

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang dilakukan adalah penelitian dasar dengan menggunakan metode deskriptif (Nazir, 1988).

B. Populasi dan Sampel

Populasi yang digunakan pada penelitian ini adalah bakteri endofit yang terdapat pada daun *V. zizanioides* (*wild type*). Sampel yang digunakan adalah bakteri endofit yang terdapat pada daun *V. zizanioides* dari Manoko, Lembang, Bandung.

C. Waktu dan Lokasi Penelitian

Penelitian ini dimulai dari bulan Maret sampai dengan Oktober 2016. Penelitian dilaksanakan Laboratorium Riset Bioteknologi Jurusan Pendidikan Biologi, Fakultas Pendidikan Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Pendidikan Indonesia, Bandung.

D. Alat dan Bahan

Alat dan bahan yang digunakan dalam penelitian ini terdapat di Laboratorium Riset Bioteknologi Jurusan Pendidikan Biologi, Fakultas Pendidikan Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Pendidikan Indonesia, Bandung. Daftar alat dan bahan yang digunakan tercantum dalam Lampiran 1.

E. Prosedur Penelitian

1. Tahap Persiapan

Pada tahap ini dilakukan pengecekan alat-alat yang akan digunakan dalam penelitian. Kemudian alat-alat tersebut dibersihkan dan disterilisasi dengan menggunakan *autoclave* selama 15 menit pada suhu 121°C dengan

tekanan 1,5 atm. Dilakukan pula pembuatan Medium NA (*Nutrient Agar*) untuk menumbuhkan bakteri dari daun *V. zizanioides*. Medium disterilisasi menggunakan *autoclave* pada suhu 121°C selama 15-20 menit dengan tekanan 1,5 atm.

2. Tahap Penelitian

a. Pengambilan Sampel

Pengambilan sampel bakteri dilakukan dengan mengambil tanaman *V. zizanioides* (*wild type*) dari Manoko, Lembang, Bandung. Kemudian tanaman dimasukkan ke dalam *cool box* yang berisi es. Bagian tanaman yang akan digunakan dalam penelitian adalah daun. Selain pengambilan sampel, dilakukan pula pengukuran faktor lingkungan yang mencakup ketinggian tempat (1250 mdpl), suhu udara (24°C), kelembaban udara (76%) dan intensitas cahaya (75600 Lux) pada lokasi pencuplikan sampel.

b. Isolasi Bakteri

Isolasi bakteri endofit dilakukan dengan mengambil sampel daun tanaman *V. zizanioides* (*wild type*), kemudian daun yang didapat dicuci dengan air mengalir hingga tidak ada tanah yang menempel. Kemudian daun dipotong-potong sepanjang 3-5 cm menggunakan *sterile blade* atau gunting steril. Setelah itu, dilakukan sterilisasi permukaan pada daun yang telah dipotong-potong dengan menggunakan larutan etanol 75% selama dua menit, sodium hipoklorit 5,3% selama lima menit, dan terakhir dicuci dengan etanol 75% selama 30 detik. Daun kemudian dibilas dengan akuades steril sebanyak 2 kali dan dikeringkan menggunakan kertas saring steril. Setelah kering, kedua ujung daun dipotong ± 1 cm dan daun diletakkan pada permukaan medium NA dengan posisi tertelungkup. Kemudian medium yang sudah ditanami daun tersebut diinkubasi pada suhu 27°C selama 48 jam (Roy & Banerjee, 2010).

c. Pengamatan Morfologi dan Isolasi Biakan Murni

Pengamatan morfologi dilakukan setelah diinkubasi selama 48 jam. Ciri morfologi koloni yang diamati diantaranya adalah bentuk, warna, kenampakan bakteri (mengkilat atau suram), kenaikan permukaan (elevasi), dan tepian. Pengamatan morfologi merujuk kepada Cappuccino & Sherman (2011).

