

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Jenis Penelitian

Penelitian yang dilakukan berupa penelitian murni atau *pure research* 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 bagian akar *A.conyzoides* L. yang terdapat di Kebun Botani UPI Bandung. Sampel yang diamati pada penelitian ini adalah bakteri endofit pada bagian akar *A.conyzoides* L. yang terisolasi dari Kebun Botani UPI Bandung.

C. Waktu dan Lokasi Penelitian

Penelitian ini dimulai bulan Februari sampai dengan Juli 2012. Pengambilan sampel di Kebun Botani UPI Bandung dan dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Universitas Pendidikan Indonesia, Bandung.

D. Alat dan Bahan

Peralatan yang digunakan pada penelitian ini terdapat di Laboratorium Mikrobiologi Universitas Pendidikan Indonesia. Daftar alat dan bahan yang digunakan selama penelitian ini terlihat pada Lampiran 3.

E. Langkah Kerja

1. Tahap Persiapan

Pada tahap persiapan yaitu pengecekan alat dan bahan yang akan digunakan dalam penelitian. Alat-alat kaca dan plastik yang akan digunakan dicuci terlebih dahulu dan dikeringkan. Alat kemudian dibungkus dengan kertas pembungkus setelah itu dilakukan sterilisasi panas lembab dengan cara dimasukkan ke autoklaf. Kemudian pembuatan medium NA (Nutrient agar) yang sudah disterilisasi untuk menumbuhkan bakteri dari akar *A.conyzoides* L.

2. Tahap Penelitian

a. Pengambilan Sampel

Pengambilan sampel akar *A.conyzoides* L. di lakukan di Kebun Botani UPI. Sampel akar diambil dari lahan yang ternaungi dan terdedah, dimana setiap titik diambil satu tanaman, setiap pengulangan diambil dari bagian akar yang berbeda. Selain pengambilan sampel, pengukuran faktor lingkungan juga diukur pada lokasi pencuplikan sampel *A.conyzoides* L.

b. Isolasi Bakteri

Isolasi bakteri dimulai dari tahap pencucian akar *A.conyzoides* L. dengan air untuk menghilangkan kotoran yang menempel dipermukaan akar tanaman dengan air mengalir selama 30 menit. Akar dipotong menjadi tiga bagian dari satu tanaman. Kemudian dipotong 3-5 cm. Potongan akar tersebut disterilisasi bagian permukaannya. Selanjutnya akar dibilas dengan akuades steril sebanyak 2 kali dan dikeringkan dengan kertas saring steril. Setelah kering, bagian ujung kiri dan kanan dibuang ± 1 cm. Akar diletakkan pada permukaan medium NA yang telah ditambahkan antifungi dengan posisi bekas potongan ke arah media lalu diinkubasi pada suhu ruang selama 2-4 hari (Simarmata *et al* , 2007; Roy & Banerjee, 2010).

c. Pengamatan Morfologi

Pengamatan morfologi bakteri meliputi morfologi koloni yang diamati mulai dari bentuk, warna, kenampakan bakteri (mengkilat atau suram), kenaikan permukaan (elevasi), dan tepian (Cappuccino & Sherman, 2005).

d. Isolasi Biakan Murni Bakteri

Koloni yang tumbuh pada cawan Petri merupakan biakan umum bakteri yang tumbuh dari akar *A.conyzoides* L. Setiap koloni dipindahkan 1 ose ke dalam cawan Petri berisi medium NA supaya diperoleh biakan murni, hal tersebut dilakukan untuk mempermudah dalam tahap identifikasi selanjutnya.

Teti Trinayanti, 2012
Keanekaragaman dan Potensi Antimikroba Pada Bakteri Endofit Rzofer *Ageratum Conyzoides* L.

