

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Jenis Penelitian

Penelitian yang dilakukan adalah penelitian dengan menggunakan metode deskriptif untuk mengidentifikasi keragaman bakteri endofit pada kultivar nanas (*Ananas comosus* (L.) Merr.) Leor dan Duri di Kabupaten Subang.

B. Populasi dan Sampel

1. Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah bakteri endofit yang berasal dari dua kultivar buah nanas (Leor dan Duri).
2. Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah semua bakteri yang tumbuh pada medium NA melalui pengenceran dari dua kultivar buah nanas (Leor dan Duri).

C. Lokasi dan Waktu Penelitian

Lokasi penelitian dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Jurusan Pendidikan Biologi FPMIPA Universitas Pendidikan Indonesia, Jl. Dr. Setiabudhi, No.229 Bandung. Penelitian dimulai dari bulan Maret sampai dengan bulan Juli 2013.

D. Alat dan Bahan Penelitian

Penelitian ini menggunakan materi utama yaitu dua kultivar nanas Leor dan Duri yang berasal dari Kabupaten Subang. Alat dan bahan yang digunakan dalam penelitian ini tercantum pada Tabel 3.1 dan 3.2.

Tabel 3.1 Alat-alat dalam penelitian

No.	Nama Alat	Spesifikasi	Jumlah
1.	Autoklaf	Merek EYELA model HL36AE	1 unit
2.	Mikroskop	221.03 BI.J070	1 unit
3.	<i>Rotary Shaker</i>	Merek EYELA model multi shaker MMS	1 unit
4.	Tips 1ml, 5ml dan 10ml	-	Secukupnya
5.	Oven dan Lemari Pendingin	Merek National	1 unit
6.	Neraca timbangan analitik	Merek AND	1 unit
7.	Vortex	Merek EYELA	1 unit
8.	Mikropipet 1m dan 5ml	Merek Effendorf	1 unit
9.	Mikropipet	Merek Effendorf	1 unit
10.	Gelas Beker; labu erlenmeyer 100ml, 250ml, 500ml; labu ukur 100ml; gelas ukur 25ml, 100ml, 500ml; cawan Petri; tabung reaksi; tabung durham; jarum inokulasi; lampu spirtus	Merek Pyrex	50 buah

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini tercantum pada Tabel 3.2

Tabel 3.2 Bahan-Bahan dalam Penelitian

No.	Nama Bahan	Spesifikasi	Jumlah
1.	Medium <i>Nutrient Agar</i> (NA)	Merek (<i>pure analytic</i>)	secukupnya
2.	Larutan Lugol	-	secukupnya
3.	Larutan safranin	-	secukupnya
4.	Laruran <i>crystal violet</i>	-	secukupnya
5.	<i>Aluminium foil</i>	Merek Bagus	1 Roll
6.	Alkohol	70%	secukupnya
7.	Reagen reduksi nitrat	-	secukupnya
8.	Reagen uji katalase	-	secukupnya
9.	Reagen uji oksidase	-	0.01 gr
10.	Reagen uji MR-VP	-	Secukupnya

Fitria Afrianty Ramadhaniah, 2013

Keragaman Bakteri Endofit Pada Kultivar Nanas (*Ananas comosus* (L.) Merr) Leor Dan Duri Di Kabupaten Subang

E. Langkah Kerja

Adapun prosedur kerja yang dilakukan dalam setiap kegiatan adalah sebagai berikut:

1. Tahap Persiapan

Dalam tahap persiapan, yang dilakukan dalam setiap pengecekan alat dan bahan yang digunakan selama penelitian. Setelah lengkap semua kebutuhan penelitian, maka dilakukan sterilisasi botol sampel, beaker glass, labu Erlenmeyer, labu ukur, gelas ukur, cawan Petri, dan tabung reaksi serta peralatan lain yang harus disterilisasi untuk menghindari kontaminasi. Setelah sterilisasi selesai, maka dilakukan pembuatan medium NA untuk menumbuhkan bakteri dari buah nanas. Tiap tabung reaksi masing-masing berisi 5-7 medium NA untuk agar miring sebanyak 40 tabung. Tabung reaksi diisi 12-15 ml medium NA untuk pertumbuhan bakteri melalui cawan tuang.