Koloni-koloni yang tumbuh pada cawan petri merupakan biakan umum bakteri yang tumbuh dari daun *V. zizanioides* (*wild type*). Setiap koloni dipindahkan satu ose ke dalam cawan petri yang berisi Medium NA agar diperoleh biakan murni. Hal tersebut dilakukan untuk mempermudah dalam tahap identifikasi selanjutnya.

d. Uji Pewarnaan Gram Bakteri

Pewarnaan Gram dilakukan untuk mengetahui jenis Gram dan bentuk sel bakteri. Setiap bakteri endofit dibuat sediaan mikroskopik dengan mengambil bakteri menggunakan ose. Pada kaca objek ditetaskan akuades, kemudian ose digoyangkan ke dalam tetesan akuades sampai bakteri menyebar. Gerakkan di atas api Bunsen hingga mengering, kemudian sediaan dituangi dengan karbol kristal violet. Setelah dibiarkan selama tiga menit, kelebihan zat warna dibuang dan dituangi lugol selama 45-60 detik. Sediaan yang telah dituangi lugol dimasukkan ke dalam *staining jar* yang berisi alkohol 96%, digoyang selama satu menit lalu dibilas dengan akuades dan dikeringkan dengan kertas hisap. Safranin dituangkan di atas sediaan yang telah kering dan dibiarkan selama tiga menit. Sediaan dicuci dengan akuades menggunakan botol semprot dan dikeringkan di udara. Sediaan yang akan diamati, diberi minyak imersi terlebih dahulu. Pengamatan dilakukan di bawah mikroskop dengan menggunakan perbesaran 1000 kali. Hasil pewarnaan berwarna ungu jika sel bakteri berjenis Gram positif dan berwarna merah jika berjenis Gram negatif (Cappuccino & Sherman, 2011).

e. Uji Aktivitas Biokimia

1) Uji Hidrolisis Pati

Medium agar pati digunakan untuk mengetahui kemampuan bakteri untuk menghidrolisis pati. Medium agar pati dicairkan dalam penangas air. Setelah cair, atur suhu medium sampai hangat-hangat kuku. Medium dituangkan ke dalam cawan petri steril. Setelah medium membeku, masing-masing isolat bakteri diinokulasikan ke dalam medium agar pati dan diinkubasi pada suhu 27°C selama 24-48 jam. Setelah terlihat adanya pertumbuhan, larutan iodium dituangkan pada medium yang berisi biakan dan dibiarkan selama beberapa menit. Hasil positif terjadi hidrolisis pati oleh enzim amilase terlihat adanya daerah bening di sekitar koloni (Cappuccino & Sherman, 2011).

2) Uji Hidrolisis Lipid

Medium lipid agar digunakan untuk mengetahui kemampuan bakteri untuk menghidrolisis lipid dengan bantuan enzim lipase. Medium Lipid Agar dicairkan dalam penangas air. Setelah cair, atur suhu medium sampai hangat-hangat kuku. Medium dituangkan ke dalam cawan petri steril. Setelah medium membeku, masing-masing isolat bakteri diinokulasikan ke dalam Medium Agar Lipid dan diinkubasi pada suhu 27°C selama 24-48 jam. Hasil uji hidrolisis lipid positif apabila terdapat zona bening di sekitar koloni atau perubahan medium lipid yang telah ditambahkan indikator *neutral red* menjadi warna merah pada bagian bawah koloni bakteri (Cappuccino & Sherman, 2011).

3) Uji Hidrolisis Kasein

Kemampuan bakteri untuk menghidrolisis kasein dapat diketahui dengan menginokulasikan bakteri pada medium susu skim agar. Medium susu skim agar dicairkan dalam penangas air. Setelah cair, atur suhu medium sampai hangat-hangat kuku. Medium dituangkan ke dalam cawan petri steril. Setelah medium

membeku, masing-masing isolat bakteri diinokulasikan ke dalam Medium Susu Skim Agar dan diinkubasi pada suhu 27°C selama 24-48 jam. Pertumbuhan di sekitar koloni bakteri diamati. Hasil uji hidrolisis kasein positif apabila terdapat zona bening di sekitar koloni (Cappuccino & Sherman, 2011).

4) Uji Hidrolisis Gelatin

Uji hidrolisis gelatin dilakukan untuk mengetahui kemampuan bakteri dalam menghidrolisis gelatin dengan bantuan enzim gelatinase. Uji gelatin dilakukan dengan menggunakan Medium gelatin agar. Isolat bakteri diinokulasikan dengan cara ditusuk menggunakan jarum ose dan diinkubasi pada suhu 27°C selama 24-48 jam. Hasil positif untuk uji gelatin ditunjukkan oleh medium yang padat atau semi solid menjadi cair (Cappuccino & Sherman, 2011).

5) Uji Fermentasi Karbohidrat

Pada uji fermentasi karbohidrat, bakteri diinokulasikan pada masing-masing tabung yang berisi Medium Laktosa, Medium Sukrosa, dan Medium Dekstrosa. Di dalam tabung tersebut telah dimasukkan tabung Durham. Isolat bakteri diinokulasi dan diinkubasi pada suhu 27°C selama 24-48 jam, kemudian dilihat perubahan yang terjadi, yaitu perubahan warna medium menjadi kuning dan ada tidaknya gelembung udara pada tabung Durham (Cappuccino & Sherman, 2011).

