

BAB IV

PELAKSANAAN PENELITIAN

4.1. Sumber Isolat Bakteri

Bakteri tandan kosong kelapa sawit diambil di Desa Tetap Jaya Dusun IV Sumber Mulyo, Kec.Marbau, Kab. Labuhanbatu Utara.

4.2. Pembuatan Media

Ditimbang 2,8gram *Nutrient Agar* (NA) dan dimasukkan ke dalam Erlenmeyer. Kemudian ditambahkan air Aguadest sebanyak 100 ml diaduk kemudian dipanaskan diatas hot plate hingga mendidih di tutup menggunakan kapas yang telah dibalut alumunium foil, kemudian dibungkus dengan kertas, setelah itu diikat pakai benang wol dan diberi label, dimasukkan ke dalam outoclave. Setelah media steril media di tuang ke dalam petri setelah itu di diamkan hingga memadat.

4.3. Sterilisasi Alat dan Bahan

Sterilisasi alat dilakukan dengan mencuci bersih dan keringkan alat-alat yang terbuat dari kaca dan keringkan dengan kertas. Kemudian alat-alat tersebut disusun kedalam autoclave. Bahan-bahan yang perlu dilakukan proses sterilisasi juga ikut dimasukan di dalam autoklaf dengan suhu 121⁰C selama 20 menit dengan tekanan 15 psi.

4.4. Pembuatan Aquadest Steril Untuk Pengenceran

Disediakan erlenmeyer yang berukuran 1000 ml dimasukan 600 ml air aquadest kemudian ditutup dengan kapas yang telah dilapisin alumunium foil kemudian diikat dengan benang wol kemudian diberi label dimasukan kedalam outoclave.

4.5. Isolasi Bakteri Dari Tandan Kosong Kelapa Sawit

Ditimbang tandan kosong kelapa sawit sebanyak 10 gram kemudian dimasukan kedalam tabung reaksi pertama yang berisi air aquadest steril 10 ml kemudian divorteks sampai homogen, kemudian ambil 1 ml masukan kedalam tabung reaksi yang kedua berisi air aquadest sebanyak 9 ml, lakukan berulang sampai tabung yang ke 6, dari tabung ke 6 diambil sebanyak 0,1 ml dimasukan ke dalam cawan petri yang berisi media Na dan disebar dengan hocky stiek, ditutup dengan kertas dan diberi label kemudian diinkubasi.

4.6. Karakterisasi Morfologi Isolat Bakteri

Isolat bakteri yang diperoleh dari tandan kosong kelapa sawit dikarakterisasi secara morfologi meliputi bentuk, warna, elevasi, tepi koloni

4.7. Subkultur Bakteri

Ditimbang media *Nutrient agar* (NA) 2,8 gram masukkan ke dalam erlenmeyer. Setelah itu tambahkan Aquadest 100 ml dimasukan ke dalam erlenmeyer diaduk

dipanaskan diatas hote plate, setelah itu dimasukan ke kedalam autoclave untuk disterilkan.

Disiapkan petri steril, dituang media *Nutrient agar*(NA) ke dalam petri di diamkan hingga memadat setelah itu diambil bakteri dari petri isolasi awal untuk disubkultur agar mendapatkan biakan murni.

4.8. Uji Antagonis Tandan Kosong Kelapa Sawit

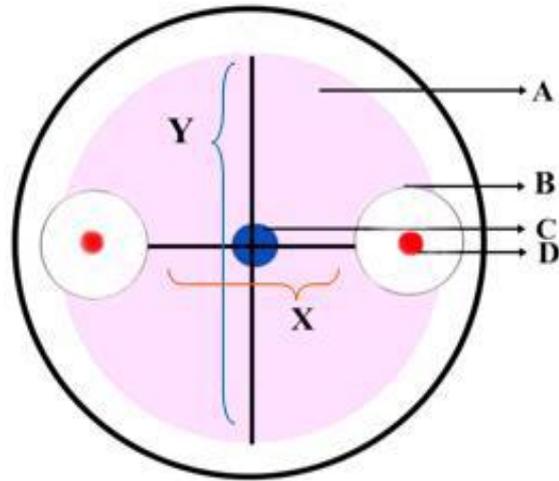
Uji antagonis dilakukan untuk melihat kemampuan bakteri tandan kosong kelapa sawit dalam menghambat pertumbuhan jamur akar putih (*Rigidoporus microporus*). Biakan murnibakteri yang sudah diremajakan dibuat suspensi kedalam tabung reaksi 10^8 yang setara dengan 10^8 CFU/ml.

Ditimbang media PDA sebanyak 3,9 gram dimasukan ke dalam erlenmeyer yang berisi air aquades 100 ml kemudian diaduk hingga merata dipanaskan hingga mendidih di atas hote plate, kemudian ditutup dengan kapas yang sudah dilapisin alumunium foil kemudian diikat dengan benang wol dan diberi label masukan ke dalam autoclave. Media PDA yang sudah steril dituang ke dalam cawan petri yang sudah steril, didiamkan hingga memadat. Diinokulasikan jamur akar putih ke dalam media kemudian dilabel dan di inkubasi.

Sediakan media steril PDA + Yeast Ekstrak kemudian dituang ke dalam cawan petri steril didiamkan hingga memadat dan cawan petri dibuat garis kuadran di bawah petri. Jamur akar putih diambil dengan *cork borer*, lalu diinokulasikan pada bagian tengah media modifikasi PDA + YE 1% dengan jarak 3,5 cm dari cakram tempat inokulum isolat bakteri lalu biakan tersebut diinkubasi selama 72 jam pada

suhu ruang. Pengujian daya hambat isolat bakteri tandan kosong kelapa sawit terhadap jamur akar putih menggunakan metode difusi cakram kertas sesuai dengan metode Kirby-Baur (Mishra *et al.*, 2006; Kulsuntiwong *et al.*, 2008). Sebanyak 10 μ l suspensi isolat bakteri endofit dengan kerapatan $\approx 10^8$ CFU/ml, diteteskan pada kertas cakram (Oxoid) yang berdiameter 0,6 cm.

Selanjutnya uji antagonis dilakukan dengan cara meletakkan cakram tersebut pada 2 titik di tepi media PDA + YE 1 %, kemudian diinkubasi pada suhu ruang selama 7 hari. Isolat bakteri tandan kosong kelapa sawit yang berpotensi antagonis ditunjukkan dengan adanya zona hambatan terhadap pertumbuhan miselium beberapa fungi patogen. Masing-masing perlakuan dilakukan dengan 2 kali pengulangan. Pengamatan dilakukan terhadap pengukuran zona hambat yang terbentuk di sekitar cakram kertas yang menunjukkan adanya aktivitas antimikroba (Lechevalier, 2000).



Gambar 3.7.1 Metode pengukuran zona hambat bakteri tandan kosong kelapa sawit terhadap koloni Jamur akar putih; A. Koloni jamur akar putih, B. Zona hambat bakteri tandan kosong kelapa sawit terhadap koloni jamur akar putih, C. Titik tengah jamur akar putih diletakkan, D. Koloni bakteri tandan kosong kelapa sawit , X. Diameter koloni jamur akar putih yang terhambat pertumbuhannya oleh bakteri, Y. Diameter koloni jamur akar putih normal (Suryanto, 2006)