e. Pewarnaan Gram

Pewarnaan Gram dilakukan untuk memastikan karakteristik dan bentuk sel bakteri. Pembuatan preparat dengan metode pewarnaan Gram dilakukan melalui dua tahap yaitu membuat olesan bakteri dan melakukan pewarnaan Gram terhadap olesan bakteri. Dibuat sediaan mikroskopik dari biakan yang akan diwarnai, dituangi dengan karbol kristal violet, dibiarkan selama 1 menit. Lalu dibuang kelebihan warna pada sediaan tersebut. Sediaan dituangi larutan lugol dibiarkan selama 1 menit, lalu dimasukkan ke dalam gelas kimia yang berisi alkohol 96%. Dibilas dengan air menggunakan botol semprot, dikeringkan dengan kertas isap. Lalu sediaan dituangi larutan safranin biarkan selama 45 detik, dicuci dengan air menggunakan botol semprot dan dikeringkan di udara. Amati sediaan di bawah mikroskop dengan menggunakan lensa objektif 100x, terlebih dahulu sediaan ditetesi minyak imersi. Hasil pewarnaan berwarna ungu jika sel bakteri berjenis Gram positif dan berwarna merah jika berjenis Gram negatif (Cappuccino & Sherman, 2005).

f. Pewarnaan Endospora

Pewarnaan endospora dilakukan untuk memastikan karakteristik ada atau tidaknya endospora dan letak endospora pada sel bakteri. Dari setiap isolat bakteri murni yang telah berumur 24-48 jam dibuat sediaan mikroskopis, kemudian difiksasi panas, lalu ditetesi dengan malakit hijau di atas sediaan mikroskopik yang telah dialasi kertas isap pada permukaan sediaan. Kegiatan tersebut

Teti Trinayanti, 2012

Keanekaragaman dan Potensi Antimikroba Pada Bakteri Endofit *Rzofer Ageratum Conyzoides L.*

dilakukan secara terus menerus selama 5 menit di atas penangas dan dijaga agar tidak kering kertang isapnya. Kelebihan warna dicuci dengan air mengalir dan dikeringkan. Selanjutnya, sediaan tersebut ditetesi safranin selama 1 menit, lalu dicuci dengan air mengalir, dan dibiarkan kering. Sediaan yang akan diamati, diberi minyak imersi terlebih dahulu. Amati sediaan di bawah mikroskop dengan menggunakan lensa objektif 100x, terlebih dahulu sediaan ditetesi minyak imersi. Endospora akan terlihat berwarna hijau, sedangkan sel vegetatif berwarna merah (Cappuccino & Sherman, 2005)

g. Analisis Biokimia

1) Hidrolisis Pati

Hidrolisis pati menggunakan medium agar pati. Medium agar pati 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 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. Jika terbentuk daerah bening di sekitar koloni menandakan terjadinya hidrolisis pati oleh enzim amilase (Cappuccino & Sherman, 2005).

2) Hidrolisis Kasein

Hidrolisis kasein menggunakan medium susu skim agar. Medium susu skim agar dicairkan dalam penangas air, dinginkan suhunya sampai 45°C. 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).

3) Hidrolisis Lipid

Hidrolisis lipid dilakukan dengan cara medium lipid agar 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 lipid agar dan diinkubasi pada suhu 25-27°C selama 24 jam. Pertumbuhan disekitar koloni diamati. Hasil uji hidrolisis lipid positif apabila terdapat zona bening di sekitar koloni dan perubahan medium lipid yang telah ditambahkan indikator *neutral red* menjadi warna merah pada bagian bawah koloni bakteri (Cappuccino & Sherman, 2005).

4) Hidrolisis Gelatin

Hidrolisis gelatin dilakukan dengan cara diinokulasikan masing-masing isolat bakteri ke dalam medium nutrient gelatin dan diinkubasi pada suhu 37°C selama

Teti Trinayanti, 2012

Keanekaragaman dan Potensi Antimikroba Pada Bakteri Endofit *Rzofer Ageratum Conyzoides L.*

24 jam. Selanjutnya medium disimpan didalam inkubator suhu 4°C selama 30 menit. Hasil uji positif apabila medium tetap dalam keadaan cair (Cappuccino & Sherman, 2005).

5) Uji Katalase

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% diteteskan di atas permukaan koloni dan dibiarkan selama beberapa menit. Jika terdapat gelembung udara di atas permukaan koloni, maka mikroorganismenya tersebut menghasilkan enzim katalase (Cappuccino & Sherman, 2005).

6) Uji Urease

Uji urease menggunakan medium urea. Isolat 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 merah muda yang sangat pekat (Cappuccino & Sherman, 2005).