6) Uji Katalase

Uji katalase dilakukan dengan menggunakan Medium nutrien agar (NA). Medium NA dicairkan dalam penangas air. Setelah cair, atur suhu medium sampai hangat-hangat kuku. Medium dituangkan ke dalam cawan petri steril. Setelah medium membeku, masing-masing isolat bakteri diinokulasikan ke dalam Medium NA dan diinkubasi pada suhu 27°C selama 24-48 jam. Setelah terlihat adanya pertumbuhan, larutan H₂O₂ 3% ditetaskan di atas permukaan koloni dan dibiarkan selama beberapa menit.

Hasil positif ditunjukkan dengan adanya gelembung udara di atas permukaan koloni. Hal ini menunjukkan bahwa bakteri tersebut menghasilkan enzim katalase (Cappuccino & Sherman, 2011).

7) Uji Produksi H₂S dan Motilitas

Uji produksi H₂S dilakukan dengan menusukkan isolat bakteri menggunakan jarum ose ke dalam medium SIM agar dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24-48 jam. Jika warna medium berubah menjadi hitam, maka hasil uji adalah positif. Selain untuk mengetahui produksi H₂S, uji ini juga dapat menunjukkan motilitas bakteri. Bakteri yang motil menyebabkan keadaan medium yang menjadi keruh karena bakteri tumbuh menyebar pada medium. Sedangkan bakteri yang non-motil hanya tumbuh pada bekas tusukkan jarum ose (Cappuccino & Sherman, 2011).

8) Uji IMViC

a) Uji Indol

Uji indol dilakukan untuk melihat pembentukan indol oleh bakteri. Pengujian dilakukan dengan menusukkan isolat bakteri menggunakan jarum ose ke dalam medium SIM agar dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24-48 jam. Kemudian medium ditetaskan reagen Kovac's. Cincin merah yang terbentuk mengindikasikan bahwa bakteri membentuk indol dari triptofan sebagai sumber karbon dan menunjukkan hasil positif (Cappuccino & Sherman, 2011).

b) Uji Methyl Red

Uji Methyl Red dilakukan untuk mengetahui adanya fermentasi asam campuran. Uji ini dilakukan dengan cara menginokulasikan isolat bakteri ke dalam medium Methyl Red-Voges Proskauer (MR-VP) dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24-48 jam. Kemudian medium ditetaskan reagen methyl red. Hasil positif ditunjukkan dengan perubahan warna medium menjadi merah (Cappuccino & Sherman, 2011).

c) Uji Voges-Proskauer

Uji Voges-Proskauer dilakukan untuk mengetahui kemampuan bakteri dalam menghasilkan produk akhir yang netral (asetilmetilkarbinol) dari fermentasi glukosa. Pengujian dilakukan dengan menginokulasikan isolat bakteri ke dalam medium MR-VP dan dinkubasi pada suhu 37°C selama 24-48 jam. Setelah itu, medium diteteskan 10 tetes reagen Barrit's A kemudian Barrit's B dan didiamkan selama 15-30 menit. Reaksi positif ditunjukkan oleh terbentuknya cincin merah pada medium (Cappuccino & Sherman, 2011).

d) Uji Sitrat (Simmons' Citrate)

Uji sitrat dilakukan untuk melihat kemampuan bakteri dalam menggunakan sitrat sebagai satu-satunya sumber karbon pada medium. Uji dilakukan dengan menginokulasikan bakteri ke dalam medium Simmons' Citrate agar dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24-48 jam. Adanya pertumbuhan bakteri dan perubahan warna medium menjadi biru menunjukkan hasil positif (Cappuccino & Sherman, 2011).

f. Uji Aktivitas Antibakteri

Isolat bakteri endofit dari *V. zizanioides* (*wild type*) dikultur ke dalam medium Luria Bertani Broth (LB) selama 5 hari pada suhu ruangan dengan kecepatan 150 rpm (Roy & Banerjee, 2010). Setelah 5 hari, kultur dipindahkan ke dalam *microtube* steril dan disentrifugasi selama 10 menit dengan kecepatan 10.000 rpm. Supernatan yang telah terpisah dari pelet kemudian dipindahkan ke dalam tabung reaksi steril dan nantinya diujikan terhadap bakteri patogen.

