

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Prodi Pendidikan Biologi Universitas Jambi, yaitu pada bulan April sampai Mei 2019.

3.2 Pendekatan dan Jenis Penelitian

Jenis penelitian ini berupa penelitian deskriptif eksploratif dengan cara pengisolasian bakteri yang terdapat pada tanaman Kaktus. Penelitian ini dilakukan dengan beberapa tahapan, yakni: pengambilan sampel, pengisolasian bakteri endofit dari perakaran tanaman kaktus dengan metode sterilisasi permukaan, pemurnian bakteri, pewarnaan bakteri, uji biokimia, dan identifikasi bakteri.

3.3 Data dan Sumber Data

Data yang digunakan dalam penelitian ini adalah genus bakteri endofit pada akar tanaman kaktus. Sumber data diperoleh dari hasil identifikasi bakteri endofit pada akar tanaman kaktus di Jalan Gedong Karya, Kecamatan Kumpeh, Kabupaten Muaro Jambi dimana lokasi pengambilan sampel ini memiliki kriteria yaitu berupa tanah yang kering dan kaktus yang tumbuh tinggi.

3.4 Teknik Pengambilan Sampel

Teknik pengambilan sampel yaitu dengan menggunakan teknik pengambilan sampel yang bertujuan (*purposive sampling*) berarti teknik pengambilan yang dilakukan secara sengaja dengan pertimbangan tertentu (Fachrul, 2007:13). Pemilihan sampel yang dicari berupa tanaman kaktus yang memiliki kriteria tanah yang kering

serta tumbuh tinggi. Tanah tersebut digali hingga terlihat akarnya, setelah itu akarnya diukur 5cm dari ujung nya dan dipotong menggunakan gunting lalu dimasukkan kedalam plastik atau botol steril.

3.5 Teknik Pengumpulan Data

Teknik pengumpulan data pada penelitian ini yaitu yang dikumpulkan dari hasil pengamatan serta data pendukung berupa studi dokumentasi terkait proses dan hasil penelitian.

3.6 Teknik Analisis Data

Data pada penelitian ini dianalisis secara deskriptif melalui pewarnaan bakteri, pengamatan morfologi sel, koloni, dan identifikasi bakteri melalui uji biokimia.

3.7 Prosedur Penelitian

3.7.1 Persiapan Alat dan Bahan

Persiapan alat dan bahan alat dan bahan yang akan dibutuhkan untuk melakukan penelitian ditempat penelitian, yaitu dilakukan untuk persiapan pengambilan akar tanaman kaktus. Selain itu tahap persiapan untuk mangisolasi bakteri endofit di Laboratorium Prodi Pendidikan Biologi Universitas Jambi. Alat yang digunakan dalam penelitian ini yaitu tabung reaksi, rak tabung reaksi, objek *glass*, cawan petri, tabung durham, pipet tetes, erlenmeyer, beker *glass*, gelas ukur, batang pengaduk, jarum ose, mortal, mikroskop, kompor listrik, lemari pendingin, inkes, dan botol semprot.

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu akar tanaman kaktus 1 gram, alkohol 70%, alkohol 95%, *Nutrient Agar* (NA), *nutrient* gelatin, *starch* agar, *Sulfide Indol Motility* (SIM) agar, *simmons citrate* agar, *Trypticase Soy Agar* (TSA), MR-VP

brot, laktosa *broth*, Akuades, larutan NaCl 0,85%, larutan NaOCl 3%, safranin, kristal violet, *hidrogen peroksida* 3%, reagen *erlich*, reagen *barrit a* dan *barrit b*, *methyl red*, iodine, tisu, kertas label, kapas, kain kassa, *aluminium foil* dan spiritus.

3.7.2 Sterilisasi Alat dan Bahan

Sterilisasi alat dilakukan sebelum semua peralatan digunakan dengan cara membungkus semua alat yang akan digunakan tersebut dengan kertas koran dan dimasukkan kedalam autoklaf pada suhu 121°C dengan tekanan 15 psi (per square inci) selama 15 menit. Untuk alat-alat yang tidak tahan suhu panas tinggi maka disterilisasi menggunakan alkohol 70%.

3.7.3 Pembuatan Media Pertumbuhan Bakteri

Media yang dipergunakan dalam penelitian ini berupa media padat dan media cair, dengan cara pembuatannya sebagai berikut :

1. Nutrien Agar

Nutrient Agar(NA) merupakan media untuk membiakkan bakteri yang umum digunakan. Media ini dibuat dengan cara melarutkan 10 gram NA sintetis dengan menggunakan aquades sebanyak 500 ml, lalu dipanaskan dengan menggunakan kompor listrik dan diaduk hingga homogen. Setelah itu disterilkan dengan menggunakan autoklaf dengan suhu 121°C dan tekanan 15 lbs selama 15 menit.

