

BAB I. PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Tanaman karet (*Hevea brasiliensis*) merupakan salah satu komoditas perkebunan penting yang berkontribusi terhadap penyediaan bahan baku industri, sumber devisa, dan pendapatan petani Indonesia. Namun, produktivitas tanaman ini sering terhambat oleh serangan organisme pengganggu tanaman, khususnya penyakit gugur daun. Penyakit tersebut menyebabkan defoliasi berulang, penurunan fotosintesis, terhambatnya pertumbuhan, dan penurunan produksi lateks. Serangan berat dilaporkan dapat menyebabkan kehilangan hasil hingga 25–45% (Cai et al., 2016; Febbiyanti & Fairuzah, 2020).

Pada tahun 2016 *outbreak* penyakit gugur daun karet pertama kali di Sumatera Utara berhasil dideteksi dan menyebar ke provinsi lainnya di Sumatera ((BPS, 2022). Penyebab penyakit gugur daun (*Leaf Blight*) ini sebelumnya diduga disebabkan oleh *Fusicoccum*. Penyakit yang disebut menyerupai antraknos *Colletotrichum* dilaporkan menyerang 60% TBM umur 4 tahun di daerah 50m di atas permukaan tanah di negara bagian Johor, Semenanjung, Malaysia (Permana & Diyasti, 2022). Di Indonesia, penyakit dengan gejala yang serupa pernah terjadi di Kebun Percobaan Balai Penelitian Sungai Putih, Sumatera Utara tahun 2013, namun belum menimbulkan kerugian yang berarti.

Penelitian lanjutan dilaksanakan oleh *International Rubber Research and Development Board* (IRRDB) di Kuala Lumpur pada tahun 2019 sementara menyimpulkan penyebab penyakit gugur daun adalah *Pestalotiopsis* sp. intensitas serangan gugur daun karet (GDK) *Pestalotiopsis* sp. sejak 2017 hingga 2019 mengalami peningkatan dengan nilai kehilangan produksi hingga 25% (Damiri et al., 2022). Cendawan lain yang menjadi penyebab penyakit gugur daun yaitu *Corynespora casicola*. Penyakit gugur daun *Corynespora* (PGDC) merupakan salah satu penyakit karet yang sangat penting. Hal ini disebabkan karena penyakit ini dapat mengakibatkan perenggasan tanaman karet sepanjang tahun sehingga pertumbuhan terhambat, penyiapan tidak dapat dilakukan dan bahkan menyebabkan kematian tanaman. Selain menyerang tanaman di lapangan, penyakit ini juga menjangkiti tanaman karet yang ada di pembibitan, sehingga dapat mengakibatkan kerugian yang besar. Penyakit ini dapat menyerang daun karet baik yang masih muda maupun yang telah tua (Damiri et al., 2022; Febbiyanti et al., 2021).

Upaya pengendalian penyakit tanaman umumnya masih mengandalkan fungisida sintetik. Walaupun efektif, penggunaan berlebih menimbulkan risiko resistensi patogen, pencemaran lingkungan, penurunan biodiversitas mikroba tanah, serta gangguan organisme non-target (Anitha & Rabeeth, 2009). Oleh karena itu, diperlukan strategi pengendalian yang ramah lingkungan, berkelanjutan, dan berbasis hayati.

Salah satu pendekatan yang semakin banyak diteliti adalah pengendalian hayati menggunakan mikroorganisme, karena terbukti dapat menjadi alternatif yang lebih aman bagi lingkungan (Rangkuti et al., 2014). Di antara berbagai mikroorganisme, pemanfaatan bakteri endofit sebagai agens hayati menjadi pilihan menarik. Bakteri endofit mampu menghasilkan enzim kitinase, pektinase, metabolit antimikroba, siderofor, dan hormon IAA yang berperan dalam menekan pertumbuhan patogen sekaligus mendukung kesehatan tanaman (Haggag, 2010; Mishra et al., 2022). Salah satu komponen penting yang dihasilkan bakteri endofit adalah kitinase. Enzim ini berfungsi mengkatalisis pemecahan kitin dengan cara menghidrolisis ikatan β -1,4 N-asetilglukosamina (NacGlc) pada kitin, yaitu polimer polisakarida penyusun dinding sel beberapa fungi patogen dan eksoskeleton invertebrata. Karena sifat tersebut, kitinase dikenal luas sebagai agen antifungal yang efektif (Harni et al., 2021a). Untuk mendapatkan organisme penghasil kitinase, eksplorasi dan isolasi biasanya dilakukan pada medium yang mengandung kitin (Cahyo, 2019).

Informasi mengenai eksplorasi bakteri endofit pada daun karet sebagai agen pengendali penyakit gugur daun hingga saat ini masih terbatas. Sebagian besar penelitian terdahulu berfokus pada satu jenis patogen atau mengandalkan metode kultur konvensional, sehingga tidak mampu memberikan gambaran menyeluruh mengenai struktur komunitas mikroba. Keterbatasan ini diperparah oleh fakta bahwa sebagian besar mikroorganisme tidak dapat dikultur menggunakan media standar.

Perkembangan teknologi molekuler, khususnya *Next Generation Sequencing* (NGS), memungkinkan identifikasi komunitas mikroba secara komprehensif melalui pendekatan metagenomik. Analisis berbasis gen 16S rRNA dan ITS telah digunakan untuk memetakan keragaman, kelimpahan, serta struktur komunitas bakteri dan jamur pada jaringan tanaman bergejala maupun tidak bergejala (Wensel et al., 2022).

Meskipun pendekatan metagenomik memberikan informasi yang luas, metode kultur tetap diperlukan untuk memperoleh isolat nyata yang dapat diuji aktivitas antagonisnya terhadap patogen. Berdasarkan pertimbangan tersebut, penelitian ini mengintegrasikan metode kultur dan metagenomik untuk mengidentifikasi patogen penyebab gugur daun serta mengeksplorasi bakteri endofit potensial sebagai agens biokontrol.

1.2. Rumusan Masalah

Adapun rumusan masalah dalam penelitian ini adalah sebagai berikut:

- a. Bagaimana keragaman dan komposisi cendawan patogen pada daun bergejala dan tidak bergejala tanaman *Hevea brasiliensis* berdasarkan analisis metagenomik?
- b. Apakah terdapat perbedaan struktur komunitas mikroba antara daun bergejala dan tidak bergejala?
- c. Mikroorganisme patogen apa saja yang dapat diisolasi melalui metode kultur, dan bagaimana karakter morfologi serta identifikasi molekulernya?
- d. Bakteri endofit apa saja yang dapat diisolasi dari daun karet, dan bagaimana potensi antagonistiknya terhadap cendawan patogen penyebab penyakit gugur daun?

1.3. Tujuan dan Manfaat

Tujuan dari penelitian ini adalah sebagai berikut:

- a. Menganalisis keragaman mikroorganisme patogen pada daun bergejala dan tidak bergejala menggunakan pendekatan metagenomik.
- b. Mengisolasi dan mengidentifikasi bakteri endofit dan jamur patogen melalui metode kultur dan identifikasi molekuler.
- c. Menilai potensi antagonistik bakteri endofit terhadap cendawan patogen secara *in vitro*.
- d. Mengintegrasikan data kultur dan metagenomik untuk menentukan kandidat bakteri endofit potensial sebagai agens biokontrol.

Kerangka Pikir Penelitian

Penyakit gugur daun pada *Hevea brasiliensis* disebabkan oleh beberapa spesies cendawan patogen yang memiliki mekanisme infeksi dan sebaran berbeda pada tiap kondisi lingkungan. Serangan patogen menyebabkan defoliasi, penghambatan metabolisme fotosintesis, penurunan pertumbuhan, hingga berkurangnya produksi lateks. Pada kondisi lapangan, patogen tidak hanya terdiri atas satu jenis spesies, sehingga identifikasi patogen penting dilakukan secara menyeluruh, baik melalui pendekatan kultur maupun molekuler.

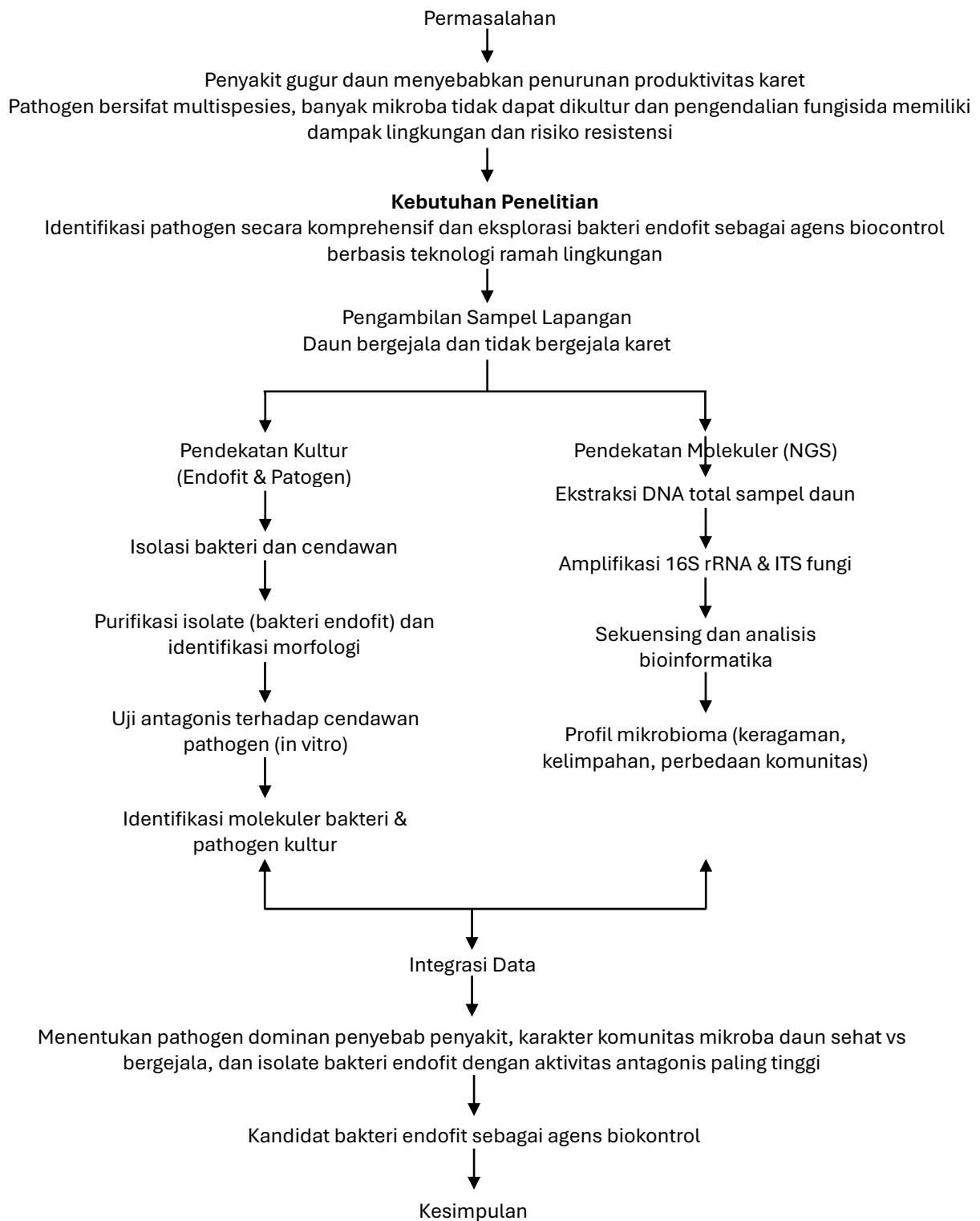
Bakteri endofit diketahui mampu menghasilkan metabolit antimikroba, enzim pendegradasi dinding sel patogen, siderofor, serta hormon tumbuh yang dapat meningkatkan ketahanan tanaman. Oleh karena itu, eksplorasi bakteri endofit sebagai agens biokontrol diharapkan menjadi alternatif pengendalian ramah lingkungan. Namun, sebagian besar penelitian terdahulu hanya mengandalkan isolasi kultur, padahal banyak mikroorganisme tidak dapat tumbuh di media buatan sehingga keberadaannya hanya dapat terdeteksi melalui analisis metagenomik.

Pendekatan *Next Generation Sequencing* (NGS) berbasis gen 16S rRNA (bakteri) dan ITS (fungi) mampu memetakan komunitas mikroba, membandingkan struktur mikrobioma daun bergejala dan tidak bergejala, serta mengidentifikasi patogen dominan. Sementara itu, metode kultur memberikan isolat nyata untuk diuji secara biologis terhadap patogen sehingga menghasilkan kandidat bakteri biokontrol yang aplikatif.

Integrasi kedua pendekatan ini (kultur dan metagenomik) menjadi dasar logis penelitian. Pertama, sampel daun sehat dan bergejala dikumpulkan dari lapangan. Bagian pertama sampel dianalisis menggunakan NGS untuk mengetahui keragaman mikrobioma. Bagian kedua dilakukan isolasi bakteri dan cendawan melalui kultur. Bakteri yang berhasil diisolasi diuji antagonis terhadap patogen secara *in vitro*, kemudian diidentifikasi secara molekuler. Data komunitas mikroba, hasil uji antagonis, serta identifikasi molekuler kemudian dianalisis bersama untuk menentukan patogen dominan dan kandidat bakteri endofit potensial sebagai agens biokontrol.

Hasil akhir penelitian diharapkan mampu memberikan data dasar identifikasi patogen gugur daun pada *H. brasiliensis*, memahami perbedaan komunitas mikroba antara daun bergejala dan tidak bergejala, serta menghasilkan kandidat bakteri antagonis yang dapat dikembangkan dalam formulasi biofungisida ramah lingkungan untuk pengendalian penyakit pada tanaman karet

Kerangka Berpikir Penelitian



BAB II. METODOLOGI PENELITIAN

2.1. Waktu dan Tempat

Penelitian dilaksanakan mulai bulan November 2023 hingga Februari 2024. Pelaksanaan penelitian ini dibagi menjadi dua tahap yaitu pengambilan sampel penelitian yang berlokasi di Kabupaten Tebo, Provinsi Jambi. Isolasi, identifikasi, dan karakterisasi mikroba dari daun *H. brasiliensis* akan dilakukan Badan Riset dan Inovasi Nasional, Jl. Raya Jakarta-Bogor No. 32, Kec. Cibinong, Kab. Bogor, Jawa Barat.

2.2. Alat dan Bahan

Alat yang digunakan untuk pengambilan sampel di lapangan yaitu *cutter*, pita ukur, GPS, *tallysheet*, kamera digital, gunting, alat tulis menulis, *coolerbox*, spidol permanen, dan kantong klip plastik. Bahan yang digunakan adalah *ice gel*, kertas label, *hand gloves*, dan sampel daun karet bergejala penyakit dan tidak bergejala penyakit sebanyak enam helai yang masing-masing diambil mewakili plot tanam.

Alat yang digunakan untuk pengerjaan di tingkat laboratorium yaitu sebagai *Laminar Air Flow* (LAF), *autoklaf*, *incubator*, mikropipet, tip steril, cawan petri, tabung kultur, jarum ose, *spreader*, spektrofotometer, mesin PCR, dan elektroforesis gel. Sedangkan bahan yang digunakan yaitu daun karet bergejala dan tidak bergejala, etanol 70%, NaOCl 1-2% untuk sterilisasi permukaan, media *Nutrient Agar* (NA), *Potato Dextrose Agar* (PDA), reagen ekstraksi DNA, primer universal 16S rRNA dan ITS, marker DNA, agarose, dan *buffer TAE*.

2.3. Studi Metagenomik

2.3.1. Persiapan Sampel

Studi metagenomik dilakukan pada daun karet yang terserang menunjukkan tanda dan gejala penyakit gugur daun (symptomatic) dan yang tidak menunjukkan penyakit gugur daun (asymptomatic). Sampel di ambil dari lokasi perkebunan karet area Jambi.

2.3.2. Ekstraksi DNA Jaringan Tanaman

Ekstraksi DNA daun karet dilakukan menurut prosedur kit ekstraksi DNA (Nucleon Phytopure Genomic DNA Extraction Kit) dengan modifikasi. Daun digerus dalam mortar sampai lembut, untuk merusak dinding sel. Proses pelisisan sel dilakukan dengan menambahkan 500µL Reagen PHYTOPURE I dalam mortar, kemudian diratakan dan digerus kembali secara perlahan. Campuran yang telah halus dituangkan ke dalam tube 1,5mL, lalu ditambahkan 400µL Reagen PHYTOPURE II dan dihomogenisasi secara perlahan. Selanjutnya diinkubasi pada perlakuan suhu dan lama inkubasi yang berbeda (yaitu: suhu 60°C, 65°C, dan 70°C masing-masing selama 10 dan 20 menit) dalam gelas beker berisi air di atas pemanas hot plate. Setelah diinkubasi, kemudian *tube* dimasukkan dalam *ice box* selama 20 menit. Tahap ekstraksi DNA dilakukan dengan menambahkan 400µL kloroform dingin dan 20µL Resin PHYTOPURE ke dalam *tube*, kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm untuk mengendapkan komponen sel dan kontaminan. Hasil dari sentrifugasi berupa tiga lapisan yang terdiri dari supernatan, kompleks resin dan debris sel, dan kloroform. Supernatan diambil dan dipindahkan ke dalam tube baru lalu ditambahkan isopropanol dingin melalui dinding tube sejumlah volume supernatan yang dimasukkan ke dalam tube (1:1), kemudian dibolak-balik perlahan sampai terlihat benangbenang halus DNA. Selanjutnya, tube disentrifugasi dengan kecepatan 12.000rpm selama 10 menit untuk mengendapkan DNA. Setelah itu dihasilkan pelet DNA berwarna putih pada dasar tube. Supernatan dibuang dan pelet dicuci dengan menambahkan 100µL etanol 70%, lalu disentrifugasi kembali dengan kecepatan 10.000rpm selama 5 menit. Proses pencucian ini dilakukan sebanyak tiga kali. Etanol dibuang, pelet DNA dikering anginkan (tube dapat dibalik untuk mempercepat pengeringan), lalu ditambahkan TE 1X sebanyak 50µL. Penyimpanan DNA hasil ekstraksi yaitu di dalam freezer dengan suhu -20°C.

2.4. Next Generation Sequencing (NGS) dan Analisis Metagenomik

Komunitas jamur dan bakteri dari sampel daun dianalisa menggunakan Next Generation Sequencing (NGS) dari gen ITS (jamur) dan 16S rRNA (bakteri) pada platform Illumina Miseq di Singapura. Gen ITS diamplifikasi dari gDNA sampel daun dengan primer ITS amplicon PCR forward ITS1-30F dan Reverse ITS1- primer universal (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Sedangkan gen 16S rRNA diamplifikasi dari gDNA sampel daun dengan primer 16S Amplicon PCR dan Reverse primer universal (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA).

Amplifikasi PCR dilakukan sebanyak 25 siklus, menggunakan 12,5 ng DNA dan KAPA HiFi Hot Start Ready Mix (KAPA Biosystems), dengan denaturasi pada 95 C selama 30 detik, annealing pada 55 C selama 30 detik dan ekstensi pada 72 C selama 30 detik. Untuk menambahkan tag indeks Illumina ke ujung amplicon, Kit Indeks Nextera XT digunakan (Illumina, San Diego, CA, USA) dengan primer indeks 502, 503, 504, dan 701, 702, 703, 704, 705, 706. PCR dilakukan oleh KAPA HiFi Hot Start Ready Mix (KAPA) dengan parameter sebagai berikut: 8 siklus denaturasi pada 95 C selama 30 detik, annealing pada 55 C selama 30 detik dan ekstensi pada 72 C selama 30 detik. Untuk validasi library, 1 L final library diencerkan dijalankan pada chip Bioanalyzer DNA 100 pada Agilent Bioanalyzer (Agilent Technologies, USA). Pustaka dikumpulkan, dan dimuat ke platform Illumina MiSeq untuk pengurutan ujung berpasangan 2 × 250 bp. Analisa data menggunakan bioinformatika.

2.5. Isolasi dan Karakterisasi Bakteri Potensial

2.5.1. Pembuatan Media & Reagen

2.5.1.1. Media NA

Isolasi Bakteri dilakukan dengan mengisolasi bakteri endofit dan bakteri filosfer daun tanpa gejala (sehat) menggunakan media NA (Nutrient Agar). Sebelum dilakukan isolasi bakteri didahului dengan pembuatan media NA, Penyiapan alat dan bahan (Sterilisasi). Tahapan pembuatan media NA dilakukan dengan menimbang sebanyak 5,6g NA dan dimasukkan ke dalam erlenmeyer 250 ml yang berisikan 200 ml aquades. Erlenmeyer kemudian ditutup menggunakan sumbat kasa yang dilapisi kertas bekas dan plastik diatasnya, kemudian sumbat tersebut direkatkan dengan karet. Media NA kemudian disterilisasi menggunakan *Autoclave* pada suhu 121°C dan tekanan 2 ATM selama 15 menit. Media yang telah disterilisasi dan didinginkan sampai suhu 45-50°C dapat dituang sebanyak 12-13 ml pada masing-masing cawan.

2.5.1.2. Media Agar Miring

Tahapan pembuatan media agar miring sebagai berikut yaitu sebanyak 5,6g NA ditimbang dan dimasukkan ke dalam erlenmeyer 250 ml yang berisikan 200 ml aquades. Media dalam Erlenmeyer dihomogenkan dan dimasak sampai mendidih dengan *microwave*. Sebanyak 200 ml media NA dibagi sebanyak 5 ml ke dalam masing-masing 40 tabung reaksi. Tabung reaksi ditutup menggunakan sumbat kasa. Tabung reaksi disterilisasi menggunakan Autoclave pada suhu 121°C dan tekanan 2 ATM selama 15 menit. Setelah disterilisasi, saat medium dalam keadaan masih cair (sekitar suhu 45-50°C), tabung reaksi harus dimiringkan dengan derajat kemiringan 160-170°. Media NA dalam agar miring kemudian didiamkan pada suhu ruang selama 5-7 hari.

2.5.1.3. Media NB

Pengujian bakteri penghasil hormon IAA terlebih dahulu dilakukan proses sterilisasi alat dan bahan yang akan digunakan serta pembuatan media kultur. Media kultur bakteri yang digunakan adalah media NB (*Nutrient Broth*), tahapan pembuatan media NB yaitu sebanyak 1,6 g NB ditimbang dan dimasukkan ke dalam erlenmeyer 250 ml yang berisikan 200 ml aquades dan dihomogenkan. Sebanyak 200 ml media NB dibagi sebanyak 5 ml ke dalam masing-masing 40 tabung reaksi. Tabung reaksi ditutup menggunakan sumbat kasa. Tabung reaksi disterilisasi menggunakan *autoclave* pada suhu 121°C dan tekanan 2 ATM selama 15 menit. Setelah disterilisasi media NB kemudian didiamkan selama 1 hari.

2.5.1.4. Reagen Salkowski

Proses pengujian bakteri penghasil hormon IAA terdapat *Reagen Salkowski*. Adapun tahapan pembuatan reagen tersebut adalah sebanyak 16,6 ml akuades steril dimasukkan ke dalam Erlenmeyer yang terlebih dahulu dibungkus dengan aluminium foil. Penambahan 10 ml H_2SO_4 ke dalam Erlenmeyer berisi aquades harus dilakukan di dalam lemari asam. Saat menuang H_2SO_4 ke dalam akuades akan terjadi reaksi kedua larutan menyebabkan larutan mendidih, sehingga perlu untuk menunggu sampai suhu larutan turun. Saat suhu larutan turun kemudian ditambahkan dengan 1,5M $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ sebanyak 0,5 ml. kemudian dihomogenkan. Erlenmeyer ditutup dengan aluminium foil.

2.5.2. Isolasi dan Karakterisasi Bakteri Potensial

2.5.2.1. Isolasi Bakteri Endofit

Tahapan isolasi bakteri Endofit dilakukan di dalam *Laminar Air Flow* menggunakan metode sterilisasi permukaan mengikuti Fisher *et al.*, (1992) dan Kabir *et al.*, (2023) dengan modifikasi waktu menyesuaikan sampel daun *D. celebica*. Tahapan isolasi bakteri endofit dijabarkan sebagai berikut:

- a. Sampel daun tanpa gejala (daun sehat) dari masing-masing pohon dipotong dalam 3 bagian pangkal, tengah dan ujung daun dengan ukuran 3-4 cm. bagian daun yang diambil harus daun yang tidak ada bercak atau bintik (daun sehat).
- b. Ketiga bagian daun tersebut kemudian dibersihkan dari kotoran atau debu yang menempel pada daun dengan akuades steril. Masing-masing daun dari pohon yang berbeda direndam atau dibersihkan menggunakan gelas beker yang berbeda.
- c. Sampel daun yang telah dibersihkan, kemudian direndam dengan Alkohol 70% selama 30 detik (menggunakan gelas beker berbeda untuk masing-masing sampel).
- d. Sampel daun kemudian direndam dengan NaOCl 2,5% selama 60 detik (menggunakan gelas beker berbeda untuk masing-masing sampel).
- e. Sampel daun selanjutnya dibilas sebanyak 4 kali dengan akuades steril. Sampel daun dikeringkan dengan tisu steril.
- f. Sampel daun dipotong menggunakan *scalpel* membentuk persegi dengan ukuran 1-2 cm pada masing-masing sisi. Pada bagian bawah daun digores sampai daun menjadi tipis.
- g. Potongan daun diletakkan pada media NA dalam cawan petri, peletakan daun harus memosisikan permukaan atas daun bersentuhan dengan media NA. Cawan petri kemudian ditutup dan diberikan *plastik wrap* pada sisi samping cawan agar menghindari kontaminasi mikroba pada saat inkubasi.
- h. Sebanyak 1 ml akuades sisa pencucian terakhir diletakkan dan diratakan menggunakan *Spreader* diatas permukaan media NA. Tahapan ini bertujuan memastikan tidak adanya kontaminasi mikroba lain pada sampel daun yang ditumbuhkan.
- i. Potongan daun dan akuades sisa sterilisasi yang ditumbuhkan pada media NA kemudian diinkubasi pada suhu $28^{\circ}C$ selama 12-24 jam.
- j. Koloni bakteri yang telah tumbuh pada bagian filosfer daun (yang tidak terluka) dipurifikasi atau dipindahkan ke media NA baru, kemudian diinkubasi pada suhu $28^{\circ}C$ selama 12-24 jam.
- k. Koloni tunggal yang diperoleh dari hasil purifikasi kemudian diremajakan atau ditumbuhkan pada media agar miring (NA) pada tabung reaksi dan diinkubasi selama 12 jam pada suhu ruang.
- l. Isolat bakteri pada media agar miring kemudian diambil sebanyak 1 ose dan dimasukkan ke dalam gliserol 1ml dan disimpan pada suhu $-20^{\circ}C$. untuk penyimpanan jangka panjang.

2.5.2.2. Uji Bakteri Penghasil Hormon IAA

Karakterisasi bakteri potensi dilakukan dengan uji bakteri penghasil hormon IAA, penambat nitrogen dan pelarut fosfat. Adapun tahapan uji bakteri penghasil hormon IAA adalah sebagai berikut (Bric *et al.*, 1991)

Sebanyak 0,01 ml *Tryptophan* dimasukkan ke dalam 5 ml media NB. Kemudian disimpan pada suhu ruang selama 24 jam.

- Satu ose isolat bakteri diinokulasi ke media NB+*Tryptophan* kemudian inkubasi dengan *Shaker Incubator* pada suhu 28°C kecepatan 150 rpm selama 24-48 jam.
- Sebanyak 2 ml kultur bakteri dipindahkan ke *Eppendorf tube* 2 ml dan disentrifugasi pada suhu 4°C kecepatan 10.000 rpm selama 10 menit untuk memisahkan pellet dan supernatan.
- Dua ml supernatan dipindahkan ke tabung reaksi dan ditambahkan 2 ml *Reagen Salkowski* kemudian diinkubasi 60 menit pada suhu ruang (gelap).
- Pengamatan kualitatif dengan melihat perubahan warna pada tabung reaksi, perubahan warna dari kuning menjadi merah muda mengindikasikan adanya hormon IAA yang dihasilkan isolat bakteri.
- Pengamatan kuantitatif dengan mengukur absorbansi. Nilai absorbansi diperoleh dari *Spektrofotometer* dengan panjang gelombang 530 nm. Konsentrasi IAA diperoleh dengan memasukkan nilai absorbansi kedalam persamaan kurva standar IAA.

2.5.2.3. Uji Bakteri Penghasil Kitinase

Uji kualitatif kitinase mengikuti Ahmed et al. (2014), Linda et al. (2018) dan Harvinda et al. (2023). Koloidal kitin dibuat dari kitin cangkang udang (SigmaAldrich). Sebanyak 20 g kitin dilarutkan dalam 150 ml HCl 37% dan dihomogenkan dengan *magnetic stirrer* selama 1 jam. Larutan disaring menggunakan glass wool. Hasil saringan ditampung dalam 800 ml akuades steril dingin (4 °C) dan diinkubasi pada suhu 4 °C selama 24 jam. Endapan akan terbentuk sebagai koloid kitin. Kemudian bilas dengan air secara terus menerus sampai pH netral. Endapan kitin dikumpulkan melalui sentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm selama 10 menit.

Setelah koloidal kitin didapatkan, selanjutnya disiapkan media Colloidal Chitin Agar (CCA) dengan komposisi terdiri dari K₂HPO₄ 0,07% (w/v), KH₂PO₄ 0,03% (w/v), MgSO₄.5H₂O 0,05% (w/v), MnCl₂ 0,0001% (w/v), ZnSO₄ 0,0001% (w/v), bacto agar 2% (w/v) dan koloidal kitin 2% (w/v). Sebanyak 20 µl kultur bakteri dari media NB diinokulasikan pada kertas cakram steril (d = 0,8 mm, Whatman No.1) dan ditempatkan pada permukaan media koloidal kitin dengan menggunakan pinset steril. Kemudian diinkubasi pada suhu 37 °C selama 7 hari untuk menghitung indeks kitinolitik. Indeks kitinolitik diperoleh dengan cara membandingkan diameter zona bening yang terbentuk dengan diameter koloni yakni sebagai berikut:

$$IK = \frac{D1}{D2}$$

Keterangan:

IK = Indeks kitinolitik

D1 = Diameter zona bening

D2 = Diameter koloni bakteri

2.5.2.4. Uji Antagonis

Uji antagonis bertujuan untuk melihat kemampuan bakteri menghambat pertumbuhan jamur patogen. Tahapan uji antagonis menggunakan metode Dual Culture (Pretscher et al., 2018).

- Efek antagonis bakteri diuji dengan menumbuhkan satu ose bakteri dan satu ose isolat jamur patogen dalam satu cawan petri berisi media PDA.
 - Posisi isolat jamur diletakan ditengah cawan dan isolat bakteri digores di 4 sisi jamur dengan jarak 3 cm.
- c. Analisa anatogistik dihitung menggunakan persentase waktu penutupan permukaan cawan petri oleh bakteri dan pengamatan efek yang ditimbulkan bakteri terhadap jamur patogen (Leiwakabessy et al.,

2019). Perhitungan PIRG (Percentage Inhibition of Radial Growth) menggunakan persamaan (Leiwakabessy et al., 2019, Skidmore & Dickinson, 1976).

2.5.2.5. Identifikasi Molekuler Bakteri Potensial Biokontrol

Isolat Bakteri potensial identifikasi molekuler menggunakan gen 16S rRNA. Proses Identifikasi didahului dengan proses PCR menggunakan primer 1492R dan 27F. Tahapan PCR Colony sebagai berikut (Noer, 2021):

- a. Satu ose isolat bakteri dimasukkan ke dalam tube pcr, kemudian isolat tersebut dipanaskan dengan microwave dengan suhu 50°C selama 40 detik.
- b. PCR Mix disiapkan di tube berbeda (total volume 25 µl/isolat) menggunakan Kit Mytaq HS Red. PCR mix terdiri dari primer forward dan reverse masing-masing sebanyak 1,5 µl, master mix Gotaq green sebanyak 12,5 µl dan nuclease free water sebanyak 7 µl. Master Mix campur di dalam PCR tube.
- c. Master mix kemudian divortex dan dispin down, selanjutnya ditambahkan 2 µl Template Larutan PCR kemudian divortex dan dispin down. Larutan PCR selanjutnya dimasukkan ke mesin PCR dengan kondisi PCR, Pra-Denaturasi 95°C selama 1 menit; Denaturasi 95°C selama 30 detik; Annealing 53°C selama 30 detik; Extension 72°C selama 1 menit; Pra-Extension 72°C selama 5 menit, Final Hold 4°C dengan waktu yang tidak ditentukan. Proses Amplifikasi sebanyak 30 siklus.
- d. Hasil PCR divisualisasikan menggunakan Gel Doc. Pita yang terang mengindikasikan proses PCR berhasil. Selanjutnya PCR mix dikirim ke Genetika science untuk dilakukan proses Sekuensing.
- e. Hasil sekuens DNA diedit menggunakan program MEGA versi 11. Pencarian sekuens menggunakan BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) dan dibandingkan dengan database pada NCBI (Sulistiani & Hidayat, 2020).