Pengujian aktivitas antibakteri dari supernatan ini dilakukan kepada tiga isolat bakteri patogen yaitu *Eschericia coli*, *Staphylococcus aureus*, dan *Pseudomonas aeruginosa* dengan dua kali pengulangan. Bakteri uji diencerkan dalam akuades steril hingga

mencapai konsentrasi 10^6 cfu/ml atau setara dengan nilai turbiditas standar 0,5 McFarland (Sasidharan *et al.*, 2010). Lalu sebanyak 1 ml bakteri uji dituangkan pada cawan petri bersama 9 ml Medium Luria Bertani Agar (LA) dan dihomogenkan.

Pengujian aktivitas antibakteri dilakukan dengan menggunakan metode difusi cakram. Kertas cakram steril direndam dalam supernatan selama 2 menit. Kemudian kertas cakram diletakkan di atas medium yang telah berisi bakteri uji dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C (Sasidharan *et al.*, 2010). Setelah diinkubasi selama 24 jam dilakukan pengukuran zona hambat dengan menggunakan jangka sorong (Cappuccino & Sherman, 2011). Besar zona hambat yang terbentuk dibandingkan dengan skala sensitivitas antibiotik untuk mengetahui sensitivitas dari supernatan (Tabel 3.1) (Sharma *et al.*, 2009).

Tabel 3.1 Skala Sensitivitas Antibiotik (Sharma *et al.*, 2009)

No.	Diameter zona hambat (mm)	Sensitivitas
1	$\mu < 6$	Tidak sensitif
2	$6 < \mu < 9$	Sensitivitas rendah
3	$9 < \mu < 12$	Sensitivitas sedang
4	$\mu > 12$	Sensitivitas tinggi

Keterangan: μ (zona hambat pada kultur)

g. Isolasi DNA Bakteri Endofit

Isolasi DNA bakteri endofit dilakukan dengan menggunakan kit komersial *GeneJET Genomic DNA Purification Kit Fermentas* (Thermoscientific inc., Lithuania) dan protokol yang terdapat pada kit. Bakteri endofit yang diisolasi adalah bakteri yang memiliki kemampuan menghambat pertumbuhan bakteri patogen *E. coli* maupun *P. aeruginosa* atau *S. aureus*. Isolasi DNA dimulai dengan mengkultur bakteri endofit ke dalam medium LB cair dan diinkubasi selama 16 jam pada *shaker* dengan kecepatan 150 rpm di suhu ruangan. Sebanyak 1,5 ml kultur bakteri diambil dan dipindahkan ke dalam *microtube* steril. Kemudian kultur bakteri disentrifugasi pada

kecepatan 5000 x g selama 10 menit. Supernatan yang telah terpisah dari pelet dibuang. Pelet pada *microtube* disuspensikan dengan menambahkan 180 μ l *Digestion Solution* dan 20 μ l larutan Proteinase K, lalu divorteks hingga homogen. Setelah itu, sampel diinkubasi pada *waterbath shaker* dengan suhu 56°C selama 30 menit atau sampai sel benar-benar lisis. Langkah selanjutnya yaitu menambahkan 20 μ l *RNAse A Solution* pada sampel lalu dihomogenkan dengan menggunakan vorteks. Setelah homogen, sampel diinkubasi selama 10 menit pada suhu ruang. Sampel yang telah diinkubasi kemudian ditambahkan *Lysis Solution* sebanyak 200 μ l dan dihomogenkan menggunakan vorteks selama 15 detik. Selanjutnya sampel ditambahkan 400 μ l etanol 50% dingin lalu dihomogenkan dengan menggunakan pipet.

Pindahkan *lysate* dari *microtube* ke dalam *GeneJET Genomic DNA Purification Column* yang telah dipasangi *Collection Tube*. *Purification Column* yang sudah terisi *lysate* disentrifugasi bersama dengan *Collection Tube*-nya selama 1 menit pada 6000 x g. Selanjutnya *Collection Tube* yang mengandung filtrat hasil sentrifugasi dibuang. Pasang *Purification Column* pada *Collection Tube* baru berukuran 2 ml. Tambahkan 500 μ l *Wash Buffer I* kemudian sentrifugasi selama 1 menit pada 8000 x g. Buang filtrat yang terdapat pada *Collection Tube* dan pasang kembali *Purification Column* pada *Collection Tube*. Tambahkan 500 μ l *Wash Buffer II* kemudian sentrifugasi selama 3 menit pada kecepatan maksimum (≥ 12.000 x g). Buang *Collection Tube* yang berisi filtrat hasil sentrifugasi dan pasang *Purification Collumn* pada *microtube* steril berukuran 1,5 ml. Selanjutnya tambahkan 200 μ l *Buffer Elution* tepat pada bagian tengah membran *Purification Collumn*. Inkubasi selama 2 menit pada suhu ruang lalu sentrifugasi selama 1 menit pada 8000 x g. Tahap terakhir yaitu buang *Purification Collumn* dan simpan filtrat berisi DNA hasil isolasi pada *microtube* dalam freezer pada suhu -20°C.

