

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **A. Jenis Penelitian**

Jenis penelitian yang dilakukan adalah penelitian dasar dengan metode deskriptif (Nazir, 1998).

#### **B. Populasi dan Sampel**

Populasi yang diamati pada penelitian ini diperoleh dari penelitian sebelumnya (Maemunah, 2010) yang merupakan strain elit simbiosis endorizosfer pada *Ageratum conyzoides* L. sebanyak 51 biakan.

#### **C. Waktu dan Lokasi Penelitian**

Penelitian dilaksanakan dari bulan Februari sampai Juli 2012 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 yang digunakan dapat dilihat pada Lampiran 2.

## **E. Langkah Kerja**

### **1. Tahap persiapan**

Tahap persiapan meliputi proses sterilisasi alat-alat yang akan digunakan dan pembuatan medium. Proses sterilisasi dilakukan ialah sterilisasi panas lembab dengan menggunakan *autoclave* selama 15 menit pada suhu 121<sup>0</sup>C dengan tekanan 15 lbs. Pembuatan medium tumbuh yang digunakan meliputi medium *Luria Bertani broth* dan agar (medium umum untuk semua bakteri), *Muller Hinton* agar, dan *Potato Dextrose Agar* yang juga mengalami proses sterilisasi.

### **2. Tahap Penelitian**

#### **a. Peremajaan Biakan Bakteri**

Sampel yang digunakan diperoleh dari penelitian sebelumnya (Maemunah, 2010) yang merupakan strain elit simbiosis endorizosfer pada *Ageratum conyzoides* L. dari Lapangan Golf, SD Isola dan Kebun Botani UPI yang telah diawetkan dalam *Cryo Buffer*. Bakteri dalam *cryo buffer* diinokulasi sebanyak satu ose ke dalam medium LB agar miring. Kemudian diinkubasi pada suhu 25-28<sup>0</sup>C selama 24 jam.

#### **b. Uji Antagonistik**

- 1) Uji Antagonistik Antarbakteri Simbiosis Endorizosfer Pada *Ageratum conyzoides* L..

Uji antagonistik ini menggunakan metode *well diffusion agar* (Schilinger & Lucke, 1989). Biakan murni bakteri simbiosis endorizosfer yang berumur 24

Nurul Fauziah, 2012

Potensi Bakteri Endorizosfer *Ageratum Conyzoides* L. Sebagai Antagonis Patogen Manusia

Universitas Pendidikan Indonesia | repository.upi.edu

jam disuspensikan ke dalam larutan NaCl 0,85% ( $10^8$ /ml cfu). Selanjutnya sebanyak 1 ml larutan NaCl 0,85% tersebut dicampurkan ke dalam 9 ml media LB agar. Homogenkan dengan cara memutar cawan Petri membentuk angka 8, kemudian dinginkan sampai medium memadat. Setelah homogen, dengan menggunakan pelubang gabus steril berdiameter 5 mm, buatlah “sumur” tempat mensuspensikan supernatan bakteri antagonis.

Supernatan bakteri antagonis diperoleh dari inokulasi bakteri endorizosfer yang diinkubasi selama 5 hari dalam 20 ml medium LB cair pada suhu 25-27°C dan digoyangkan dengan kecepatan 150 rpm. Kemudian sebanyak 1,5 ml medium tumbuh diambil untuk dipindahkan ke dalam tabung *Eppendorf* untuk selanjutnya disentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm selama 10 menit. Sebanyak 20 µL supernatan bakteri antagonis ditambahkan ke dalam sumur.

Pengamatan dilakukan terhadap pembentukan daerah bening atau zona penghambatan yang dihasilkan isolat bakteri antagonis. Selanjutnya dilakukan pengukuran terhadap diameter daerah penghambatan masing-masing isolat bakteri dengan menggunakan jangka sorong. Pengujian ini dilakukan pada setiap biakan bakteri secara berulang sampai semua biakan bertemu, sehingga diperoleh bakteri simbiosis endorizosfer yang memiliki potensi antagonis. Pengujian ini dilakukan sebagai proses penyeleksian terhadap bakteri potensial untuk selanjutnya diujikan terhadap patogen.

