

BAB III METODE PENELITIAN

A. Jenis Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian deskriptif. Metode deskriptif yaitu suatu prosedur pemecahan masalah yang diselidiki dengan menggambarkan/melukiskan keadaan subjek/objek penelitian pada saat sekarang berdasarkan fakta-fakta yang tampak atau sebagaimana adanya (Zulnaldi, 2007).

B. Populasi dan Sampel

Populasi yang diamati pada penelitian ini adalah seluruh bakteri endofit pada bagian daun *Ageratum conyzoides* L. yang terdapat di Kebun Botani UPI. Sampel yang diamati pada penelitian ini adalah seluruh bakteri endofit pada bagian daun *Ageratum conyzoides* L. yang terisolasi dari Kebun Botani UPI.

C. Waktu dan Lokasi Penelitian

Waktu pelaksanaan penelitian dilakukan pada bulan Februari hingga Juli 2012 bertempat di Laboratorium Mikrobiologi Jurusan Pendidikan Biologi FPMIPA Universitas Pendidikan Indonesia Jl. Dr. Setiabudhi No.229 Bandung.

D. Alat dan Bahan

Alat dan bahan yang digunakan di dalam penelitian ini terdapat di Laboratorium Mikrobiologi Jurusan Pendidikan Biologi FPMIPA Universitas Pendidikan Indonesia. Adapun rinciannya tertera dalam Lampiran 2.

Diny Andria Gustianti, 2012
Karakteristik Keaneekaragaman Dan Potensi Antimikroba Bakteri Endofit Filosfer
Ageratum conyzoides L.

Universitas Pendidikan Indonesia | repository.upi.edu

E. Langkah Kerja

1. Tahap Persiapan

Alat-alat yang akan digunakan dicuci terlebih dahulu dan dikeringkan. Alat kemudian dibungkus dengan kertas pembungkus setelah itu dilakukan sterilisasi panas lembab dengan cara dimasukkan ke *autoclave* selama 15-20 menit pada suhu 121°C dengan tekanan 15 lb. Medium NA (Nutrient Agar) untuk menumbuhkan bakteri endofit dari daun *Ageratum conyzoides* L. juga disterilkan selama 15 menit.

2. Tahap Penelitian

1) Pengambilan sampel

Untuk mengambil sampel bakteri endofit dari daun tanaman *Ageratum conyzoides* L. perlu dilakukan pencuplikan bagian daun tanaman tersebut kemudian dimasukkan ke dalam kantong plastik. Pencuplikan *Ageratum conyzoides* L. dilakukan di Kebun Botani UPI pada bulan Februari. Sampel daun yang diambil berasal dari satu tanaman utuh yang tumbuh di tempat ternaungi dan satu tanaman utuh yang tumbuh di tempat terdedah. Daun yang dicuplik adalah daun ke 1, 3, dan 5.

2) Pengukuran Faktor Lingkungan

Faktor lingkungan yang diukur yaitu pH tanah, intensitas cahaya, suhu tanah dan udara, serta kelembaban tanah dan udara. Pengukuran faktor lingkungan bertujuan untuk mengetahui perbedaan kondisi lingkungan antara tempat terdedah

dan tempat teraungi. Pengukuran faktor lingkungan dilakukan di sekitar lokasi pencuplikan *Ageratum conyzoides* L. di Kebun Botani UPI.

3) Isolasi Bakteri Endofit

Isolasi bakteri endofit dimulai dari tahap pencucian daun *Ageratum conyzoides* L. dengan menggunakan air mengalir selama 20 menit untuk menghilangkan kotoran yang menempel dipermukaan daun tanaman. Tiga buah daun dari satu tanaman disterilkan di dalam laminar air flow dengan menggunakan alkohol 75% selama 1 menit, lalu dalam natrium hipoklorit selama 5 menit, selanjutnya dibersihkan dengan menggunakan aquades steril selama 1 menit dan dikeringkan menggunakan kertas saring steril. Masing-masing daun kemudian dipotong menjadi beberapa bagian kecil dengan ukuran ± 1 cm. Potongan daun yang disterilkan tersebut diletakkan pada medium NA yang telah ditambahkan Nystatin (0,01%) sebagai antifungi dengan posisi bekas potongan ke arah media. Sampel kemudian diinkubasi selama 5-7 hari pada suhu 27-29°C (Bacon, 1988 dalam Kumala & Siswanto, 2007).