2. Starch Agar

Starch agar merupakan media yang berguna untuk uji hidrolisis pati bakteri. Media ini dibuat dengan mencampurkan 0,5 gram pati, 3,75 gram agar, 1,25 gram pepton, 0,75 gram ekstrak daging sapi, dan 250 ml aquades, lalu dipanaskan di

kompur listrik sambil diaduk hingga homogen. Setelah itu disterilkan dengan menggunakan autoklaf dengan suhu 121⁰C dan tekanan 15 lbs selama 15 menit.

3. *Nutrient Gelatin*

Nutrient gelatin merupakan media yang berfungsi untuk uji gelatin bakteri. Media ini dibuat dengan mencampurkan 30 gram gelatin, 1,25 gram pepton, 0,75 gram ekstrak daging sapi dan 250 ml aquades, lalu dipanaskan di kompor listrik sambil diaduk sampai homogen. Setelah itu disterilkan dengan autoklaf dengan suhu 121⁰C dan tekanan 15 lbs selama 15 menit.

4. *SIM Agar*

SIM Agar merupakan media yang digunakan untuk uji produksi indol bakteri dan uji hidrogen sulfida bakteri. Media ini dibuat dengan mencampurkan 7,5 gram pepton, 0,75 gram ekstrak daging sapi, 0,05 gram fero amonium sulfat, 0,00625 gram natrium tiosulfat, 0,75 gram agar dan 250 ml aquades, lalu dipanaskan di kompor listrik sambil diaduk hingga homogen. Setelah itu disterilkan menggunakan autoklaf dengan suhu 121⁰C dengan tekanan 15 lbs selama 15 menit.

5. *MR –VP Broth*

MR – VP Broth merupakan media yang digunakan untuk uji metilen merah dan uji *voges – proskaur*. Media ini dibuat dengan mencampurkan 1,75 gram pepton, 1,25 gram dekstroza, 1,25 gram kalium fosfat dan 250 ml aquades, lalu dipanaskan di kompor listrik sambil diaduk hingga homogen. Setelah itu disterilkan dengan menggunakan autoklaf pada suhu 121⁰C dengan tekanan 15 lbs selama 15 menit.

6. *Simmon's Sitrata Agar*

Simmon's Sitrata Agar digunakan untuk uji pemanfaatan sitrat bakteri. Media ini dibuat dengan mencampurkan 0,25 gram amonium dihidrogen fosfat, 0,25 gram dikalium fosfat, 1,25 gram natrium klorida, 0,5 gram natrium sitrat, 0,05 gram magnesium sulfat, 3,75 gram agar, 0,02 gram bromtimol biru dan 250 ml aquades, lalu dipanaskan di kompor listrik sambil diaduk hingga homogen. Setelah itu, disterilkan dengan menggunakan autoklaf dengan suhu 121⁰C pada tekanan 15 lbs selama 15 menit.

7. *Phenol Red Lactose Broth*

Phenol Red Lactose Broth merupakan media yang berguna untuk uji fermentasi karbohidrat pada bakteri. Media ini dapat dibuat dengan mencampurkan 2,5 gram triptikase, 1,25 gram dekstroza, 1,25 gram natrium klorida, 0,0045 gram fenol merah dan 250 ml aquades, lalu dipanaskan di kompor listrik sambil diaduk hingga homogen. Setelah itu disterilkan dengan autoklaf dengan suhu 121⁰ C dengan tekanan 15 lbs selama 15 menit.

8. *Trypticase Soy Agar*

Trypticase soy agar merupakan media yang digunakan untuk uji katalase pada bakteri. Media ini dibuat dengan mencampurkan 10 gram *Trypticase soy agar* sintesis kedalam 250 ml aquades sambil dipanaskan di kompor listrik sambil diaduk hingga homogen. Setelah itu disterilkan dengan menggunakan autoklaf pada suhu 121⁰C dengan tekanna 15 lbs selama 15 menit.

9. *Nitrate Broth*

Nitrate broth merupakan media yang digunakan untuk uji kemampuan reduksi nitrat oleh bakteri. Media ini dibuat dengan mencampurkan 30 gram gelatin, 1,25

gram pepton, 0,75 gram ekstrak daging sapi dan 250 ml aquades, lalu dipanaskan di kompor listrik sambil diaduk sampai homogen. Setelah itu disterilkan dengan menggunakan autoklaf pada suhu 121⁰C dengan tekanan 15 lbs selama 15 menit.

