

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

A. Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang akan dilakukan adalah penelitian dasar dengan menggunakan metode deskriptif.

B. Populasi dan Sampel

1. Populasi yang digunakan pada penelitian ini adalah seluruh komunitas bakteri strain elit simbion ektorizosfer pada *Ageratum conyzoides* yang sudah berbunga dan terdapat di UPI Bandung.
2. Sampel yang digunakan adalah komunitas bakteri strain elit simbion ektorizosfer pada *A. conyzoides* yang terambil di tiga titik di UPI Bandung. Lapangan Golf (titik A dengan intensitas cahaya 1013.67 Lux dan kelembaban 43.33%), SD Isola (titik B dengan intensitas cahaya 942 Lux dan kelembaban 52.33%) dan Kebun Botani (titik C dengan intensitas cahaya 855.33 Lux dan kelembaban 63.33%). Letak titik-titik pengambilan sampel dapat dilihat pada **Lampiran I**.

C. Waktu dan Lokasi Penelitian

Pengambilan data lapangan dilaksanakan pada bulan April 2010 sampai bulan September 2010. Penelitian dilakukan di Laboratorium Fisiologi dan Laboratorium Mikrobiologi Jurusan Pendidikan Biologi FPMIPA UPI Bandung, Jalan Dr. Setiabudhi 229 Bandung.

D. Alat dan Bahan

Tabel 3.1 Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian

No	Nama Alat	Spesifikasi	Jumlah
1.	<i>Hot plate and Magnetic stirrer</i>	Merek EYELA, RSCH-3	2 buah
2.	<i>Autoclave</i>	Merek Hirayama Mode HC36At	1 buah
3.	<i>Vortets</i>	Merek SIBATA	1 buah
4.	<i>Colony Counter</i>	Merek SIBATA	1 buah
5.	Laminar Air Flow	-	1 buah
6.	Timbangan Analitik	Merek AND, HF 300	1 buah
7.	Miroskop Binokuler	-	1 buah
8.	Mikropipet 1 ml	Merek Eppendorf	1 buah
9.	Mikropipet 10 ml	Merek Eppendorf	1 buah
10.	Tips 1 ml	-	12 buah
11.	Tips 10 ml	-	2 buah
12.	Cawan Petri	Merek CMSI	72 buah
13.	Tabung Reaksi	Pyrex	63 buah
14.	Kaca Arloji	-	3 buah
15.	Plastik Tahan Panas	-	4 pak
16.	Spidol Marker	Merek Faber Castell	2 buah
17.	Kertas Label	-	1 pak
18.	Kapas	-	1 pak
19.	Kasa	-	1 pak
20.	Plastik Wrap	Merek Bagus	2 buah
21.	Kertas Tisu	Merek Multi	4 pak
22.	<i>Aluminium Foil</i>	Merek Klin Pak	1 buah
23.	Kertas saring	Merek Whiteman	1 pak
24.	Gelas Ukur 10 mL	Pyrex	1 buah
25.	Gelas Ukur 250 mL	Pyrex	1 buah
26.	Gelas Ukur 500 mL	Pyrex	1 buah
27.	Beker Glass 250 mL	Pyrex	1 buah
28.	Beker Glass 1 L	Pyrex	1 buah
29.	Tabung Erlenmeyer	Pyrex	1 buah
30.	Spatula	-	2 buah
31.	Karet Gelang	-	1 pak
32.	Benang Kasur	-	1 gulung
33.	Lup Inokulasi	-	2 buah
34.	Lampu Spirtus	-	2 buah
35.	Tabung Eppendorf	-	63 buah
36.	Jangka Sorong	Caliper	1 buah
37.	Kamera Dgital	Merek Fujifilm	1 buah
38.	Rak Tabung	-	6 buah

Tabel 3.2 Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian

No	Nama Bahan	Jumlah
1.	Akar <i>Ageratum conyzoides</i> L.	10 gram
2.	Alkohol Absolut (pa) dan 70 %	1 liter
3.	Aquadest	12 liter
4.	NaCl 0,85 % (pa)	40 ml
5.	Kristal Violet	5 ml
6.	Lugol	20 ml
7.	Safranin O	5 ml
8.	<i>Luria Bertani Agar</i>	300 ml
9.	<i>King's B Agar</i>	150 ml
10.	<i>Nutrien Soil Extract Agar</i>	150 ml
11.	<i>N-Acetylglukosamin Agar</i>	150 ml
12.	<i>Yeast Extract Mannitol Agar</i>	150 ml
13.	<i>Winogradsky's Agar</i>	150 ml
14.	Susu Skim	10 gram
15.	Koloidal Kitin	10 gram
16.	Tepung Beras	10 gram
17.	Minyak Imersi	5 ml
18.	<i>Cryo Buffer</i>	50 l