4) Isolasi Biakan Murni Bakteri Endofit

Koloni-koloni yang tumbuh pada cawan Petri merupakan biakan campuran bakteri yang tumbuh dari daun *Ageratum conyzoides* L. Setiap koloni dipindahkan 1 ose ke dalam cawan Petri berisi medium NA, selanjutnya diinkubasi pada suhu 25-28°C. Hal tersebut dilakukan untuk memperoleh biakan murni sehingga mempermudah dalam tahap identifikasi selanjutnya.

5) Karakterisasi Bakteri Endofit

a. Uji Morfologi Bakteri

Karakteristik keragaman bakteri yang diamati meliputi morfologi koloni berupa warna koloni, bentuk koloni, tepian koloni, kenaikan permukaan koloni, dan kepekatan warna (Cappuccino & Sherman, 2005). Pengamatan morfologi tersebut dilakukan setelah 24 jam waktu inkubasi.

b. Pewarnaan Gram Bakteri

Isolat bakteri dioles pada kaca slide dan ditambahkan 1 tetes kristal violet selama 1 menit kemudian dicuci dengan air mengalir. Isolat bakteri ditambahkan 1 tetes Gram's iodine mordant (Emerck) selama 1 menit, kemudian dicuci dengan air mengalir. Selanjutnya isolat bakteri ditambah etil alkohol 95% sampai kristal violet tidak larut lagi dan dicuci dengan air mengalir. Pada isolat bakteri ditambahkan safranin selama 45 detik dan dicuci dengan air mengalir, kemudian dikeringkan, tetesi minyak imersi dan diperiksa dengan menggunakan mikroskop (Cappuccino & Sherman, 2005). Pengamatan dilakukan dibawah mikroskop dengan perbesaran 1000 kali. Hasil pewarnaan berwarna ungu jika sel bakteri Gram positif dan berwarna merah jika Gram negatif.

Untuk memastikan isolat uji ber-Gram positif atau negatif maka dilakukan *KOH String Test*. Satu ose penuh bakteri diemulsikan ke dalam larutan KOH 3% yang telah ditetaskan sebanyak 1 tetes ke atas objek glass. Suspensi diaduk memutar terus menerus selama 60 detik kemudian ditarik dari suspensinya secara perlahan (Arthi, 2003). Jika suspensi yang ditarik mengental maka terjadi reaksi

saponifikasi yang menunjukkan bahwa bakteri tersebut Gram negatif sedangkan jika suspensi tetap dalam keadaan cair maka bakteri tersebut Gram positif.

c. Pewarnaan Endospora Bakteri

Pewarnaan endospora dilakukan untuk membedakan endospora dengan sel vegetatif, sehingga perbedaannya tampak jelas. Isolat bakteri dioles sebanyak satu ose ke atas objek glass. Tetesi ulasan bakteri tersebut dengan malakit hijau diatas kertas saring. Letakkan di atas air yang mendidih sehingga terkena uap panas selama 3 menit dan dijaga jangan sampai kering. Jika bagian pinggir mulai mengering, ditambahkan lagi malakit hijau. Setelah dingin, dibilas dengan aquades mengalir kemudian ditetesi dengan safranin selama 30 detik. Cuci dan dikeringkan, kemudian preparat diamati menggunakan mikroskop dengan perbesaran 1000 kali (Cappuccino & Sherman, 2005).

6) Uji Biokimia

1. Uji 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/lugol 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. Uji 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 di sekitar koloni bakteri diamati. Hasil uji hidrolisis kasein positif apabila terdapat zona bening di sekitar koloni (Cappuccino & Sherman, 2005).

