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

C. Waktu dan Lokasi Penelitian

Penelitian ini dimulai pada bulan Maret sampai dengan Juli 2013 yang dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi Jurusan Pendidikan Biologi Fakultas Pendidikan Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Pendidikan Indonesia, Jalan Dr. Setiabudhi No.229 Bandung.

D. Alat dan Bahan

1. Alat

Alat-alat yang digunakan adalah mikroskop (22.103 BI.J07), *hot plate and magnetic stirer* (EYELA), *autoclave* (Hirayama Mode HC36At), *Vorteks* (SIBATA), timbangan analitik (AND,HF 300), spatula, cawan petri, tabung reaksi, lup inokulasi, rak tabung, gelas ukur 10ml, gelas ukur 500ml, gelas kimia 1000ml, mikropipet 5ml, inkubator, tips 5ml, 10ml, kamera digital (Canon Ixus 115), plastik tahan panas, kain kasa, kapas, label, *object glass*, *tissue*, kertas saring, dan alat tulis menulis.

2. Bahan

a. Bahan Segar

Bahan segar yang digunakan dalam penelitian ini adalah 4 sampel nanas dengan dua kultivar yang berbeda yang diambil dari kebun nanas Toto di Kabupaten Subang, Jawa Barat. Dua kultivar nanas tersebut, antara lain:

Indri Rahmithasuci, 2013
Keragaman Bakteri Endofit Pada Kultivar Nanas (*Ananas comosus* (L.) Merr) Simadu Dan Biasa Di Kabupaten Subang
Universitas Pendidikan Indonesia | repository.upi.edu | perpustakaan.upi.edu

1) *Smooth Cayenne* (Simadu)
2) *Cayenne* (Biasa)

b. Bahan uji

Bahan uji yang diperlukan adalah safranin, kristal violet, alkohol 96%, H_2O_2, dimethyl 1-naphthhylamine, asam sulfanilat, Kovac's reagen, methyl red, reagen Barritt's A, reagen Barritt's B.

c. Bahan Media

Bahan media yang diperlukan adalah, akuades, kaldu laktosa, kaldu sukrosa, kaldu dekstrosa, phenol red, pati agar, lipid agar, kasein agar, gelatin agar, *urea broth*, *Tryptone broth*, *Nitrate broth*, SIM (*Sulfide Indole Motily*) agar, *MRVP broth*, Simmon's sitrat agar.

E. Langkah Kerja

Penelitian ini dibagi menjadi 2 tahap yaitu tahap persiapan dan tahap penelitian.

1. Tahap Persiapan

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°C dan tekanan 2 atm.

2. Tahap Penelitian

a. Pengambilan Sampel

Sampel buah nanas dengan masa penanaman 2 tahun 1 minggu diambil dari kebun nanas Toto di Jalan Cagak, Kabupaten Subang. Pengambilan sampel dilakukan secara random.

b. Pengujian Organoleptik

Pengujian organoleptik dilakukan saat sampel masih dalam kondisi segar. Sampel yang akan diisolasi, sebagian diambil dan dilakukan pengujian organoleptik. Penilaian organoleptik yang diamati adalah warna, aroma, rasa dan tekstur. Untuk mengetahui respon masyarakat terhadap tingkat kesukaan buah nanas dari dua kultivar yang berbeda, dipilih 15 orang sebagai panelis.

Indri Rahmithasuci, 2013
Keragaman Bakteri Endofit Pada Kultivar Nanas (*Ananas comosus* (L.) Merr) Simadu Dan Biasa Di Kabupaten Subang
Universitas Pendidikan Indonesia | repository.upi.edu | perpustakaan.upi.edu

Pemeringkatan dilakukan dengan menyusun data dari nilai terbesar pada setiap panelis (Gagung, 2012).

Form uji yang akan digunakan dalam pengujian organoleptik tetera pada tabel 3.1 dengan Na1 sebagai nanas Simadu dan Na2 sebagai nanas biasa dan keterangan untuk pengisian form tertera pada tabel 3.2.

Tabel 3.1 Form uji Organoleptik

Indikator	Kode Sampel	
	Na1	Na2
Warna		
Aroma		
Rasa		
Tekstur		

Na1 = Nanas Simadu
Na2 = Nanas Biasa

Tabel 3.2 Keterangan untuk pengisian form pengujian organoleptik

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

c. Pembiakan Isolat Bakteri

1) Sterilisasi permukaan

Sampel berupa buah nanas dibersihkan dari kotoran dengan cara dicuci dengan air mengalir, kemudian merendamnya dengan alkohol 75% selama 2 menit dan dibilas dengan akuades 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 dengan akuades steril sebanyak tiga kali.

