

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

1. Populasi

Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah bakteri asal tanah perkebunan teh Kemuning.

2. Sampel

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah bakteri asal tanah perkebunan teh Kemuning, Tawangmangu, Karanganyar, Jawa Tengah. Diambil pada tiga titik lokasi yang berbeda dengan jarak 1 m dari pohon teh dan kedalaman tanah antara 10-15 cm. Pengambilan pada bulan Oktober 2018.

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi variabel utama

Variabel utama dalam penelitian ini adalah tanah yang diambil dari daerah Kemuning, Tawangmangu, Jawa Tengah dengan ciri-ciri tanahnya gembur, berwarna coklat pekat dan kering.

Variabel kedua dalam penelitian ini adalah masing-masing isolat bakteri asal tanah kawasan perkebunan teh Kemuning, Tawangmangu, Karanganyar, Jawa Tengah penghasil enzim amilase dan selulase.

2. Klasifikasi variabel utama

Variabel utama yang terlebih dahulu telah diidentifikasi, selanjutnya dapat diklasifikasikan ke dalam berbagai macam variabel yakni variabel bebas, variabel tergantung, dan variabel terkontrol,

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah variabel utama yang sengaja diubah-ubah untuk diteliti pengaruhnya terhadap variabel tergantung dengan perubahan yang dilakukan. Variabel yang dimaksud adalah isolat bakteri tanah perkebunan teh Kemuning, Tawangmangu, Jawa Tengah.

Variabel tergantung adalah titik pusat persoalan yang merupakan kriteria penelitian. Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah adanya penghasil

enzim amilase dan selulase dari beberapa isolat dari bakteri tanah perkebunan teh Kemuning Tawangmangu.

Variabel terkontrol dalam penelitian ini adalah variabel yang dianggap berpengaruh terhadap variabel terikat selain variabel bebas. Variabel ini perlu ditetapkan atau dinetralisir kualitasnya sehingga hasil yang diperoleh tidak tersebar dan dapat diulangi oleh peneliti lain secara tepat. Variabel terkontrol yang dimaksud yakni tanah perkebunan teh, bakteri, kondisi laboratorium (meliputi kondisi inkubasi, alat, serta bahan yang digunakan harus steril), media yang digunakan dalam penelitian, metode tempel.

3. Definisi operasional variabel utama

Pertama, tanah di daerah rhizofera dengan ciri-ciri tanahnya gembur, berwarna coklat pekat dan kering yang ada di perkebunan teh adalah tanah perkebunan yang didapat di kawasan perkebunan teh Kemuning, Tawangmangu, Karanganyar, Jawa Tengah pada bulan Oktober 2018

Kedua, suspensi tanah adalah tanah yang dilarutkan dalam 9 ml larutan Na fisiologis kemudian di vortex selama 5 menit.

Ketiga, isolat bakteri adalah bakteri yang diperoleh dari tanah perkebunan teh Kemuning, Tawangmangu, Karanganyar, Jawa Tengah.

Keempat, uji bakteri penghasil enzim amilase dan selulase adalah uji menggunakan metode tempel dengan melihat zona bening bakteri dalam media uji.

Kelima, isolat bakteri adalah bakteri yang diperoleh dari tanah perkebunan teh dengan melihat adanya pertumbuhan dalam media uji.

Keenam, identifikasi bakteri adalah bakteri yang diperoleh dari tanah dengan melihat morfologi, metode pewarnaan Gram negatif dan Gram positif, pewarnaan endospora dan uji biokimia.

Ketujuh, zona hambat adalah garis tengah daerah hambatan jernih yang mengelilingi sampel uji dianggap sebagai ukuran hambatan bakteri penghasil enzim amilase dan selulase.

C. Bahan dan Alat

1. Bahan

1.1 Bahan utama. Bahan utama yang digunakan adalah tanah yang diambil di perkebunan teh Kemuning, Tawangmangu, Jawa Tengah.

1.2 Bahan lain-lain. Media Gula–Gula, media NA (Nutrien Agar), CMC (*Carboxy Methyl Cellulose*), amilum, alkohol, aquadest, larutan Na fisiologis.

1.3 Pewarnaan. Pewarna yang digunakan dalam penelitian ini adalah Gram A (cat kristal violet), Gram B (lugol Iodine), Gram C (alkohol), Gram D (cat safarin), *malacite green*.

2. Alat yang Digunakan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah tabung reaksi, gelas ukur, erlenmeyer, beaker glass, jarum Ose, cawan petri, inkas, pipet tetes, pipet volum, lampu spirtus, autoklaf, inkubator, vortek, timbangan analitik, kaca objek, mikroskop dan oven.