h. Amplifikasi DNA

Amplifikasi DNA dilakukan berdasarkan metode Marchesi *et al.* (1998). Bahan PCR dicampurkan hingga volume akhir 50 μ l untuk satu reaksi. Bahan yang digunakan merupakan bagian dari kit *DreamTaq Green Fermentas*. Konsentrasi akhir dari setiap bahan adalah 1x *DreamTaq Green Polymerase*, 0,5 μ M primer *forward*, 0,5 μ l dan DNA yang digunakan untuk setiap sampel 200 ng. Primer yang digunakan yaitu 63F dan 1387R untuk mengamplifikasi gen *16S rRNA*.

Tabung PCR dimasukkan ke dalam mesin PCR (Perkin Elmer Thermal Cycler). Proses PCR terdiri dari: tahap denaturasi awal pada suhu 95°C selama 5 menit, tahap denaturasi pada suhu 94°C selama 1 menit, tahap *annealing* pada suhu 55°C selama 1 menit, tahap ekstensi pada suhu 72°C selama 1 menit, tahap ekstensi akhir pada suhu 72°C selama 10 menit, dan inkubasi pada suhu 4°C tanpa batas waktu. Total siklus pada amplifikasi mesin PCR adalah 45 siklus. Amplikon dielektroforesis pada gel agarose dengan konsentrasi 1% untuk dapat didokumentasi.

i. Elektroforesis DNA

Elektroforesis dilakukan untuk melihat pita-pita DNA yang ada setelah melakukan amplifikasi. Elektroforesis membutuhkan gel. Gel dibuat menggunakan cetakan gel yang harus berada pada bidang datar. Hal ini dilakukan agar gel yang terbentuk tidak miring. Digunakan *waterpass* untuk mengecek apakah bidang yang digunakan sudah datar atau belum. Gel agarose dibuat dengan konsentrasi 1% dalam *buffer* TBE 0,5x. Gel agarose dipanaskan menggunakan *microwave* hingga larut dan berwarna bening. Kemudian gel agarose didiamkan hingga hangat-hangat kuku lalu dituangkan ke dalam cetakan yang dilengkapi dengan sisir (*comb*) tempat aplikasi sampel. Cetakan dibiarkan mengeras pada suhu ruangan (Sambrook & Russel, 2001).

Gel yang masih berada di dalam cetakan dan sisirnya telah dilepas kemudian direndam dalam *buffer* TBE 0,5x pada kolom elektroforesis. Sampel (amplikon hasil PCR) diambil sebanyak 2 μ l, lalu dicampurkan dengan 1 μ l *loading dye*. Sampel dimasukkan ke dalam sumur (*well*) yang terdapat dalam gel pada kolom elektroforesis. Setelah sampel dimasukkan, kemudian dielektroforesis pada tegangan 80 volt selama 40 menit. Gel hasil elektroforesis yang berisi DNA kemudian diwarnai dengan larutan etidium bromida (EtBr) selama 5 menit, kemudian dibilas dengan akuades untuk membuang kelebihan EtBr. Gel hasil elektroforesis diamati dengan UV *transiluminator* dan kemudian didokumentasikan