7) Fermentasi Karbohidrat

Uji ini dilakukan untuk mengetahui kemampuan isolat bakteri dalam memfermentasi karbohidrat dengan menggunakan tiga jenis gula, yaitu laktosa, dekstrosa dan sukrosa. Dilakukan dengan menginokulasi bakteri ke dalam masing-masing medium kaldu laktosa, sukrosa, dan dekstrosa. Kemudian inkubasi selama 24 - 48 jam pada suhu 30°C . Tes positif ditandai dengan berubahnya medium menjadi warna kuning, sedangkan tes negatif jika warna medium tidak berubah (Cappuccino & Sherman, 2005).

8) Reduksi Nitrat

Uji ini dilakukan dengan menginokulasi satu ose bakteri ke dalam medium *nitrat broth* dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Kemudian ditetesi reagen solution A dan solution B . Tes positif ditandai dengan perubahan medium menjadi berwarna merah (Cappuccino & Sherman, 2005).

9) Uji Produksi H₂S

Uji ini dilakukan dengan cara menginokulasi satu ose jarum bakteri ke dalam medium SIM agar dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Jika medium menjadi berwarna hitam maka hasil uji adalah positif. Selain untuk mengetahui produksi H₂S, uji ini juga dapat menunjukkan adanya aktivitas motil dari bakteri (Cappuccino & Sherman, 2005).

10) Uji IMViC

Uji IMViC dilakukan untuk membedakan bakteri enterik (Family Enterobacteriaceae seperti *E.coli* dan *Enterobacter*). Terdiri dari Uji Indol, Uji Metil Red dan Voges-Proskauer (MR-VP), serta Uji Sitrat.

a) Uji Indol

Uji ini dilakukan untuk mengetahui apakah bakteri yang dapat membentuk indol dari degradasi asam amino triptophan karena tidak semua bakteri mampu mendegradasi triptophan menjadi bentuk indol. Medium yang digunakan dalam pengujian ini adalah medium *tryptone broth*, uji ini dilakukan dengan cara menginokulasi masing-masing isolat bakteri ke dalam *tryptone broth* lalu diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Hasil uji indol positif apabila ditambahkan reagen *Kovac's* terbentuk cincin merah beberapa menit setelah penambahan reagen (Cappuccino & Sherman, 2005).

b) Uji Metil Red

Uji Metil Red (MR) dilakukan untuk menentukan apakah glukosa dapat diubah menjadi produk asam seperti asam laktat, asam asetat atau asam format. Uji metil red dilakukan dengan cara menginokulasi masing-masing isolat bakteri ke dalam medium MR-VP (Metil Red – Voges Proskauer) broth lalu diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Hasil uji metil red positif apabila perubahan medium yang telah ditambahkan reagen metil red terbentuk cincin merah (Cappuccino & Sherman, 2005).

Teti Trinayanti, 2012

Keanekaragaman dan Potensi Antimikroba Pada Bakteri Endofit Rzofer *Ageratum Conyzoides L.*

c) Uji Voges-Proskaver

Uji Voges Proskauer dilakukan dengan menginokulasi 1 ose bakteri ke dalam media MR-VP. Kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam . Setelah itu ditetaskan 2 tetes reagen barit A dan barit B, apabila terbentuk cincin merah menunjukkan reaksi positif (Cappuccino & Sherman, 2005).

d) Uji Sitrat

Uji sitrat dilakukan dengan cara menginokulasi 1 ose bakteri ke dalam medium agar simmon sitrat dan diinkubasi pada suhu 35°C selama 48-96 jam, warna biru menunjukkan reaksi positif, warna hijau menunjukkan reaksi negatif (Cappuccino & Sherman, 2005).

h. Identifikasi Bakteri

Identifikasi bakteri dilakukan pada masing-masing isolat bakteri yang telah dikarakterisasi melalui pewarnaan Gram, pewarnaan endospora dan uji biokimia. Identifikasi mengacu pada buku *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology Ninth Edition* (1994) dan *Cowan and Steel's Manual for the Identification of Medical Bacterial Third Edition* (1993).

i. Uji Resistensi Antimikroba

Isolat bakteri endofit ditumbuhkan dalam medium nutrien broth pada suhu 25-27°C selama lima hari dan digoyangkan dengan kecepatan 150 rpm. Setelah

dikultur selama lima hari, medium NB yang berisi biakan tersebut dipindahkan 1,5 ml ke dalam tabung *Eppendorf*, kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm selama 10 menit. Supernatan dipindahkan ke dalam cawan Petri. Supernatan telah siap digunakan untuk tes aktivitas antimikroba (Arunachalam & Gayathri, 2010).