3. Uji 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 di sekitar 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. Uji Hidrolisis Gelatin

Hidrolisis gelatin dilakukan dengan cara diinokulasikan satu ose bakteri dengan menggunakan teknik aseptik ke dalam medium nutrient gelatin. Kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Selanjutnya medium disimpan di

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

5. Uji Katalase

Uji katalase menggunakan medium nutrisi 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 mikroorganisme tersebut menghasilkan enzim katalase (Cappuccino & Sherman, 2005).

6. Uji Urease

Uji urease menggunakan medium urea broth. 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).

7. Uji Fermentasi Karbohidrat

Fermentasi karbohidrat diuji dengan substrat laktosa, dekstroza dan sukrosa. Dilakukan dengan menginokulasi bakteri endofit *Ageratum conyzoides* L. ke dalam masing-masing medium kaldu laktosa, sukrosa, dan dekstroza. Kemudian inkubasi selama 24-48 jam pada temperatur 30°C (Cappuccino & Sherman, 2005). Tes positif ditandai dengan terbentuk warna kuning dan tes negatif ditandai

dengan warna biru (tidak menunjukkan perubahan warna), serta dilihat juga ada atau tidaknya gelembung gas yang terbentuk di dalam tabung durham.

8. Reduksi Nitrat

Uji reduksi nitrat dilakukan dengan cara diinokulasikan satu ose bakteri dengan menggunakan teknik sterilisasi ke dalam medium nitrat broth. Kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Kemudian untuk mengetahui hasilnya, medium yang telah ditumbuhi bakteri kemudian ditetesi reagent solution A, solution B dan serbuk Zn. Uji positif jika ditetesi oleh reagent solution A dan B terbentuk warna merah. Sedangkan hasil negatif jika setelah ditetesi oleh reagent solution A dan B tidak terbentuk warna merah namun ketika saat dimasukan serbuk Zn menjadi berubah warna menjadi merah.

9. Uji Produksi H₂S

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

10. Uji IMViC

a. Uji Methyl Red

Uji methyl red digunakan untuk menentukan adanya fermentasi asam campuran. Dilakukan dengan cara diinokulasi 1 ose biakan ke dalam media MR-VP. Kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam (Cappuccino &

Sherman, 2005). Lalu ditetaskan 2 tetes reagen methyl red, jika terbentuk cincin merah menunjukkan reaksi positif.

b. Uji Voges-Proskauer

Uji Voges Proskauer digunakan untuk menentukan kemampuan bakteri tersebut menghasilkan produk akhir yang netral (asetilmetilkarbinol) dari fermentasi glukosa. Dilakukan dengan cara diinokulasi 1 ose biakan ke dalam media MR-VP. Kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam . Setelah itu ditetaskan 2 tetes reagent barit A dan barit B, apabila terbentuk cincin merah menunjukkan reaksi positif (Cappuccino & Sherman, 2005).

c. Uji Penggunaan Sitrat

Uji sitrat digunakan untuk melihat kemampuan bakteri menggunakan sitrat sebagai satu-satunya sumber karbon. Uji sitrat dilakukan dengan cara diinokulasikan 1 ose bakteri ke dalam media Simmon Citrate Agar, inkubasi pada suhu 35°C selama 48-96 jam, warna biru menunjukkan reaksi positif, warna hijau menunjukkan reaksi negatif (Cappuccino & Sherman, 2005).

d. Uji Indol

Uji indol digunakan untuk melihat pembentukan indol oleh bakteri. Cara pengujian yaitu satu ose diinokulasikan pada medium tryptone broth, diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Lalu ditetaskan reagen Kovacks (terdiri dari dimetil aminobenzaldehid, n-amil alkohol & asam hidroklorik), Jika terbentuk cincin merah berarti positif dan jika terbentuk cincin kuning berarti negatif. Terbentuknya cincin merah karena bakteri membentuk indol dari triptopan sebagai sumber karbon (Cappuccino & Sherman, 2005).

7) Identifikasi Bakteri

Identifikasi bakteri dilakukan pada masing-masing isolat bakteri yang telah dikarakterisasi melalui pewarnaan Gram, endospora dan uji biokimia. Identifikasi mengacu pada *Cowan and Steel's* dan *Bergeys*.