2. Tahap Penelitian

Dalam tahap penelitian ini, dilakukan beberapa kegiatan yaitu pengambilan sampel buah nanas, isolasi bakteri dari buah nanas, isolasi biakan murni bakteri, dan identifikasi atau karakterisasi bakteri dari buah nanas yang berasal dari kebun nanas Pak Toto Mariuk di Jalan Cagak, Kabupaten Subang, Jawa Barat.

a. Pengambilan Sampel Buah Nanas

Sampling diambil dari kebun nanas Pa Toto Mariuk di Jalan Cagak Kabupaten Subang sebanyak 10 buah. Masing-masing lima buah untuk nanas Leor dan nanas Duri. Buah nanas dipilih dengan tingkat kematangan yang dapat dilihat dari warna buah kuning kehijauan, aromanya tajam dan tekstur buah yang lunak. Selain itu, masa panen buah sama yaitu, umur tanaman 2 tahun 1 minggu. Pengambilan sampel dilakukan secara random.

Fitria Afrianty Ramadhaniah, 2013

Keragaman Bakteri Endofit Pada Kultivar Nanas (*Ananas comosus* (L.) Merr) Leor Dan Duri Di Kabupaten Subang

b. Pengujian Organoleptik

Uji organoleptik dilakukan terhadap 15 orang panelis yang berasal dari mahasiswa Universitas Pendidikan Indonesia untuk mengetahui respon terhadap tingkat kesukaan buah nanas dari kultivar nanas Leor dan nanas Duri. Penilaian uji organoleptik yang diamati meliputi warna, aroma, rasa dan tekstur buah nanas. Semua panelis diberikan kertas hasil uji dan alat tulis untuk menuliskan hasil. Panelis dipersilahkan untuk memakan dan mengamati kedua kultivar nanas yang hanya diberikan kode NA1 dan NA2, sehingga panelis tidak mengetahui jenis nanas yang dimakan. Selanjutnya panelis menuliskan hasil uji organoleptik dari mulai rasa, tekstur, warna dan aroma pada lembar hasil pengamatan yang telah diberikan.

Format uji yang akan digunakan dalam uji organoleptik disajikan pada Tabel 3.3 dengan NA1 sebagai nanas Duri dan NA2 sebagai nanas Leor dan keterangan pengisian format disajikan pada Tabel 3.4.

Tabel 3.3 Format Uji Organoleptik

Indikator	Kode Sampel	
	NA1	NA2
Warna		
Aroma		
Rasa		
Tekstur		

NA1 = Nanas Duri

NA2 = Nanas Leor

Tabel 3.4 Keterangan Pengisian Format Pengujian Organoleptik

Warna	Aroma	Rasa	Tekstur daging buah	Nilai
Lemah	Lemah	Asam	Kasar	1
Sedang	Sedang	Sedang	Sedang	2
Kuat	Kuat	Manis	Halus	3

(Mulyasari, 2004)

Fitria Afrianty Ramadhaniah, 2013

Keragaman Bakteri Endofit Pada Kultivar Nanas (*Ananas comosus* (L.) Merr) Leor Dan Duri Di Kabupaten Subang

