

## **BAB III**

### **METODOLOGI PENELITIAN**

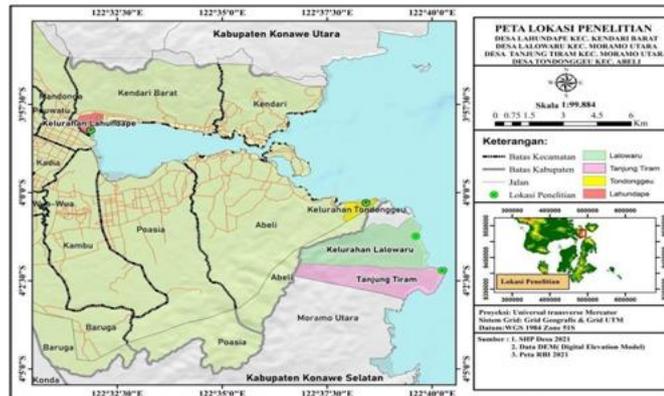
#### **3.1 Jenis Penelitian**

Jenis penelitian yang dilakukan peneliti yaitu penelitian kualitatif dengan pengambilan sampel dilapangan serta melakukan uji di Laboratorium. Penelitian ini dilakukan untuk mendapatkan fakta dan data terkait isolasi dan karakterisasi bakteri endofit toleran kekeringan dari tanaman mangrove.

#### **3.2 Tempat dan Waktu Penelitian**

##### **3.2.1 Tempat Penelitian**

Lokasi penelitian berada di Wilayah Kabupaten Konawe Selatan dan Kota Kendari Provinsi Sulawesi Tenggara. Lokasi pengambilan sampel tanaman mangrove di Wilayah Kabupaten Konawe Selatan meliputi dua kecamatan dan tiga desa. Kecamatan Moramo Utara terdiri atas dua desayakni Desa Lalowaru dan Desa Tanjung Tiram. Kecamatan Abeli terdiri atas satu desa yakni Desa Tondonggeu. Sedangkan Wilayah Kota Kendari meliputi satu kecamatan dan satu desa. Kecamatan Kendari Barat yakni Desa Lahundape. Isolasi bakteri endofit dilaksanakan di Laboratorium IPA Terpadu Fakultas Tarbiyah dan Ilmu Keguruan, Institut Agama Islam Negeri Kendari.



Gambar 3.1. Peta Lokasi Pengambilan Sampel Tanaman Mangrove

### 3.2.2 Waktu Penelitian

Penelitian berlangsung selama 5 bulan, yakni April 2022 sampai dengan Agustus 2022.

### 3.3 Prosedur Penelitian

#### 3.3.1 Pengambilan Sampel Tanaman Mangrove

Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah sampel yang berasal dari endovit mangrove berupa batang, dan daun tumbuhan yang sehat dengan kriteria pertumbuhan sehat, dan diameter batang besar yang berasal dari perairan Moramo Utara, Abeli, dan Kandai Barat. Diperoleh 16 sampel tanaman mangrove yang selanjutnya sampel dimasukkan dalam masing-masing plastik yang berbeda dan sudah diberi label yang berisi tentang data lokasi pengambilan sampel kemudian dimasukkan dalam wadah *sterofoam* dan ditutup rapat, sehingga selama perjalanan dari tempat pengambilan sampel hingga ke Laboratorium IPA Terpadu Fakultas Tarbiyah dan Ilmu Keguruan sampel masih dalam keadaan segar untuk

selanjutnya dilakukan tahap isolasi.

