

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Jenis Penelitian

Penelitian yang dilakukan berupa penelitian murni yang dilakukan dengan metode deskriptif, yaitu suatu metode penelitian untuk membuat deskripsi, gambaran atau lukisan secara sistematis, faktual dan akurat mengenai fakta-fakta, sifat-sifat serta hubungan antar fenomena yang diselidiki (Nazir, 1988: 64).

B. Populasi dan Sampel

Populasi yang diamati pada penelitian ini adalah seluruh bakteri endofit pada batang *Vetiveria zizanioides* L. Sedangkan sampel yang diamati pada penelitian ini adalah bakteri endofit pada batang *Vetiveria zizanioides* L.

C. Waktu dan Lokasi Penelitian

Penelitian dilakukan bulan Maret 2011 sampai Juni 2011. Penelitian dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Jurusan Pendidikan Biologi FPMIPA UPI Bandung.

D. Alat dan Bahan

Alat dan bahan yang digunakan terdapat di Laboratorium Mikrobiologi Jurusan Pendidikan Biologi FPMIPA UPI. Daftar alat dan bahan disajikan pada Lampiran 3.

E. Langkah Kerja

1. Tahap persiapan

Alat-alat yang akan digunakan dicek terlebih dahulu kemudian dicuci dan dikeringkan. Alat kemudian dibungkus dengan kertas pembungkus, disterilisasi panas lembab dengan menggunakan *autoclave* selama 15-20 menit pada suhu 121°C dengan tekanan 15 lb. Medium NA (*Nutrient Agar*) untuk menumbuhkan bakteri dari batang *Vetiveria zizanioides* L. dan medium lain yang digunakan selama penelitian juga disterilkan selama 15 menit.

2. Tahap Penelitian

a. Pengambilan Sampel

Untuk mengambil sampel bakteri endofit dilakukan dengan cara mengambil tanaman *Vetiveria zizanioides* L. kemudian dimasukkan ke dalam plastik. Pengambilan sampel dilakukan di Perkebunan Usar Kamojang, Kabupaten Garut. Sampel tanaman diambil dari tiga titik sebagai pengulangan. Dari tanaman yang diambil, organ yang digunakan adalah batang. Selain pengambilan sampel, pengukuran faktor lingkungan yang dilakukan mencakup ketinggian tempat, suhu udara, kelembaban udara, pH tanah, serta intensitas cahaya diukur pada lokasi pencuplikan sampel *V. zizanioides*.

b. Isolasi Bakteri

Bakteri diisolasi dari batang *Vetiveria zizanioides* L. Batang dipotong-potong 3-5 cm menggunakan gunting steril kemudian dilakukan sterilisasi permukaan dengan merendam batang yang telah dipotong-potong dengan larutan etanol 75% selama 2 menit, larutan sodium hipoklorit 5,3% selama 5 menit, dan etanol 75% selama 30 detik. Batang kemudian dibilas dengan aquades steril sebanyak 2 kali dan dikeringkan menggunakan kertas saring steril. Setelah kering, bagian ujung kanan dan kiri dipotong ± 1 cm. dan diletakkan pada permukaan medium NA (Simarmata *et al.*, 2007; Roy *et al.*, 2010) dengan posisi bekas potong ke arah medium.

c. Pengamatan Morfologi dan Isolasi Biakan Murni

Pengamatan morfologi dilakukan setelah diinkubasi selama 48 jam. Ciri morfologi koloni yang diamati diantaranya bentuk, warna, kenampakan bakteri (mengkilat atau suram), kenaikan permukaan (elevasi), dan tepian. Pengamatan morfologi bakteri merujuk kepada Cappuccino & Sherman (2005),

Koloni-koloni yang tumbuh pada cawan petri merupakan biakan umum bakteri yang tumbuh dari batang *Vetiveria zizanioides* L. Setiap koloni dipindahkan 1 ose ke dalam cawan petri berisi Medium NA agar diperoleh biakan murni, hal tersebut dilakukan untuk mempermudah dalam tahap identifikasi selanjutnya.