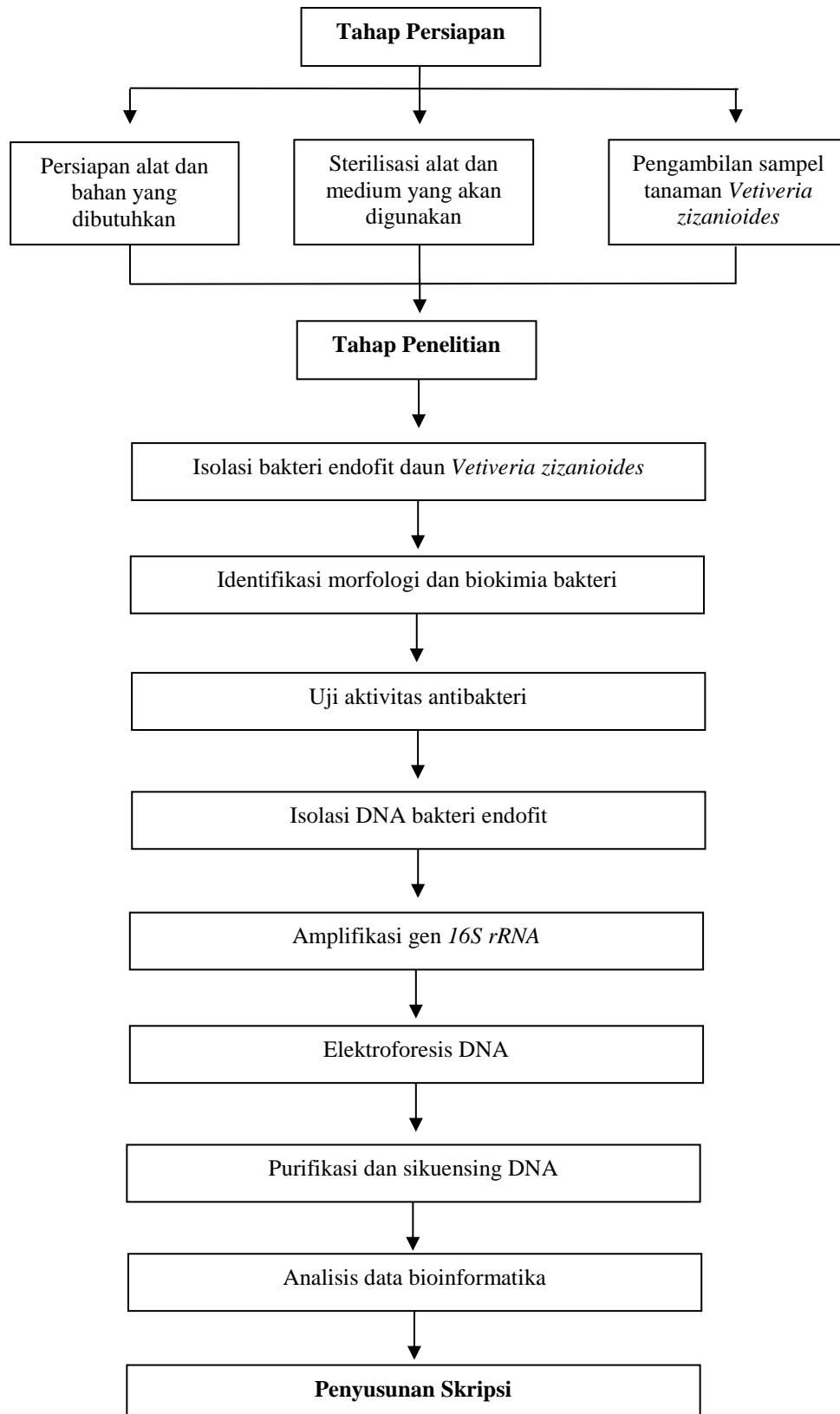
j. Purifikasi dan Sikuensing DNA

Bakteri endofit diidentifikasi melalui analisis sikuen gen 16S *rRNA*. Amplikon hasil PCR disiapkan untuk proses purifikasi dan sikuensing. Sebanyak 40 μ l masing-masing amplikon dikirim ke Macrogen inc., Korea untuk dipurifikasi dan disikuensing dengan menggunakan mesin *sequencer BigDye Applied Biosystem*. Sikuensing dilakukan hanya dari arah *forward*.

k. Analisis Data Bioinformatika

Analisis data bioinformatika dilakukan dengan hasil sikuen gen 16S *rRNA* yang didapatkan setelah proses sikuensing. Sikuen gen 16S *rRNA* dari bakteri endofit dibandingkan dengan data sikuen bakteri yang terdapat pada *database* Bank Gen NCBI (*National Center of Biotechnology Information*) di alamat website <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>. Setelah itu dilanjutkan dengan proses *alignment* dari setiap sikuen dengan menggunakan program Clustal-X dan *software* MEGA (versi 4) untuk menganalisis filogenetik bakteri endofit tersebut melalui pohon filogenetik yang dihasilkan.

F. Alur Penelitian



Gambar 3.1 Bagan Alur Penelitian