ke 10^{-4} , pada pengenceran 10^{-4} diambil 100 μ l dimasukkan ke dalam cawan petri yang telah berisi media NA dan disebarkan hingga tetesan suspensi merata. Cawan beserta isi diinkubasi dengan posisi terbalik dalam inkubator bersuhu 37 °C selama 3-4 hari.

Bakteri hasil inkubasi diamati secara langsung (makroskopis), pengamatan karakteristik morfologi koloni dilihat dari bentuk koloni, permukaan koloni, elevasi koloni, tepi koloni dan warna koloni. Pengamatan makroskopis dapat disesuaikan dengan Gambar 3.1., Gambar 3.2., dan Gambar 3.3.



Gambar 3.1. Bentuk Morfologi dari Atas (Hadioetomo, 1993)

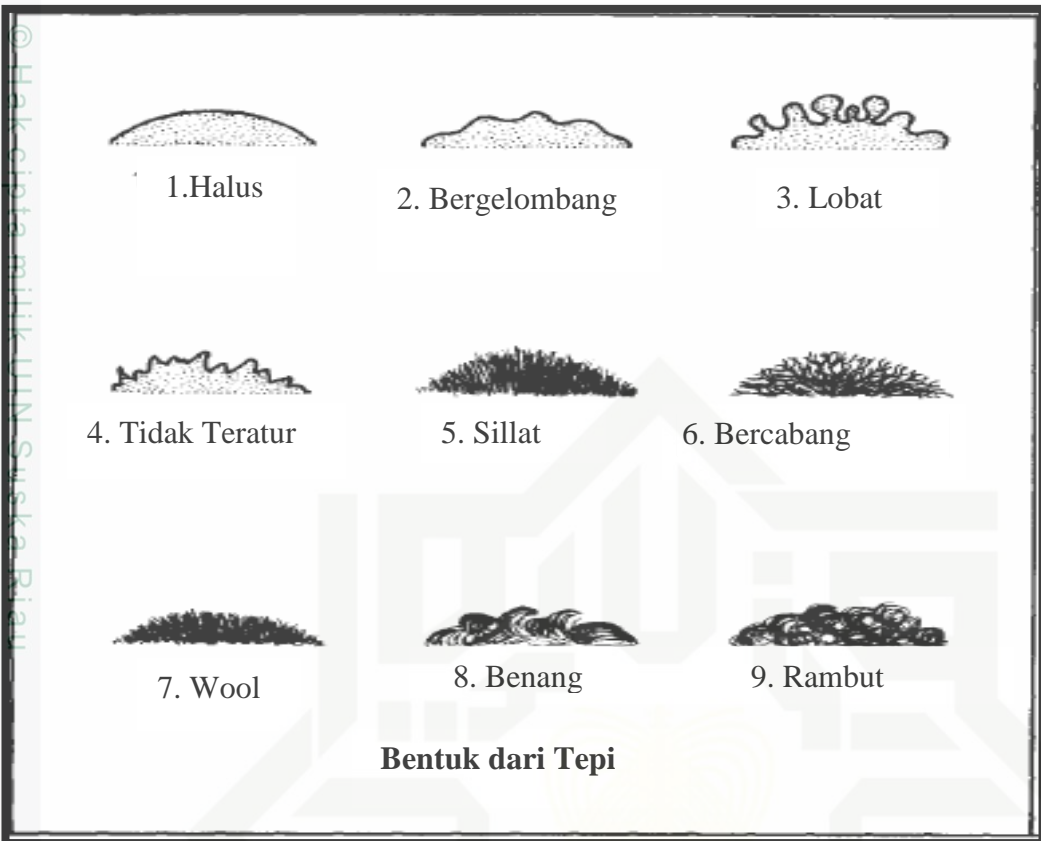
Hak Cipta Diindungi Undang-Undang

1. Diarangi mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:

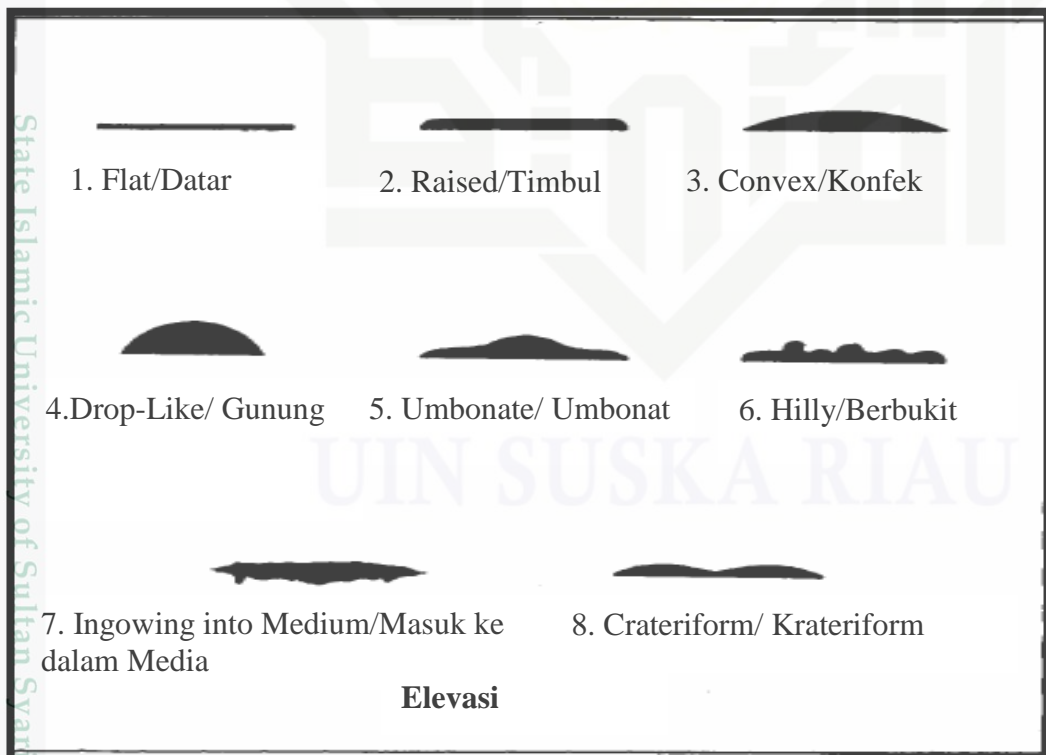
a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.

b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar UIN Suska Riau.

2. Diarangi mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin UIN Suska Riau.



Gambar 3.2. Bentuk Morfologi dari Tepi (Hadioetomo, 1993)



Gambar 3.3. Bentuk Morfologi dari Bentuk Penonjolan (Hadioetomo, 1993)

Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar UIN Suska Riau.
2. Dilarang mengumpukan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin UIN Suska Riau.

Hak Cipta Diindungi Undang-Undang

1. Diarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:

a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.

b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar UIN Suska Riau.

Metode yang digunakan untuk menghitung jumlah koloni adalah metode cawan hitung. Cawan yang dipilih dan dihitung adalah cawan petri yang mengandung koloni antara 30-300. Prinsip dari metode ini adalah jika sel mikroba yang masih hidup ditumbuhkan dalam media, maka mikroba tersebut akan berkembang biak dan membentuk koloni yang dapat dilihat langsung dan kemudian dihitung tanpa menggunakan mikroskop (Irfan, 2014). Rumus menghitung jumlah koloni adalah sebagai berikut (Omar dkk., 1996).

$$\text{Jumlah koloni/ml} = \frac{1}{\text{vol. sampel}} \times \frac{1}{\text{faktor pengenceran}} \times \text{jumlah koloni}$$