### **3.3.2 Isolasi Bakteri Endofit dari Tanaman Mangrove**

Isolasi bakteri endofit yang dipilih dari bagian tumbuhan yang sehat yaitu batang dan daun tidak terinfeksi dan tidak terdapat luka bekas gigitan serangga. Sampel dilakukan sterilisasi permukaan, pertama-tama sampel dicuci bersih dengan air mengalir selama 10 menit dan dipotong menjadi 5 bagian dengan ukuran setiap potongannya  $\pm 2$  cm kemudian ditimbang sebanyak 2 gram. Selanjutnya potongan sampel disterilisasi secara bertingkat dengan mencelupkannya ke dalam alkohol 70% selama 1 menit, memasukkannya ke dalam aquadest steril selama 1 menit, dan mencelupkannya lagi ke dalam aquades selama 1 menit. Potongan sampel yang telah disterilkan kemudian digerus menggunakan mortar sampai halus dan ditambah 18 ml aquades steril dan dilakukan pengenceran bertingkat  $10^{-7}$ . (Djaman. 2012: 57)

Seri pengenceran  $10^{-7}$  kemudian ditanam pada media TSA dalam cawan petri dengan cara mengambil 0,1 ml suspensi menggunakan pipet mikro kemudian diteteskan di atas permukaan media yang telah memadat. Suspensi kemudian disebar menggunakan batang L yang telah disteril. Media kemudian diinkubasi pada suhu ruang selama 24-48 jam (Firdausi, 2018). Media yang telah diinkubasi selama 2 hari selanjutnya dilakukan pengamatan terhadap koloni tumbuh. Koloni yang menunjukkan perbedaan morfologi selanjutnya diisolasi. Isolasi koloni bakteri dari media biakan dilakukan secara berulang-ulang (pemurnian isolat) sampai didapatkan koloni tunggal

atau biakan murni untuk pengujian selanjutnya dan disimpan dalam *tube* berisi 0,9 larutan gliserol 15% dan disimpan dalam *freezer*. (Abdul, 2015: 26).

### 3.3.3 Karakterisasi Potensi Bakteri Endofit sebagai Penginduksi Ketahanan Tanaman terhadap Kekeringan.

Media yang digunakan adalah media *Nutrient Broth* (NB). Media tersebut dihomogenkan dan disterilisasi selama 15 menit dengan suhu 121°C. Media NB yang sudah disterilkan, ketika masih panas ditambah dengan PEG 6000 (Karwati, 2012: 22) untuk menurunkan potensial osmotik mengikuti persamaan Michel dan Kaufmann (1973):

$$\psi_s : - (1,18 \times 10^{-2} C) - ((1,18 \times 10^{-4}) CT) + ((8,39 \times 10^{-7}) \times C^2T)$$

Keterangan:

$\psi_s$  : potensial osmotik solut (MPa);

C : konsentrasi PEG (g/L);

T : temperatur (°C)

Potensial osmotik yang ditentukan adalah -1,0 MPa; -1.25 MPa, - 1,5 MPa; -1,75 MPa dan -2,0 MPa. Berdasarkan persamaan di atas, banyaknya PEG 6000 yang ditambahkan ke dalam media untuk masing-masing potensial osmotik tertera pada Tabel 3.1.

**Tabel 3.1.** Jumlah PEG 6000 yang ditambahkan untuk mendapatkan tekanan osmotik tertentu pada media tumbuh

Tekanan Osmotik (MPa)	PEG 6000 yang ditambahkan (g/L)
-1,00	147,87
-1,25	165,85
-1,50	183,83
-1,75	199,14
-2,00	214,44

Isolat bakteri diambil sebanyak 3 loop ose kemudian dibuat suspense dengan mencampurkan 3 loop ose kedalam 20 ml media NB. Sebanyak 1 ml suspense kemudian ditumbuhkan pada media NB dan diinokulasikan ke dalam 20 ml media NB yang sudah ditambahkan dengan PEG 6000. Selanjutnya diinkubasi dan dishaker pada kecepatan 80 rpm pada suhu 38°C selama 24 jam untuk selanjutnya dilakukan pengukuran Optical Density dengan menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 570 nm. Berdasarkan nilai Optical Density yang termasuk toleransi kekeringan tertera pada Tabel 3.2 (Alikhani dan Mohamadi, 2010: 13-16).