E. Langkah Kerja

1. Sterilisasi Alat dan Medium

Alat-alat kaca dan plastik yang akan digunakan dicuci terlebih dahulu dan dikeringkan, kemudian dibungkus menggunakan kertas pembungkus. Setelah itu dilakukan sterilisasi panas lembab dengan cara dimasukkan ke dalam autoclave selama 15-20 menit pada suhu 121°C dengan tekanan 15 lbs. Medium yang digunakan *Luria Bertani* (LB), *King's B*, *Nutrient Soil Extract Agar*, *N-Acetylglucosamine*, *Yeast Extract Mannitol Agar* (YEMA), dan *Winogradsky's* (Atlas, 2005).

2. Pengambilan Sampel Bakteri Strain Elit Simbion Ektorizosfer

Pengambilan sampel bakteri strain elit ektorizosfer dilakukan pada tiga titik sebagai pengulangan yaitu lapangan Golf, SD Isola, dan kebun Botani agar mewakili keberadaan populasi *A. conyzoies* di UPI Bandung. Pengambilan sampel dilakukan dengan cara menggali tanah di sekitar perakaran *A. conyzoies* yang sudah berbunga secara perlahan-lahan menggunakan sendok tanah. Akar dipisahkan dari bongkahan tanah besar dan membiarkan sebanyak mungkin tanah yang melekat pada akar. Secepat mungkin, akar beserta tanah yang melekat dimasukkan ke dalam cawan Petri (steril) dan diberi label, kemudian dimasukkan ke dalam termos es agar tidak cepat kering. Semua sampel tanah secepat mungkin dibawa ke laboratorium dan segera dianalisis untuk menghindari perubahan dramatis terhadap populasi dan aktivitas mikroba (Modifikasi Husen, 2008).

3. Isolasi Bakteri Strain Elit Simbion Ektorizosfer

Satu gram tanah ektorizosfer dilarutkan ke dalam 9 ml akuades steril, kemudian divorteks selama 5 menit. Sebanyak 1 ml dari ekstrak tersebut dimasukkan dalam tabung reaksi berisi 9 ml akuades steril, kemudian divorteks hingga homogen dan 1 ml dipindahkan ke tabung berikutnya, begitu seterusnya hingga terjadi seri pengenceran 10^{-1} - 10^{-6} . (Krieg *et al.*, 1984 dalam Widawati *et al.*, 2004). Hal ini bertujuan untuk menghitung jumlah sel bakteri per gram tanah dari kultur original (Capuccino dan Sherman, 1987).

Dari pengenceran 10^{-1} sampai dengan 10^{-6} diambil masing-masing 1 ml suspensi dengan menggunakan pipet steril yang kemudian dimasukkan ke dalam 6 cawan Petri yang masing-masing berisi 9 ml medium *Luria Bertani* (LB) sebagai *rich media* untuk menumbuhkan berbagai jenis bakteri yang sukar ditumbuhkan dan *selective media* untuk menghambat pertumbuhan jenis bakteri yang satu yang menumbuhkan jenis bakteri yang lain (Pelczar dan Chan, 2005), yaitu *King's B* untuk mengkultivasi *Pseudomonas*, *Nutrient Soil Extract Agar* untuk mengkultivasi bakteri tanah, *N-Acetylglucosamine* untuk mengkultivasi jenis bakteri yang memanfaatkan N-acetylglucosamine, *Yeast Extract Mannitol Agar* (YEMA) untuk mengkultivasi *Rhizobacteria*, dan *Winogradsky's* untuk mengkultivasi jenis bakteri nitrifikasi (Atlas, 2005), dihomogenkan dengan cara memutar cawan Petri membentuk angka 8, didinginkan sampai membeku, diinkubasi pada suhu 25-28°C selama 24 jam dan diamati selama 7 hari (Capuccino dan Sherman, 1987).

4. Isolasi Biakan Murni Bakteri Strain Elit Simbion Ektorizosfer

Koloni yang tumbuh pada cawan Petri merupakan biakan campuran. Untuk memperoleh biakan murni, setiap koloni yang mewakili digesekkan 1 ujung ose ke cawan agar berisi LB, selanjutnya diinkubasi pada suhu 25-28°C selama 24 jam. Kegiatan ini dilakukan untuk mendapatkan koloni bakteri yang lebih spesifik. Untuk kebutuhan uji biokimia dan pewarnaan Gram dilakukan subkultur

dengan cara diambil 1 ujung ose dari cawan agar lalu digesekkan ke LB miring.

5. Uji Biokimia Aktivitas Amilase, Kitinase, dan Protease

Setiap koloni dari LB miring masing-masing ditotolkan pada cawan Petri yang berisi LB+2% tepung beras untuk uji amilase (Mishra & Behera, 2008), medium LB+0,5% koloidal kitin untuk uji kitinase (Modifikasi El-Hamshary dan Khattab, 2008), dan medium LB+1% susu skim untuk uji protease (Dajanta *et al.*, 2009). Reaksi positif dari masing-masing uji hidrolitik ditunjukkan dengan adanya zona bening di sekitar koloni bakteri. Untuk melihat zona bening (holozone) lebih jelas pada uji aktivitas hidrolitik amilum maka perlu ditambahkan pewarna Lugol. Inkubasikan 24 jam pada temperatur 25-28°C. Pengamatan dilakukan selama 7 hari (Cappucino dan Sherman, 1987).

6. Pewarnaan Gram Bakteri Strain Elit Symbion Ektorizosfer

Dilakukan pewarnaan Gram dan KOH *string test* pada isolat bakteri yang berumur 1 x 24 jam dari subkultur (Cappucino dan Sherman, 1987; Arthi *et al.*, 2003). Metode pewarnaan Gram dilakukan melalui dua tahap yaitu pertama pembuatan sediaan mikroskopik dengan cara mengambil biakan murni yang akan diwarnai. Tahap selanjutnya yaitu meneteskan karbol kristal violet pada sediaan mikroskopik hingga seluruh permukaannya tertutupi, biarkan selama tiga menit. Kemudian membuang kelebihan zat warna

pada sediaan tersebut. Setelah itu ditetesi larutan lugol dan biarkan selama 45-60 detik. Sediaan dimasukan ke dalam *staining jar* yang berisi alkohol 96 %, digoyang-goyangkan selama satu menit, bilas dengan akuades menggunakan botol semprot dan keringkan dengan kertas isap. Kemudian ditetesi dengan larutan safranin O biarkan selama tiga menit. Untuk kelebihan warna dapat dicuci menggunakan akuades lalu keringkan di udara. Setelah sediaan kering ditetesi minyak imersi dan diamati dibawah mikroskop dengan menggunakan lensa objektif 100x. Hasil pewarnaan dapat diketahui dengan indikator warna merah untuk Gram negatif dan warna ungu untuk Gram positif (Cappuccino dan Sherman, 1987).

Penentuan jenis Gram dapat dilakukan dengan metode KOH *string test* dengan cara dicampurkan satu loop inokulasi dengan KOH 4% yang sebelumnya telah ditetaskan pada kaca objek, kemudian diamati perubahan yang terjadi. Indikator bakteri Gram negatif ditunjukkan dengan adanya perubahan suspensi menjadi lengket (Arthi *et al.*, 2003).

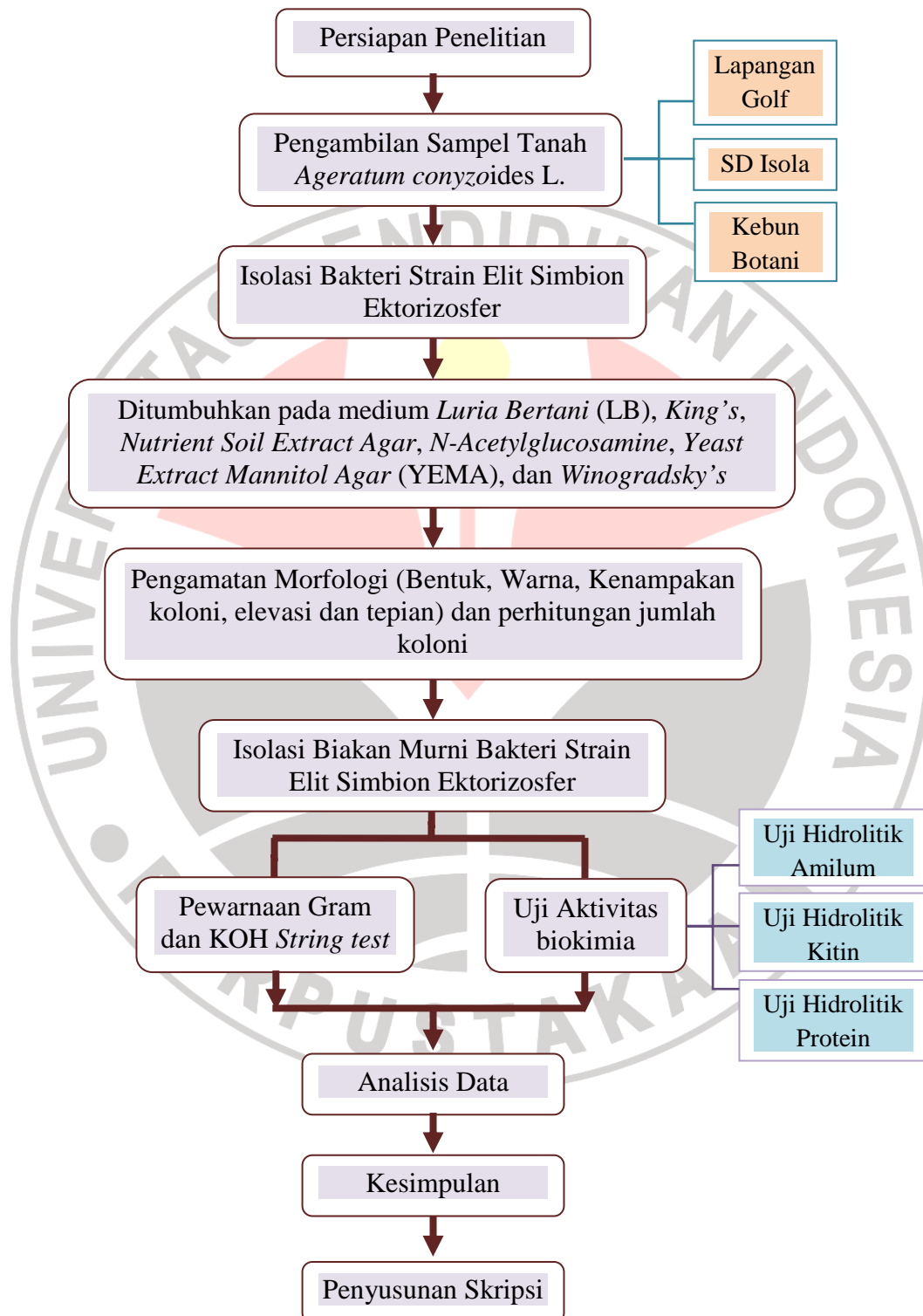
7. Cryoreservasi

Semua isolat bakteri dimasukan dalam tabung sentrifugal yang berisi *Cryo Buffer* kemudian disimpan pada suhu 20°C. Hal ini dilakukan agar isolat bakteri dapat disimpan dalam waktu yang cukup lama.

F. Analisis Data

Karakterisasi isolat bakteri strain elit simbion ektorizosfer dilakukan dengan cara seri pengenceran cawan tuang 10^{-1} sampai 10^{-6} . Hasil pengenceran cawan tuang koloni bakteri diamati berdasarkan struktur morfologis dari koloni bakteri itu sendiri yaitu ukuran koloni, warna koloni, bentuk koloni, tepian koloni, kenaikan permukaan koloni, kenampakan dan jumlah koloni (Capuccino dan Sherman, 1987). Pengamatan dilakukan selama 7 x 24 jam untuk mengetahui optimalisasi pertumbuhan bakteri dengan nutrisi yang ada (terbatas). Kemudian sejumlah bakteri yang memiliki karakteristik morfologi berbeda disubkultur pada medium LB miring. Setelah tahap-tahap di atas selesai dikerjakan kemudian dilakukan uji aktivitas enzimatis, dan reaksi pewarnaan Gram. Uji aktivitas enzimatis bertujuan untuk mengetahui adanya aktivitas amilase, protease, dan kitinase yang ada pada bakteri. Reaksi terhadap pewarnaan Gram bertujuan untuk mengetahui bentuk sel bakteri dan jenis Gram.

G. Alur Penelitian



Gambar 3.1 Diagram Alur Penelitian