

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

1. Populasi

Populasi adalah semua obyek yang menjadi sasaran penelitian. Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah umbi tanaman talas (*Colocasia esculenta* L.) yang diperoleh di kawasan Tawangmangu, Karanganyar, Jawa Tengah.

2. Sampel

Sampel adalah sebagian kecil dari populasi yang digunakan dalam melakukan penelitian. Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah umbi tanaman talas yang masih segar, bebas penyakit serta bersih dan siap panen berumur 7-9 bulan yang diambil dari kawasan perkebunan talas milik warga di daerah Tawangmangu, Karanganyar, Jawa Tengah.

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi Variabel Utama

Variabel utama pertama dalam penelitian ini adalah aktivitas antibakteri dari bakteri endofit umbi tanaman talas (*Colocasia. esculenta* L.) terhadap bakteri *S. aureus* ATCC 25923 dan variabel kedua penelitian ini adalah waktu optimum fermentasi bakteri endofit umbi tanaman talas.

2. Klasifikasi Variabel Utama

Variabel yang telah diidentifikasi dapat diklasifikasikan dalam berbagai macam variabel yaitu variabel bebas, variabel terkontrol dan variabel tergantung.

Variabel bebas dalam penelitian adalah variabel yang direncanakan untuk diteliti pengaruhnya terhadap variabel tergantung. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah waktu fermentasi bakteri endofit umbi talas.

Variabel tergantung adalah titik pusat persoalan yang merupakan kriteria penelitian dan variabel tergantung dalam penelitian ini adalah aktivitas antibakteri bakteri endofit umbi talas dengan melihat pertumbuhannya pada media uji dan zona hambat yang dihasilkan.

Variabel terkontrol adalah variabel yang dianggap berpengaruh terhadap variabel tergantung selain variabel bebas, sehingga perlu ditetapkan kualifikasinya agar hasil yang didapatkan tidak tersebar dan dapat diulang dalam penelitian lain secara tepat. Variabel terkontrol dalam penelitian ini adalah kemurnian bakteri endofit, kemurnian bakteri uji *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, jumlah bakteri dengan standar Mc Farland 0,5, kondisi peneliti, kondisi laboratorium meliputi inkas, suhu inkubasi, waktu inkubasi, sterilisasi, media yang digunakan dalam penelitian dan metode penelitian.

3. Definisi Operasional Variabel Utama

Pertama, bakteri endofit adalah bakteri dari umbi tanaman talas (*Colocasia esculenta* L.) pada penelitian sebelumnya yang diharapkan menghasilkan senyawa bioaktif untuk menghambat pertumbuhan *S. aureus* ATCC 25923.

Kedua, bakteri uji dalam penelitian ini adalah *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 yang merupakan bakteri patogen Gram positif yang menyebabkan infeksi dan diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Universitas Setia Budi Surakarta.

Ketiga, waktu fermentasi adalah waktu yang dibutuhkan oleh bakteri endofit untuk memproduksi senyawa bioaktif dan waktu yang digunakan yaitu pada hari ke-2, ke-3 dan ke-4.

Keempat, media adalah suatu bahan yang terdiri dari campuran zat-zat hara (nutrient) yang berguna untuk membiakkan mikroba. Media digunakan untuk melakukan fermentasi bakteri endofit.

Kelima, uji aktivitas antibakteri adalah pengujian sensitivitas aktivitas antibakteri dengan metode difusi disk.

Keenam, metode difusi adalah dengan menghitung diameter zona hambat terhadap bakteri uji dari hasil fermentasi bakteri endofit yaitu cakram yang ditetesi supernatan hasil fermentasi bakteri endofit. Kontrol positif adalah antibiotik ciprofloxacin 5 µg dan kontrol negatif adalah kertas cakram tanpa senyawa antibakteri.

C. Alat dan Bahan

1. Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini meliputi alat-alat gelas, oven, autoklaf, jarum Ose, jarum N, lemari pendingin, cawan petri, inkubator, pipet tetes, bunsen, mikropipet dan tip, vortex mixer, erlenmayer, tabung reaksi, rak tabung reaksi, vial, aluminium foil, silk wrap, pinset, penggaris, jangka sorong, mikroskop, timbangan analitik, kapas lidi steril, spidol dan inkas.

2. Bahan

Bahan sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah bakteri endofit *P. knackmussii* dan *B. siamensis* dari umbi tanaman talas (*Colocasia esculenta* L.)