c. Isolasi Bakteri dari Buah Nanas

Isolasi bakteri diambil dari bagian endofit buah nanas pada kedua kultivar nanas Leor dan nanas Duri. Sebelum dilakukan isolasi bakteri, kedua kultivar nanas melalui tahap sterilisasi permukaan. Sterilisasi permukaan ini dilakukan untuk menghindari adanya kontaminasi dari bakteri atau jamur lain yang tidak diharapkan terbawa saat isolasi bakteri. Tahapan pertama, buah nanas dibersihkan dari kotoran dengan cara dicuci dengan air mengalir, kemudian merendamnya dengan alkohol 75% selama 2 menit dan dibilas dengan aquades steril sebanyak dua kali. Selanjutnya, sterilisasi permukaan dengan menggunakan larutan alkohol 75% selama 1 menit, Bayclin 25% selama 5 menit. Lalu membilas sampel dengan air steril sebanyak dua kali. Sampel direndam kembali dengan alkohol 75% selama 30 detik dan dibilas kembali sampel dengan aquades steril sebanyak tiga kali. Buah nanas yang telah melewati tahap sterilisasi permukaan, kemudian di jus secara aseptik dengan cara mencuplik bagian endofit (kulit dan daging) buah nanas menggunakan pisau dan ditimbang sebanyak 20 gram. Lalu ditambahkan 180 ml *aquades* dan diblender hingga halus, kemudian dimasukkan ke dalam *erlenmeyer*. Selanjutnya dilakukan metode pengenceran bertingkat.

Proses pengenceran dilakukan dengan menyiapkan empat tabung reaksi yang berisi 9 ml *aquades* steril untuk proses pengenceran dari mulai pengenceran 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} hingga pengenceran 10^{-4} , dengan cara diambil 1 ml jus buah nanas dari *erlenmeyer* dengan tips steril 1 ml melalui mikropipet 1 ml, masukkan ke dalam tabung reaksi 10^{-2} dan dilakukan seterusnya hingga pengenceran 10^{-4} . Setiap hasil pengenceran, diambil 1 ml dengan tips steril 1 ml melalui mikropipet 1 ml dan dimasukkan ke dalam cawan Petri steril. Selanjutnya medium NA cair suhu 37°C dituang ke dalam cawan Petri yang berisi hasil pengenceran dan dihomogenkan dengan cara memutar cawan Petri membentuk angka 8 dan didinginkan hingga agar membeku. Setelah agar membeku, cawan Petri tersebut dimasukkan ke dalam inkubator suhu 30°C selama 24 jam dan diamati koloni yang terbentuk dalam setiap cawan Petri serta dihitung jumlah koloninya melalui *colony counter*.

Fitria Afrianty Ramadhaniah, 2013

Keragaman Bakteri Endofit Pada Kultivar Nanas (*Ananas comosus* (L.) Merr) Leor Dan Duri Di Kabupaten Subang

d. Isolasi Biakan Murni Bakteri Hasil Kultivasi

Koloni bakteri yang telah tumbuh pada cawan Petri hasil kultivasi merupakan biakan umum yang hidup pada buah nanas. Setiap koloni diambil 1 ose yang ditumbuhkan pada medium NA miring agar dihasilkan biakan murni sehingga memudahkan tahap identifikasi selanjutnya. Proses ini dapat berulang beberapa kali untuk peremajaan kultur. Koloni yang telah terbentuk setelah masa inkubasi selama 24 jam pada suhu 30°C kemudian diamati pertumbuhannya dan karakterisasi bakteri dapat digunakan untuk proses pewarnaan Gram dan uji biokimia.

e. Tahap Karakterisasi dan Identifikasi Bakteri

Pada tahap ini, langkah penelitian yang dilakukan adalah pewarnaan Gram dan uji aktivitas biokimia sebagai tahap utama dalam identifikasi bakteri aerob yang ditemukan pada buah nanas. Identifikasi dilakukan dengan berbagai macam metode, yaitu membuat preparat dengan metode pewarnaan Gram dan melakukan uji aktivitas biokimia terhadap bakteri hasil isolasi (Kusnadi *et al.*, 2003). Tahapan identifikasi dalam penelitian ini meliputi pembuatan preparat dengan metode pewarnaan Gram dan uji aktivitas biokimia bakteri.