d. Uji Pewarnaan Gram Bakteri

Pewarnaan Gram dilakukan untuk mengetahui karakteristik dan bentuk sel bakteri. Bakteri yang akan diuji pewarnaan Gram berumur 24 jam. Setiap bakteri dibuat sediaan mikroskopik dengan mengambil bakteri menggunakan ose. Pada kaca objek ditetaskan air, kemudian ose digoyangkan ke dalam tetesan air sampai bakteri menyebar. Setelah kering, gerakkan beberapa kali di atas api Bunsen kemudian sediaan dituangi dengan karbol kristal violet. Setelah dibiarkan selama tiga menit, kelebihan zat warna dibuang dan dituangi lugol selama 45-60 detik. Sediaan yang telah dituangi lugol dimasukkan ke dalam *staining jar* berisi alkohol 96%, digoyang selama satu menit lalu dibilas dengan aquades dan dikeringkan dengan kertas isap. Safranin dituangkan di atas sediaan yang telah kering dan dibiarkan selama tiga menit. Sediaan dicuci dengan aquades menggunakan botol semprot dan dikeringkan di udara. Sediaan yang akan diamati, diberi minyak imersi terlebih dahulu. Pengamatan dilakukan dibawah mikroskop dengan menggunakan perbesaran 1000 kali. Hasil pewarnaan berwarna ungu jika sel bakteri berjenis Gram positif dan berwarna merah jika berjenis Gram negatif (Cappuccino & Sherman, 2005).

e. Uji Resistensi Antibiotik

Isolat bakteri endofit ditumbuhkan pada Medium NA dan diinkubasi selama 24 jam. Uji resistensi antibiotik menggunakan metode Difusi Cakram *Kirby Bauer* (Capuccino & Sherman, 2005; Kumar, 2008; Kumala *et al.*, 2004). Antibiotik yang digunakan

diantaranya Ampisilin 10 mg/ml, Tetrasiklin 30 µg/ml (Kumala *et al.*, 2004, Jalal *et al.*, 2010), dan Streptomisin 10 µg/ml (Middleton & Ambrose, 2005). Koloni bakteri endofit dibuat suspensi dalam larutan NaCl 0,85% sampai standar kekeruhan *Mac Farland*. Diambil 1 ml dan dimasukkan ke dalam cawan petri yang kemudian dituang oleh Medium NA yang hangat-hangat kuku. Cakram antibiotik ampisilin, tetrasiklin, dan streptomisin ditempelkan pada agar yang telah beku. Satu cawan petri ditempelkan tiga jenis antibiotik dan dikerjakan secara duplo (Kumala *et al.*, 2004). Selanjutnya cawan petri diinkubasi selama 1x24 jam. Diamati dan diukur zona beningnya. Ukuran zona bening akan menjadi hasil untuk menyatakan bakteri resisten, intermediet, atau sensitif (Cappuccino & Sherman, 2005).

f. Uji Biokimia

Hidrolisis pati menggunakan Medium Agar Pati. Medium Agar Pati dicairkan dalam penangas air, suhu didinginkan sampai 45°C atau hangat-hangat kuku. Medium dituangkan ke dalam cawan petri steril. Setelah medium membeku, masing-masing isolat bakteri diinokulasikan ke dalam Medium Agar Pati dan diinkubasi pada suhu 25-27°C selama 24 jam. Setelah terlihat adanya pertumbuhan, larutan iodium dituangkan pada medium yang berisi biakan dan dibiarkan selama beberapa menit. Hasil positif terjadi hidrolisi pati oleh enzim amilase terlihat adanya daerah bening di sekitar koloni (Cappuccino & Sherman, 2005).

Medium Lipid Agar digunakan untuk mengetahui kemampuan bakteri untuk menghidrolisis lipid dengan bantuan enzim lipase. Medium Lipid Agar dicairkan dalam penangas air, suhu didinginkan sampai 45°C atau hangat-hangat kuku. Medium dituangkan ke dalam cawan petri steril. Setelah medium membeku, masing-masing isolat bakteri diinokulasikan ke dalam Medium Lipid Agar dan diinkubasi pada suhu 25-27°C selama 24 jam. Hasil uji hidrolisis lipid positif apabila terdapat zona bening di sekitar koloni atau perubahan medium lipid yang telah ditambahkan indikator *neutral red* menjadi warna merah pada bagian bawah koloni bakteri (Cappuccino & Sherman, 2005).

Kemampuan bakteri untuk menghidrolisis kasein dapat dibuktikan dengan menginokulasi bakteri pada Medium Susu Skim Agar. Medium Susu Skim Agar dicairkan dalam penangas air, suhu didinginkan sampai 45°C atau hangat-hangat kuku. Medium kemudian dituangkan ke dalam cawan petri steril. Setelah medium membeku, masing-masing isolat bakteri diinokulasikan ke dalam Medium Susu Skim Agar dan diinkubasi pada suhu 25-27°C selama 24 jam. Pertumbuhan disekitar koloni bakteri diamati. Hasil uji hidrolisis kasein positif apabila terdapat zona bening di sekitar koloni (Cappuccino & Sherman, 2005).