3.7.4 Isolasi Bakteri Endofit

Isolasi bakteri endofit dilakukan dengan menggunakan metode sterilisasi permukaan. Bakteri endofit diisolasi dari bagian akar tanaman kaktus. Akar tanaman tersebut dicuci bersih dan dikeringkan selama 30 menit. Akar kaktus di sterilkan sebanyak 1 gram secara bertahap dengan alkohol 70% selama 30 detik, NaOCl 3% selama 2 menit, dan dengan aquades steril bertahap sampai 3 kali, kemudian akar dipindahkan ke dalam mortal yang sudah disterilisasi menggunakan autoclave pada suhu 121⁰C, kemudian digerus dan ditambahkan 9 ml aquades steril. Sebanyak 1 ml ekstrak akar dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang berisi 9 ml larutan NaCl, kemudian dikocok hingga homogen, selanjut diambil 1 ml ekstrak dan diencerkan secara seri hingga pengenceran 10⁻⁴. Selanjutnya sebanyak 0,1 ml ekstrak dari seri pengenceran sampai dimasukkan ke dalam petridish steril yang telah diisi media NA dan kemudian disebar merata dalam petridish. Ekstrak yang telah disebar dalam petridish, diinkubasi selama 3 hari (72 jam), kemudian dihitung jumlah koloni bakteri yang tumbuh. Koloni yang tumbuh pada saat isolasi dimurnikan, dan disimpan dalam lemari es (Kumala, 2014:43).

3.7.5 Pengamatan Isolat Bakteri Endofit

Pengamatan koloni bakteri ini dilakukan dengan mengamati morfologi koloni bakteri yang terbentuk dalam media NA saat pengisolasian dan dihitung jumlah isolat

bakteri yang tumbuh pada media NA. Indikator dalam pengamatan koloni bakteri ini yaitu mengamati bentuk, warna, tepi dan permukaan dari koloni bakteri.

3.7.6 Pewarnaan Gram

Pengamatan bakteri dengan pewarnaan gram dilakukan untuk mengetahui bakteri tersebut termasuk dalam bakteri gram positif atau gram negatif. Pewarnaan ini dilakukan dengan cara koloni bakteri yang diperoleh dibuat preparat ulas kemudian difiksasi, lalu ditetesi dengan larutan kristal violet, dibiarkan 1 menit. Setelah itu, kaca objek dimiringkan guna untuk membuang zat warna ungu berlebih, lalu dibilas dengan aquades dengan cara dialirkan dari botol semprot. Selanjutnya, diberi larutan iodium dan dibiarkan selama 1 menit, lalu kaca objek dimiringkan untuk membuang larutan iodium yang berlebih dan bilas dengan aquades. Kemudian, dicuci dengan alkohol 95% dengan cara ditetesi selama 10 detik sampai zat warna ungu tidak terlihat lagi. Dicuci dengan aquades lalu beri pewarna safranin selama 1 menit, lalu kaca objek untuk membuang pewarna safranin berlebih, dan dibilas dengan aquades. Setelah itu, diamati dengan menggunakan mikroskop (Cappucino dan Sherman, 2014:75).

3.7.7 Uji Biokimia

1. Hidrolisis Pati

Bakteri yang telah diinokulasi pada medium *Starch Agar* dengan cara gores (*Streak inoculation*) diinkubasi pada suhu kamar selama 24 – 48 jam. Lalu dituangkan iodium pada media hingga mengenai media dan didiamkan selama 30 detik, lalu iodium ditumpahkan dan amati perubahan yang terjadi. Apabila terbentuk zona bening mengelilingi koloni bakteri maka menunjukkan reaksi positif, sedangkan

apabila tidak terbentuk zona bening yang mengelilingi koloni bakteri maka menunjukkan reaksi negatif (Cappucino dan Sherman, 2014:155).

2. Hidrolisis Gelatin

Bakteri yang telah diinokulasi pada media nutrisi gelatin dengan cara ditusuk (*stab inoculation*) diinkubasi pada suhu kamar selama 24 – 48 jam. Lalu dimasukkan ke dalam lemari pendingin pada suhu 40C selama 30 menit, dan amati perubahan yang terjadi pada media tersebut. Apabila media tetap dalam keadaan mencair, maka menunjukkan reaksi positif. Begitu pula sebaliknya, jika media dalam keadaan membeku maka menunjukkan reaksi negatif (Cappucino dan Sherman, 2014:156).