1) Pembuatan Preparat dengan Metode Pewarnaan Gram

Pembuatan preparat dengan metode pewarnaan Gram dilakukan melalui dua tahap yaitu membuat olesan bakteri dan melakukan pewarnaan Gram terhadap olesan bakteri.

a) Membuat Olesan Bakteri

Objek gelas dibersihkan dengan kapas beralkohol hingga bebas lemak, lalu ditetaskan aquades dengan menggunakan pipet tetes pada obyek gelas dan mengambil satu ose biakan murni bakteri buah nanas dengan menggunakan jarum inokulasi yang telah dipijarkan. Suspense dipijarkan sehingga menjadi sediaan yang tipis dalam bentuk lingkaran

Fitria Afrianty Ramadhaniah, 2013

Keragaman Bakteri Endofit Pada Kultivar Nanas (*Ananas comosus* (L.) Merr) Leor Dan Duri Di Kabupaten Subang

dengan garis tengah ± 2 cm dan dikeringkan di udara lalu difiksasi panas dengan melewati sediaan tersebut pada api sebanyak tiga kali.

b) Melakukan Pewarnaan terhadap Olesan Bakteri

Sediaan bakteri yang telah difiksasi, kemudian ditetesi pewarna karbol kristal violet dan didiamkan selama 3 menit. Kelebihan zat warna dibuang dan ditambahkan larutan lugol, didiamkan selama 45-60 detik. Selanjutnya, sediaan bakteri dialiri dengan larutan alkohol 96% selama 1 menit, lalu dibilas sediaan tersebut dengan botol semprot dan dikeringkan olesan tersebut dengan kertas isap. Kemudian ditambahkan larutan safranin O dan dibiarkan selama 3 menit, lalu dicuci dengan aquades dan dikeringkan di udara. Sebelum diamati di bawah mikroskop cahaya dengan menggunakan lensa obyektif 100x, sediaan tersebut ditetesi minyak imersi. Apabila warna koloni bakteri menunjukkan merah maka bakteri tersebut termasuk bakteri Gram negatif dan jika menunjukkan warna biru/ungu maka bakteri tersebut termasuk menunjukkan bakteri Gram positif.

2) Uji Aktivitas Biokimia

Uji aktivitas biokimia yang dilakukan dalam penelitian ini adalah uji hidrolisis pati, hidrolisis lipid, hidrolisis kasein, hidrolisis gelatin, uji fermentasi karbohidrat, uji produksi H_2S , uji reduksi nitrat, uji reaksi katalase, uji urease, uji oksidase dan uji IMVIC yang terdiri dari uji Indol, uji Metil merah, uji Voges Proskeur dan uji sitrat. Uji aktivitas biokimia ini berpedoman pada buku (Cappuccino & Sherman, 2005).

a) Uji Hidrolisis Pati

Bakteri yang telah diisolasi dari buah nanas dalam cawan Petri yang berisi medium agar pati diinokulasi lalu diinkubasi jam pada suhu $37^{\circ}C$, setelah terlihat adanya pertumbuhan maka kultur dituangi dengan larutan lugol dan didiamkan selama beberapa menit. Kemudian diamati

Fitria Afrianty Ramadhaniah, 2013

Keragaman Bakteri Endofit Pada Kultivar Nanas (*Ananas comosus* (L.) Merr) Leor Dan Duri Di Kabupaten Subang

perubahan warna yang terjadi pada sekitar koloni. Hasil positif ditunjukkan dengan terbentuknya zona bening disekitar koloni setelah ditetaskan iodium.

b) Uji Hidrolisis Lipid

Bakteri yang telah diisolasi dari buah nanas dalam cawan Petri yang berisi medium agar pati diinokulasi lalu diinkubasi selama 1x24 jam pada suhu 37°C, kemudian diamati perubahan daerah suram/merah pada medium lipid menjadi daerah bening/terang di sekitar pertumbuhan koloni diakibatkan oleh reaksi kemampuan bakteri menghidrolisis lipid agar menjadi asam lemak dan gliserol (Syulasma *et al.*, 2009).

c) Uji Hidrolisis Kasein

Bakteri yang telah diisolasi dari buah nanas dalam cawan Petri yang berisi medium agar kasein diinokulasi lalu diinkubasi selama 1x24 pada suhu 37°C, kemudian diamati perubahan warna yang terjadi pada sekitar koloni. Hasil positif ditunjukkan dengan adanya area bening di sekitar koloni.