2) Uji Antagonistik Bakteri Simbion Endorizosfer Pada *Ageratum conyzoides* L. terhadap Patogen.

Pada uji antagonistik terhadap bakteri patogen ini dilakukan dengan metode yang sama dengan metode yang dikembangkan Schilinger dan Lucke (1989). Patogen diinkubasikan dalam 20 ml medium tumbuh NA cair (*Streptococcus sp.*, *Escheria coli*, *Pseudomonas sp.*, dan *Staphylococcus sp.* ) dan medium PDA (*Candida sp.*) selama 2 hari pada suhu 25-27<sup>0</sup>C dan digoyangkan dengan kecepatan 150 rpm. Selanjutnya sebanyak 1 ml medium NA cair yang telah diinkubasikan bakteri tersebut dicampurkan ke dalam 9 ml media LB agar. Homogenkan dengan cara memutar cawan Petri membentuk angka 8, kemudian dinginkan sampai medium memadat. Setelah homogen, dengan menggunakan pelubang gabus steril berdiameter 5 mm, buatlah “sumur” tempat mensuspensikan supernatan bakteri antagonis..

Supernatan bakteri antagonis diperoleh dari inokulasi bakteri endorizosfer hasil seleksi dari pengujian antagonisme antibakteri simbion endorizosfer, kemudian diinkubasikan selama 5 hari dalam 20 ml medium LB cair pada suhu 25-27<sup>0</sup>C dan digoyangkan dengan kecepatan 150 rpm. Kemudian sebanyak 1,5 ml medium tumbuh diambil untuk dipindahkan ke dalam tabung *Eppendorf* untuk selanjutnya disentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm selama 10 menit. Sebanyak 20  $\mu$ L supernatan bakteri antagonis ditambahkan ke dalam sumur.

Pengamatan dilakukan terhadap pembentukan daerah bening atau zona penghambatan yang dihasilkan isolat bakteri antagonis. Selanjutnya dilakukan

pengukuran terhadap diameter daerah penghambatan masing-masing isolat bakteri dengan menggunakan jangka sorong.

### **c. Pengamatan Morfologi dan Pewarnaan Bakteri**

#### 1) Pengamatan Morfologi Koloni

Pengamatan morfologi dilakukan setelah bakteri diinkubasi selama 24 jam dalam medium LB agar. Ciri morfologi koloni yang diamati meliputi bentuk, warna, kenampakan bakteri (mengkilat atau suram), kenaikan permukaan (elevasi), dan tepian (Capuccino & Sherman, 2005)

#### 2) Pewarnaan Gram

Pewarnaan Gram dilakukan untuk mengetahui karakteristik dan bentuk sel bakteri. Isolat bakteri berumur 24 jam digunakan dalam pewarnaan ini. Metode pewarnaan Gram dilakukan melalui dua tahap. Pertama pembuatan sediaan mikroskopik dengan menginokulasikan satu ose bakteri pada kaca objek yang telah ditetesi akuades. Setelah mengering dilakukan fiksasi panas untuk kemudian ditetesi oleh karbol kristal violet, biarkan selama satu menit. Kelebihan warna pada sediaan dibuang, kemudian ditetaskan larutan lugol dan diamkan selama satu menit. Selanjutnya sediaan dimasukan ke dalam *staining jar* berisi alkohol 96%, digoyangkan perlahan selama satu menit kemudian bilas dengan akuades dan keringkan menggunakan kertas hisap. Safranin kemudian ditetaskan pada sediaan untuk kemudian didiamkan selama 45 detik. Kelebihan warna dibilas

**Nurul Fauziah, 2012**

Potensi Bakteri Endorizosfer *Ageratum Conyzoides* L. Sebagai Antagonis Patogen Manusia

Universitas Pendidikan Indonesia | repository.upi.edu

menggunakan akuades kemudian sediaan dikeringkan di udara bebas (Capuccino & Sherman, 2005).