Bakteri uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

Medium uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Vogel Johnson Agar* (VJA), *Pseudomonas Selektive Agar* (PSA), *Mueler Hilton Agar* (MHA), *Nutrien Agar* (NA) dan *Brain Heart Infusion* (BHI).

Bahan kimia yang digunakan adalah etanol 70%, aquadest steril dan NaCl 0,9%.

Kontrol uji yang digunakan adalah cakram antibiotik ciprofloxacin konsentrasi 5µg dan cakram tanpa senyawa antibakteri.

D. Jalannya Penelitian

1. Sterilisasi Alat dan Bahan

Sterilisasi dilakukan untuk mencegah terjadinya kontaminasi. Alat dicuci bersih, dikeringkan dan dibungkus dengan kertas dan disumbat kapas. Sterilisasi

bahan yang akan digunakan dengan autoklaf selama 15 menit pada suhu sebesar 121°C dengan tekanan sebesar 1 atm. Sterilisasi cawan petri, kapas lidi steril dan alat gelas dengan menggunakan oven pada suhu 171°C selama 30 menit.

2. Pembuatan Media

2.1. Pembuatan Media *Mueller Hinton Agar* (MHA). Media MHA dibuat dengan cara sebanyak 38 gram bubuk *Mueller Hinton Agar* (MHA) dilarutkan hingga 1000 mL akuades. Media tersebut dicampur hingga merata dengan menggunakan *hot plate* dan diaduk dengan menggunakan batang pengaduk. Campuran media kemudian disterilisasi dalam autoklaf pada suhu 121°C dengan tekanan sebesar 1 atm selama 15 menit. Media kemudian dituang ke dalam cawan petri dan dibiarkan hingga memadat

2.2. Pembuatan media *Vogel Johnson Agar* (VJA). Media VJA dibuat dengan cara sebanyak 60 gram bubuk VJA dilarutkan hingga 1000 mL akuades. Media tersebut dicampur hingga merata dengan menggunakan *hot plate* dan diaduk dengan menggunakan batang pengaduk. Campuran media kemudian disterilisasi dalam autoklaf pada suhu 121°C dengan tekanan sebesar 1 atm selama 15 menit. Media kemudian dituang ke dalam cawan petri dan dibiarkan hingga memadat.

2.3. Pembuatan Media *Pseudomonas Selektive Agar* (PSA). Media PSA dibuat dengan cara sebanyak 45,3 gram bubuk PSA dilarutkan hingga 1000 mL akuades. Media tersebut dicampur hingga merata dengan menggunakan *hot plate* sampai mendidih. Setelah mendidih tambahkan 10 ml gliserin kemudian diaduk dengan batang pengaduk hingga rata. Campuran media kemudian disterilisasi dalam autoklaf pada suhu 121°C dengan tekanan sebesar 1 atm selama 15 menit. Media kemudian dituang ke dalam cawan petri saat ingin digunakan.

2.4. Pembuatan Media *Nutrient Agar* (NA). Media NA dibuat dengan cara sebanyak 20 gram bubuk NA dilarutkan hingga 1000 mL akuades. Media tersebut dicampur hingga merata dengan menggunakan *hot plate* dan diaduk dengan menggunakan batang pengaduk. Campuran media kemudian disterilisasi

dalam autoklaf pada suhu 121°C dengan tekanan sebesar 1 atm selama 15 menit. Media kemudian dituang ke dalam cawan petri dan tabung reaksi. Media yang dituang ke dalam tabung reaksi diletakkan pada posisi miring $\pm 45^\circ$ dan dibiarkan hingga memadat.

2.5. Pembuatan Media *Brain-Heart Infusion* (BHI). Media MHA dibuat dengan cara sebanyak 37 gram bubuk BHI dilarutkan hingga 1000 mL akuades. Media tersebut dicampur hingga merata dengan menggunakan *hot plate* dan diaduk dengan menggunakan batang pengaduk. Campuran media kemudian disterilisasi dalam autoklaf pada suhu 121°C dengan tekanan sebesar 1 atm selama 15 menit. Media kemudian dituang ke dalam tabung reaksi saat ingin digunakan.

3. Pembuatan Kultur Bakteri

Pembuatan stok bakteri ini dilakukan untuk memperbanyak dan meremajakan bakteri dengan cara menginokulasikan satu Ose biakan murni bakteri endofit dan bakteri uji ke dalam media NA miring, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam di dalam inkubator.