Isolat bakteri patogen *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Eschericia coli*, dan *Pseudomonas aeruginosa* ditumbuhkan dan diperbanyak dalam medium NB (Nutrien Broth), sedangkan patogen *Candida albicans* ditumbuhkan dan diperbanyak dalam medium PDB, kemudian dikocok selama sehari dengan menggunakan shaker. Kultur murni *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Eschericia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, dan *Candida albicans* dimasukan 1 ml ke dalam cawan Petri dan ditambahkan 9 ml medium NA (untuk isolat bakteri)/PDA (untuk isolat jamur) lalu dihomogenkan.

Setelah dihomogenkan lalu di beri lubang dengan menggunakan pelubang gabus. Satu cawan Petri digunakan untuk tiga kali pengulangan, lalu dimasukan 20 μ L supernatan bakteri endofit kedalam lubang yang telah disediakan. Selanjutnya diinkubasi pada suhu 25 - 27°C selama 24 jam. Setelah inkubasi, dilakukan pengukuran zona hambat (Roy & Benerjee, 2010; Simarmata, 2007).

j. Uji Resistensi Antibiotik

Isolat bakteri endofit ditumbuhkan pada medium NA dan diinkubasi selama

24 jam. Uji resistensi antibiotik menggunakan metode sumuran. Antibiotik yang

Teti Trinayanti, 2012
Keanekaragaman dan Potensi Antimikroba Pada Bakteri Endofit Rzofer *Ageratum Conyzoides L.*

digunakan diantaranya Ampisilin 10 mg/ml, Tetrasiklin 30 $\mu\text{g/ml}$ (Kumala *et al.*, 2004, Jalal *et al.*, 2010), Streptomisin 10 $\mu\text{g/ml}$ (Middelton & Ambrose, 2005) dan Kloramfenikol 30 $\mu\text{g/ml}$ (Cappuccino & Sherman, 2005). Koloni bakteri endofit dibuat suspensi dalam larutan NaCl 0,85% sampai standar kekeruhan *Mac Farland* 0,5. Diambil 1 ml dan dimasukkan ke dalam cawan Petri yang kemudian dituang oleh medium *Mueller hinton* agar. Setelah dihomogenkan lalu di beri lubang dengan pelubang gabus. Satu cawan Petri digunakan untuk empat antibiotik yang berbeda dan dikerjakan secara duplo (Kumala *et al.*, 2004). Lalu dimasukkan 20 μL suspensi antibiotik ke dalam lubang yang telah disediakan. Selanjutnya diinkubasi selama 1x24 jam. Diamati dan diukur zona beningnya. Ukuan zona bening akan menjadi hasil untuk menyatakan bakteri resisten, intermediet, atau sensitif (Capuccino & Sherman, 2005).