D. Jalannya Penelitian

1. Sterilisasi

Media agar yang digunakan disterilkan terlebih dahulu dengan autoklaf pada suhu 121^oC tekanan 2 atm selama 15 menit. Alat- alat dari gelas dapat disterilkan dengan menggunakan autoklaf atau oven pada suhu 170-180^oC selama 2 jam, sedangkan alat-alat seperti jarum Ose disterilkan dengan pemanasan api langsung. Sterilisasi inkas menggunakan formalin (Suriawiria 1985).

2. Pengambilan sampel

Tanah diambil dari kawasan perkebunan teh Kemuning, Tawangmangu. Tanah yang diambil adalah tanah dekat perakaran dengan kedalaman 10-15 cm dengan 3 titik lokasi berbeda sebanyak kurang lebih 1 gram yang kemudian dihomogenkan.

3. Pembuatan Medium

3.1 Pembuatan Media *Nutrient Agar* (NA). Media NA dibuat dengan cara NA sebanyak 20 gram dilarutkan hingga 1000 mL aquadest. Media tersebut dicampur hingga merata dengan menggunakan *hot plate* dan diaduk dengan

menggunakan batang pengaduk. Campuran media kemudian di autoclave pada suhu 121°C tekanan 2 atm selama 15 menit. Kemudian media dituang ke dalam cawan petri dan tabung reaksi. Media yang dituang ke dalam tabung reaksi diletakan pada posisi miring $\pm 45^{\circ}\text{C}$ dan dibiarkan hingga memadat.

3.2 Pembuatan Media Amilum. Media Amilum dibuat dengan cara NA sebanyak 2 gram dan Amilum 1% dengan menimbang sebanyak 1 gram dilarutkan dengan aquadest *ad* 100 mL. Media tersebut dicampur hingga merata dengan menggunakan *hot plate* dan diaduk dengan menggunakan batang pengaduk. Campuran media tersebut kemudian di autoklaf pada suhu 121°C tekanan 2 atm selama 15 menit. Kemudian di tuang ke dalam cawan petri ukuran besar dan dibiarkan hingga media memadat.

3.3 Pembuatan Media CMC. Media CMC (Carboxy Methil Cellulose) dibuat dengan cara NA sebanyak 2 gram dan CMC 1% dengan menimbang sebanyak 1 gram dilarutkan dengan aquadest *ad* 100 mL. media tersebut dicampur hingga merata dengan menggunakan *hot plate* dan diaduk dengan menggunakan batang pengaduk. Campuran media tersebut kemudian di autoklaf pada suhu 121°C tekanan 2 atm selama 15 menit. Kemudian di tuang ke dalam cawan petri ukuran besar dan dibiarkan hingga media memadat.

4. Persiapan sampel

Tanah yang sudah diperoleh diambil ± 1 gram dimasukkan dalam tabung reaksi yang berisi 9 ml larutan Na fisiologis 0,9 % kemudian di homogenkan dengan alat vortek selama 5 menit menjadi suspensi tanah, sehingga diperoleh pengenceran 10^{-1} . Digunakan larutan Na fisiologis karena bersifat isotonis agar mikroba tetap bertahan hidup.

5. Isolasi bakteri

Tanah yang telah disuspensikan diambil satu Ose dan digunakan dengan teknik metode goresan dengan Ose pada plat media NA (Nutrient Agar) lalu diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Selanjutnya mengamati adanya pertumbuhan koloni bakteri pada lempeng cawan petri yang berisi media NA, dan dipilih koloni bakteri yang mempunyai karakteristik berbeda. Koloni bakteri hasil isolasi yang sudah murni kemudian dibuat larutan stok pada media NA miring.

6. Identifikasi mikroorganisme dari tanah

Identifikasi dilakukan pada bakteri aerob yang sudah diisolasi. 6 isolat bakteri masing-masing diidentifikasi dengan cara uji morfologi, pewarnaan gram, pewarnaan spora, dan uji biokimia.

6.1 Uji Morfologi. Morfologi bakteri dilakukan secara makroskopis dengan dibuat biakan pada media Nutrient Agar (NA) cawan lalu diinkubasi selama 24 jam dan mengamati bentuk koloni isolat dari atas, permukaan koloni dilihat dari samping dan tepi koloni dilihat dari atas.