4. Pembuatan Suspensi Bakteri

Biakan bakteri diambil satu Ose kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang berisi *Brain-Heart Infusion* (BHI), diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam di dalam inkubator. Suspensi yang terbentuk distandarisasi dengan larutan baku Mc Farland konsentrasi 0,5 yang ekuivalen dengan suspensi sel bakteri konsentrasi $1,5 \times 10^8$ cfu/ml (Andrews 2008).

5. Identifikasi *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

5.1 Uji Morfologi. Suspensi bakteri *S. aureus* diambil satu Ose kemudian diinokulasikan dengan cara *streak* berupa zig-zag pada media VJA yang sudah ditambah dengan kalium tellurit 1%, diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam di dalam inkubator. Hasil pengujian ditunjukkan dengan warna koloni hitam dan medium berwarna kuning.

5.2 Pewarnaan Gram. Pewarnaan Gram bertujuan untuk memastikan bakteri tersebut termasuk dalam golongan bakteri Gram positif atau Gram negatif.

Pewarnaan Gram dilakukan dengan cara dibuat preparat ulas. Bakteri *S. aureus* diambil 1-2 Ose dicampur merata dengan satu tetes aquadest steril pada objek glass kemudian difiksasi diatas api bunsen. Smear pada objek glass kemudian ditetesi dengan Gram A (cat kristal violet sebagai cat utama) \pm 1 menit kemudian dibilas, ditetesi dengan Gram B (lugol iodine sebagai pengintensif warna) \pm 1 menit kemudian dibilas, ditetesi lagi dengan Gram C (alkohol sebagai peluntur) \pm 30 detik kemudian dibilas, terakhir ditetesi dengan Gram D (cat safranin sebagai cat penutup) diamkan \pm 1 menit kemudian dibilas. Preparat ditetesi dengan minyak imersi dan diamati menggunakan mikroskop dengan perbesaran 1000 kali. *S. aureus* akan tampak berwarna ungu (Gram positif) dan berbentuk kokus bergerombol seperti buah anggur.

5.3 Uji Koagulase. Suspensi bakteri *S. aureus* diambil satu Ose dan dicampur bersama 1 ml plasma darah kelinci yang mengandung EDTA ke dalam tabung tabung reaksi kemudian dihomogen menggunakan *vortex*. Diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Koagulase positif ditandai dengan menggumpalnya plasma darah kelinci.

5.4 Uji Katalase. Koloni *S. aureus* dari media VJA diambil 1-2 ose kemudian dicampur H₂O₂ 3% di atas objek glass. Jika timbul gelembung – gelembung udara berarti positif bakteri tersebut menghasilkan enzim katalase.

6. Identifikasi Bakteri Endofit

Identifikasi dilakukan pada bakteri endofit *Pseudomonas knackmussii* dan bakteri endofit *Bacillus siamensis*.

6.1 Uji Morfologi. Uji morfologi bakteri endofit *Pseudomonas knackmussii* digoreskan pada media selektif PSA dan bakteri endofit *Bacillus siamensis* digoreskan pada media NA. Kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam di dalam inkubator. Hasil pengamatan bakteri dengan mengamati bentuk dan tepi koloni yang dilihat dari atas dan permukaan koloni yang dilihat dari samping dan untuk bakteri endofit *Pseudomonas knackmussii* hasil positif ditunjukkan dengan koloni bakteri berwarna hijau.

6.2 Pewarnaan Gram. Pewarnaan Gram bertujuan untuk memastikan bakteri tersebut termasuk dalam golongan bakteri Gram positif atau Gram negatif. Pewarnaan Gram dilakukan dengan cara buat preparat ulas, bakteri diambil 1-2 Ose dicampur merata dengan satu tetes aquadest steril pada objek glass lalu difiksasi diatas api bunsen. Smear pada objek glass kemudian ditetesi dengan Gram A (cat kristal violet sebagai cat utama) \pm 1 menit kemudian dibilas, ditetesi dengan Gram B (lugol iodine sebagai pengintensif warna) \pm 1 menit kemudian dibilas, ditetesi lagi dengan Gram C (alkohol sebagai peluntur) \pm 30 detik kemudian dibilas, terakhir ditetesi dengan Gram D (cat safranin sebagai cat penutup) diamkan \pm 1 menit kemudian dibilas. Preparat ditetesi dengan minyak imersi dan diamati menggunakan mikroskop dengan perbesaran 1000 kali. Hasil pengujian ditunjukkan dengan bakteri *Pseudomonas knackmussii* merupakan bakteri Gram negatif yang akan berwarna merah sedangkan bakteri *Bacillus siamensis* merupakan bakteri Gram positif yang akan berwarna ungu.