2.6. Identifikasi Morfologi dan Mikroskopis Jamur Patogen

Isolat Jamur hasil Isolasi pada cawan petri diidentifikasi dengan melihat ciri-ciri makroskopis seperti warna, bentuk miselia, serta tampilan permukaan koloni, dan ukuran diameter koloni. Identifikasi mikroskopis mencakup pengukuran bentuk konidia, hifa, serta memeriksa keberadaan septa. Hasil identifikasi disesuaikan dengan karakteristik jamur dalam buku panduan identifikasi (Putra et al, 2022). Isolat jamur yang telah diidentifikasi dilanjutkan dengan penentuan jamur patogen. Penentuan jamur patogen menggunakan studi literatur yakni memadukan ciri-ciri makroskopis dan mikroskopis jamur dengan hasil karya penelitian atau tulisan terkait tentang jamur patogen pada tanaman.

2.6.1. Isolasi DNA dan Identifikasi Molekuler Jamur Patogen

Isolasi DNA fungal patogen mengikuti protocol Yeastar Genomic DNA Kit. Adapun tahapan isolasi DNA menggunakan Yeastar Genomic DNA Kit adalah sebagai berikut:

- a. 1 ml spora jamur dalam Eppendorf Tube disentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm selama 2 menit
- b. Pellet ditambahkan 120 µl YD Digestion dan 5 µl R-zymolyase (RNase A +Zymolase), selanjutnya diinkubasi pada suhu 37°C selama 60 menit.
- c. Larutan step 2 ditambahkan 120 µl YD Lysis Buffer, kemudian divortex selama 10 detik.
- d. Larutan step 3 disentrifugasi dengan kecepatan 12.000 rpm selama 2 menit
- e. Supernatan dipindahkan ke Zymospin II Colum, kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 12.000 rpm selama 1 menit
- f. Supernatan dibuang, kemudian 300 µl DNA Wash Buffer dimasukkan ke dalam Zymospin II Colum dan disentrifugasi dengan kecepatan 12.000 rpm selama 1 menit (dua kali proses)
- g. Zymospin II Colum dipindahkan ke Eppendorf Tube baru, lalu ditambahkan 40 µl NFW (Nuclease Free Water) kemudian diinkubasi selama 5 menit.
- h. Larutan pada step tujuh disentrifugasi 12.000 rpm selama 1 menit. Supernatan yang dihasilkan merupakan DNA murni jamur.

Setelah proses Isolasi DNA jamur, Selanjutnya dilakukan Amplifikasi DNA. Isolat DNA terpilih PCR menggunakan primer ITS1/4 atau 18S (NS1-NS8). Tahapan Amplifikasi DNA jamur adalah sebagai berikut:

- a. Sebelum running PCR dilakukan menggunakan mesin PCR terlebih dahulu dibuatkan larutan PCR Mix menggunakan KOD One yang terdiri dari 12,5 µl KOD fix, Primer NS1 0,75 µl, Primer NS8 0,75 µl, dan NFW 9 µl. Master Mix campur di dalam PCR *Cabinet*.
- b. Master mix kemudian di-*vortex* dan di-*spindown*, selanjutnya ditambahkan 2µl *template* DNA jamur.
- c. Larutan PCR kemudian di-*vortex* dan di-*spindown*. Larutan PCR selanjutnya dimasukan ke mesin PCR dengan pengaturan suhu Pra-Denaturasi 94°C selama 4 menit; Denaturasi 94°C selama 30 detik; Aneling 55°C selama 45 detik; Extesion 72°C selama 1 menit; Pra-Extention 72°C selama 4 menit, Final Hol 4°C dengan waktu yang tidak ditentukan. Proses Amplifikasi sebanyak 30 siklus.
- d. Hasil PCR divisualisasikan menggunakan Gel Doc. Pita yang terang mengindikasi proses isolasi dan amplifikasi DNA jamur berhasil. Selanjutnya PCR mix dikirim ke Genetika science untuk dilakukan proses Sekuensing.

Hasil sekuen DNA diedit menggunakan program MEGA versi 11. Pencarian sekuen menggunakan BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) dan dibandingkan dengan database pada NCBI (Sulistiani & Hidayat, 2020) untuk memperoleh spesie mikroba (Sulistiani & Hidayat, 2020).