8) Uji Aktivitas Metabolit Bakteri

Isolat bakteri endofit ditumbuhkan dalam medium nutrisi pada suhu 25-27°C selama lima hari dan digoyangkan dengan kecepatan 150 rpm. 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 yang terbentuk dipindahkan ke dalam cawan Petri. Setelah disentrifugasi, supernatan tersebut telah siap digunakan untuk tes aktivitas metabolit bakteri (Arunachalam & Gayathri, 2010; Roy & Banerjee, 2010).

Isolat bakteri patogen *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, dan fungi *Candida albicans* ditumbuhkan dan diperbanyak dalam media NB (Nutrien Broth) dan PDB (Potato Dextrose Broth) dengan lama waktu inkubasi selama 24 jam. Masing-masing isolat bakteri patogen dimasukkan 1 ml ke dalam cawan Petri dan ditambahkan 9 ml medium NA/PDA lalu dihomogenkan. Pada medium yang telah dihomogenkan dengan bakteri patogen tersebut, dibuat sumur uji menggunakan pelubang gabus secara aseptik. Masing-masing supernatan bakteri endofit, dituangkan ke dalam permukaan sumur uji sebanyak 20 µl. Selanjutnya diinkubasi pada suhu 25-27°C

selama 24 jam (Roy & Banerjee, 2010; Simarmata, 2007). Zona hambat yang terbentuk diukur menggunakan jangka sorong.