6.3 Pewarnaan Spora. Pewarnaan spora dengan metode *Schaeffer fulton* bertujuan untuk melihat apakah bakteri memiliki spora atau tidak beserta letaknya pada bakteri. Pewarnaan Spora dilakukan dengan cara buat preparat ulas. Bakteri diambil 1-2 Ose dicampur merata dengan satu tetes aquadest steril pada object glass lalu difiksasi diatas api bunsen namun jangan sampai kering. Kemudian ditambahkan dengan 2-3 tetes *Malachite green* lalu dipanas uapkan (sampai uap terlihat) didiamkan selama 1 menit lalu dibilas. Selanjutnya ditetesi lagi dengan safranin dan dibiarkan selama 30 detik tanpa pemanasan lalu dibilas dan keringkan. Hasil pewarnaan ditetesi dengan minyak imersi dan diamati menggunakan mikroskop dengan perbesaran 1000 kali. Spora berwarna hijau sedangkan bagian sel lainnya berwarna merah.

6.4 Uji Biokimia. Identifikasi uji biokimia dengan menggunakan media SIM, KIA, LIA dan Citrat dilakukan pada bakteri Gram negatif.

6.4.1 Media *Sulfida Indol Motility* (SIM). Biakan bakteri endofit diinokulasi pada permukaan media dengan cara ditusukkan kemudian diinkubasi

pada suhu 37°C selama 24 jam. Tujuan dari identifikasi ini yaitu untuk mengetahui terbentuknya sulfida, indol dan motilitas bakteri. Uji sulfida positif jika media berwarna hitam, uji indol positif jika terbentuk warna merah setelah ditambah dengan reagen Erlich A dan B, uji motilitas positif jika terjadi pertumbuhan bakteri pada seluruh media

6.4.2 Media *Kliger Iron Agar (KIA)*. Biakan bakteri endofit diinokulasi pada media dengan cara ditusuk dan digores kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Tujuan dari identifikasi ini yaitu untuk uji fermentasi karbohidrat (glukosa, laktosa) dan sulfida. Uji positif jika pada lereng akan berwarna merah (ditulis K), serta bagian dasar berwarna kuning (ditulis A), terbentuknya gas ditandai dengan pecahnya media ditulis (G+), sulfida positif terbentuk warna hitam pada media (ditulis S+).

6.4.3 Media *Lysine Iron Agar (LIA)*. Biakan bakteri endofit diinokulasi dengan cara ditusuk dan digores kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Tujuan dari identifikasi ini yaitu untuk menguji lisin dan sulfida. Bila uji positif maka lereng akan berwarna coklat (ditulis R), berwarna ungu (ditulis K), berwarna kuning (ditulis A) serta terbentuknya warna hitam pada media (ditulis S+).

6.4.4 Media *Sitrat*. Biakan bakteri endofit diinokulasi dengan cara digoreskan kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Tujuan dari identifikasi ini yaitu untuk mengetahui kemampuan bakteri menggunakan sitrat sebagai sumber karbon tunggal. Uji positif bila media berwarna biru.

7. Fermentasi Bakteri Endofit

Proses fermentasi bakteri endofit bertujuan untuk memproduksi senyawa metabolit sekunder yang diduga berpotensi sebagai antibakteri. Fermentasi bakteri endofit dilakukan menurut metode Nursyam (2017) yang termodifikasi yaitu dengan cara menumbuhkan bakteri endofit menggunakan media *Brain-Heart Infusion* (BHI) sebanyak 80 mL dalam erlenmeyer steril yang disumbat kapas. Inkubasi dilakukan selama 4 hari pada suhu 37°C dan setiap hari dilakukan

penggojogan selama 15 menit. Hari ke-2, ke-3 dan ke-4 dilakukan pengambilan hasil fermentasi sebanyak 5 mL kemudian disentrifugasi pada kecepatan 4000 rpm selama 60 menit untuk memisahkan supernatan dan biomassan (endapan). Supernatan pada hari ke-2, ke-3 dan ke-4 yang diperoleh digunakan sebagai uji aktivitas antibakteri.

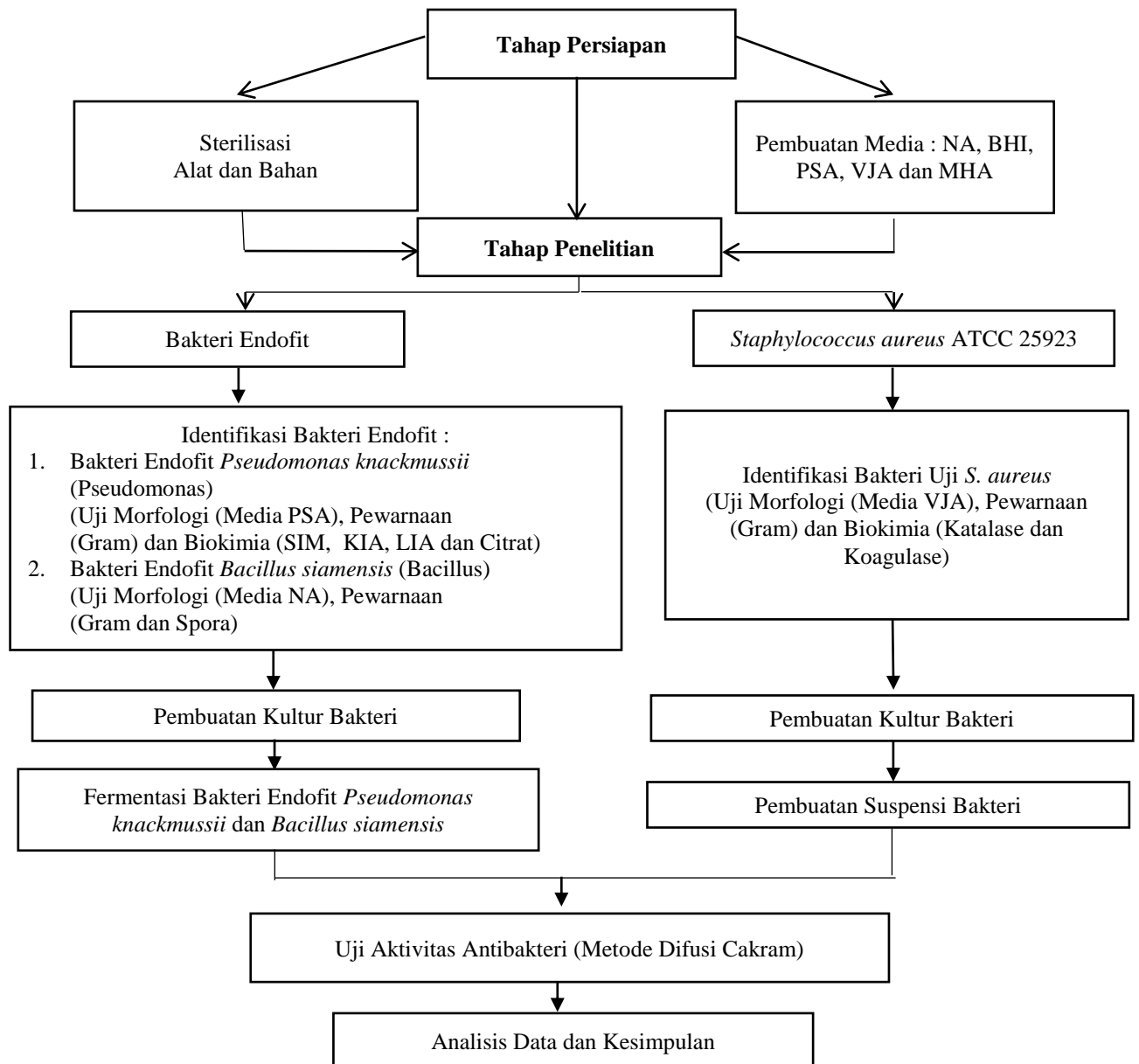
8. Uji Aktivitas Antibakteri

Uji aktivitas antibakteri yang digunakan adalah metode difusi cakram (*disc diffusion methods*). Prinsip dari metode ini adalah penghambatan pertumbuhan terhadap mikroorganisme yaitu terbentuknya zona hambat yang terlihat jernih disekitar cakram yang mengandung zat antibakteri (Harmita dan Radji 2008). Suspensi bakteri uji *S. aureus* distandarisasi dengan larutan baku Mc Farland konsentrasi 0,5 dan diencerkan dengan menggunakan BHI kemudian divortex untuk menghomogenkan suspensi bakteri tersebut. Selanjutnya menginokulasi bakteri uji dengan menggunakan metode swab pada permukaan media MHA dengan kapas lidi steril. Bakteri yang sudah diusap pada media MHA didiamkan selama 5-10 menit dengan tujuan agar bakteri terdifusi ke dalam media. Kemudian kertas cakram steril ditetesi supernatan fermentasi hari ke-2, ke-3 dan ke-4 masing-masing sebanyak 50 μ l dan didiamkan selama 1 menit. Kontrol positif yang digunakan adalah antibiotik ciprofloxacin konsentrasi 5 μ g sedangkan kontrol negatifnya adalah kertas cakram tanpa senyawa antibakteri. Selanjutnya kertas cakram kontrol positif, kontrol negatif, dan kertas cakram yang mengandung supernatan diletakkan pada permukaan media MHA yang telah diusap