

III. METODE PENELITIAN

A. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lampung. Penelitian ini dilakukan pada bulan Januari hingga Maret 2015.

B. Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain rak tabung reaksi, mikroskop, tabung reaksi, gelas objek, tabung *anaerobic jar*, cawan petri, erlenmeyer 500 ml, 250 ml, 100 ml, dan 50 ml, gelas ukur, ose, spatula, bunsen, vortex mixer, neraca analitik, lemari es, autoklaf, *laminar air flow*, inkubator dengan suhu 37°C, mikrotube, pH meter, pipet tetes, tisu, kapas, pinset, kertas kopi, aluminium foil, dan peralatan lainnya.

Bahan-bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah Nutrient Agar (NA), MRS Broth, Bacterial Agar, akuades, 3 isolat bakteri dari usus itik yaitu B2, B7, dan B8 (koleksi Sutrisna, 2010), isolat bakteri uji *Salmonella* sp. umur 24 jam, lilin, alkohol 70 %, spiritus, larutan buffer fosfat dan sitrat.

C. Metode Penelitian

Besarnya produksi antibakteri ditentukan berdasarkan besarnya diameter zona hambat terhadap *Salmonella* sp. Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap pola faktorial 3X 5 (3 isolat bakteri X 5 perlakuan pH) dengan tiga kali ulangan. Faktor pertama terdiri dari pH (4, 5, 6, 7, 8), dan faktor kedua terdiri dari isolat bakteri B2, B7, B8, sedangkan parameter yang dilihat yaitu zona bening. Perbedaan produksi antibakteri ditentukan berdasarkan hasil analisis ragam. Untuk perlakuan yang berpengaruh nyata dilakukan uji lanjut BNT pada taraf 5%.

D. Prosedur Kerja

1. Peremajaan

Setiap isolat bakteri usus itik koleksi Sutrisna (2010) pada media cair MRS Broth diambil 1 ml dan dibiakkan pada tabung reaksi yang berisi 9 ml media MRS Broth steril, kemudian diinkubasi dalam anaerobic jar selama 48 jam.

2. Pembuatan starter

Bakteri yang telah diremajakan diambil sebanyak 1 ml dan dimasukkan ke dalam 9 ml MRS Broth steril, lalu diinkubasi selama 48 jam dalam anaerobic jar.

3. Penyiapan zat antibakteri

3.1 MRS Broth diukur pHnya untuk dijadikan media kontrol.

3.2 20 ml MRS Broth Steril dengan ditambahkan larutan penyangga sitrat untuk dibuat pH 4, pH 5, dan pH 6. lalu diukur dengan pH meter.

3.3 20 ml MRS Broth Steril dengan ditambahkan larutan penyangga fosfat untuk dibuat pH 7, dan pH 8 lalu diukur dengan pH meter

4. