

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 bakteri endofit *Pseudomonas knackmussii* dan *Bacillus siamensis* yang telah berhasil di isolasi dan dimurnikan dari umbi talas (*Colocasia esculenta* L.) dan diperoleh dari laboratorium mikrobiologi Universitas Setia Budi Surakarta.

2. Sampel

Sampel adalah sebagian kecil dari populasi yang digunakan dalam melakukan penelitian. Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah bakteri endofit *Pseudomonas knackmussii* dan *Bacillus siamensis* yang telah berhasil di isolasi dan dimurnikan dari umbi talas (*Colocasia esculenta* L.) yang diambil secara acak dari laboratorium mikrobiologi Universitas Setia Budi Surakarta.

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi variabel utama

Variabel utama pertama dalam penelitian ini adalah bakteri endofit *Pseudomonas knackmussii* dan *Bacillus siamensis* yang telah berhasil di isolasi dan dimurnikan dari umbi talas (*Colocasia esculenta* L.).

Variabel utama kedua adalah uji aktivitas antibakteri isolat bakteri endofit *Pseudomonas knackmussii* dan *Bacillus siamensis* dari umbi talas (*Colocasia esculenta* L.) terhadap bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922.

Variabel utama ketiga adalah waktu optimum fermentasi isolat bakteri endofit *Pseudomonas knackmussii* dan *Bacillus siamensis* dari umbi talas (*Colocasia esculenta* L.).

2. Klasifikasi variabel utama

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

Variabel bebas adalah variabel yang sengaja diubah untuk diteliti pengaruhnya terhadap variabel tergantung. Variabel bebas yang dimaksud dalam penelitian adalah lamanya waktu fermentasi isolat bakteri endofit *Pseudomonas knackmussii* dan *Bacillus siamensis* dari umbi talas (*Colocasia esculenta* L.).

Variabel terkendali adalah variabel yang mempengaruhi variabel tergantung sehingga perlu ditetapkan kualifikasinya agar hasil yang diperoleh tidak tersebar dan dapat diulang oleh peneliti lain secara tepat. Variabel terkendali penelitian ini adalah kemurnian isolat bakteri endofit *Pseudomonas knackmussii* dan *Bacillus siamensis*, kemurnian bakteri uji *Escherichia coli* ATCC 25922, jumlah bakteri dengan standar Mc Farland 0,5, kondisi peneliti, kondisi laboratorium meliputi inkas, suhu inkubasi, waktu inkubasi, strerilisasi, media yang digunakan dalam penelitian dan metode penelitian.

Variabel tergantung adalah titik pusat persoalan yang merupakan kriteria penelitian ini. Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah aktivitas antibakteri isolat bakteri endofit *Pseudomonas knackmussii* dan *Bacillus siamensis* dari umbi talas (*Colocasia esculenta* L.) dengan melihat pertumbuhannya pada media uji dan diameter daya hambat yang dihasilkan.

3. Definisi operasional variabel utama

Pertama, bakteri endofit *Pseudomonas knackmussii* dan *Bacillus siamensis* adalah bakteri hasil isolasi yang telah berhasil dimurnikan dari umbi talas (*Colocasia esculenta* L.) dan diharapkan menghasilkan senyawa bioaktif untuk menghambat pertumbuhan *Escherichia coli* ATCC 25922.

Kedua, bakteri uji *Escherichia coli* ATCC 25922. adalah bakteri patogen Gram negatif yang menyebabkan infeksi dan diperoleh dari laboratorium mikrobiologi Universitas Setia Budi Surakarta.

Ketiga, waktu fermentasi adalah waktu yang dibutuhkan oleh isolat bakteri endofit untuk melakukan metabolisme menghasilkan senyawa bioaktif dan waktu yang digunakan untuk melakukan fermentasi yaitu hari ke-2 sampai hari ke-7.