Indri Rahmithasuci, 2013
Keragaman Bakteri Endofit Pada Kultivar Nanas (*Ananas comosus* (L.) Merr) Simadu Dan Biasa Di Kabupaten Subang
Universitas Pendidikan Indonesia | repository.upi.edu | perpustakaan.upi.edu

2) Pengenceran Sampel

Sampel berupa irisan daging buah dan kulit buah nanas dijus dengan cara mencuplik bagian daging dan kulit buah sebanyak 20 gram. Lalu ditambahkan akuades 180 ml. Lalu diencerkan menggunakan metode pengenceran, pada pengenceran ke- 10^{-2},10^{-3} dan 10^{-4} sampel diambil masing-masing sebanyak 1 ml lalu di tuang ke media KNA dan diinkubasi pada suhu 37 ^{o}C selama 1x24 jam. Tahap selanjutnya, yaitu pemurnian Isolat dilakukan pada medium KNA yang baru. Lalu diinkubasi pada suhu 37 ^{o}C selama 2x24 jam.

Metode pengenceran dilakukan dengan mengencerkan larutan sampel sampai empat kali pengenceran. Pengenceran sampel secara bertingkat dilakukan dengan memindahkan 1 ml larutan sampel secara aseptik ke dalam larutan pengencer (9 ml akuades). Dari pengenceran pertama didapatkan pengenceran 10^{-2}, kemudian 1 ml sampel dari 10^{-2} dipindahkan ke dalam 9 ml larutan pengencer sehingga didapatkan pengenceran 10^{-3} dan 1 ml sampel diambil kembali sampai pada pengenceran 10^{-4}.

d. Pengamatan Morfologi dan Isolasi Biakan Murni Bakteri

Pengamatan morfologi koloni bakteri dilakukan setelah 24 jam masa inkubasi. Pengamatan morfologi tersebut merujuk kepada Cappuccino& Sherman (2005), ciri morfologi koloni yang diamati mulai dari bentuk, warna, kenampakan bakteri (mengkilat atau suram), kenaikan permukaan (elevasi), dan tepian. Koloni-koloni yang tumbuh pada cawan Petri masih merupakan biakan campuran, maka dari itu setiap koloni yang berbeda dipindahkan kembali ke dalam medium KNA miring agar diperoleh biakan murni.

Indri Rahmithasuci, 2013
Keragaman Bakteri Endofit Pada Kultivar Nanas (*Ananas comosus* (L.) Merr) Simadu Dan Biasa Di Kabupaten Subang
Universitas Pendidikan Indonesia | repository.upi.edu | perpustakaan.upi.edu

e. Pewarnaan Gram

Pewarnaan gram dilakukan untuk melihat karakteristik dan bentuk sel bakteri. Sebuah koloni tunggal bakteri diambil dari *slide culture* dibuat sediaan mikroskopiknya. Preparat kemudian ditetesi kristal violet selama 1 menit. Preparat kemudian ditetesi dengan lugol selama 45-60 detik. Selanjutnya, proses dekolorisasi dengan menggunakan alkohol 96% sampai tidak ada sisa warna yang keluar dari preparat. Lalu bilas dengan akuades dan dikeringkan dengan kertas isap. Selanjutnya, preparat ditetesi safranin selama 1 menit, dicuci dengan akuades dan dibiarkan kering. Sebelum diamati dibawah mikroskop cahaya 1000x, preparat ditetesi minyak imersi. Untuk hasil, warna ungu menunjukkan bakteri gram positif dan warna merah menunjukkan bakteri gram negatif (Cappuccino & Sherman, 2005).

f. KOH *string test*

KOH *string test* dilakukan untuk memastikan kebenaran dari hasil uji pewarnaan Gram. Kaca objek ditetesi 3% KOH cair, kemudian pindahkan sejumlah sel dari biakan ke tetesan KOH menggunakan jarum inokulum (jumlah ini jangan terlalu sedikit), aduk sampai merata sempurna, jika suspensi menjadi berlendir maka dinyatakan sebagai Gram negatif. Untuk mengetahuinya ujung inokulum diangkat-angkat kurang lebih 1 cm dari kaca objek. Jika tidak terdapat lendir dinyatakan sebagai Gram positif (Cappuccino & Sherman, 2005).

g. Uji Biokimiawi

Uji biokimiawi yang dilakukan merujuk pada Cappuccino & Sherman (2005). Adapun uraian dari uji biokimiawi yang digunakan, antara lain:

1) Uji Fermentasi Karbohidrat

Uji fermentasi karbohidrat dilakukan untuk mengetahui kemampuan isolat bakteri dalam memfermentasi karbohidrat. Terdapat tabung medium phenol red laktosa, medium phenol red dekstrosa dan medium phenol red sukrosa. Masukan tabung durham tanpa ada gelembung ke masing-masing medium. Inokulasikan mikroorganisme ke dalam masing-

Indri Rahmithasuci, 2013
Keragaman Bakteri Endofit Pada Kultivar Nanas (*Ananas comosus* (L.) Merr) Simadu Dan Biasa Di Kabupaten Subang
Universitas Pendidikan Indonesia | repository.upi.edu | perpustakaan.upi.edu

masing medium. Inkubasi 1-2 x 24jam pada suhu 37°C (Cappuccino & Sherman, 2005).

2) Uji Hidrolisis Pati

Menyiapkan medium agar pati dalam cawan petri. Lalu menginokulasi bakteri dan diinkubasi selama 1-2 x 24 jam pada suhu 22-37 ^{o}C selama 24 jam (Cappuccino & Sherman, 2005).

3) Uji Hidrolisis Lipid

Medium lipid agar dituang ke cawan petri. Bakteri diinokulasi dan diinkubasi selama 1-2 x 24 jam pada suhu 22-37°C (Cappuccino & Sherman, 2005).

4) Uji Hidrolisis Gelatin

Media gelatin diinkubasi pada suhu 37°C selama 48 jam. Kemudian, diinkubasi dalam lemari es pada suhu 4°C selama kurang lebih 30 menit (Cappuccino & Sherman, 2005).

5) Uji Hidrolisis Kasein

Uji ini dapat digunakan untuk mendeteksi adanya enzim protease. Medium susu skim dicairkan lalu didinginkan sampai suhu 45°C dan dituang ke cawan petri. Mikroorganisme diinokulasi dan diinkubasi selama 1-2 x 24 jam pada suhu 22-37°C (Cappuccino & Sherman, 2005).

6) Uji Katalase

Uji ini dapat digunakan untuk mendeteksi keberadaan enzim katalase. Isolat bakteri diinokulasikan ke dalam medium NA dan diinkubasi pada suhu 22-37°C selama 24 jam. Setelah terlihat adanya pertumbuhan, larutan H_2O_2 (hidrogen peroksida) 3% diteteskan di atas permukaan koloni. Gelembung yang muncul menunjukkan hasil yang positif (Cappuccino & Sherman, 2005).

7) Uji Oksidase

Sejumlah inokulum kecil dari cawan petri dioleskan pada selembar kertas saring. Setetes reagen oksidase (1% b / v tetramethyl-phenylenediaminedihydrochloride) diteteskan ke koloni dan mengamati

Indri Rahmithasuci, 2013
Keragaman Bakteri Endofit Pada Kultivar Nanas (*Ananas comosus* (L.) Merr) Simadu Dan Biasa Di Kabupaten Subang
Universitas Pendidikan Indonesia | repository.upi.edu | perpustakaan.upi.edu

perubahan warna. Pembentukkan warna ungu kebiruan yang secara bertahap menjadi warna ungu menunjukkan hasil positif dan tidak ada perubahan warna menunjukkan hasil negatif (Cappuccino & Sherman, 2005).

8) Uji Reduksi Nitrat

Mikroorganisme ditumbuhkan dalam kaldu *nitrate broth*. Inkubasi selama 1-2 x 24 jam pada suhu 37°C. Teteskan reagen A (sulfanilic acid) dan reagen B (∝-naphthylamine), jika terbentuk warna jingga menunjukkan hasil positif. Biakan yang tidak berubah warna diteteskan kembali dengan zinc powder, jika berubah warna menjadi jingga maka hasil positif (Cappuccino & Sherman, 2005).

9) Uji Urease

Uji ini bertujuan untuk mengetahui adanya urease. Medium yang digunakan adalah bacto urea agar base. Semua bahan medium dilarutkan, tidak boleh dipanaskan dan disterilkan dengan cara menyaring dengan *filter Seitz*. Kemudian dilarutkan bacto agar 15 gram dalam akuades 900 ml dan disterilkan dalam otoklaf. Larutan pertama dicampur dengan larutan kedua secara aseptik pada suhu 50-55 ^{o}C. Kemudian tuang dalam tabung steril 3-5 ml dan diletakan dalam posisi miring (Tim Praktikum POLTEKES Bandung, 2005).