bakteri uji. Setelah itu, diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam di dalam inkubator. Aktivitas antibakteri ditunjukkan dengan terbentuknya zona hambat yang terlihat jernih disekitar kertas cakram dan diukur diameter zona hambatnya dengan menggunakan jangka sorong yang dinyatakan dalam satuan milimeter (mm).

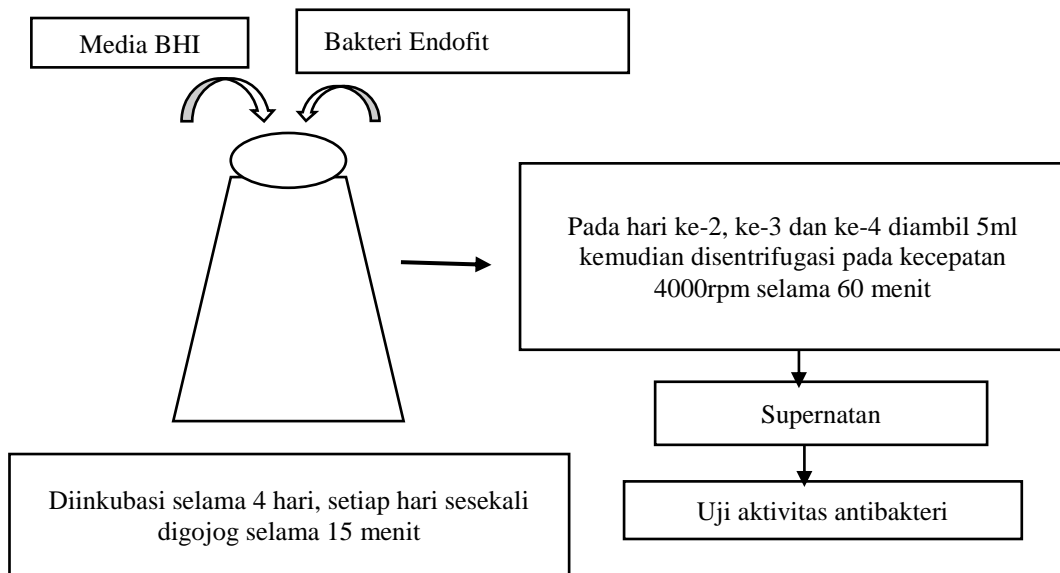
E. Analisis Data

Hasil penelitian dari uji aktivitas antibakteri dari bakteri endofit umbi tanaman talas terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dianalisis berdasarkan nilai zona hambat yang terbentuk. Hasil data yang diperoleh dilakukan analisa dengan menggunakan uji Kolmogorof-Smirnov untuk mengetahui normalitas data, sedangkan kehomogenan varian diuji dengan uji levene. Apabila $P > 0.05$, maka data terdistribusi normal dan homogen untuk setiap varian dan dilanjutkan dengan uji parametrik One Way Anova. Jika terdapat perbedaan yang bermakna, dilanjutkan dengan uji LSD (*Least Significant Difference*) dengan taraf kepercayaan 95%. Apabila data terdistribusi tidak normal, maka dilakukan uji Kruskal-Wallis dan jika perbedaan bermakna dilanjutkan dengan uji Mann-Whitney untuk mengetahui perbedaan antar perlakuan. Data yang diperoleh dianalisis menggunakan SPSS statistik 21.