**Tabel 3.2. Nilai Optical Density (OD) yang termasuk golongan toleran kekeringan**

Toleransi Terhadap Kekeringan	Optical Density (OD)
Sangat Sensitif	OD<0,3
Sensitif	OD=0,3-0,4
Toleran	OD=0,4-0,5
Sangat Toleran	OD>0,5

Bakteri dengan nilai OD 0,5 pada tekanan -1 MPa termasuk bakteri toleran. Pengujian toleran kekeringan menggunakan lima tekanan osmotik yang akan menentukan golongan bakteri. Bakteri yang memiliki nilai OD 0,4-

>0,5 dinyatakan sebagai golongan toleran kekeringan (Hasanah, 2013: 56).

### 3.3.4. Uji Kemampuan Menghasilkan IAA

Pengujian bakteri rhizosfer yang mampu menghasilkan IAA (*Indole Acetid Acid*) dilakukan dengan membuat media NB cair dengan menggunakan Nutrient Broth sebanyak 8 gram dan sukrosa 20 gram kedalam Erlenmeyer yang berisi aquadest sebanyak 1 liter. Larutan dihomogenkan dan dipanaskan menggunakan hot plate stirrer kemudian ditambahkan L-Triptofan 0,1 gram. Kemudian menuangkan media NB cair yang telah jadi kedalam botol scot dan dimasukkan kedalam autoclave selama 15 menit pada suhu 121 °C untuk disterilisasi. Memasukkan 1 lop ose dari isolat bakteri kedalam botol erlenmeyer yang berisikan 20 ml media NB cair kemudian dishaker pada kecepatan 100 rpm selama 6 hari dengan suhu ruang hingga isolat bakteri tumbuh. Setelah 6 hari kemudian diambil masing-masing 2 ml media NB cair yang telah ditumbuhi isolat bakteri menggunakan mikropipet dan memasukkan kedalam tabung eppendorf. Isolat kemudian disentrifugasi selama 30 menit dengan kecepatan 7000 rpm.

Supernatant yang terbentuk dari hasil sentrifugasi kemudian diambil 1 ml dan ditambahkan dengan 4 ml reagen salkowski. (150 ml H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 250 ml aquades steril, 7,5 ml FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O 0,5 M) lalu diinkubasi pada ruangan gelap selama 1 hari kemudian diamati perubahan yang terjadi. Perubahan warna menjadi merah muda setelah inkubasi mengindikasikan isolat menghasilkan IAA. Selajutnya mengukur konsentrasi IAA menggunakan spektrofotometer

pada panjang gelombang 520 nm. Konsentrasi IAA dihitung setelah dibandingkan dengan kurva larutan standar.

### 3.3.5 Kemampuan Memfiksasi Nitrogen

Kemampuan sebagai pemfiksasi nitrogen secara bebas dari udara dianalisis secara kualitatif dengan menggunakan media Burk sebagai berikut :

(1) 2 gr  $MgSO_4$ , 8 gr  $K_2HPO_4$ , 2 gr  $KH_2PO_4$ , dan 1,3 gr  $CaSO_4$  dicampur menjadi satu dan digunakan sebagai stok media Burk Salt; (2) 0,145 gr  $FeCl_3$  dan 0,0235 gr  $Na_2MnO_4$  dilarutkan dalam 100 ml aquadest dan dijadikan sebagai stok larutan Fe-Mo. Sebanyak 1,3 gram media Burk Salt dicampur dengan 1 ml stok larutan Fe-Mo lalu ditambahkan 10 gram sukrosa, semua bahan tersebut dilarutkan dalam 1000 ml aquades steril dan selanjutnya disterilisasi dengan autoclave pada suhu  $121^\circ C$  tekanan 1 atm selama 15 menit. Sebanyak 20  $\mu l$  media Burk salt dimasukkan dengan tahap reaksi steril. Sebanyak 1 ose isolat bakteri endofit yang diuji dimasukkan ke dalam larutan tersebut lalu diinkubasi pada shaker inkubator selama 48 jam menggunakan 150 rpm. Isolat positif sebagai pemfiksasi nitrogen jika bakteri tersebut mampu tumbuh dalam larutan Burk Salt yang ditandai dengan kekeruhan media dalam tabung reaksi. Isolat yang tumbuh diberi tanda + (positif), sedangkan yang tidak tumbuh diberi kode - (negatif).