10) Uji Motilitas

Isolat bakteri diinokulasikan pada medium *Sulfate Indol Motily* (SIM) dan diinokulasikan menggunakan ose lurus dengan posisi lurus. (Raihana,2011).

11) Uji Produksi H_2S

Uji ini dilakukan pada medium *Sulfate Indol Motily* (SIM). Bakteri diinokulasikan menggunakan ose lurus dengan posisi lurus. Hasil uji positif bila terdapat gelembung (Raihana,2011).

12) Uji IMViC

Indri Rahmithasuci, 2013
Keragaman Bakteri Endofit Pada Kultivar Nanas (*Ananas comosus* (L.) Merr) Simadu Dan Biasa Di Kabupaten Subang
Universitas Pendidikan Indonesia | repository.upi.edu | perpustakaan.upi.edu

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 dipaparkan sebagai berikut:

a) Uji Indol

Uji Indol dilakukan untuk mengetahui apakah bakteri dapat membentuk indole dari degradasi asam amino tryptophan. Satu ose bakteri ditanam dalam media SIM, diinkubasi pada suhu 37^0C selama 24 jam. Lalu diteteskan *reagen Kovacks* (terdiri dari dimetil aminobenzaldehid, n-amyl alkohol & HClp), hasil positif menunjukkan terbentuknya cincin merah pada permukaan medium dan hasil negatif menunjukkan warna kuning atau coklat pada permukaan medium (Cappuccino & Sherman, 2005).

b) Uji Methyl Red

Uji ini bertujuan untuk menentukan adanya fermentasi asam campuran. Kaldu MR-VP disiapkan, lalu dimasukkan 5 mL kaldu MR-VP dalam tabung reaksi dan diinokulasikan biakan bakteri. Kemudian diinkubasi pada suhu 37^oC selama 24 jam. Hari berikutnya ditambahkan reagen methyl red 5 tetes, jika kaldu berwarna merah setelah penambahan reagen methyl red maka menunjukan hasil uji positif, dan jika warna kaldu berwarna kuning maka hasil uji negatif.

c) Uji Voges-Proskauer

Uji Voges-Proskauer dilakukan untuk membedakan organisme yang menghasilkan asam atau produk netral berupa asetil metil karbinol dari metabolisme glukosa. Kaldu MR-VP disiapkan, lalu dimasukkan 5 mL kaldu MR-VP dalam tabung reaksi dan diinokulasikan biakan bakteri. Kemudian diinkubasi pada suhu 37^0C selama 24 jam. Setelah itu diteteskan 2 tetes reagen barit A (mengandung naphtol) dan barit B (mengandung KOH), apabila terjadi perubahan warna menjadi pink menunjukkan reaksi positif, sedangkan reaksi negatif tidak menunjukkan perubahan warna (Cappuccino & Sherman, 2005).

Indri Rahmithasuci, 2013
Keragaman Bakteri Endofit Pada Kultivar Nanas (*Ananas comosus* (L.) Merr) Simadu Dan Biasa Di Kabupaten Subang
Universitas Pendidikan Indonesia | repository.upi.edu | perpustakaan.upi.edu

d) Uji Simmon's Sitrat

Digunakan untuk mengenali mikroba yang mampu memanfaatkan sitrat sebagai sumber karbon. Media ini mengandung indikator pH. Jika sitrat digunakan oleh bakteri dalam media, maka pH menjadi lebih alkalin sehingga media berubah dari hijau ke biru (basa). Sebuah koloni bakteri tunggal digoreskan ke medium Simmon's sitrat agar dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 48 jam. Hasil positif menunjukkan jika media berubah menjadi warna biru sementara hasil negatif menunjukkan bahwa tidak ada perubahan warna.