3. Fermentasi Karbohidrat

Bakteri dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang telah berisi media, lalu tabung Durham dimasukkan secara terbalik yang masing-masing berisi *phenol red lactose broth*. Selanjutnya bakteri ditumbuhkan di dalamnya dan diinkubasi selama 24–48 jam, lalu amati apa yang terjadi pada tabung Durham dan warna media. Apabila terdapat gelembung gas pada tabung Durham dan warna menjadi keruh maka menunjukkan reaksi positif, sedangkan apabila tidak terbentuk gelembung gas pada tabung Durham maka menunjukkan reaksi negatif (Cappucino dan Sherman, 2014:161).

4. Produksi Indol

Bakteri yang diinokulasi pada media *SIM Agar* dengan cara ditusuk lalu diinkubasi pada suhu kamar selama 24–48 jam. Selanjutnya, diteteskan 10 tetes reagen Ehrlich ke dalam media yang telah ditumbuhi bakteri, lalu digoyang-goyang secara perlahan dan amati perubahan yang terjadi pada media. Jika terbentuk lapisan

merah setelah ditambahkan reagen Ehrlich maka menunjukkan reaksi positif, sedangkan jika tidak terbentuk lapisan merah setelah ditambahkan reagen Ehrlich maka menunjukkan reaksi negatif (Cappucino dan Sherman, 2014:173).

5. Tes Katalase

Bakteri yang digoreskan pada media *Trypticase Soy Agar*, lalu diinkubasi pada suhu kamar selama 24–48 jam. Selanjutnya ditetaskan 4 tetes Hidrogen peroksida 3 % hingga merendami seluruh permukaan agar miring terseut, kemudian amati yang terjadi pada media. Apabila terbentuk buih atau gelembung setelah ditetesi Hidrogen peroksida 3 % maka akan menunjukkan reaksi positif, sedangkan reaksi negatif dapat ditunjukkan dengan tidak terbentuknya buih atau gelembung (Cappucino dan Sherman, 2014:197).

6. Tes Metil Merah

Bakteri yang diisolasi pada media *MR-VP Broth* diinkubasi pada suhu kamar selama 24–48 jam, lalu teteskan metil merah indikator sebanyak 5 tetes pada media yang telah ditumbuhi bakteri lalu amati perubahan yang terjadi pada media. Reaksi positif ditandai dengan terbentuknya warna merah setelah ditambahkan reagen methyl red indikator, sedangkan reaksi negatif ditandai dengan tidak terbentuknya warna merah (Cappucino dan Sherman, 2014:173).

7. Tes *Voges Proskauer*

Bakteri yang diisolasi pada media *MR-VP Broth* diinkubasi pada suhu kamar selama 24–48 jam, lalu ditetaskan 10 tetes reagen barrit A lalu dikocok secara perlahan. Sesaat kemudian langsung ditambahkan lagi 10 tetes reagen barrit B dan dikocok lagi secara perlahan. Setelah 30 menit, amati perubahan yang terjadi pada

media. Reaksi positif ditunjukkan dengan terbentuknya lapisan warna merah, sedangkan reaksi negatif ditunjukkan dengan tidak terbentuknya lapisan warna merah pada media (Cappucino dan Sherman, 2014:174).

8. Tes Pemanfaatan Sitrat

Bakteri yang digoreskan pada media *Simmon's citrate Agar* diinkubasi pada suhu kamar selama 24–48 jam dan amati perubahan yang terjadi pada media. Reaksi positif ditunjukkan dengan berubahnya warna media menjadi biru, sedangkan reaksi negatif ditunjukkan dengan warna media tetap berwarna hijau (Cappucino dan Sherman, 2014:174).

9. Tes Hidrogen Sulfida

Bakteri yang diinokulasi pada media *SIM Agar* dengan cara ditusuk lalu diinkubasi pada suhu kamar selama 24–48 jam dan amati perubahan yang terjadi pada media. Reaksi positif ditandai dengan terbentuknya warna hitam disepanjang tusukan pada media, sedangkan reaksi negatif ditandai dengan tidak terbentuknya warna hitam tersebut (Cappucino dan Sherman, 2014:180).

Untuk melihat bahwa uji biokimia menunjukkan reaksi positif atau negatif dapat dilihat pada Tabel 3.1 di bawah ini:

Tabel 3.1 Ciri-Ciri Reaksi Biokimia Positif Atau Negatif

Uji Biokimia	Reaksi Biokimia	
	Positif	Negatif
Hidrolisis starch (amilum)	Terbentuk zona bening mengelilingi bakteri	Tidak terbentuk zona bening mengelilingi bakteri
Hidrolisis gelatin	Media mencair	Media membeku
Tes Indol	Terbentuk lapisan merah	Tidak terbentuk lapisan merah