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

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

Keenam, metode difusi adalah dengan menentukan diameter daya hambat terhadap bakteri uji dari hasil fermentasi isolat bakteri endofit yaitu dibuat cakram yang direndam dalam supernatan hasil fermentasi isolat bakteri endofit. Kontrol positif adalah antibiotik ciprofloxacin dan kontrol negatif adalah cakram yang direndam pada BHI steril.

C. Alat dan Bahan

1. Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini meliputi alat-alat gelas, oven, autoclave, jarum ose, lemari pendingin, inkas, cawan petri, erlenmeyer, inkubator, pipet tetes, bunsen, mikropipet dan tip, *vortex mixer*, beaker glass, tabung reaksi, rak tabung reaksi, aluminium foil, silk wrap, pinset, erlenmeyer, batang pengaduk, penggaris, jangka sorong, spidol, kapas lidi steril, objek glass, mikroskop, kulkas dan timbangan analitik.

2. Bahan

Bahan sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah bakteri endofit *Pseudomonas knackmussii* dan *Bacillus siamensis* yang telah berhasil di isolasi dan dimurnikan dari umbi talas (*Colocasia esculenta* L.) yang diperoleh dari laboratorium mikrobiologi Universitas Setia Budi Surakarta.

Bakteri uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Escherichia coli* ATCC 25922.

Medium uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Endo Agar* (EA), *Pseudomonas Selektive Agar* (PSA) *Mueler Hinton 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 kosong steril.

D. Jalannya Penelitian

1. Sterilisasi alat dan bahan

Keadaan steril digunakan untuk mencegah terjadinya kontaminasi. Alat-alat dicuci bersih, dikeringkan dan dibungkus dengan kertas dan disumbat kapas. Sterilisasi bahan yang akan digunakan di autoclave suhu 121⁰C selama 15 menit, sedangkan untuk sterilisasi cawan petri, alat gelas dan kapas lidi steril menggunakan oven suhu 171⁰C selama 30 menit. Media yang digunakan disterilkan menggunakan autoklaf pada suhu 121⁰C selama 15 menit dengan tekanan 1 atm.

2. Pembuatan media

2.1 Pembuatan media *Mueller Hinton Agar* (MHA). Berdasarkan prosedur yang tertera dalam kemasan, media MHA dibuat dengan cara sebanyak 38 gram bubuk *Mueller Hinton Agar* (MHA) dilarutkan dalam 1000 mL aquadest. Media tersebut dicampur hingga merata dengan menggunakan *hot plate* dan diaduk dengan menggunakan batang pengaduk. Campuran media kemudian disterilisasi dalam *autoclave* pada suhu 121⁰C selama 15 menit dengan tekanan 1 atm. Media kemudian dituang ke dalam cawan petri dan dibiarkan hingga memadat.

2.2 Pembuatan media *Nutrient Agar* (NA). Berdasarkan prosedur yang tertera dalam kemasan, media NA dibuat dengan cara NA sebanyak 20 gram dilarutkan dalam 1000 mL aquadest. Media tersebut dicampur hingga merata dengan menggunakan *hot plate* dan diaduk dengan menggunakan batang pengaduk. Campuran media kemudian disterilisasi dalam *autoclave* pada suhu

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

2.3 Pembuatan media *Brain-Heart Infusion* (BHI). Berdasarkan prosedur yang tertera dalam kemasan, media BHI dibuat dengan cara sebanyak 37 gram bubuk *Brain-Heart Infusion* (BHI) dilarutkan dalam 1000 mL aquadest. Media tersebut dicampur hingga merata dengan menggunakan *hot plate* dan diaduk dengan menggunakan batang pengaduk. Campuran media kemudian disterilisasi dalam *autoclave* pada suhu 121°C selama 15 menit dengan tekanan 1 atm. Media kemudian dituang ke dalam tabung reaksi saat ingin digunakan.

2.4 Pembuatan media *Endo Agar* (EA). Berdasarkan prosedur yang tertera dalam kemasan, media EA dibuat dengan cara sebanyak 36 gram bubuk *Endo Agar* (EA) dilarutkan dalam 1000 mL aquadest. Media tersebut ditambahkan dengan 6 mL basic fuchsin 10% dalam alkohol kemudian dicampurkan menggunakan *hot plate* dan diaduk dengan menggunakan batang pengaduk. Campuran media kemudian disterilisasi dalam *autoclave* pada suhu 121°C selama 15 menit dengan tekanan 1 atm. Tunggu suhu sampai hangat-hangat kuku (45°C-50°C) kemudian homogenkan tuang ke dalam cawan petri.

2.5 Pembuatan media *Pseudomonas Selektive Agar* (PSA). Berdasarkan prosedur yang tertera dalam kemasan, media PSA dibuat dengan cara sebanyak 45,3 gram bubuk *Pseudomonas Selektive Agar* (PSA) dilarutkan dalam 1000 mL aquadest. Media tersebut dicampur hingga merata dengan menggunakan *hot plate* dan diaduk dengan menggunakan batang pengaduk. Setelah mendidih tambahkan 10 mL gliserin, campuran media kemudian disterilisasi dalam *autoclave* pada suhu 121°C selama 15 menit dengan tekanan 1 atm. Media kemudian dituang ke dalam tabung reaksi saat ingin digunakan.

3. Pembuatan kultur bakteri

Pembuatan stok bakteri dilakukan untuk memperbanyak dan meremajakan bakteri dengan menginokulasikan satu ose biakan murni bakteri uji dan isolat bakteri endofit ke dalam media NA miring, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C

selama 24 jam. Masing-masing bakteri uji dan isolat bakteri endofit dibuat dua pada Na miring sebagai *stock culture* dan *working culture* (Pratiwi 2015).

4. Pembuatan suspensi bakteri uji

Biakan bakteri *Escherichia coli* diambil satu ose dan kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang berisi 10 mL *Brain-Heart Infusion* (BHI) steril, diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam di dalam inkubator. Suspensi yang terbentuk disetarakan dengan larutan baku Mc. Farland 0,5 yang ekuivalen dengan suspensi sel bakteri dengan konsentrasi $1,5 \times 10^8$ cfu/ml (Andrews 2008). Hasil pengenceran kemudian dibuat perbandingan 1 : 1000 dalam erlenmeyer, kemudian digunakan untuk pengujian antibakteri *Escherichia coli* ATCC 25922.

5. Uji identifikasi bakteri uji dan isolat bakteri endofit

5.1 Uji Morfologi. Bakteri uji diambil satu ose secara aseptis, kemudian di buat goresan pada permukaan media *Endo agar* (EA). Kondisikan petri disk yang dibungkus kebalik yang kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Sesudah diinkubasi akan tampak koloni-koloni bakteri. Ciri koloni bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922 hasil positif koloni kilat logam berwarna merah.

Isolat bakteri endofit diambil satu ose secara aseptis, kemudian di buat goresan pada permukaan media. Isolat bakteri endofit *Pseudomonas knackmussii* digoreskan pada media *Pseudomonas Selektive Agar* (PSA) dan isolat bakteri endofit *Bacillus siamensis* digoreskan pada media *Nutrien Agar* (NA). Kondisikan petri disk yang dibungkus kebalik yang kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Sesudah diinkubasi akan hasil positif koloni isolat bakteri endofit *Pseudomonas knackmussii* ditunjukkan dengan koloni berwarna hijau, sedangkan pada isolat bakteri endofit *Bacillus siamensis* ditunjukkan dengan koloni berwarna putih sampai kekuningan (Sulviana *et al.* 2017; Mukamto 2015).

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 membuat preparat ulas. Bakteri diambil 1-2 ose dicampur merata dengan satu tetes aquadest steril pada objek glass lalu difiksasi diatas api bunsen. Kemudian ditetesi dengan Gram A (cat kristal violet

sebagai cat utama) ± 1 menit kemudian dibilas, ditetesi dengan Gram B (lugol iodine sebagai pengintensif warna) ± 1 menit kemudian dibilas, ditetesi lagi dengan Gram C (alkohol sebagai peluntur) ± 30 detik kemudian dibilas, terakhir ditetesi dengan Gram D (cat safranin sebagai cat penutup) diamkan ± 1 menit kemudian dibilas. Hasil pewarnaan diamati menggunakan mikroskop dengan perbesaran 1000 kali. Bakteri *Escherichia coli* akan tampak berwarna merah (gram negatif) dan berbentuk batang, tidak berspora, dan motil (Sari *et al.* 2018). Isolat bakteri endofit *Pseudomonas knackmussii* merupakan bakteri Gram negatif yang akan berwarna merah sedangkan isolat bakteri endofit *Bacillus siamensis* merupakan bakteri Gram positif yang akan berwarna ungu.

5.3 Pewarnaan spora. Pewarnaan dengan metode *Schaeffer fulton* bertujuan untuk melihat apakah isolat bakteri endofit memiliki spora atau tidak beserta letaknya. Pewarnaan dilakukan dengan cara buat preparat ulas. Isolat bakteri endofit 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 diamati menggunakan mikroskop dengan perbesaran 1000 kali. Spora berwarna hijau sedangkan bagian sel lainnya berwarna merah.

6. Uji biokimia bakteri uji dan isolat bakteri endofit

6.1 Media *Sulfida Indol Motility* (SIM). Biakan bakteri 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.

6.2 Media *Kliger Iron Agar* (KIA). Biakan bakteri 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+).

6.3 Media *Lysine Iron Agar* (LIA). Biakan bakteri 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 Media *Citrat*. Biakan bakteri 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 isolat bakteri endofit

Proses fermentasi bertujuan untuk menghasilkan senyawa bioaktif lebih banyak dari isolat bakteri endofit. Fermentasi isolat dilakukan dengan cara menumbuhkan pada media *Brain-Heart Infusion* (BHI) sebanyak 80 mL dalam erlenmeyer steril bersumbat kapas. Inkubasi dilakukan selama 7 hari suhu 37°C dan setiap hari dilakukan penggojogan selama 15 menit. Hari ke-2 sampai hari ke-7 dilakukan pengambilan sampel sebanyak 5 mL. Hasil fermentasi disentrifugasi pada kecepatan 4000 rpm selama 60 menit untuk memisahkan supernatan dan biomasanya. Supernatan pada hari ke-2 sampai hari ke-7 yang diperoleh digunakan sebagai uji aktivitas antibakteri (Kumala *et al.* 2006; Kumala & Endro 2007).

8. Uji aktivitas antibakteri

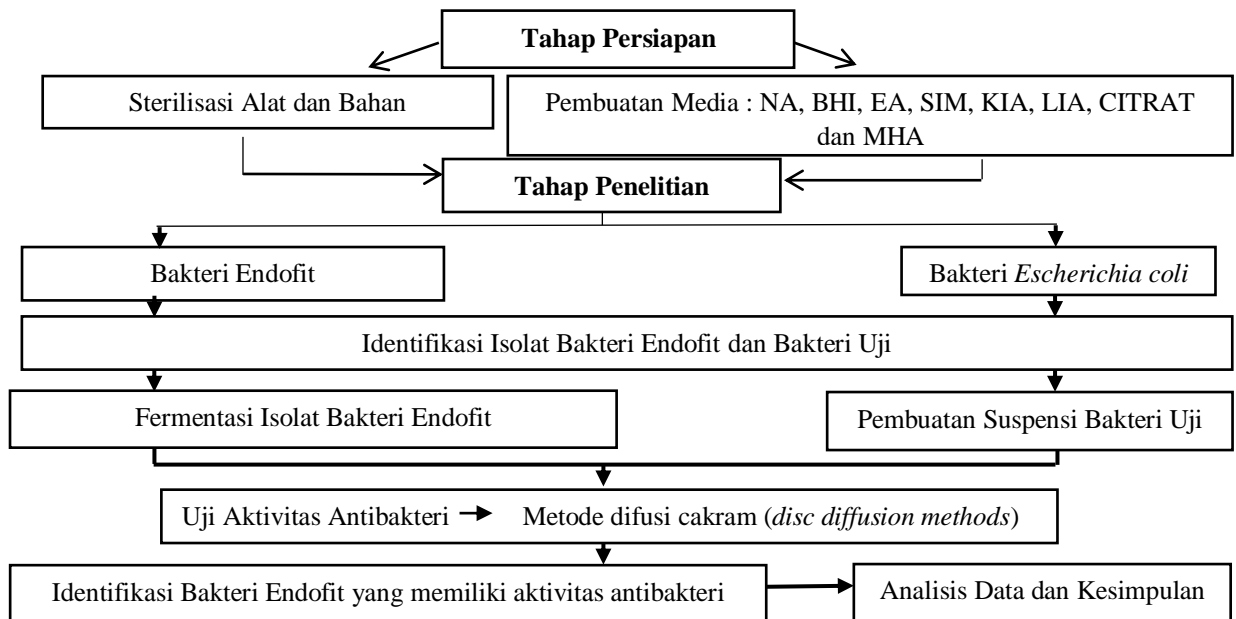
Uji antibakteri yang digunakan adalah metode difusi cakram (*disc diffusion methods*). Metode difusi digunakan untuk menentukan diameter daya hambat terhadap bakteri uji dengan terlihatnya daerah jernih disekitar cakram

yang mengandung antibakteri (Harmita & Radji 2008). Metode difusi cakram (*disc diffusion methods*) menggunakan cawan steril yang telah diisikan dengan media MHA sebanyak 50 mL. Secara aseptis pada cawan petri digoreskan pengenceran suspensi bakteri uji *Escherichia coli* menggunakan kapas lidi steril, kemudian digunakan kertas cakram kosong steril sebanyak 6 untuk uji difusi. Cakram kosong steril masing-masing direndam ke dalam supernatan fermentasi hari ke-2, ke-3, ke-4, ke-5, ke-6 dan ke-7 sebanyak 30 μ L menggunakan mikropipet. Kontrol positif yang digunakan adalah antibiotik ciprofloxacin konsentrasi 5 μ g dan kontrol negatif adalah cakram kosong steril yang direndam dalam 30 μ L media BHI steril. Cakram yang sudah diresapi larutan supernatan diletakkan pada permukaan media MHA padat. Inkubasi selama 24 jam pada suhu 37⁰C dan diamati hasilnya. Aktivitas antibakteri dinyatakan sebagai diameter daya hambat sekitar kertas cakram dinyatakan dalam satuan milimeter (mm) yang diukur dengan menggunakan jangka sorong (Radji 2011).

E. Analisis Hasil

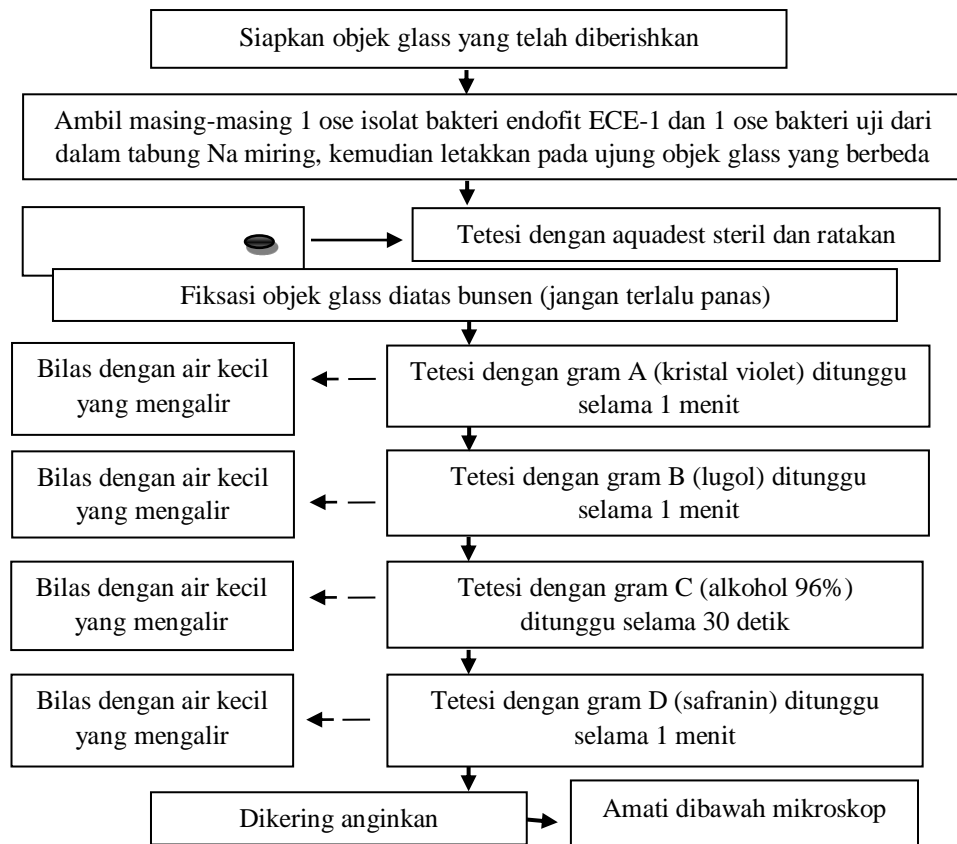
Hasil penelitian dari uji aktivitas antibakteri dari hasil isolat bakteri endofit *Pseudomonas knackmussii* dan *Bacillus siamensis* umbi talas (*Colocasia esculenta* L.) terhadap *Escherichia coli* ATCC 25922 dianalisis berdasarkan nilai diameter daya hambat yang terbentuk. Hasil data yang diperoleh dilakukan analisa dengan menggunakan uji *Shapiro-Wilk* 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 $P < 0.05$, maka data terdistribusi tidak normal dan tidak homogen. Hasil normal dilanjutkan dengan uji parametrik *One Way Anova* dan *Two Way Anova* dengan taraf kepercayaan 95% diikuti uji *Post Hoc Duncan*. Data yang diperoleh dianalisis menggunakan SPPSS statistik 24.

F. Skema Alur Penelitian



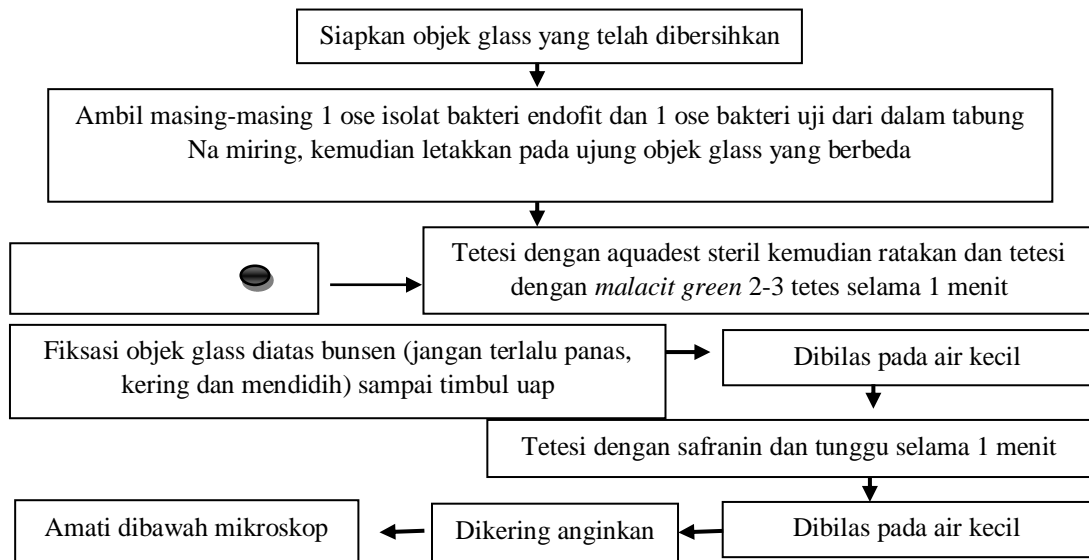
Gambar 3. Skema alur penelitian

G. Pewarnaan Gram



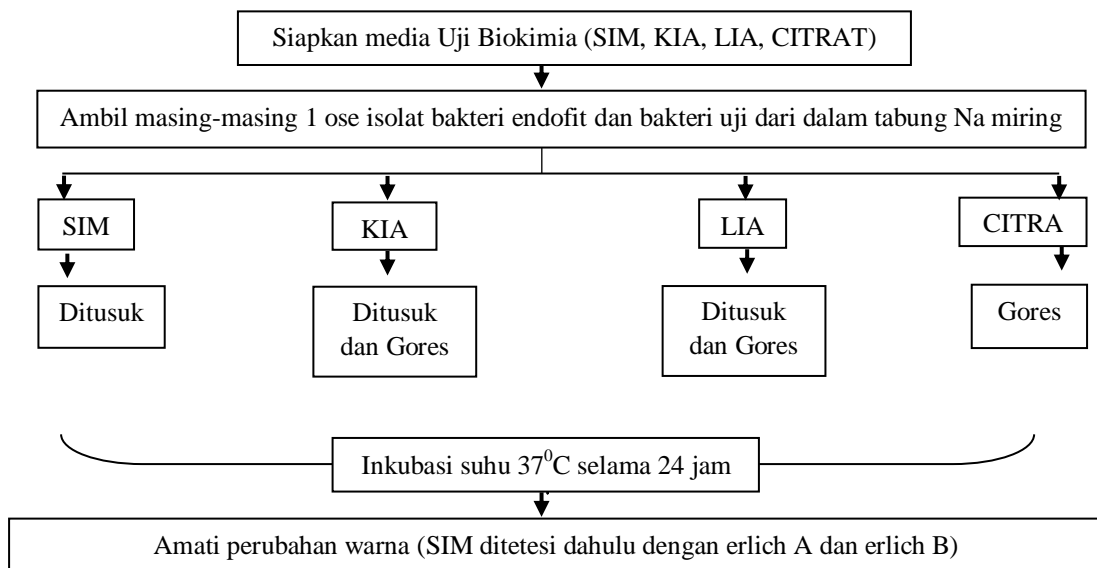
Gambar 4. Pewarnaan Gram

H. Pewarnaan Spora



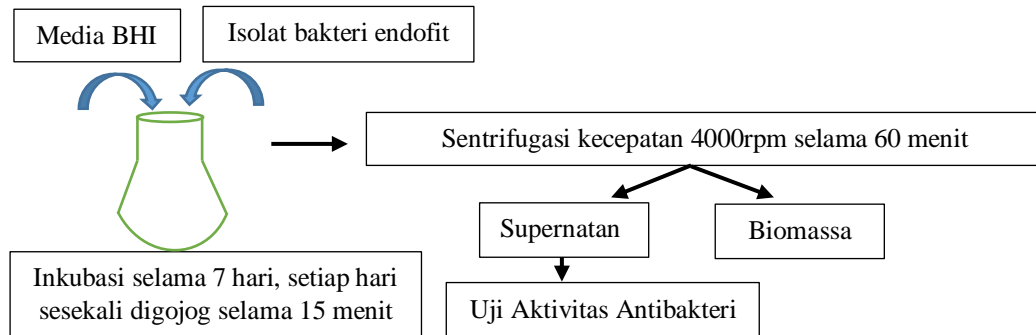
Gambar 5. Pewarnaan spora

I. Uji Biokimia



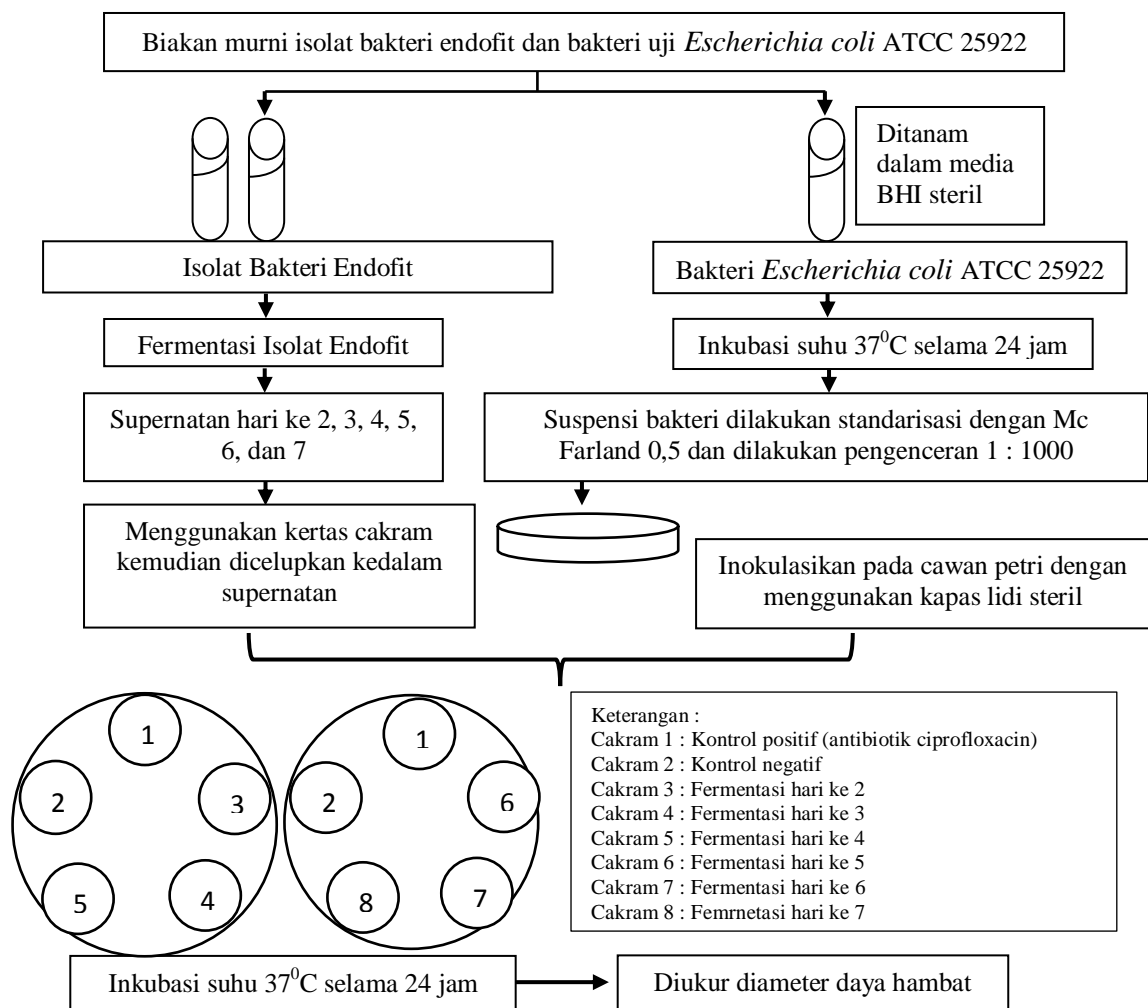
Gambar 6. Uji biokimia

J. Fermentasi Isolat Bakteri Endofit *Pseudomonas knackmussii* dan *Bacillus siamensis*



Gambar 7. Fermentasi isolat bakteri endofit

K. Uji Aktivitas Antibakteri



Gambar 8. Uji aktivitas antibakteri