Pengamatan dilakukan dibawah mikroskop dengan perbesaran 1000X setelah sebelumnya sediaan ditetesi minyak imersi. Hasil pewarnaan dapat diketahui dengan indikator sel terwarnai ungu bila berjenis Gram positif dan akan terwarnai merah jika merupakan bakteri Gram negatif. Penentuan jenis Gram bakteri dapat ditunjang pula dengan KOH *string test*, dimana satu ose bakteri diinokulasikan pada kaca objek yang telah ditetesi larutan KOH 4%. Indikator bakteri Gram negatif ditunjukkan dengan adanya perubahan suspensi menjadi lengket (Capuccino & Sherman, 2005).

### 3) Pewarnaan Endospora

Langkah awal pewarnaan endospora dilakukan dengan pembuatan sediaan mikroskopik dengan menginokulasikan satu ose bakteri pada kaca objek yang telah ditetesi akuades, keringkan di udara bebas kemudian lakukan fiksasi panas. Selanjutnya tetesi sediaan yang telah dilapisi kertas hisap dengan larutan malakit hijau selama tiga menit. Proses ini dilakukan di atas gelas kimia yang berisikan air yang telah dididihkan di atas *hot plate*. Selama proses ini malakit hijau dalam kertas hisap diperhatikan jangan sampai kering, lakukan penambahan malakit hijau secara teratur. Selanjutnya angkat sediaan kemudian dinginkan untuk selanjutnya dibasuh dengan akuades. Tetesi sediaan dengan safranin dan biarkan selama 30 detik. Kemudian basuh kelebihan warna dengan akuades. Pengamatan dilakukan dibawah mikroskop dengan perbesaran 1000X

**Nurul Fauziah, 2012**

Potensi Bakteri Endorizosfer *Ageratum Conyzoides* L. Sebagai Antagonis Patogen Manusia

Universitas Pendidikan Indonesia | repository.upi.edu

setelah sebelumnya sediaan ditetesi minyak imersi. Endospora akan berwarna hijau pada bagian sel (Capuccino & Sherman, 2005).

#### **d. Uji Aktivitas Biokimia**

##### **1) Uji Hidrolisis Pati**

Uji hidrolisis pati dilakukan dengan medium Agar Pati. Medium Agar Pati yang sebelumnya telah disterilisasi dipanaskan dalam penangas air untuk selanjutnya dipindahkan ke dalam cawan Petri steril. Setelah medium membeku, bakteri diinokulasikan ke dalam medium Agar Pati untuk kemudian diinkubasi pada suhu 25-27<sup>0</sup>C selama 24 jam. Setelah terlihat adanya pertumbuhan bakteri, teteskan larutan Iodin pada koloni bakteri, diamkan selama beberapa menit. Hasil positif terlihat dengan munculnya daerah bening di sekitar koloni bakteri (Capuccino & Sherman, 2005).

##### **2) Uji Hidrolisi Lipid**

Medium Agar Lipid digunakan dalam pengujian hidrolisis lipid ini. Medium Agar Lipid yang sebelumnya telah disterilisasi dipanaskan dalam penangas air untuk selanjutnya dipindahkan ke dalam cawan Petri steril. Setelah medium membeku, bakteri diinokulasikan ke dalam medium Agar Lipid untuk kemudian diinkubasi pada suhu 25-27<sup>0</sup>C selama 24 jam. Reaksi positif ditunjukkan dengan adanya daerah bening disekitar koloni bakteri dan adanya perubahan warna merah pada koloni bakteri yang tumbuh pada medium uji (Capuccino & Sherman, 2005).