### 3.3.6 Kemampuan Melarutkan Fosfat

Pengujian bakteri pelarut fosfat dilakukan dengan menggunakan media Pikovskaya dengan komposisi (perliter): 10 gr glukosa, 2,5 gr  $Ca_3(PO_4)_2$ , 5 gr  $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ , 0,25 gr  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 0,2 gr KCl, 0,1 gr  $(NH_4)_2SO_4$ ,

0.025 gr *Bromophenol blue*. Setelah dilakukan inkubasi selama 24 jam pada suhu ruang dilakukan pengamatan aktivitas fosfat yang ditandai dengan terbentuknya zona bening pada media pikovskaya (Ghevariya & Desai, 2014: 52-58). Lalu dilakukan penghitungan indeks zona bening yakni dengan rumus total diameter (zona bening) / diameter koloni (Israwan *et al.*, 2015: 28). Setelah inkubasi, zona bening yang terbentuk di sekitar koloni diukur dan dihitung indeks kelarutan fosfat (IKF) pada masing-masing koloni untuk mengetahui daya degradasi bakteri terhadap P dengan persamaan berikut (Karpagam, and Nagalakshmi 2014).

$$\text{IKF} = \frac{\text{Diameter koloni (mm)} + \text{Diameter zona bening (mm)}}{\text{Diameter koloni (mm)}}$$

Rumus Perhitungan Diameter Zona Bening Koloni yang tumbuh dan mampu membentuk zona bening diindikasikan sebagai isolat yang mampu melarutkan fosfat. Adapun katagori pengukuran indeks 24 kelarutan fosfat (IKF) dengan mengukur zona bening yang terbentuk berdasarkan Ruwandani(2016) adalah sebagai berikut:

**Tabel 3.3** Kriteria Nilai Indeks Kelarutan Fosfat

Nilai IKF	Kriteria
≤ 1,59	Rendah
1,6 – 2,12	Sedang
2,15 – 2,59	Tinggi
2,6 – 3	Sangat tinggi

### 3.3. Uji gram KOH 3%

Uji gram KOH 3% dilakukan untuk mengetahui bakteri yang diperoleh apakah termasuk ke dalam bakteri gram negatif dan gram positif. Pengujian gram pada bakteri yang diperoleh dilakukan dengan uji KOH 3% (3g KOH + 100 ml aquades). Bakteri yang akan diuji dimurnikan di dalam media TSA kemudian diteteskan 1 tetes larutan KOH 3% pada kaca preparat dengan menggunakan pipet, kemudian bakteri pada media Tryptone Soya Agar (NA) diambil dengan menggunakan jarum ose dan dicampur dengan larutan KOH 3% kemudian dihomogenkan menggunakan jarum ose. Bakteri gram negatif akan berbentuk seperti lendir atau mengental (karena terjadi lisis sel), sedangkan gram positif tidak membentuk lendir karena dinding sel bakteri gram positif lebih tebal sehingga tidak dapat dilisis oleh KOH 3% (Endrawati, 2017: 25- 26).

