

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1. Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian yang digunakan adalah rancangan penelitian diskriptif. Data yang diperoleh disajikan secara deskriptif meliputi karakteristik mikroskopis dan makroskopis dari masing-masing genus bakteri akar alfafa yang berhasil diisolasi dari akar tanaman alfafa (*Madicago sativa*).

3.2. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di laboratorium Mikrobiologi, Jurusan Biologi, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang. Mulai bulan Maret sampai April 2014.

3.3 Alat dan Bahan Penelitian

3.3.1 Alat Penelitian

Alat-alat yang digunakan adalah mikroskop (Olympus), *shaker inkubator*, micropipet, vortex mixer, cawan petri, erlenmeyer, tabung reaksi, timbangan analitik, gelas ukur, beaker glass, autoklaf, laminar air flow, gunting, bunsen, ose, lemari es, oven, dan block heater,

3.3.2 Bahan Penelitian

3.3.2.1 Bahan Alfafa

Bahan akar alfafa diambil dari PT Greenfield indonesia yang berada di Gunung Kawi, umur rumput alfafa kurang lebih 3 bulan.

3.2.2.2 Bahan Media

Sampel yang digunakan untuk isolasi bakteri alfafa adalah akar alfafa, media yang digunakan dalam penelitian ini adalah YMA (Mannitol, Depotasium phosphate, Magnesium sulphate, Yeast ekstrak, Sodium cholide, dan agar), alkohol, NaCL, aquades, spirtus, aluminium foil, kertas label, blue tip, tissue, dan kapas secukupnya.

3.4 Prosedur Kerja

3.4.1 Sterilisasi Alat dan Bahan

Sterilisasi alat dan bahan dengan cara membungkus alat-alat (hanya untuk alat yang bisa dibungkus) dengan aluminium foil, kemudian memasukan kedalam autoklaf pada suhu 121 C dengan tekanan 15 psi (per square inch) selama 15 menit.

3.4.2 Pembuatan YMA

Pembuatan media rizobium dengan komposisi Mannitol 10gr, Depotasium phosphate 0.5gr, Magnesium sulphate 0.2gr, Yeast ekstrak 1gr, Sodium cholide 0.1gr, dan agar 20gr kemudian dicampur dengan 1 liter aquades dengan PH 6.8. Setelah itu dipanaskan di atas *hot plate* hingga mendidih sambil diaduk dengan magnetik stirer sampai homogen, lalu dibiarkan beberapa saat. Dimasukkan dalam autoklaf untuk disterilkan beserta alat-alat yang akan digunakan selama 15 menit pada suhu 121°C dan tekanan 15 psi (Graham, 1969).

3.4.3 Isolasi Bakteri Pada Akar Alfafa

Bakteri pada akar alfafa diisolasi dari nodul akar dan akar alfafa yang berasal dari 5 tanaman *alfafa* yang berbeda dengan spesies yang sama. Cuci akar tanaman bernodula. Amati dan catat bentuk, distribusi dan jumlah nodula yang ada. Pisahkan nodula yang besar, dan berwarna putih kekuningan dengan hati-hati jangan sampai terluak atau pecah, nodula kecil dibiarkan melekat di perakatan. Jika memungkinkan pilih bentuk nodula yang gemuk terutama yang berwarna kemerahan (pink) Lakukan sterilisasi permukaan nodula. Rendam nodula dalam petridish berisi 0,1 % HgCl_2 selama 5 menit. Pindahkan nodula ke petridish steril lain yang berisi etanol 70% rendam selama tiga menit. Pindahkan nodula ke dalam petridish steril berisi akuades dengan menggunakan penjepit steril. Cucilah nodula tersebut. Pindahkan nodula ke petridish steril lain yang berisi etanol 70% rendam selama tiga menit. Pindahkan kembali ke petridish berisi aquades dan cuci. Pindahkan kembali ke petridis kedua yang berisi aquades untuk pencucian terakhir. Tambahkan 15 ml *Rhizobium* media ke dalam masing-masing petridish. Inkubasikan pada suhu 35°C selama 2X 24 jam atau 2 hari. Pilih satu koloni di antara yang dominan dan pindahkan ke agar miring *Rhizobium* media. Inkubasikan untuk pengujian lebih lanjut.