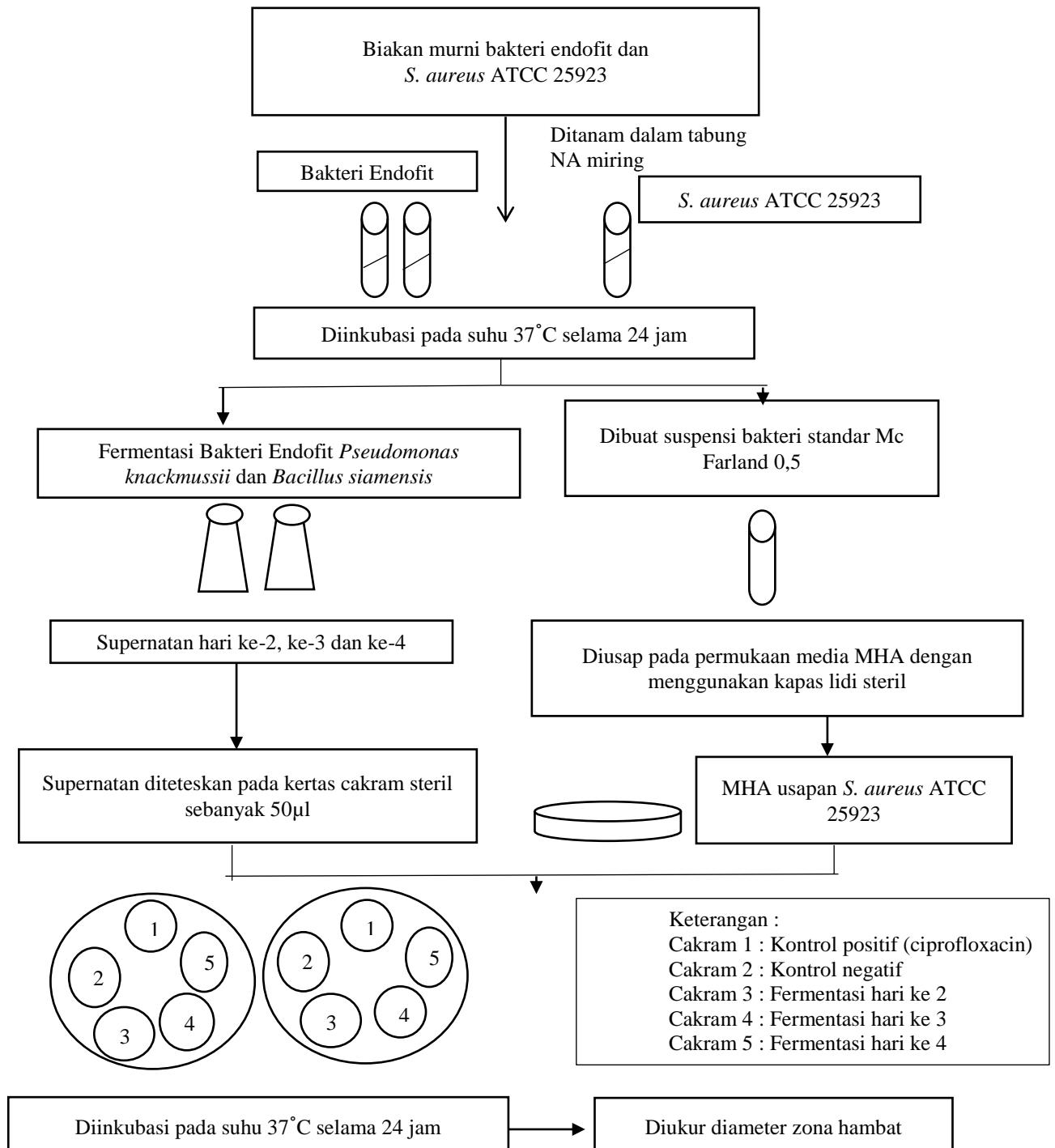
F. Skema Jalannya Penelitian



Gambar 5. Skema jalannya penelitian.



Gambar 6. Fermentasi bakteri endofit.



Gambar 7. Tahapan uji aktivitas antibakteri.