#### 3.3.8 Uji Coba Kelayakan Bahan Ajar

Uji coba produk bahan ajar dimaksudkan untuk mengumpulkan data yang dapat digunakan sebagai dasar untuk menetapkan tingkat keefektifan, efisiensi dan daya tarik dari produk yang dihasilkan. Secara lengkap uji coba produk pengembangan dilakukan melalui tiga tahapan, yaitu uji ahli (*expert judgment*), uji kelompok kecil (*small group*) dan uji lapangan (*field evaluation*) dalam tatap muka pembelajaran. Produk pengembangan ini mungkin hanya melewati dan berhenti pada tahap uji ahli (*expert judgment*),

untuk uji kelompok kecil (*small group*) dan uji lapangan (*field evaluation*) dapat dilakukan oleh peneliti selanjutnya yang relevan dengan penelitian ini.

#### 1. Tahap uji Ahli (*expert judgement*)

Uji coba produk sangat penting dilakukan untuk mengetahui kualitas sumber belajar yang dikembangkan. Uji coba ini untuk mengetahui produk yang dikembangkan mempunyai kualitas layak untuk digunakan dalam proses pembelajaran. Sebelum diuji cobakan, produk sumber belajar berupa modul divalidasi oleh ahli materi dan ahli media kemudian dilakukan revisi tahap pertama. Setelah itu dilakukan validasi oleh guru untuk selanjutnya di revisi kedua sampe uji coba. Metode yang dilakukan menggunakan untuk mengumpulkan data yaitu metode angket (Andi Kurniawan, 2014: 12).

### 3.4 Instrumen Penelitian

#### 3.4.1 Instrumen Penelitian Isolasi dan Karakterisasi Bakteri Endofit

Alat dan bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah sebagaiberikut:

**Tabel 3.4** Alat dan Kegunaan

NO	Alat	Kegunaannya
1.	Alat Tulis	Digunakan untuk menulis
2.	Kantong (ziploc bag)	Digunakan sebagai tempat sampel
3.	Kacang Preparat	Digunakan sebagai tempat objek yang akan diamati
4.	Cawan Petri	Digunakan sebagai wadah perbanyakan bakteri
5.	<i>Laminer Air Flow</i>	Digunakan untuk perbanyakan dan pembuatan suspensi bakteri

6. Bunsen	Digunakan untuk sterilisasi ketika beradadi dalam laminar
7. <i>Autoclave</i>	Digunakan untuk sterilisasi alat pembuatan suspense bakteri
8. Oven	Digunakan untuk menyimpan dan mengeringkan alat yang telah disterilisasi
9. Timbangan Analitik	Untuk mengukur berat bahan yang akan digunakan
10. <i>Rotary Shaker</i>	Digunakan untuk mengocok suspensi agen hayati dengan kecepatan dan suhuputaran konstan agar homogeny
11. Kaca Penutup	Digunakan untuk menutup objek atau preparat yang diamati
12. <i>Hot Plate</i>	Digunakan saat pembuatan media agar
13. Erlenmeyer	Digunakan dalam pembatan suspensi Bakteri
14. Pinset	Digunakan untuk mengambil benih saat Sterilisasi
15. Gelas Ukur	Digunakan saat membuat larutan Sterilisasi
16. Botol <i>Schott Duran</i> 250 ml	Digunakan saat pembuatan media agar
17. Corong	Digunakan saat memasukkan larutan ke Erlenmeyer
18. Kamera	Digunakan untuk mendokumentasikan kegiatan berupa gambar
19. Gelas Kimia	Digunakan dalam pembuatan suspense
20. Jarum Ose bulat	Digunakan dalam perbanyakan bakteri
21. Batang Pengaduk	Digunakan dalam pembuatan suspense
22. Mikroskop	Digunakan untuk mengamati objek

**Tabel 3.5** Bahan dan Kegunaan

No.	Bahan	Kegunaan
1.	Alkohol (70%)	Digunakan sebagai cairan untuk mensterilkan alat
2.	Tanaman Mangrove	Digunakan sebagai bahan yang akan diuji
3.	TSA	Digunakan sebagai tempat perbanyakan bakteri