3.4.4 Pemurnian Bakteri

Medium yang digunakan pemurnian bakteri akar alfafa yaitu YMA. bakteri akar alfafa yang tumbuh pada YMA, dimurnikan masing2 pada media lempeng agar dan YMA miring. Kemudian diinkubasi selama 24 - 48 jam pada suhu 35 C, setelah inkubasi dilakukan pengamatan terhadap bentuk, warna, koloni

pada medium rhizobium. Setiap koloni yang berbeda bentuk maupun warna disubkultur lagi pada media lempeng rhizobium dan YMA miring sampai diperoleh koloni murni.

3.4.5 Tahap Identifikasi

3.4.5.1 Identifikasi Isolat Bakteri Akar Alfafa

Biakan murni bakteri yang ditumbuhkan pada YMA, di inkubasi pada suhu 35 C selama 24 jam. pengamatan secara mikroskopis dari morfologi dan pertumbuhan dilakukan pada koloni. preparat yang dibuat dari koloni yang tumbuh diwarnai dengan pewarnaan Gram (karbol kristal 5 menit, lugol 45-60 menit, alkohol 96 % 30 detik, safranin 1-2 menit), kemudian diamati dibawah mikroskop dengan perbesaran 1000 kali. berdasarkan pewarnaan gram, dilakukan uji biokimia untuk identifikasi lanjut. uji dengan microbact dilakukan terhadap bakteri berbentuk gram negatif yang sebelumnya yang telah dilakukan tes oksidase memakai oksidase strip (hasil positif memberikan warna biru-ungu). bakteri gram negatif berbentuk batang dan oksidase positif, diuji dengan microbact 12E dan 12B, sedangkan hasilnya menunjukan oksidase negatif dengan microbact 12E saja. sangekelit isolat bakteri dimasukan kedalam 5-10 ml NaCl 0.85% dengan kekeruhan 0.5 McFarland, kemudian suspensi bakteri dimasukan kedalam sumuran microbact dan diinkubasi pada suhu 35 C selama 16-24 jam. kemudian hasilnya didapat dengan cara membandingkan dengan warna dalam tabel, dan memasukan datanya ke komputer yang telah diprogram dalam file microbact. bakteri gram positif berbentuk batang dan kokus diuji dengan cara konvensional, memakai gula-gula glukosa laktosa, maltosa, manitol dan sakarosa

serta agar semi solid, sitrat dan kertas oksidase. setelah ditanam dan diinkubasi pada suhu 35 C selama 16-24 jam, interpretasi hasil sesuai dengan literatur (Utami, 2005)

3.4.5.2 Pewarnaan Gram

Uji pewarnaan gram dilakukan untuk mengetahui jenis bakteri termasuk gram positif atau negatif. Pewarnaan gram dilakukan dengan cara gelas obyek disemprot dengan etanol 70% sampai tidak terbentuk lapisan minyak kemudian diolesi dengan aquades steril sebanyak dua tetes. Biakan murni bakteri yang berumur 24 jam diambil sedikit secara aseptis dengan menggunakan jarum ose dan disuspensikan dengan aquades steril yang ada di gelas obyek. Suspensi difiksasi dengan cara melewatkan gelas obyek di atas api bunsen sampai kering. Ditetesi larutan kristal violet (gram A) sebanyak 2-3 tetes dan dibiarkan selama 1 menit. Preparat dibilas dengan air mengalir dan dikeringkan. Kemudian preparat ditetesi larutan iodine (gram B) selama 1 menit, dilanjutkan dengan pemberian larutan alkohol (gram C) dalam 30 detik atau hingga warna hilang kemudian dibilas dengan air mengalir kemudian dikeringkan. Preparat diamati dengan mikroskop perbesaran 1000x yang sebelumnya telah ditetesi dengan minyak emersi. Bakteri gram negative akan berwarna merah sedangkan bakteri gram positif akan berwarna ungu. Pada pewarnaan ini dapat juga dilihat morfologi atau bentuk dari sel bakteri yang ada.

3.4.5.3 Uji Katalase

Uji katalase dilakukan untuk mengetahui apakah bakteri tersebut memiliki enzim katalase untuk mereduksi efek toksik H_2O_2 . Uji katalase dilakukan dengan

cara gelas obyek disemprot dengan etanol sampai tidak terbentuk lapisan minyak kemudian diolesi dengan aquades steril sebanyak dua tetes. Biakan murni bakteri yang berumur 24 jam diambil sedikit secara aseptis dengan menggunakan jarum ose dan disuspensikan dengan aquades steril yang ada di gelas obyek. Suspensi ditetesi dengan larutan H_2O_2 selanjutnya diamati pembentukan gelembung udara (positif) yang terjadi pada koloni dan sekitarnya. Terbentuknya gelembung ini menandai bahwa bakteri tersebut bersifat aerobik.