Pada uji fermentasi karbohidrat, bakteri diinokulasikan pada masing-masing tabung yang berisi Medium Laktosa, Medium

Sukrosa, dan Medium Dekstrosa. Di dalam tabung tersebut telah dimasukkan tabung Durham. Isolat bakteri diinokulasi dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 25-27⁰C, kemudian dilihat perubahan yang terjadi, yaitu perubahan warna medium menjadi kuning dan ada tidaknya gelembung udara pada tabung durham (Cappuccino & Sherman, 2005).

Uji katalase menggunakan Medium Nutrien Agar (NA). Medium NA dicairkan dalam penangas air, dinginkan suhunya sampai 45°C. Medium dituangkan ke dalam cawan petri steril. Setelah medium membeku, masing-masing isolat bakteri diinokulasikan ke dalam Medium NA dan diinkubasi pada suhu 25-27°C selama 24 jam. Setelah terlihat adanya pertumbuhan, larutan H₂O₂ 3% ditetaskan di atas permukaan koloni dan dibiarkan selama beberapa menit. Hasil positif untuk uji katalase yaitu terdapat gelembung udara di atas permukaan koloni, maka mikroorganisme tersebut menghasilkan enzim katalase (Cappuccino & Sherman, 2005).

Uji urease menggunakan Medium Urea. Bakteri diinokulasikan ke dalam medium Urea kemudian diinkubasi pada suhu 25-27°C selama 24 jam. Reaksi positif ditunjukkan dengan adanya perubahan warna medium dari kuning menjadi pink yang sangat pekat (Cappuccino & Sherman, 2005).

Uji gelatin dilakukan untuk menunjukkan apakah bakteri mempunyai enzim gelatinase. Uji gelatin menggunakan Medium

Gelatin Agar. Isolat bakteri diinokulasikan dengan cara ditusuk menggunakan jarum ose dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 25-27°C. Hasil positif untuk uji gelatin menunjukkan medium yang padat atau semi solid menjadi cair (Cappuccino & Sherman, 2005).

g. Isolasi DNA

Isolasi DNA total isolat bakteri dilakukan dengan menggunakan KIT (FERMENTAS, Lithuania) dengan beberapa modifikasi pada langkah proses isolasi. Bakteri diperoleh dari kultur bakteri yang telah ditumbuhkan sebelumnya pada Medium LB (Luria Bertani) Broth selama 16 jam. Sebanyak 1,5 ml kultur cair bakteri masing-masing dipindahkan dalam tabung *Eppendorf* steril. Sampel tersebut disentrifugasi dengan kecepatan 6000 rpm selama 4 menit. Supernatan yang terbentuk dibuang hingga yang tersisa di dalam tabung hanya endapan sel bakteri saja. Kemudian ditambahkan 200 µl larutan NaCl 0,85% dan diresuspensikan dengan cara dibolak-balik 30-50 kali. Selanjutnya, ditambahkan 400 µl larutan *Lysis Solution* ke dalam tabung *Eppendorf*. Tabung tersebut kemudian diinkubasi dalam *waterbath shaker* pada suhu 65°C selama 25 menit. setelah diinkubasi, ditambahkan 400 µl chloroform ke dalam tabung tersebut dan dihomogenkan dengan cara dibolak-balik 3-5 kali.

Sentrifugasi tabung tersebut pada kecepatan 10.000 rpm selama 2 menit. setelah sentrifugasi, supernatan yang terbentuk dipindahkan pada tabung *Eppendorf* yang baru dan ditambahkan 800 µl larutan

presipitasi (80 μ l larutan *precipitation solution* dilarutkan dengan 720 μ l ddH₂O steril) lalu disentrifugasi pada kecepatan 10.000 rpm selama 2 menit. Supernatan yang terbentuk dibuang secara hati-hati lalu ditambahkan 100 μ l NaCl solution (1,2 M) pastikan pellet DNA larut. Setelah itu ditambahkan 300 μ l etanol absolut dingin, kemudian disimpan pada suhu -20°C selama 24 jam. Sampel kemudian disentrifugasi pada kecepatan 12.000 rpm selama 5 menit. Supernatan pada lapisan atas dibuang secara hati-hati sampai habis. Tutup tabung *Eppendorf* dibiarkan terbuka sampai alkohol menguap dan pellet DNA mengering. Pelet DNA kemudian dilarutkan dalam 20 μ l ddH₂O steril dan disimpan pada suhu -20°C untuk digunakan pada proses amplifikasi. PCR

h. Amplifikasi (PCR)