**Nurul Fauziah, 2012**

Potensi Bakteri Endorizosfer Ageratum Conyzoides L. Sebagai Antagonis Patogen Manusia

### 3) Uji Hidrolisis Kasein

Uji hidrolisis kasein dilakukan dengan menggunakan medium Susu Skim Agar. Medium Susu Skim Agar yang sebelumnya telah disterilisasi dipanaskan dalam penangas air untuk selanjutnya dipindahkan ke dalam cawan Petri steril. Setelah medium membeku, bakteri diinokulasikan ke dalam medium Agar Pati untuk kemudian diinkubasi pada suhu 25-27<sup>0</sup>C selama 24 jam. Hasil positif ditunjukkan dengan adanya daerah bening di sekitar daerah pertumbuhan bakteri (Capuccino & Sherman, 2005).

### 4) Uji Hidrolisis Gelatin

Uji hidrolisis gelatin dilakukan dengan menggunakan medium Gelatin Agar. Isolat bakteri diinokulasikan dengan cara inokulasi tusuk ke dalam medium semisolid gelatin, kemudian diinkubasi pada suhu 25-27<sup>0</sup>C selama 24 jam. Reaksi positif ditunjukkan saat medium tidak berubah wujud menjadi padat saat disimpan dalam suhu 4<sup>0</sup>C selama 30 menit (Capuccino & Sherman, 2005).

### 5) Uji Reduksi Nitrat

Pada uji reduksi nitrat dilakukan dengan menggunakan medium Nitrat *Broth*, dimana sebanyak satu ose bakteri diinokulasikan ke dalam tabung berisi medium uji. Selanjutnya diinkubasi pada suhu 25-27<sup>0</sup>C selama 24 jam. Setelah 24 jam tambahkan 10 tetes reagen Nitrat A goyangkan secara perlahan, kemudian tambahkan kembali 10 tetes reagen Nitrat B, goyangkan kembali perlahan. Reaksi positif ditunjukkan dengan perubahan warna medium menjadi merah. Bila medium

**Nurul Fauziah, 2012**

Potensi Bakteri Endorizosfer *Ageratum Conyzoides* L. Sebagai Antagonis Patogen Manusia

Universitas Pendidikan Indonesia | repository.upi.edu



menunjukkan reaksi negatif tambahkan sedikit bubuk Zn. Setelah penambahan tersebut bila medium mengalami perubahan warna menunjukkan reaksi negatif, bila tidak terjadi perubahan warna maka reaksi positif terhadap reduksi nitrat (Capuccino & Sherman, 2005).

#### 6) Uji IMViC

Uji IMViC ini meliputi beberapa test, yaitu uji Produksi Indol, *Methyl-red*, Voges-Proskauer, dan Sitrat. Uji Produksi Indol dilakukan menggunakan medium SIM Agar, dimana bakteri diinokulasikan dengan teknik inokulasi tusuk, selanjutnya diinkubasi pada suhu 25-27<sup>0</sup>C selama 24 jam. Setelah 24 jam, tambahkan 10 tetes reagen Kovac's. Setelah penambahan tersebut bila medium mengalami perubahan warna sehingga terdapat lapisan berwarna *cherry-red* maka menunjukkan reaksi positif. Melalui pengujian ini dapat pula digunakan untuk mengamati motilitas bakteri dan produksi H<sub>2</sub>S. Dimana reaksi positif produksi H<sub>2</sub>S ditunjukkan dengan adanya daerah hitam di sekitar tusukan bakteri (Capuccino & Sherman, 2005).

