

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Rancangan Penelitian

Jenis penelitian ini adalah penelitian eksplorasi dan eksperimental dengan menguji isolat bakteri endofit dari akar tanaman kentang (*Solanum tuberosum* L) terhadap bakteri *Ralstonia (Pseudomonas) solanacearum*, jamur *Fusarium sp.*, dan jamur *Phytophthora infestans*.

3.2 Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Februari sampai April 2010, di Laboratorium Mikrobiologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.

3.3 Variabel Penelitian

3.3.1 Variabel Bebas

Variabel bebas yang digunakan dalam penelitian ini adalah spesies bakteri endofit dengan beberapa spesies bakteri endofit yang ditumbuhkan pada medium TSA (*Triptic Soy Agar*).

3.3.2 Variabel Terikat

Variabel terikat dalam penelitian ini merupakan variabel yang dapat diukur yaitu daya hambat bakteri endofit terhadap bakteri *Ralstonia solanacearum*, jamur *Fusarium sp.*, dan jamur *Phytophthora infestans* yang diletakkan pada cawan petri.

3.4 Alat dan Bahan

3.4.1 Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain: cawan petri, Autoklaf, *laminar flow cabinet*, jarum ose, kertas label, kertas saring, *beaker glass*, oven, bunsen, hot plate, pengaduk kaca, pinset, inkubator, benang woll,

kapas, plastik tahan panas, korek api, kain kasa, alumunium voil, gelas ukur, shaker, sentrifugasi, tabung reaksi, mikro pipet, erlenmeyer, jangka sorong, timbangan analitik dan plastik wrap.

3.4.2 Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah biakan bakteri *Ralstonia solanacearum*, jamur *Fusarium sp.*, dan jamur *Phytophthora infestans*, biakan bakteri endofit yang diisolasi dari akar tanaman kentang varietas *Granola Kembang* yang sehat, TSA (*Triptic Soy Agar*), TSB, PDA, NA, Aquades, apirtus dan alkohol 70%.

3.5 Prosedur Penelitian

3.5.1 Sterilisasi Alat dan Bahan

Sterilisasi alat dan bahan dengan cara membungkus alat-alat dengan alumunium foil dan plastik tahan panas, kemudian memasukkannya ke dalam autoklaf pada suhu 121° C dengan tekanan 15 psi (*per square inchi*) selama 15 menit.

3.5.2 Pembuatan Media

3.5.2.1 Pembuatan Media TSA

Pembuatan media TSA (*Triptic Soy Agar*) dilakukan sebagai berikut:

- 1) TSB (*Triptic Soy Broth*) ditimbang sebanyak 30 g.
- 2) Media agar ditambahkan 15 g.
- 3) Aquades diukur sebanyak 1000 ml.
- 4) TSB dan agar dicampur dengan 1000 ml aquades.
- 5) Campuran dipanaskan sampai mendidih selama \pm 40 menit. Kemudian media ditunggu sampai hangat-hangat kuku.
- 6) Dimasukkan ke dalam erlenmeyer masing-masing 250 ml.
- 7) Menutup erlenmeyer dengan kapas dan alumunium foil.

3.5.2.2 Pembuatan Media TSB

Pembuatan media TSB (*Triptic Soy broth*) dilakukan sebagai berikut:

- 1) TSB (*Triptic Soy Broth*) ditimbang sebanyak 30 g.
- 2) Aquades diukur sebanyak 500 ml.
- 3) TSB dicampur dengan 500 ml aquades.
- 4) Campuran dipanaskan sampai mendidih selama \pm 40 menit. Kemudian media ditunggu sampai hangat-hangat kuku.
- 5) Dimasukkan ke dalam tabung erlenmeyer 100 ml masing-masing 18 ml.
- 6) Menutup erlenmeyer dengan kapas dan alumunium foil.

3.5.2.3 Pembuatan Media PDA

Pembuatan media PDA (*Potato Destrosa Agar*) dilakukan sebagai berikut:

- 1) PDA (*Potato Destrosa Agar*) ditimbang sebanyak 19,5 g.
- 2) Aquades diukur sebanyak 500 ml.
- 3) PDA dicampur dengan 500 ml aquades.
- 4) Campuran dipanaskan sampai mendidih selama \pm 40 menit. Kemudian media ditunggu sampai hangat-hangat kuku.
- 5) Dimasukkan ke dalam tabung reaksi masing-masing 10 ml dan erlenmeyer.
- 6) Menutup erlenmeyer dengan kapas dan alumunium foil.