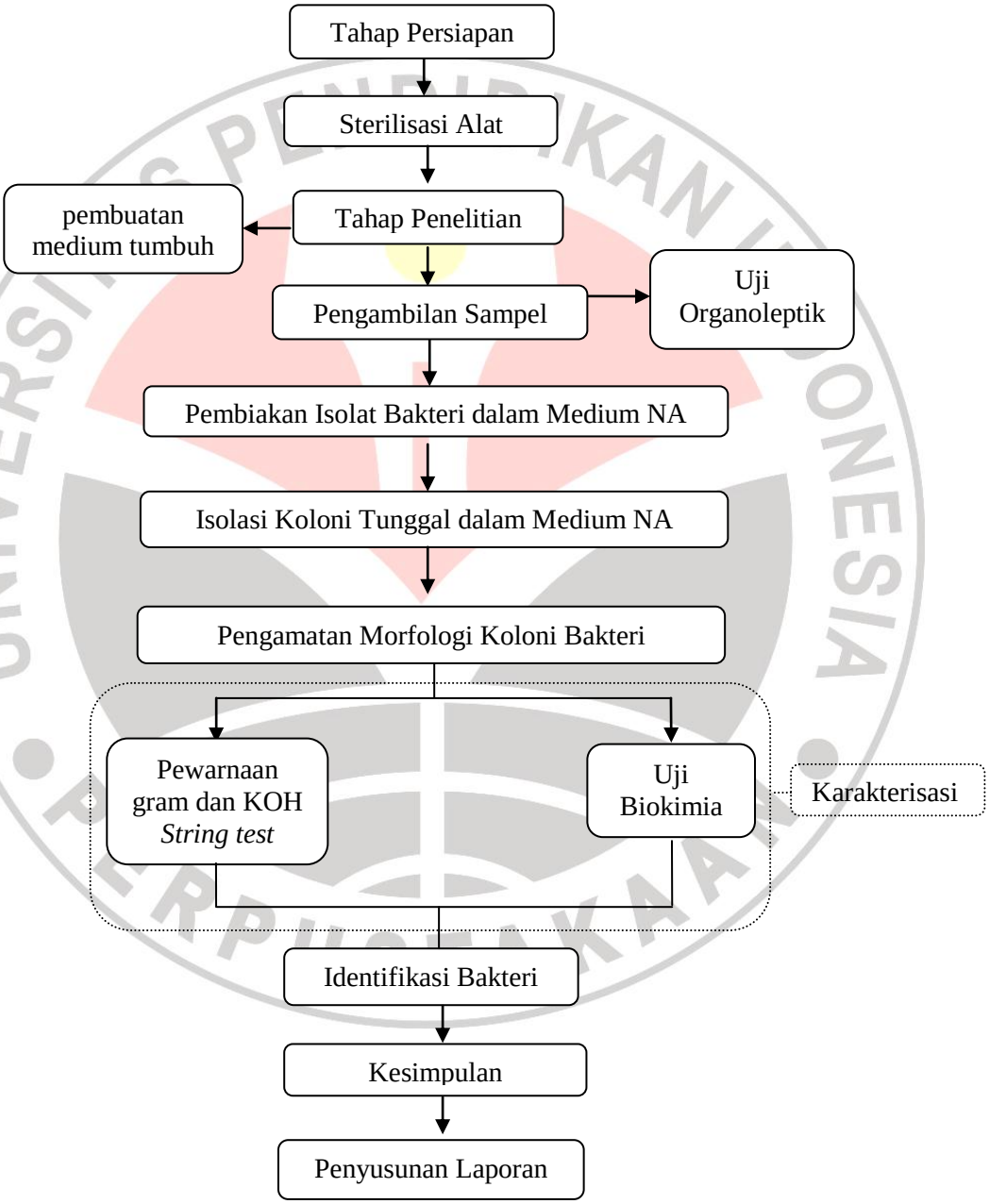
F. Identifikasi Bakteri

Melalui uji pewarnaan Gram, KOH *string test* dan uji biokimia akan diketahui karakteristik dari bakteri pada buah nanas. Karakteristik bakteri tersebut kemudian dicocokkan dengan *Bergey's manual Determinative Bacteriology Ninth Edition* (1994).

Indri Rahmithasuci, 2013
Keragaman Bakteri Endofit Pada Kultivar Nanas (*Ananas comosus* (L.) Merr) Simadu Dan Biasa Di Kabupaten Subang
Universitas Pendidikan Indonesia | repository.upi.edu | perpustakaan.upi.edu

G. Alur Penelitian

Alur penelitian dapat dilihat pada Gambar 3.1.



Gambar 3.1 Bagan Alur Penelitian

Indri Rahmithasuci, 2013
Keragaman Bakteri Endofit Pada Kultivar Nanas (*Ananas comosus* (L.) Merr) Simadu Dan Biasa Di Kabupaten Subang
Universitas Pendidikan Indonesia | repository.upi.edu | perpustakaan.upi.edu

UNIVERSITAS PENDIDIKAN INDONESIA
PERPUSTAKAAN

Indri Rahmithasuci, 2013
Keragaman Bakteri Endofit Pada Kultivar Nanas (*Ananas comosus* (L.) Merr) Simadu Dan Biasa Di Kabupaten Subang
Universitas Pendidikan Indonesia | repository.upi.edu | perpustakaan.upi.edu