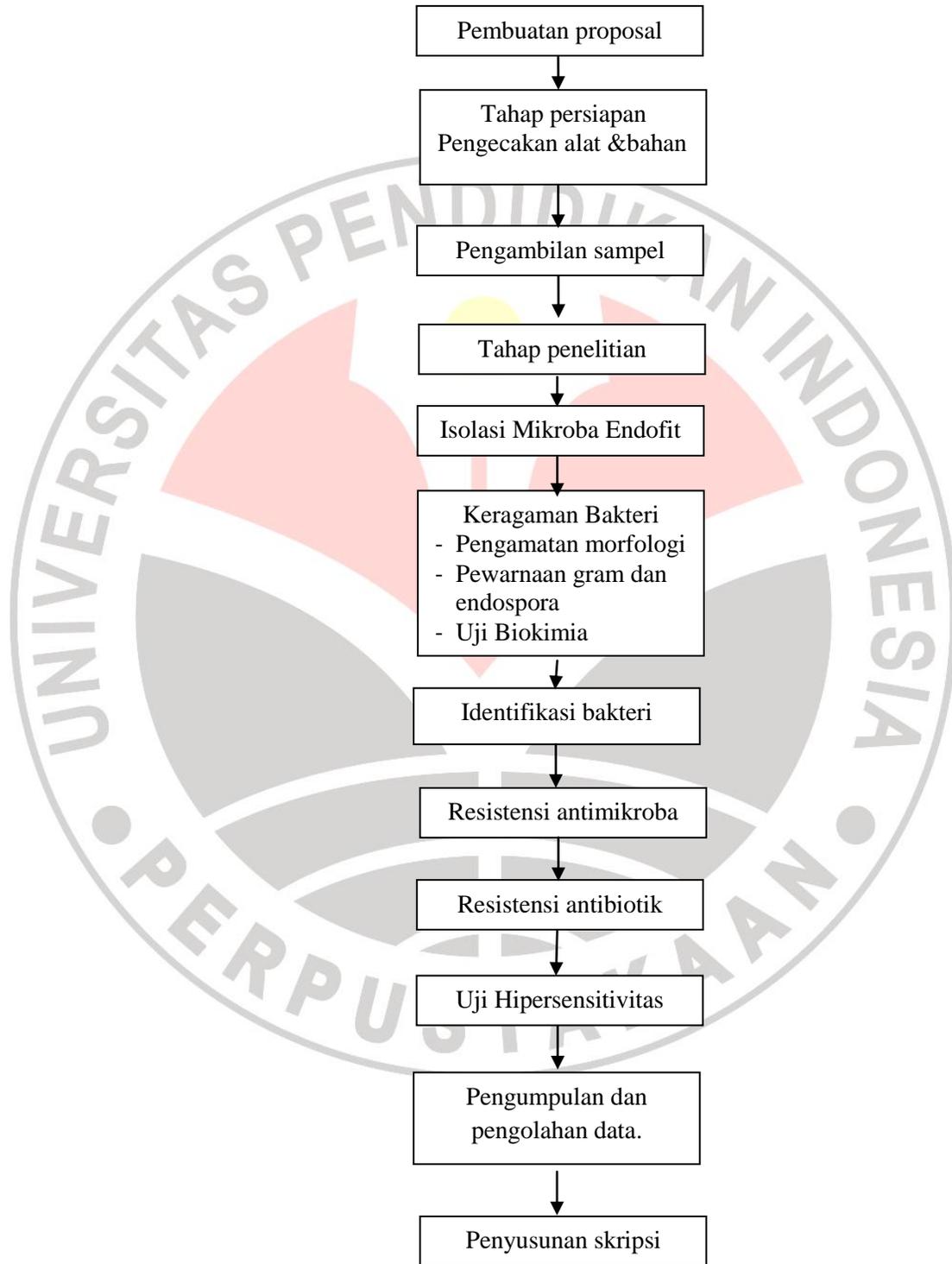
k. Uji Hipersensitivitas

Uji hipersensitivitas isolat bakteri terhadap tanaman tembakau (Zou *dalam* Wahyudi *et al.*, 2011) yang berumur 7 bulan. Koloni bakteri hasil isolasi dengan kerapatan $\pm 10^8$ sel/mL dalam kultur cair (Wahyudi, 2011), disuntikkan pada area intervena ruas daun tembakau menggunakan *syringe* sebanyak 1 mL (Lelliot & Stead, 1987 *dalam* Widyawati, 2008). Sebagai kontrol positif digunakan *Ralstonia solanacearum* yang merupakan bakteri patogen tanaman, sedangkan untuk kontrol negatif digunakan *Escherichia coli* (DH5 α) dan akuades (Wahyudi

et al., 2011). Pengamatan dilakukan setelah 24 - 48 jam untuk mengetahui perubahan warna dan kondisi daun tembakau setelah disuntikkan dengan isolate. Adanya bercak nekrosis kecoklatan dan kekeringan pada jaringan daun menunjukkan adanya reaksi hipersensitif positif.



F. Alur Penelitian



Teti Trinayanti, 2012
Keanekaragaman dan Potensi Antimikroba Pada Bakteri Endofit *Rzofer Ageratum Conyzoides L.*