Isolat bakteri yang didapat harus dimurnikan untuk mendapatkan biakan murni karena koloni yang tumbuh dalam cawan petri masih terdapat beberapa koloni. Bakteri yang telah dimurnikan kemudian disimpan pada media agar miring NA.

3.4.3. Uji Isolat Rhizobakteria

A. Penghasil IAA

Analisis produksi IAA secara kualitatif diukur berdasarkan metode kolorimetri dengan menggunakan reagen Salkowski, pembuatan reagen Salkowski yaitu dengan mengambil 150 mL H₂SO₄, 250 mL akuades, 7,5 mL FeCl₃·6H₂O 0,5 M (Aryantha dkk., 2004). Isolat bakteri yang diperoleh diinkubasikan sebanyak 1 lup kedalam media NB. Kultur tersebut dikocok dengan kecepatan 100 rpm selama 48 jam pada suhu ruang. Selanjutnya kultur disentrifugasi pada kecepatan 10000 rpm selama 20 menit. Supernatan diambil sebanyak 2 mL dan dimasukkan kedalam tabung reaksi steril, kemudian ditambahkan dengan 2 mL reagen Salkowski dan dikocok dengan vortex. Sebagai kontrol digunakan media NB. Selanjutnya dibiarkan pada suhu ruang dalam kondisi gelap selama satu jam (Widiyanti, 2007).

Analisis produksi IAA secara kuantitatif IAA diukur berdasarkan metode spektrofotometer dengan membuat kurva standar IAA. Sebanyak 10 mL larutan standar IAA 5 ppm dibuat beberapa tingkat pengenceran menjadi konsentrasi 5 ppm, 4,5 ppm, 4 ppm, 3,5 ppm, 3 ppm, dan seterusnya hingga 0 ppm di dalam tabung reaksi, masing-masing tabung reaksi terdapat 2 mL larutan standar IAA

dengan konsentrasi (ppm) yang berbeda kemudian ditambahkan 2 mL pereaksi Salkowski (perbandingan 1 : 1) kemudian diinkubasi selama 60 menit pada suhu ruang. Setelah penambahan pereaksi Salkowski dan inkubasi selama 60 menit, larutan akan berubah menjadi warna merah muda. Larutan standar IAA diukur absorbansinya pada panjang gelombang (λ) = 530 nm dan dibuat kurva standar yang menunjukkan hubungan antara konsentrasi larutan standar IAA (x) dan absorbansi (y) (Kasita, 2010). Hasil suspensi dari analisis secara kualitatif diukur absorbansinya dengan menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 530 nm. Konsentrasi (ppm) IAA yang terdapat dalam kultur ditetapkan berdasarkan kurva standar (Widiyanti, 2007).