4.	Aquades	Digunakan sebagai bahan dari setiappembuatan larutan
5.	KOH 3 %	Digunakan untuk uji bakteri
6.	PEG 3000	Digunakan untuk uji bakteri
7.	MgSO <sub>4</sub>	Digunakan untuk uji bakteri
8.	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Digunakan untuk uji bakteri
9.	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Digunakan untuk uji bakteri
10.	CASO <sub>4</sub>	Digunakan untuk uji bakteri
11.	FeCl <sub>3</sub>	Digunakan untuk uji bakteri
12.	NaMOO <sub>4</sub>	Digunakan untuk uji bakteri
13.	Spritus	Digunakan sebagai bahan bakar bunsen
14.	<i>Nutrient</i> agar (NA)	Media untuk pengamatan bakteri
15.	<i>Nutrient</i> Broth (NB)	Media untuk pengamatan bakteri
16.	<i>Tryptic Soy Broth</i> (TSB)	Media untuk pengamatan bakteri
17.	Pikovskaya	Media untuk pengamatan bakteri
18.	Plastik Wrap	Digunakan sebagai mempererat penutupErlenmeyer
19.	<i>Tissue</i>	Digunakan untuk membersihkan alat
20.	Alumunium Foil	Digunakan untuk menutup Erlenmeyer
21.	Korek Api	Untuk membakar Bunsen

### 3.5 Kelayakan Leaflet

#### 1. Lembar validasi

Data yang berupa skor tanggapan para ahli yang diperoleh melalui lembar validasi diubah menjadi data interval. Pada lembar validasi disediakan lima pilihan untuk memberikan tanggapan tentang kualitas *leaflet* yang dikembangkan yaitu: sangat baik (5), baik (4), cukup (3), kurang (2), sangat kurang (1), jika validator memberikan kategori “sangat baik” pada butir pertanyaan/pernyataan, maka skor butir pertanyaan sebesar “5” dan seterusnya (Zohrani, 2017: 73). Skor yang diperoleh kemudian dikonversikan menjadi

data kualitatif skala lima, dengan rumus yang dikutip dari Widoyoko (2011: 238) dapat dilihat pada Tabel berikut:

**Tabel 3. 1** Konversi Data Kuantitatif ke Data Kualitataif dengan Skala Likert (Adaptasi Widoyoko, 2011: 238).

Data Kuantitatif	Interval Skor	Data Kualitaitif
5	$X > + 1,80 S_{bi}$	Sangat Baik
4	$X_i + 0,60 S_{bi} < X \leq X_i +$	Baik
3	$X_i - 0,60 S_{bi} < X \leq X_i +$	Cukup
2	$X_i - 1,80 S_{bi} < X \leq X_i - 0,60$	Kurang
1	$X \leq X_i - 1,80 S_{bi}$	Sangat Kurang

Rumus menghitung kelayakan bahan ajar berbasis *Leaflet*.

$$X = \frac{\sum X}{n}$$

Keterangan :

X : Skor rata-rata  
 $\sum X$  : Jumlah skor  
n : Jumlah

### 3.6 Teknik Analisis Data

Teknik analisis data yang digunakan dalam penelitian isolasi dan karakterisasi bakteri endofit toleran kekeringan adalah menggunakan indikator- indikator kualitatif. Sedangkan kelayakan bahan ajar *leaflet* menggunakan analisis data kualitatif, dimana data yang berupa skor tanggapan para ahli yang diperoleh melalui lembar validasi diubah menjadi data interval. Dalam validasi lefleaf digunakan skala likert. untuk mengukur sikap, pendapat, dan persepsi seseorang atau sekelompok orang tentang fenomena sosial dengan nilai 5 Sangat Baik (SB), nilai 4 Baik (B), nilai 3

Cukup (C), nilai 2 Kurang (K) dan nilai 1 Sangat Kurang (SK)