3.4.5.4 Pewarnaan Endospora

Pewarnaan endospora dilakukan dengan cara gelas obyek disemprot alkohol 70% sampai tidak terbentuk lapisan minyak kemudian diolesi dengan aquades steril sebanyak dua tetes. Biakan murni bakteri yang berumur 72 jam diambil sedikit secara aseptik dengan menggunakan jarum ose dan disuspensikan aquades steril yang ada di gelas obyek. Suspensi difiksasi dengan cara melewatkan gelas obyek tersebut diatas api Bunsen sampai kering. Kemudian ditetesi *Melachite green* dan ditutup preparat dengan kertas isap, kemudian preparat diletakkan diatas pembakar spirtus selama 5-10 menit dan dijaga jangan sampai larutan mengering. Diangkat kertas isap dan dicuci dengan air mengalir. Ditetesi dengan larutan safranin 2-3 tetes. Dibiarkan 30-45 detik, kemudian dibilas dengan air mengalir dan dikeringanginkan. Preparat diamati dengan mikroskop perbesaran 1000x yang sebelumnya telah ditetesi dengan minyak emersi.

3.4.5.5 Identifikasi Dengan *Microbact 12B*

Satu koloni bakteri yang telah diinkubasi selama 18-24 jam diambil dengan ose kemudian dilarutkan ke dalam 3-6 ml garam fisiologis pada tabung reaksi steril hingga homogen. Larutan bakteri yang telah homogen diteteskan ke dalam sumur *Microbact* sebanyak 100 UI (4 tetes), untuk sumur Lysin, Omitin, dan H₂S ditambah dengan tetesan *mineral oil* sebanyak 1-2 tetes. Setelah itu *Microbact* diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam. *Microbact* yang telah diinkubasi diambil kemudian diteteskan reagen pada sumur nomor 8 dengan *Indol Kovact* sebanyak 2 tetes, dan sumur 12 dengan TDA sebanyak 1 tetes. Evaluasi hasil dilihat melalui sumur-sumur *Microbact* apakah positif atau negatif dengan cara membandingkan dengan tabel warna dan hasil ditulis pada formulir *Patient Record*. Angka-angka *oktal* didapat dari pejumlahan reaksi positif saja, dari tiap-tiap kelompok (3 sumur didapatkan 1 angka *oktal*). Nama bakteri dapat dilihat dengan komputer berdasarkan angka *oktal* yang di dapat.

Keterangan perubahan warna hasil uji *Microbact 12B*

Nomor Sumur	Nama Uji	Hasil
1	Gelatin	Warna putih menunjukkan hasil uji (-) Warna hitam menunjukkan hasil uji (+)
2	Malonate	Warna kuning menunjukkan hasil uji (-) Warna biru menunjukkan hasil uji (-)
3	Inositol	Warna biru / hijau menunjukkan hasil uji (-) Warna kuning menunjukkan hasil uji (-)
4	Sorbitol	Warna biru / hijau menunjukkan hasil uji (-) Warna kuning menunjukkan hasil uji (-)
5	Rhamnose	Warna biru / hijau menunjukkan hasil uji (-) Warna kuning menunjukkan hasil uji (-)
6	Sucrose	Warna biru / hijau menunjukkan hasil uji (-) Warna kuning menunjukkan hasil uji (-)
7	Lactose	Warna biru / hijau menunjukkan hasil uji (-) Warna kuning menunjukkan hasil uji (-)
8	Arabinose	Warna biru / hijau menunjukkan hasil uji (-) Warna kuning menunjukkan hasil uji (-)
9	Adonitol	Warna biru / hijau menunjukkan hasil uji (-) Warna kuning menunjukkan hasil uji (-)
10	Raffinose	Warna biru / hijau menunjukkan hasil uji (-) Warna kuning menunjukkan hasil uji (-)
11	Salicin	Warna biru / hijau menunjukkan hasil uji (-) Warna kuning menunjukkan hasil uji (-)
12	Argine	Warna biru / hijau menunjukkan hasil uji (-) Warna biru menunjukkan hasil uji (-)

3.5 Analisis Data

Data yang diperoleh dari hasil isolasi dan karakterisasi disajikan secara deskriptif meliputi karakteristik mikroskopis dan makroskopis dari masing-masing jenis bakteri akar alfafa yang berhasil diisolasi dari akar tanaman alfafa.

3.6 Skema Penelitian

Skema penelitian dapat terangkum pada bagian dibawah ini:

