

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

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

Penelitian ini merupakan jenis penelitian dasar dengan menggunakan metode deskriptif.

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

1. Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah semua isolat bakteri strain elit simbion endorizosfer *Ageratum conyzoides*.
2. Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah isolat bakteri strain elit simbion endorizosfer *A. conyzoides* dari Lapangan Golf, SD Isola dan Kebun Botani.

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

Penelitian ini dimulai bulan April 2010 sampai dengan September 2010 yang dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi dan Fisiologi Universitas Pendidikan Indonesia, Jalan Dr. Setiabudi No. 229 Bandung.

#### **D. Alat dan Bahan Penelitian**

Peralatan yang digunakan pada penelitian ini terdapat di Laboratorium Mikrobiologi Universitas Pendidikan Indonesia. Daftar alat dan bahan yang digunakan selama penelitian ini terdapat pada **Tabel 3.1** dan **Tabel 3.2**.

**Tabel 3.1** Daftar Alat-alat 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	Merek Diamon	4 pak
16.	Spidol Marker	Merek Faber Casstell	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	Logam	2 buah
31.	Karet Gelang	Tahan Panas	1 pak
32.	Benang Kasur	-	1 gulung
33.	Lup Inokulasi	P = 22,5 cm; = 5 mm	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	Dari kayu	6 buah

**Tabel 3.2** Daftar Bahan-bahan 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-Acetylglucosamine 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.	Kitin	10 gram
16.	Tepung Beras	10 gram
17.	Minyak Imersi	5 ml
18.	<i>Cryo Buffer</i>	50 ml

## E. Prosedur Penelitian

### 1. Persiapan penelitian

Medium tumbuh yang digunakan adalah medium *Luria Bertani* (medium umum untuk semua jenis bakteri), *King's B* (untuk *Pseudomonas*), *Nutrien Soil Extract* (untuk semua jenis bakteri tanah), *N-Acetylglucosamine* (untuk bakteri yang memanfaatkan *N-Acetylglucosamine*), *Yeast Extract Mannitol Agar* (untuk bakteri *Rhizobium*) dan *Winogradsky's* (untuk bakteri *Nitrifikasi*). 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 selama 15-20 menit pada suhu 121<sup>0</sup>C dan tekanan 15 lbs.

## 2. Tahap Penelitian

### a. Pengambilan Sampel dan Kondisi Lingkungan

Pengambilan sampel akar *A. conyzoides* dilakukan di area UPI Bandung. Sampel akar diambil dari tiga titik sebagai pengulangan yaitu 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%) yang dapat dilihat pada Lampiran A. Pencuplikan akar menggunakan peralatan steril yang telah dilakukan sterilisasi panas lembab dengan autoklaf dan disemprot alkohol 70%. Sampel akar yang diambil yaitu dari tumbuhan *A. conyzoides* yang telah berbunga.

### b. Isolasi Bakteri Strain Elit Symbion Endorizosfer

Akar hasil pencuplikan dicuci menggunakan aquadest, dipotong kecil-kecil, ditambahkan 10 ml NaCl 0.85%, dan divorteks selama  $\pm 30$  menit (Modifikasi Egamberdieva, 2008). Kemudian dilakukan pengenceran dari  $10^{-1}$  sampai  $10^{-6}$  (Cappucino & Sherman, 1987). Hasil pengenceran dimasukkan ke dalam cawan petri sebanyak 1 ml dan ditambahkan 10 ml medium *Luria Bertani* (LB), *King's B*, *Nutrien Soil extract*, *N-Acetylglucosamine*, *Yeast Extract Mannitol Agar* (YEMA), dan *Winogradsky's* dengan tujuan untuk mengoptimalkan pertumbuhan bakteri yang ada di endorizosfer A.

*conyzoides* (Han *et al.*, 2009; Atlas, 2005; Purwaningsih *et al.*, 2004) kemudian inkubasi pada suhu ruang selama 24 jam.

### c. Pengamatan Morfologi

Setelah 24 jam inkubasi dilakukan perhitungan jumlah dan pengamatan karakterisasi morfologi koloni selama 7x24 jam. Ciri morfologi bakteri yang diamati meliputi bentuk, warna (pigmentasi), kenampakan koloni (mengkilat atau suram), kenaikan permukaan koloni (elevasi) dan tepian (Cappucino & Sherman, 1987). Perhitungan jumlah dilakukan dengan menggunakan *colony counter*.

### d. Isolasi Biakan Murni Bakteri Strain Elit Simbion Endorizosfer

Setelah pengamatan morfologi pada hari ke tujuh, dilakukan subkultur (kultur murni) pada medium LB miring. Sejumlah koloni bakteri yang disubkultur memiliki karakteristik morfologi yang mewakili keseluruhan koloni yang ada. Hal ini dilakukan untuk mempermudah dalam tahap identifikasi selanjutnya.

### e. Pewarnaan Gram

Isolat bakteri yang berumur 24 jam dari subkultur tersebut dilakukan pewarnaan Gram dan KOH *string test* (Cappucino & 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. Selanjutnya sediaan mikroskopik tersebut dituangi dengan

karbol kristal violet, biarkan selama tiga menit. Kemudian buanglah kelebihan zat warna pada sediaan tersebut. Setelah itu tuangi larutan lugol dan biarkan selama 45-60 detik. Sediaan dimasukan ke dalam beker gelas yang berisi alkohol 96 %, goyang-goyangkan selama satu menit, bilas dengan air menggunakan botol semprot dan keringkan dengan kertas isap. Kemudian dituangi dengan larutan safranin 0 biarkan selama tiga menit. Kelebihan warna dapat dicuci menggunakan air lalu keringkan di udara. Setelah sediaan kering di tetesi 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 & Sherman, 1987).

Penentuan sifat Gram dengan KOH *string test* dapat dilakukan dengan cara satu loop inokulasi dicampurkan dengan KOH 4% yang 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).

#### **f. Uji Aktivitas Biokimia**

##### **1) Uji Hidrolitik Amilum**

Bakteri yang telah dilakukan kultur murni selama 48 jam, dilakukan uji amilolitik untuk mengetahui ada atau tidaknya aktivitas enzim degradatif amilum. Isolat bakteri ditumbuhkan pada medium *Luria Bertani* agar yang ditambah 2% tepung beras

(*rose brand*). Reaksi positif amilolitik ditunjukkan dengan adanya zona bening di sekitar koloni bakteri (Mishra & Behera, 2008).

## 2) Uji Hidrolitik Kitin

Bakteri yang telah dilakukan kultur murni selama 48 jam, dilakukan uji kitinolitik untuk mengetahui ada atau tidaknya aktivitas enzim degradatif kitin. Isolat bakteri ditumbuhkan pada medium *Luria Bertani* agar yang ditambah 0.5% koloidal kitin. Reaksi positif kitinolitik ditunjukkan dengan adanya zona bening di sekitar koloni bakteri (Kamil *et al.*, 2007).

## 3) Uji Hidrolitik Protein

Bakteri yang telah dilakukan kultur murni selama 48 jam, dilakukan uji proteolitik untuk mengetahui ada atau tidaknya aktivitas enzim degradatif protein. Isolat bakteri ditumbuhkan pada medium *Luria Bertani* agar yang ditambah 1% susu skim. Reaksi positif proteolitik ditunjukkan dengan adanya zona bening di sekitar koloni bakteri (Dajanta *et al.*, 2009).

## **g. Cryoreservasi**

Semua isolat bakteri dimasukkan ke dalam *Cryo Buffer* dalam tabung sentrifuga kemudian disimpan pada suhu 20<sup>0</sup>C. Hal ini dilakukan supaya isolat bakteri dapat disimpan dalam waktu yang lama.

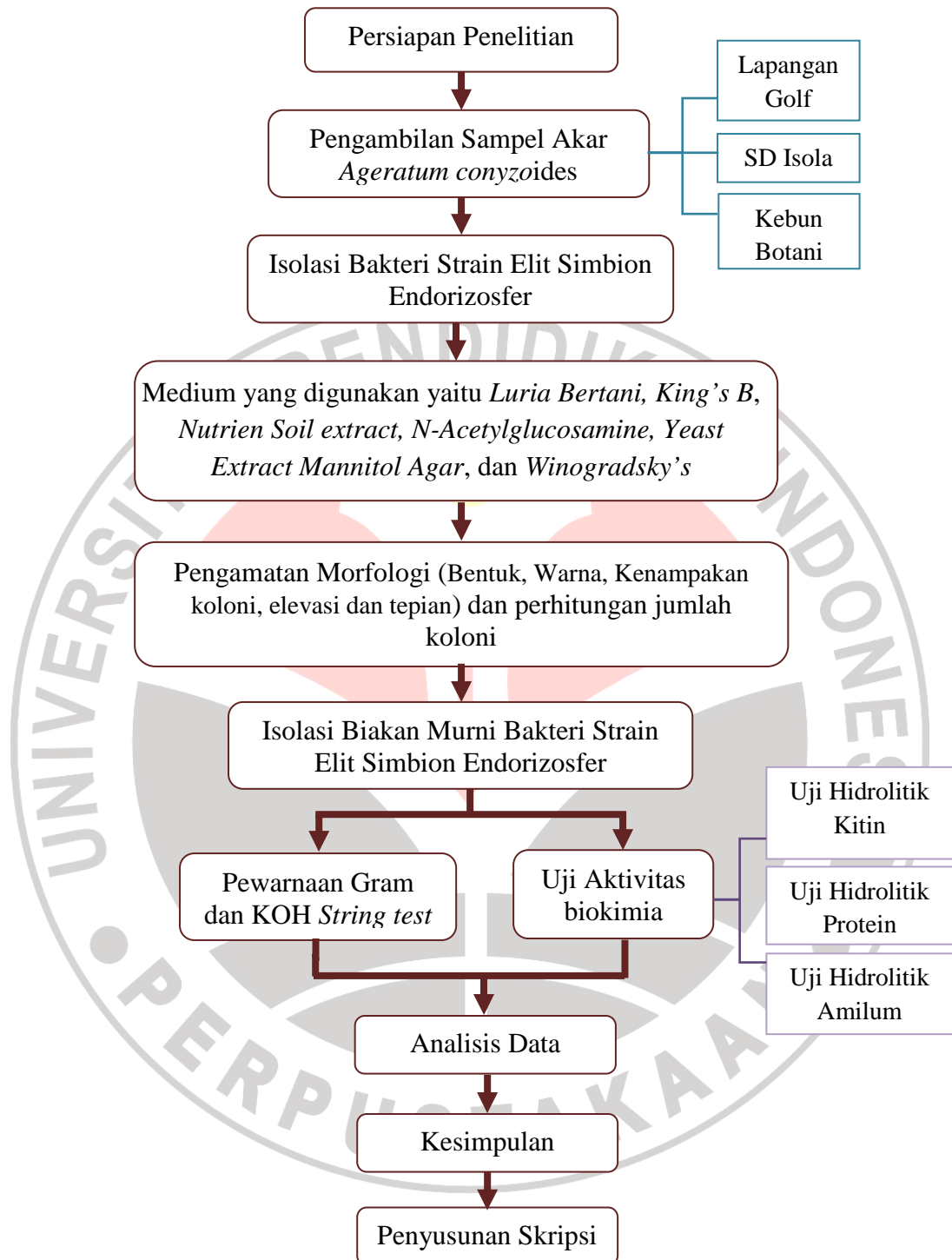
## F. Analisis Data

Identifikasi isolat bakteri strain elit simbiosis endorizosfer dilakukan melalui pengenceran cawan tuang dari  $10^{-1}$  sampai  $10^{-6}$ . Hasil pengenceran cawan tuang diamati bentuk koloni, warna koloni, tepian koloni dan kenaikan permukaan koloni selama 7 x 24 jam untuk mengetahui kemampuan optimal pertumbuhan bakterinya. Kemudian sejumlah bakteri yang memiliki karakteristik morfologi berbeda disubkultur pada medium LB miring. Selanjutnya dilakukan identifikasi lebih lanjut melalui pewarnaan Gram untuk mengetahui bentuk sel dan jenis Gramnya. Setelah itu dilakukan uji aktifitas biokimia yaitu uji hidrolitik amilum, kitin dan protein untuk mengetahui aktivitas enzim yang ada pada bakteri tersebut.

## G. Alur Penelitian

Prosedur penelitian yang akan dilakukan sesuai dengan alur penelitian yang dapat dilihat pada **Gambar 3.1**





**Gambar 3.1** Diagram Alur Penelitian