

III. METODE PENELITIAN

A. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lampung dari bulan Mei sampai dengan Oktober 2009.

B. Bahan dan Alat

Bahan-bahan yang digunakan adalah saluran pencernaan ayam kampung sebagai sample yang meliputi bolus-bolus tembolok, bubur (chime) pada ampela, cairan pada proventrikulus, serta kotoran pada usus halus dan usus besar, media *Nutrien Agar* (NA), media *Nutrien Broth* (NB), media standar produksi enzim, pati, pereaksi *Dinitro Salisilic Acid*, larutan lugols iodine, aseton alkohol, *crystal violet*, safranin, mordan, Ziehl Neelsen A, Ziehl Neelsen B, Ziehl Neelsen C, larutan Bradford, *malchit green* serta akuades.

Alat-alat yang digunakan adalah cawan petri, otoklaf, inkubator, oven, neraca Ohaus, tabung reaksi, mikroskop, erlenmeyer, *vortex mixer*, *bunsen burner* serta peralatan yang umum dipakai di laboratorium.

C. Rancangan Penelitian

Populasi dalam penelitian ini adalah seluruh mikroorganisme dalam saluran pencernaan ayam kampung. Sampel yang digunakan yaitu flora normal dari saluran pencernaan yang meliputi flora normal tembolok, ampela, proventrikulus, usus halus dan usus besar.

Penelitian ini menggunakan metode survei. Parameter dalam penelitian ini adalah adanya aktivitas enzim amilolitik yang ditunjukkan dengan terbentuknya zona jernih. Perbandingan luas zona jernih dengan luas koloni digunakan untuk menentukan indeks amilolitiknya. Setelah diisolasi dan dihitung indeks amilolitiknya, selanjutnya isolat yang menunjukkan kemampuan amilolitik diidentifikasi yang meliputi warna, bentuk, elevasi dan tepian koloni

Prosedur Kerja

1. Isolasi Bakteri

Masing-masing kotoran sebagai sampel diambil dari saluran pencernaan ayam kampung sebanyak satu gram lalu dipanaskan di dalam oven selama 15 sampai 30 menit pada suhu 80°C dengan maksud agar mendapatkan spora bakteri. Kemudian masing-masing sampel diinokulasikan pada media cair diperkaya yang mengandung nutrient broth + amilum dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 48 jam. Setelah diinkubasi, masing-masing sampel dibuat pengenceran 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} dan 10^{-4} . 1 ml sampel dalam media diperkaya dimasukkan ke dalam 9 ml akuades kemudian

dihomogenkan dengan *vortex mixer*. Pengenceran ini merupakan pengenceran 10^{-1} , kemudian suspensi dari pengenceran 10^{-1} diambil sebanyak 1 ml dimasukkan ke dalam tabung reaksi lainnya yang juga berisi 9 ml akuades lalu dihomogenkan. Pengenceran ini merupakan pengenceran 10^{-2} begitu seterusnya, hingga pengenceran 10^{-4} . Dari pengenceran 10^{-2} , 10^{-3} dan 10^{-4} masing-masing diambil 1 ml kemudian diinokulasikan pada media agar dengan metode pour plate kemudian diinkubasi selama 24 jam. Setelah diinkubasi, masing-masing kultur ditetesi dengan larutan lugols iodine, dan koloni yang membentuk zona jernih menunjukkan amilolitik positif. Selanjutnya semua sampel diukur indeks amilolitiknya.

2. Penentuan Indeks Amilolitik

Menghitung indeks amilolitik yaitu menghitung luas koloni total dan luas zona jernih total terlebih dahulu. Untuk menghitung luas koloni total yaitu dengan menghitung diameter koloni rata-rata. Begitu pula untuk menghitung luas zona jernih total yaitu dengan menghitung diameter zona jernih. Selanjutnya, diameter koloni digunakan untuk mencari luas koloni total, dan diameter zona jernih digunakan untuk mencari luas zona jernih total. Kemudian masing-masing luas yang didapat digunakan untuk menghitung indeks amilolitik yaitu luas zona jernih total dibagi dengan luas koloni total.

Rumus Indeks Amilolitik:

- Luas koloni total (A): $f \cdot r^2$
 $f \cdot \left(\frac{1}{2} \cdot d_{\text{koloni}}\right)^2$

- Luas zona jernih total (B): $f \cdot R^2$
 $f \cdot \left(\frac{1}{2} \cdot D_{\text{zona jernih}}\right)^2$

Sehingga Indeks amilolitik: $\frac{B}{A}$ (Rosenawati, 1996)

Keterangan: $f = 3,14$

r = jari-jari koloni

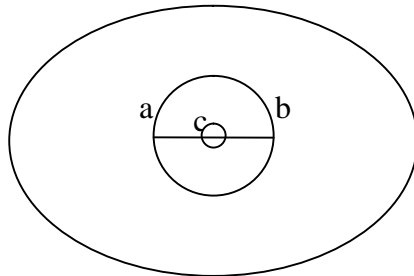
R = jari-jari zona jernih

d = diameter koloni

D = diameter zona jernih

A = Luas koloni total

B = Luas zona jernih total



Gambar 1. Penentuan indeks amilolitik

Ket: $a - b$ = diameter zona jernih

c = diameter koloni

$a-c, c-b$ = jari-jari zona jernih