6.2 Pewarnaan Gram. Pewarnaan bertujuan untuk memastikan bakteri tersebut termasuk dalam golongan bakteri Gram positif atau Gram negatif. Pewarnaan Gram dilakukan dengan cara buat preparat ulas. Isolat bakteri masing-masing diambil 1-2 ose kemudian dioleskan pada objek gelas. Smear pada objek gelas 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 1 menit kemudian dibilas, ditetesi lagi dengan Gram D (cat safranin sebagai cat penutup) diamkan \pm 1 menit kemudian dibilas. Objek gelas yang dilakukan pengecatan di lihat di mikroskop. Bakteri dinyatakan gram negatif apabila berwarna merah dibawah mikroskop dan bakteri dinyatakan gram positif apabila berwarna ungu dibawah mikroskop (Koneman *et al.* 1983; Volk dan Wheller 1998).

6.3 Pewarnaan Spora. Metode *Schaeffer Fulton* pada pewarnaan spora bertujuan untuk melihat apakah bakteri tersebut memiliki spora atau tidak. Pewarnaan spora dilakukan dengan membuat preparat bakteri dengan mengambil satu sampai dua ose isolat bakteri dan satu tetes aquadest steril, difiksasi pada kaca objek, lalu diberikan 2-3 tetes *Malachite green* lalu di panas uapkan (sampai uap terlihat) didiamkan selama 1 menit lalu dicuci dengan air mengalir, kemudian di teteskan safranin dan dibiarkan selama 30 detik tanpa pemanasan dicuci dengan air mengalir dan dikeringkan. Setelah itu diamati dengan mikroskop, spora berwarna hijau sedangkan bagian sel lainnya berwarna merah (Cappucinno 1983).

7. Uji secara Biokimia.

Identifikasi berdasarkan uji biokimia dilakukan dengan menggunakan media KIA dan Gula-Gula.

7.1 Media KIA (*Kliger Iron Agar*). Biakan murni bakteri diinokulasi pada media dengan cara ditusuk dan digores kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam. Tujuan dari identifikasi ini yaitu untuk uji fermentasi karbohidrat (glukosa, laktosa) dan sulfida. Selanjutnya diamati pada bagian lereng dasar, terdapatnya gas serta terbentuknya warna hitam pada media. Uji positif bila pada lereng akan berwarna merah (ditulis K), bagian dasar berwarna kuning (ditulis A), terbentuknya gas ditandai dengan pecahnya media (ditulis G+), sulfida positif terbentuk warna hitam pada media (ditulis S+).

7.2 Media Gula-Gula. Isolat bakteri masing-masing diambil 1-2 Ose kemudian diinokulasikan pada media uji biokimia (glukosa, sukrosa, laktosa, dan maltosa) kemudian diinkubasi selama 24 jam dalam suhu 36°C. setelah waktu inkubasi selesai, kemudian melakukan pengamatan terhadap perubahan warna pada media dan terbentuknya gelembung udara pada tabung durham. Warna media awalnya adalah merah. Jika terjadi fermentasi asam maka media akan mengalami perubahan warna media menjadi kuning. Adanya gelembung udara menunjukkan bahwa bakteri yang didapat dari tanah merupakan bakteri aerob.

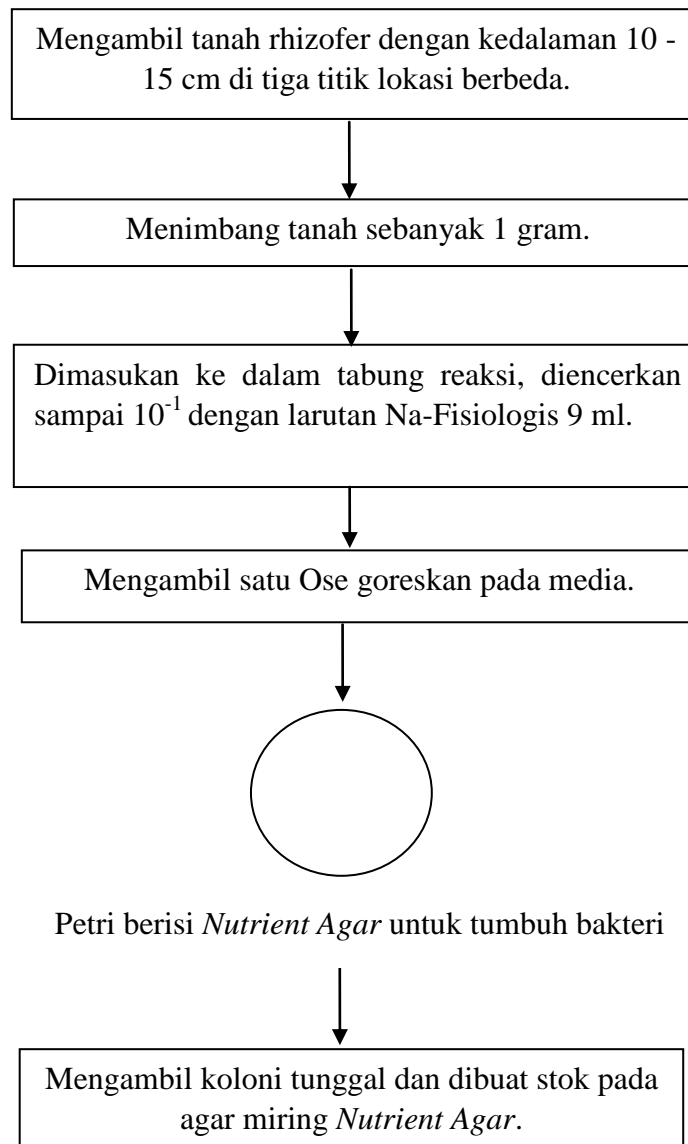
8. Uji aktivitas bakteri penghasil enzim amilase dan selulase secara difusi.