3.5.2.4 Pembuatan Media NA

Pembuatan media PDA (*Potato Destrosa Agar*) dilakukan sebagai berikut:

- 1) NA (*Nutrient Agar*) ditimbang sebanyak 19 g.
- 2) Aquades diukur sebanyak 500 ml.
- 3) NA dicampur dengan 500 ml aquades.
- 4) Campuran dipanaskan sampai mendidih selama \pm 40 menit. Kemudian media ditunggu sampai hangat-hangat kuku.
- 5) Dimasukkan ke dalam tabung reaksi masing-masing 10 ml dan erlenmeyer.
- 6) Menutup erlenmeyer dengan kapas dan alumunium foil.

3.5.3 Penyiapan dan Peremajaan Isolat Bakteri Endofit

Penyiapan dan peremajaan bakteri endofit dilakukan dengan cara sebagai berikut:

1. Bakteri endofit diremajakan pada media TSA masing-masing pada medium lempeng agar dan medium TSA miring.
2. Menginkubasi selama 24-48 jam pada suhu kamar.
3. Kemudian isolat murni bakteri endofit yang telah diperoleh diperbanyak.

3.5.4 Produktivitas Metabolit Anti Bakteri dan Anti Jamur

Produksi metabolit anti bakteri oleh bakteri endofit dilakukan dengan cara menumbuhkannya di dalam medium TSB. Koloni bakteri di ambil 1 μ L kemudian di encerkan dengan 18 ml medium TSB, kemudian diinkubasi dengan shaker selama 24 jm dengan kecepatan 130 rpm pada suhu 30°C. Kemudian disentrifugasi selama 20 menit dengan kecepatan 2000 rpm.

3.5.5 Uji Antibakteri

Medium yang digunakan untuk uji aktivitas anti bakteri yaitu medium NA. Uji aktifitas antibakteri metabolit bakteri endofit terhadap bakteri *Ralstonia solanacearum* dilakukan dengan metode difusi agar (Kirby – Bauer) menggunakan kertas cakram. Kertas cakram dibuat dari kertas saring Whatman dengan cara melubanginya dengan alat pembolong kertas sehingga didapatkan kertas cakram dengan diameter 6 mm.

Secara aseptik, kertas cakram yang sudah disterilkan direndam di dalam supernatan kultur bakteri endofit selama 30 menit. Kertas cakram diambil dengan menggunakan pinset steril dan diletakkan di atas medium uji aktifitas antibakteri (media plat NA) yaitu media yang telah terinokulasi bakteri patogen. Kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Setelah masa inkubasi selesai, dilakukan pengamatan terhadap zona jernih yang terbentuk dan diukur diameternya. Sampel yang mempunyai potensi menghasilkan zat antibakteri ditunjukkan dengan adanya zona jernih.

3.5.6 Uji Antijamur

Medium yang digunakan untuk uji aktivitas antifungi yaitu media PDA. Uji aktivitas antifungi metabolit bakteri endofit terhadap jamur *Fusarium* sp. dan *Phytophthora infestans* dilakukan dengan metode uji Kirby-bauer menggunakan kertas saring whatman dan membuat bulat dengan alat lubang kertas sehingga didapatkan kertas cakram dengan diameter 6 mm.

Secara aseptik kertas cakram yang sudah disterilkan direndam di dalam supernat kultur bakteri endofit selama 30 menit. Kertas cakram diambil dengan menggunakan pinset steril dan diletakkan diatas medium uji aktivitas antifungi (medium PDA), kemudian diinkubasi selama 3x24 jam pada suhu 37°C. Setelah masa inkubasi selesai, dilakukan pengukuran diameter zona jernih yang terbentuk. Sampel yang mempunyai potensi menghasilkan zat antifungi ditunjukkan dengan terbentuknya zona jernih atau zona hambat.

3.5.7 Pengukuran Zona Hambat

Data diperoleh dengan cara mengukur diameter zona hambat yang terbentuk, pengumpulan data dilaksanakan sebagai berikut, mengukur diameter zona hambat dengan menggunakan jangka sorong. Diameter zona hambat adalah diameter yang tidak ditumbuhi oleh jamur di sekitar kertas cakram dikurangi diameter kertas cakram.

3.5.8 Tabel Pengamatan

Bakteri Endofit	Mikroba Uji	Ulangan			Total	Rata-rata
		1	2	3		
<i>P. pseudomeallei</i>	<i>R. solanacearum</i>					
	<i>Fusarium</i> sp.					
	<i>P. infestans</i>					
<i>K. ozaenae</i>	<i>R. solanacearum</i>					
	<i>Fusarium</i> sp.					
	<i>P. infestans</i>					
<i>B. mycooides</i>	<i>R. solanacearum</i>					
	<i>Fusarium</i> sp.					
	<i>P. infestans</i>					
Total						