d) Uji Hidrolisis Gelatin

Bakteri yang telah diisolasi dari buah nanas dalam tabung reaksi yang berisi medium *nutrient* gelatin diinokulasi lalu diinkubasi selama 1x24 pada suhu 37°C selanjutnya disimpan pada inkubator suhu 4°C selama 30 menit. Kemudian diamati cair atau tidaknya medium. Hasil positif menunjukkan jika medium tetap cair (walau hanya sebagian) dan tidak memadat dalam lemari es. Hasil negatif menunjukkan jika media masih dalam keadaan utuh (bakteri tidak menghasilkan gelatinase) dan telah memadat dalam lemari es.

e) Uji Fermentasi Karbohidrat

Bakteri yang telah diisolasi dari buah nanas dalam 1 tabung reaksi yang berisi medium *fenol red* laktosa dan tabung Durham, 1 tabung reaksi berisi medium *fenol red* sukrosa dan tabung Durham dan 1 tabung reaksi berisi medium *fenol red* destroksa dan tabung Durham. Semuanya diinokulasi lalu diinkubasi selama 1x24 jam pada suhu 37°C, kemudian diamati perubahan warna pada medium dan ada atau tidaknya gelembung udara pada tabung Durham.

f) Uji Produksi H₂S

Bakteri yang telah diisolasi dari buah nanas dalam tabung reaksi yang berisi medium *Sulfate Indol Motily* (SIM) dengan menggunakan ose lurus ditusukkan pada medium dan diinokulasi lalu diinkubasi selama 1x24 jam pada suhu 37°C, dan disimpan pada inkubator suhu 4°C selama 30 menit. Kemudian diamati perubahan warna medium dari kuning menjadi kehitaman.

g) Uji Motilitas

Bakteri yang telah diisolasi dari buah nanas dalam tabung reaksi yang berisi medium SIM agar dan diinokulasi lalu diinkubasi selama 1x24 jam pada suhu 37°C, lalu disimpan pada inkubator suhu 4°C selama 30 menit. Kemudian diamati perubahannya, jika timbul kekeruhan seperti kabut menandakan hasil positif.

h) Uji Reduksi Nitrat

Bakteri yang telah diisolasi dari buah nanas dalam tabung yang berisi medium kaldu nitrat diinokulasi lalu diinkubasi pada suhu 22-37°C selama 1-2 x 24 jam. Kemudian ditetesi 3-4 tetes larutan nitrat A dan larutan nitrat B di atas permukaan kultur, didiamkan beberapa menit dan diamati perubahan yang terjadi. Perubahan warna medium putih kekuningan menjadi merah menunjukkan reaksi positif. Sedangkan

Fitria Afrianty Ramadhaniah, 2013

Keragaman Bakteri Endofit Pada Kultivar Nanas (*Ananas comosus* (L.) Merr) Leor Dan Duri Di Kabupaten Subang

medium yang tidak mengalami perubahan warna, selanjutnya ditambahkan *zinc powder* secukupnya dan diamati perubahan yang terjadi. Jika terjadi perubahan warna medium putih kekuningan menjadi merah, maka reaksi menunjukkan hasil negatif dan bila tidak menunjukkan perubahan warna, maka reaksi menunjukkan hasil positif.

i) Uji Reaksi Katalase

Bakteri yang telah diisolasi dari buah nanas dalam tabung reaksi yang berisi 7 ml medium NA diinokulasi lalu diinkubasi selama 1x24 jam pada suhu 37°C, lalu ditetesi H₂O₂ 3% dan diamati ada atau tidak adanya gelembung udara di atas permukaan kultur bakteri. Munculnya gelembung-gelembung gas menunjukkan hasil positif.

j) Uji Urease

Bakteri yang telah diisolasi dari buah nanas dalam tabung reaksi yang berisi medium urea diinokulasi lalu diinkubasi selama 1x24 pada suhu 37°C, kemudian diamati perubahan warna pada medium. Hasil positif ditunjukkan dengan perubahan warna pada medium menjadi merah muda.

k) Uji Oksidase

Bakteri yang telah diisolasi dari buah nanas lalu diambil satu ose dengan menggunakan jarum inokulasi dan dioleskan pada selembur kertas saring. Kemudian ditetesi 1-2 tetes menggunakan pipet tetes reagen oksidase pada kultur bakteri. Lalu diamati perubahan warna pada kultur bakteri. Pembentukan warna ungu kebiruan yang secara bertahap menjadi warna ungu menunjukkan hasil positif dan tidak adanya perubahan warna menunjukkan hasil negatif.

D) Uji IMVIC

Uji IMVIC digunakan untuk membedakan bakteri enterik (Family Enterobacteriaceae seperti *Enterobacter*). Terdiri dari Uji Indol, Uji Methyl Red dan Uji Voges-Proskauer (MR-VP), serta Uji Simmon's sitrat. Uji IMVIC tersebut sebagai berikut:

a) Uji Indol

Bakteri yang diisolasi dari buah nanas dalam tabung reaksi yang berisi medium *tryptone broth* diisolasi lalu diinkubasi selama 1x24 jam pada suhu 37°C, kemudian diteteskan 3-5 tetes reagen Kovacks dengan menggunakan pipet tetes dan diamati ada atau tidaknya pembentukan cincin pada medium. Hasil positif menunjukkan terbentuknya cincin merah pada permukaan medium dan hasil negatif menunjukkan warna kuning atau coklat pada permukaan medium.

b) Uji Metil Merah

Menginokulasi bakteri yang diisolasi dari buah nanas dalam tabung reaksi yang berisi medium MR-VP broth dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Lalu hari berikutnya diteteskan 3-5 tetes *methyl red* pada tabung dan dihomogenkan. Diamati perubahan warna pada medium, jika medium berwarna merah setelah penambahan reagen *methyl red* maka menunjukkan hasil positif sedangkan jika medium berwarna kuning maka menunjukkan hasil negatif.

c) Uji Voges Proskauer

Menginokulasi bakteri yang diisolasi dari buah nanas dalam tabung reaksi yang berisi medium MR-VP broth dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Kemudian ditambahkan 5 tetes reagen VP A (yang mengandung naphthol) dan ditambahkan juga 5 tetes

Fitria Afrianty Ramadhaniah, 2013

Keragaman Bakteri Endofit Pada Kultivar Nanas (*Ananas comosus* (L.) Merr) Leor Dan Duri Di Kabupaten Subang

reagen VP B (yang mengandung KOH), lalu dikocok hingga homogen dan didiamkan selama 15-20 menit. Selanjutnya diamati perubahan warna pada medium kultur bakteri, reaksi positif ditunjukkan dengan adanya perubahan warna menjadi pink atau merah yang mengindikasikan adanya aseton. Sedangkan reaksi negatif ditunjukkan dengan tidak berubahnya warna medium menjadi warna tembaga.