Uji *Methyl-red* dilakukan menggunakan medium MR-VP *broth*, dimana bakteri diinokulasikan sebanyak satu ose, selanjutnya diinkubasi pada suhu 25-27<sup>0</sup>C selama 24 jam. Setelah 24 jam, tambahkan 5 tetes reagen indikator *methyl red*. Setelah penambahan tersebut bila medium mengalami perubahan warna menjadi warna merah maka menunjukkan reaksi positif (Capuccino & Sherman, 2005). Medium MR-VP *broth* juga digunakan dalam uji selanjutnya, yaitu uji Voges-Proskauer. Bakteri diinokulasikan sebanyak satu ose ke dalam medium,

**Nurul Fauziah, 2012**

Potensi Bakteri Endorizosfer *Ageratum Conyzoides* L. Sebagai Antagonis Patogen Manusia

selanjutnya diinkubasi pada suhu 25-27<sup>0</sup>C selama 24 jam. Setelah 24 jam, tambahkan 10 tetes reagen Barrits A kemudian kocok, dilanjutkan dengan penambahan 10 tetes reagen Barrits B. Pengamatan dilakukan setelah 15 menit, dimana selama itu dilakukan pengocokan setiap selang waktu 3-4 menit. Setelah itu bila medium mengalami perubahan warna menjadi warna merah muda kompleks maka menunjukkan reaksi positif (Capuccino & Sherman, 2005).

Selanjutnya rangkaian uji terakhir ialah uji penggunaan Sitrat. Medium yang digunakan ialah medium Simmons Sitrat. Medium berupa agar miring, dimana bakteri uji cukup diinokulasikan ke permukaannya. Reaksi positif ditunjukkan dengan tumbuhnya bakteri pada medium tersebut (Capuccino & Sherman, 2005).

#### 7) Uji Fermentasi Karbohidrat

Pada uji fermentasi karbohidrat, sebanyak satu ose bakteri diinokulasikan ke dalam tabung berisi medium Laktosa, Sukrosa, dan Dekstrosa. Dalam tabung uji sebelumnya telah dimasukan tabung Durham untuk selanjutnya diinkubasi pada suhu 25-27<sup>0</sup>C selama 24 jam. Reaksi positif ditunjukkan dengan adanya perubahan warna medium menjadi warna kuning dan terdapatnya gas yang terperangkap dalam tabung Durham (Capuccino & Sherman, 2005).

#### 8) Uji Katalase

Uji katalase dilakukan dengan menggunakan medium LB agar . Medium LB yang sebelumnya telah disterilisasi dipanaskan dalam penangas air untuk selanjutnya dipindahkan ke dalam cawan Petri steril. Setelah medium membeku,

**Nurul Fauziah, 2012**

Potensi Bakteri Endorizosfer *Ageratum Conyzoides* L. Sebagai Antagonis Patogen Manusia

bakteri diinokulasikan ke dalam medium NA untuk kemudian diinkubasi pada suhu 25-27<sup>0</sup>C selama 24 jam. Setelah terlihat adanya pertumbuhan bakteri, teteskan larutan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3% pada koloni bakteri, diamkan selama beberapa menit. Hasil positif terlihat dengan munculnya gelembung udara di sekitar koloni bakteri (Capuccino & Sherman, 2005).

#### 9) Uji Urease

Uji urease dilakukan dengan menggunakan medium urea. Sebanyak satu ose bakteri diinokulasikan ke dalam tabung berisi medium urea untuk selanjutnya diinkubasi pada suhu 25-27<sup>0</sup>C selama 24 jam. Reaksi positif ditunjukkan dengan adanya perubahan warna medium yang berawal kuning menjadi merah muda pekat (Capuccino & Sherman, 2005).

#### e. Uji Resistensi Antibiotik

Pada uji resistensi ini dilakukan menggunakan metode *well diffusion* (Schilinger and Lucke, 1989). Biakan murni bakteri simbion endorizosfer yang berumur 24 jam disuspensikan ke dalam larutan NaCl 0,85% (10<sup>8</sup>/ml cfu). Selanjutnya sebanyak 1 ml larutan NaCl 0,85% berisi biakan bakteri tersebut, dicampurkan ke dalam 9 ml media Muller Hinton agar. Homogenkan dengan cara memutar cawan Petri membentuk angka 8, kemudian dinginkan sampai medium memadat. Setelah homogen, dengan menggunakan pelubang gabus steril berdiameter 5 mm, buatlah “sumur” tempat mensuspensikan antibiotik.