8.1 Uji aktivitas bakteri penghasil enzim amilase. Isolat yang sudah diisolasi dilakukan uji aktivitas enzim amilase dengan cara diinokulasikan secara tempel menggunakan Ose dengan bakteri uji dalam media NA + Amilum. Kemudian inkubasi dilakukan pada suhu 37°C selama 1 hari. Selanjutnya dilakukan pewarnaan dengan iodine dan koloni yang bersifat positif dapat diketahui dengan melihat areal bening (kuning) yang muncul di sekelilingnya.

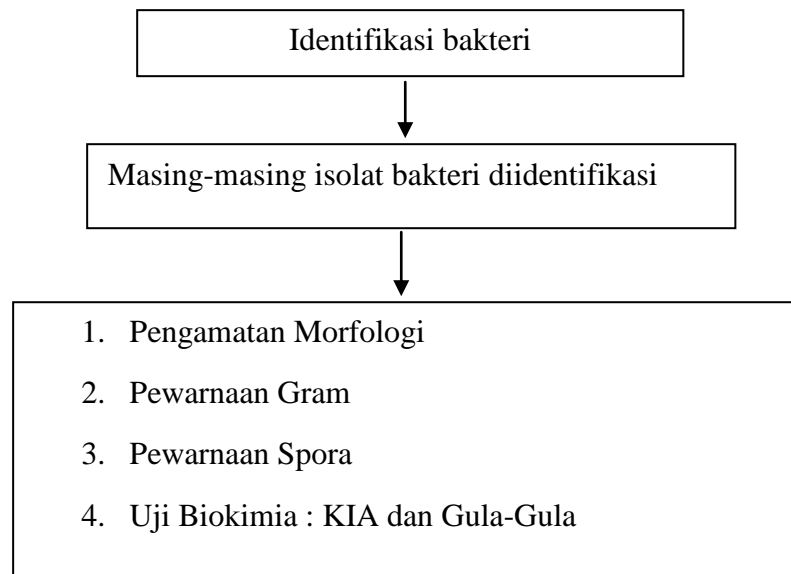
8.2 Uji aktivitas bakteri penghasil enzim selulase. Isolat bakteri yang sudah diisolasi dilakukan uji aktivitas enzim selulase dengan cara diinokulasikan secara tempel menggunakan Ose dengan bakteri uji dalam media NA + CMC.

Kemudian inkubasi pada suhu 37°C selama 1 hari. Hasil positif dapat diketahui dengan melihat areal bening yang muncul pada media tersebut.

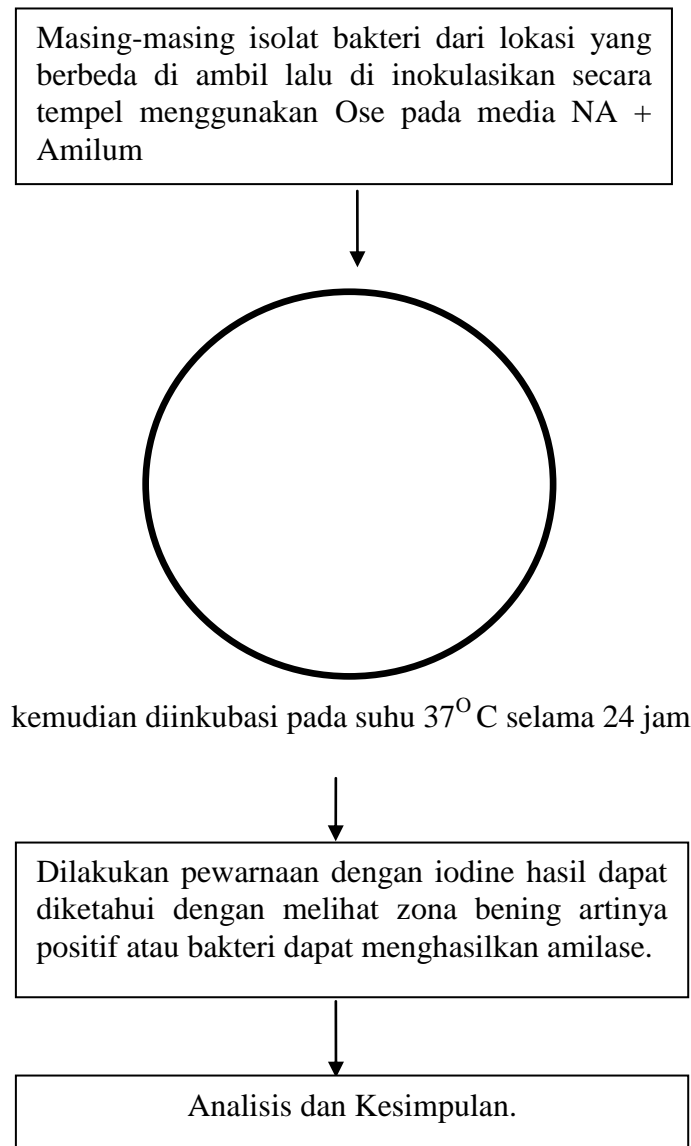
E. Skema Jalannya Penelitian



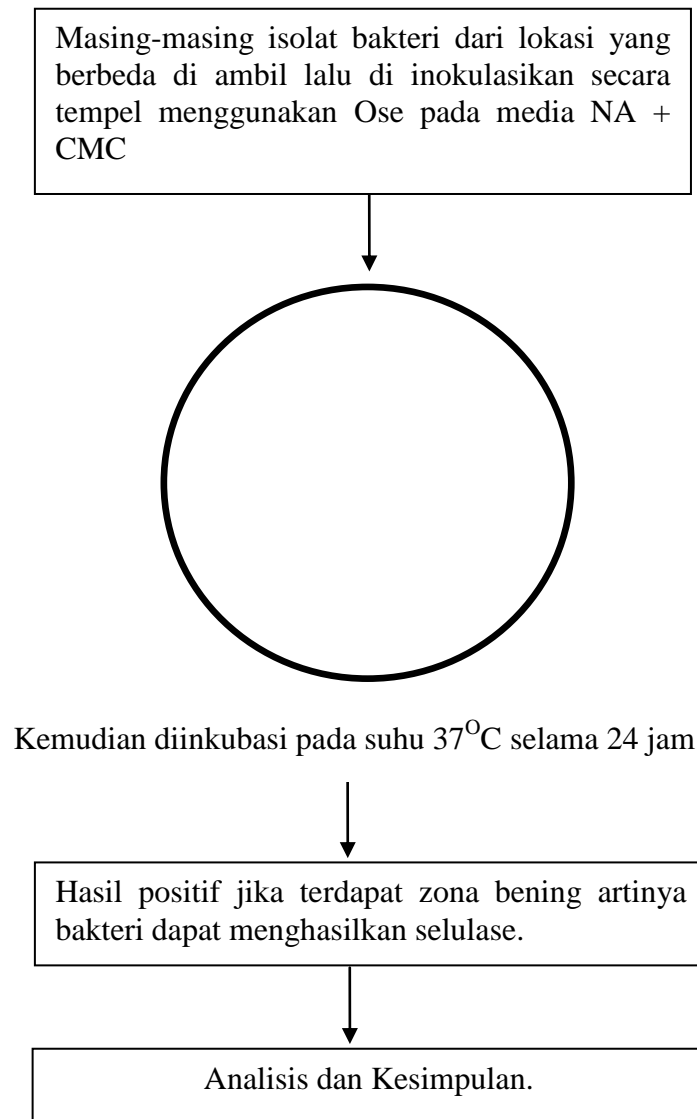
Gambar 1. Diagram isolasi bakteri dari tanah



Gambar 2. Skema identifikasi bakteri tanah



Gambar 3. Skema kerja pengujian aktivitas enzim amilase dari isolat bakteri tanah



Gambar 4. Skema kerja pengujian aktivitas enzim selulase dari isolat bakteri tanah