B. Pelarut Fosfat

Masing-masing isolat ditumbuhkan dengan cara ditotol pada media Pikovskaya agar yang mengandung trikalsium fosfat, pembuatan media Pikovskaya dengan komposisi per liter sebagai berikut: 10 g Glukosa, 5 g Trikalsium fosfat (Ca_3PO_4), 0,5 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,2 g KCl, 0,1 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,002 g MnSO_4 , 0,002 g FeSO_4 , 0,5 g ekstrak ragi (*yeast extract*), dan 20 g agar bacto (Niswati dkk., 2008). Inkubasi selama 7 hari, zona bening yang terdapat di sekeliling koloni diamati dan diukur indeks pelarutan fosfatnya berdasarkan penelitian Widiyanti (2007) rumus indeks kelarutan fosfat sebagai berikut:

$$\text{Indeks kelarutan fosfat} = \frac{\text{diameter zona bening} - \text{diameter koloni}}{\text{diameter koloni}} \times 100\%$$

C. Agen Biokontrol

1. Uji Daya Hambat Rizobakter terhadap *Cylindrocladium* sp.

Uji antagonis isolat rizobakter terhadap cendawan patogen dilakukan menggunakan metode uji ganda. Potongan medium PSA padat dengan diameter 0,5 cm yang ditumbuhi hifa cendawan patogen digunakan sebagai inokulum dan diletakkan pada cawan petri berisi medium PSA yang masih segar. Potongan inokulum diletakkan dengan jarak 3 cm dari tepi cawan petri dan kultur diinkubasikan dalam ruang bersuhu 26-28 °C selama 48 jam. Masing-masing isolat yang diuji digoreskan memanjang dengan jarak 3 cm dari tepi cawan berlawanan arah dengan letak patogen yang telah ditumbuhkan sebelumnya.

Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:

a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.

b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar UIN Suska Riau.

2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin UIN Suska Riau.

Pengamatan dilakukan tiap hari terhadap pertumbuhan patogen dengan mengukur jari-jari pertumbuhan patogen ke arah tepi cendawan (R1) dan jari-jari pertumbuhan patogen ke arah bakteri atau cendawan antagonis (R2). Selanjutnya data yang diperoleh digunakan untuk menghitung daya hambat (DH) isolat rizobakteri terhadap cendawan patogen, yang ditentukan dengan rumus:

$$\text{daya hambat} = \frac{(R1 - R2)}{R2} \times 100\%$$

Rizobakteri yang menunjukkan daya hambat tertinggi pada pengamatan terakhir dipilih sebagai isolat rizobakteri yang efektif (Sutariati dan Wahab, 2010)

2. Uji Daya Hambat Rizobakter terhadap *Ralstonia solanacearum*

Suspensi *R. Solanacearum* 200 mikroliter ditumbuhkan pada media *Trypenyl Tetrazolium Chloride* (TZC) dengan komposisi glukosa 10 g, pepton 10 g, yeast 0,5 g, beef ext 5 g, agar 20 g, dan aquades 1 liter. Selanjutnya isolat-isolat antagonis tersebut ditumbuhkan pada setiap cawan petri sebanyak tiga titik percawan dengan menggunakan kertas saring yang telah dikeringa anginkan, lalu diinkubasi selama 24 jam pada suhu ruang. Pengamatan dilakukan terhadap pembentukan daerah bening atau zona penghambatan yang dihasilkan oleh isolat bakteri antagonis, selanjutnya dilakukan pengukuran diameter daerah penghambatan dari masing-masing isolat bakteri (Aeny dkk., 2007).

$$\text{diameter daya hambat} = \text{diameter zona bening} - \text{diameter koloni}$$

D. Produksi Siderofor

Produksi siderofor dianalisis secara kualitatif, isolat dideteksi menggunakan media *Chroma Azurol Sulfonate* (CAS) agar (Gross, 1990). Suspensi bakteri sebanyak 5 µl ditetaskan pada kertas saring di atas media CAS dan diinkubasikan selama 4-7 hari pada suhu ruangan. Produksi siderofor diindikasikan dengan adanya warna jingga di sekeliling koloni bakteri (Kurniawati, dkk., 2015).

Hak Cipta Diindungi Undang-Undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:

a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.

b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar UIN Suska Riau.

2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin UIN Suska Riau.