Nurul Fauziah, 2012

Potensi Bakteri Endorizosfer *Ageratum Conyzoides* L. Sebagai Antagonis Patogen Manusia

Antibiotik yang digunakan ialah ampisilin 10mg/ml, tetrasiklin 30 $\mu$ g/ml (Kumala *et al.*, 2004, Jalal *et al.*, 2010), kloramfenikol 10 $\mu$ g/ml, dan streptomisin 10 $\mu$ g/ml (Midleton & Ambrose, 2005). Sebanyak 20  $\mu$ L antibiotik ditambahkan ke dalam sumur. Pengamatan dilakukan terhadap pembentukan daerah bening atau zona penghambatan. Selanjutnya dilakukan pengukuran terhadap diameter daerah penghambatan terhadap masing-masing isolat bakteri dengan menggunakan jangka sorong.

#### **f. Uji Hipersensitifitas**

Uji hipersensitifitas merupakan uji yang dilakukan untuk dapat melihat respon hipersensitifitas tumbuhan indikator terhadap bakteri. Tujuan dilakukannya uji hipersensitifitas dalam penelitian ini adalah sebagai pengujian terhadap patogenitas bakteri simbiosis endorizosfer. Pengujian dilakukan mengikuti metode Lelliot dan Stead (1987). Tanaman indikator yang digunakan ialah tanaman tembakau dari varietas Kedu berumur 7 bulan. Bakteri *E. coli* DH5 $\alpha$  dan akuades steril digunakan sebagai kontrol negatif, dan bakteri *Ralstonia* sp. digunakan sebagai kontrol positif.

Biakan murni bakteri simbiosis endorizosfer dan bakteri kontrol yang berumur 24 jam disuspensikan ke dalam larutan NaCl 0,85% ( $10^8$ /ml cfu) (Wahyudi, 2011; Adithya, 2006; Suwanto, 1996). Kemudian sebanyak 1 ml suspensi bakteri tersebut diinjeksikan menggunakan *hypodermic syringe* steril ke dalam ibu tulang daun tanaman tembakau. Tanaman yang telah diinokulasi diinkubasi selama 48-72 jam. Reaksi hipersensitifitas ditunjukkan dengan

terjadinya pencokelatan daun pada daerah injeksi bakteri akibat kematian lokal jaringan daun (nekrosis).