9) Uji Aktivitas Antibiotik

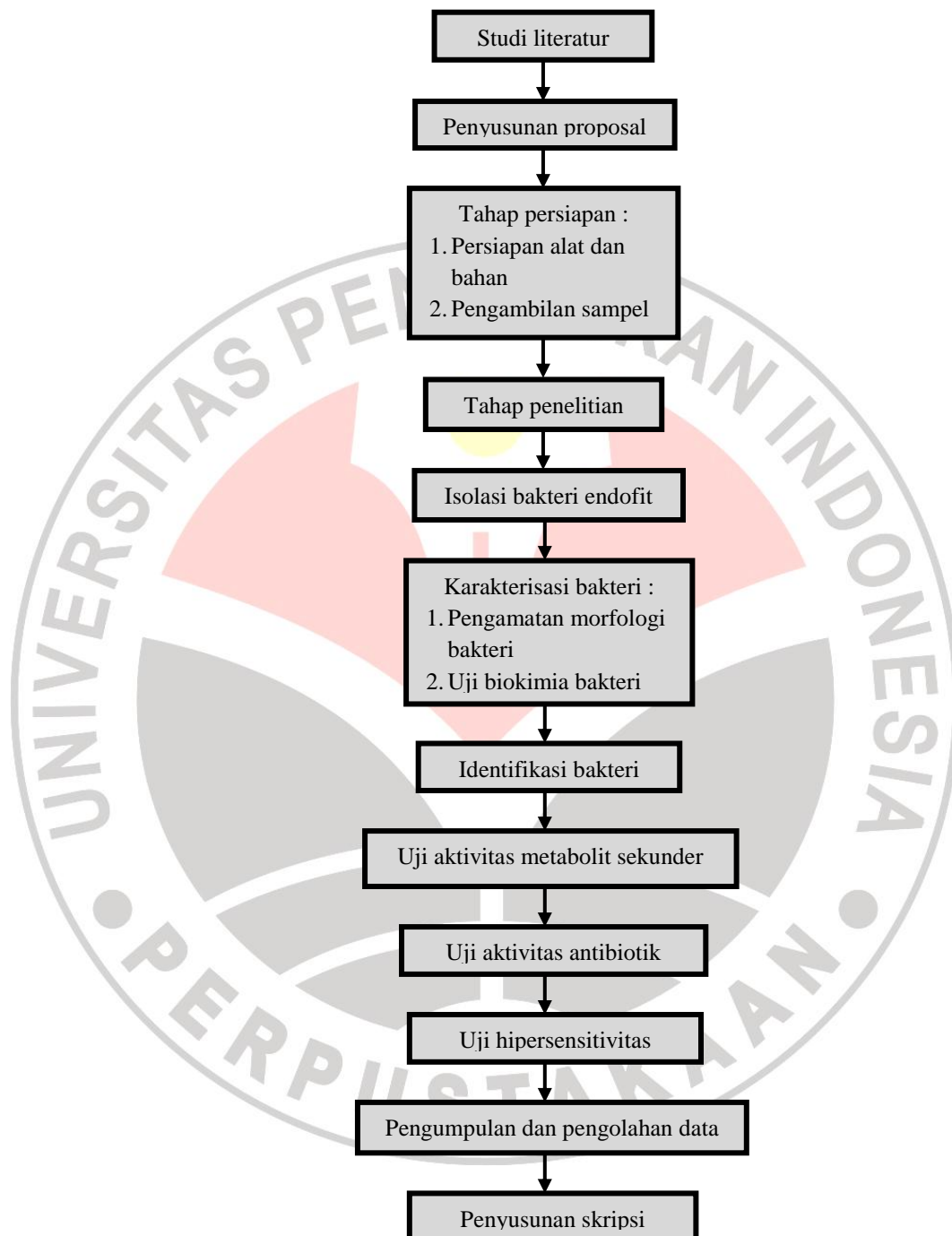
Aktivitas antibiotik diuji dengan metode sumur difusi agar menggunakan *Metode Kirby Bauer* (Cappuccino & Sherman, 2005). Antibiotik dan konsentrasi yang digunakan terdiri dari 10 mg/ml Ampisilin (Kumala *et al.*, 2004), 30 µg/ml Tetrasiklin, 10 µg/ml Streptomisin dan 30 µg/ml Kloramfenikol (Cappuccino & Sherman, 2005). Isolat bakteri ditumbuhkan pada medium NA miring kemudian diinkubasi selama 24 jam. Bakteri yang digunakan mempunyai kekeruhan sesuai dengan standart Mac Farland 0,5 (Pieshesa, 2011). Setelah sesuai dengan standart kekeruhan, masukkan 1 ml suspensi bakteri ke dalam cawan Petri steril kemudian ditambahkan 9 ml medium MHA (Mueller Hinton Agar) dan dihomogenkan. Larutan antibiotik ampisilin, tetrasiklin, streptomisin, dan kloramfenikol masing-masing dituangkan ke dalam sumur uji pada medium yang sudah beku sebanyak 20 µl. Satu lempeng agar perbenihan diuji empat jenis antibiotik dan dikerjakan secara duplo (Kumala & Siswanto, 2007). Media diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Zona hambat yang terbentuk diukur menggunakan jangka sorong.

10) Uji Hipersensitivitas

Uji hipersensitivitas dilakukan dengan menggunakan tanaman tembakau (*N. tabacum*). Uji ini dilakukan untuk mencari isolat yang tidak memberikan respons hipersensitif terhadap tanaman uji. Melalui uji ini dapat diperoleh informasi

mengenai sifat patogenitas bakteri terhadap tanaman. Masing-masing isolat bakteri endofit yang berumur 24 jam dibuat suspensi dalam larutan fisiologis 0,85% dengan konsentrasi 10^8 CFU/ml (Edy *et al.*, 2008), kemudian diinjeksikan 1 ml pada area intervena ruas daun tembakau (Widyawati, 2008). Digunakan kontrol negatif yaitu *E. coli* DH5 α dan aquades steril (Wahyudi *et al.*, 2011) serta kontrol positif yaitu *Ralstonia solanacerum* (Widyawati, 2008). Pengamatan gejala penyakit dilakukan hingga 48 jam setelah penyuntikan (Wahyudi *et al.*, 2011). Respons hipersensitivitas ditunjukkan dengan terjadinya pencoklatan daun pada daerah injeksi bakteri yang diakibatkan karena kematian lokal jaringan daun (nekrosis) (Suwanto *et al.*, 1996).

F. Alur Penelitian



Gambar 3.1. Alur Penelitian