Amplifikasi DNA dilakukan dengan menggunakan Gen 16S *rRNA* (Marchesi *et al.*, 1998). Mix PCR yang digunakan untuk amplifikasi : *buffer* enzim (NEB U.S.A) 10x sebanyak 2,5 μ l hingga konsentrasi akhir 2,5 mM. dNTPs (mix) sebanyak 0,5 μ l dengan konsentrasi akhir 0,2 mM tiap dNTP, enzim *Taq polymerase* (NEB U.S.A) dengan konsentrasi akhir 1-2,5 U/ μ l, primer 63F dan 1387R dengan konsentrasi akhir masing-masing 0,4 μ M dan 0,1 μ l. sebanyak 0,1 μ l DNA bakteri sebagai DNA templet ditambahkan ddH₂O steril hingga 25 μ l.

Tabung PCR dimasukkan ke dalam mesin PCR (Perkin Elmer Thermal Cycler). Proses PCR terdiri dari : pre denaturasi awal pada suhu 95°C selama 5 menit, denaturasi pada suhu 94°C selama 30 detik, annealing pada suhu 55°C selama 30 detik, extension pada suhu 72°C selama 30 detik, extension akhir pada suhu 72°C selama 10 menit, dan inkubasi pada suhu 4°C tanpa batas waktu. Total siklus pada amplifikasi mesin PCR adalah 30 siklus. Amplikon dielektroforesis pada gel agarose 0,8%. Atau untuk dokumentasi dapat menggunakan gel agarose dengan konsentrasi 1%.

i. Elektroforesis DNA

Elektroforesis dilakukan untuk melihat pita-pita DNA yang ada setelah melakukan amplifikasi. Elektroforesis membutuhkan gel. Gel dibuat menggunakan cetakan gel yang harus berada pada bidang datar. Hal ini dilakukan agar gel yang terbentuk tidak miring. Digunakan waterpass untuk mengecek apakah bidang yang digunakan sudah datar atau belum. Gel agarose dibuat dengan konsentrasi 0,8% dalam buffer TAE 1X. Gel agarose dididihkan menggunakan hotplate atau microwave hingga larut dan berwarna bening. Kemudian gel agarose didiamkan hingga hangat-hangat kuku lalu dituangkan ke dalam cetakan yang dilengkapi dengan sisir (*comb*) tempat aplikasi sampel. Sisir dipasang dengan posisi tegak berjarak 0,5-1 mm dari dasar cetakan. Gel dibiarkan mengeras pada suhu ruangan.

Cetakan dan gel direndam dalam *buffer* TAE 1X pada kolom elektroforesis. Larutan sampel (amplikon hasil PCR) dari freezer diambil sebanyak 5-8 μ l. kemudian dicampurkan dengan 2 μ l *loading dye*. Sampel dimasukkan ke dalam sumur (well) yang terdapat dalam gel pada kolom elektroforesis. Setelah sampel dimasukkan, kemudian dielektroforesis pada tegangan 75 volt selama 45 menit. Gel hasil elektroforesis yang berisi DNA diwarnai dengan larutan *Etidium Bromide* (EtBr) selama 5 menit, kemudian dibilas dengan aquades untuk membuang kelebihan EtBr. Gel hasil elektroforesis diamati dengan UV *transluminator*, fragmen DNA yang muncul didokumentasikan dengan menggunakan kamera digital.

j. Sikuensing DNA

Sikuensing DNA dilakukan dengan mesin *sequencer*. Karena keterbatasan fasilitas di laboratorium proses sikuensing dilakukan di PT. Wilmar Benih Indonesia, Bekasi.

F. Analisis Data

Identifikasi isolat bakteri endofit yang memiliki kemampuan resisten terhadap tiga jenis antibiotik, sampai tingkat taksa spesies atau subspecies dilakukan melalui analisis sikuensing gen *16S rRNA* menggunakan metode bioinformatika secara *online*. Hasil sikuensing dibandingkan dengan data gen *16S rRNA* yang terdapat pada database *GeneBank*.