#### **g. Cryoreservasi**

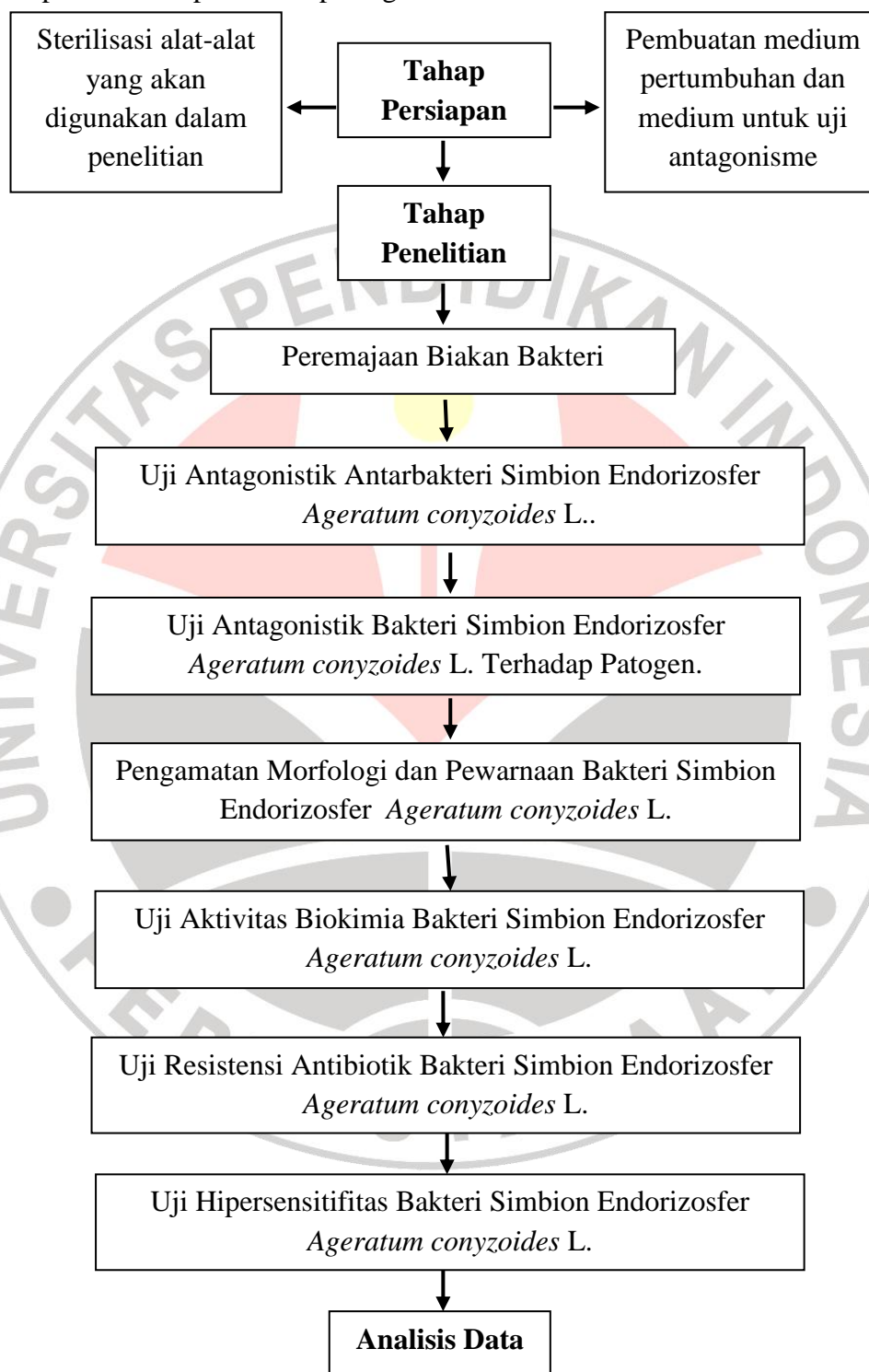
Seluruh isolat bakteri dalam penelitian ini kemudian diawetkan melalui *cryoreservasi*. Bakteri berumur 24 jam dinokulasikan sebanyak satu ose ke dalam 800 µl larutan *cryo buffer* dalam tabung *Eppendorf*. Kemudian dihomogenkan menggunakan vortex untuk selanjutnya disimpan pada suhu  $-20^{\circ}\text{C}$ . Proses ini dilakukan agar isolat bakteri dapat disimpan dalam waktu lama.

#### **h. Analisis Data**

Identifikasi isolat bakteri simbiosis endorizosfer dengan potensi antagonis dilakukan melalui pengamatan morfologi dan uji aktivitas biokimia sampai pada tingkat genus.

### i. Alur Penelitian

Alur penelitian dapat dilihat pada gambar di bawah ini.



Gambar 3.1 Alur Penelitian Potensi Bakteri Simbion Endorizosfer *Ageratum conyzoides* L. Sebagai Antagonis Terhadap Patogen

Nurul Fauziah, 2012

Potensi Bakteri Endorizosfer *Ageratum Conyzoides* L. Sebagai Antagonis Patogen Manusia