d) Uji Simmon's Sitrat

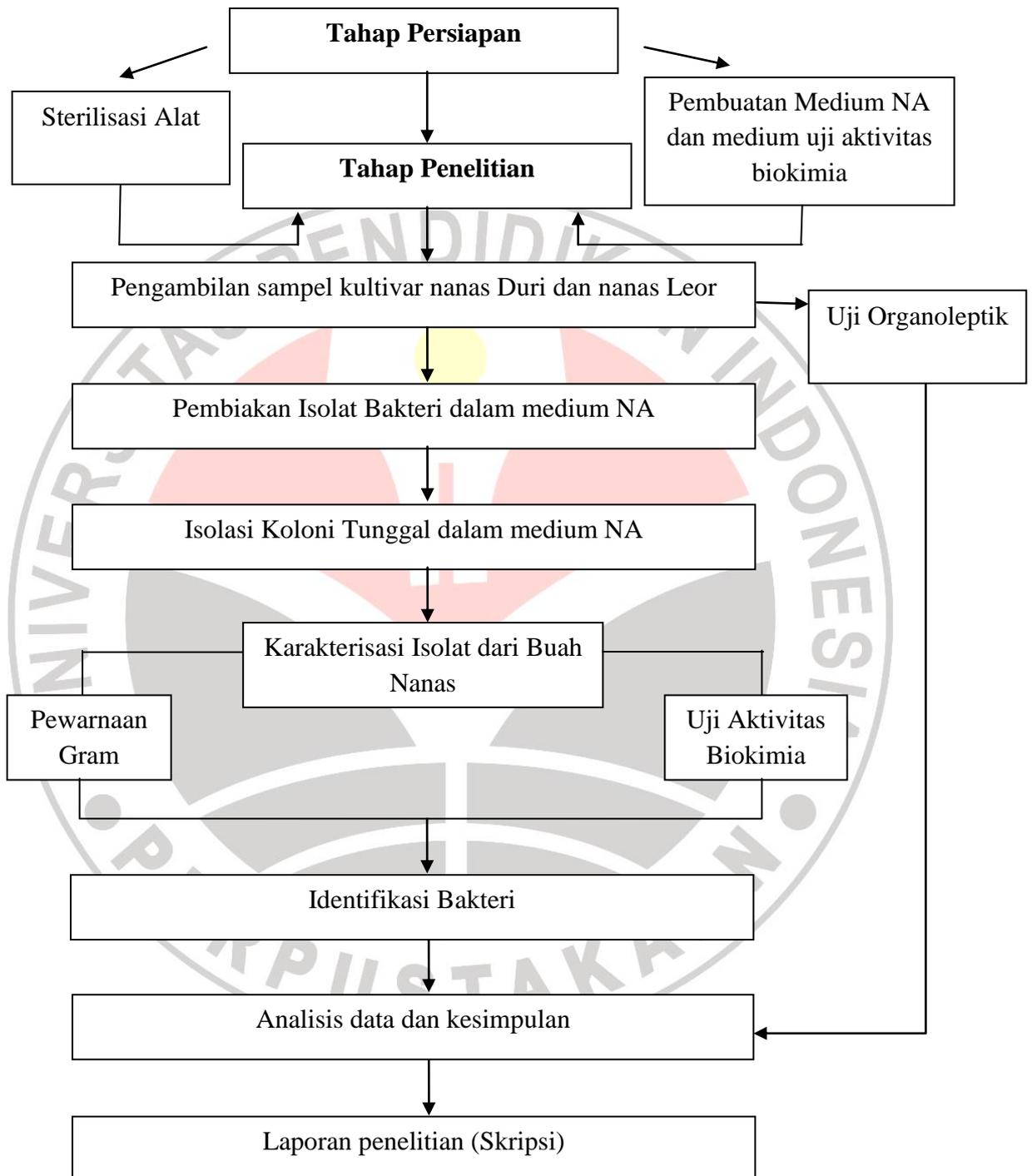
Menginokulasi bakteri yang diisolasi dari buah nanas dalam tabung reaksi yang berisi medium Simmon's sitrat agar dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Kemudian diamati perubahan pada medium, reaksi positif ditunjukkan dengan perubahan warna hijau medium menjadi warna biru. Sedangkan reaksi positif ditunjukkan dengan tidak adanya perubahan warna pada medium (tetap hijau).

f. Identifikasi Bakteri

Setelah sampling buah nanas dilakukan dan dihasilkan kultur bakteri biakan murni pada medium agar miring, maka kultur bakteri dari buah nanas akan diidentifikasi melalui reaksi pewarnaan Gram, KOH *string test* dan uji biokimia agar diketahui karakteristik bakteri sebagai tahap identifikasi yang diharapkan. Karakteristik bakteri tersebut kemudian dicocokkan dengan *Bergey's manual Determinative Bacteriology Ninth Edition* (1994). Hasil identifikasi bakteri kemudian dihubungkan dengan hasil uji organoleptik dari nanas Leor dan nanas Duri.

g. Alur Penelitian

Bagan alur penelitian dapat dilihat pada Gambar 3.1.



Gambar 3.1 Bagan Alur Penelitian

Fitria Afrianty Ramadhaniah, 2013

Keragaman Bakteri Endofit Pada Kultivar Nanas (*Ananas comosus* (L.) Merr) Leor Dan Duri Di Kabupaten Subang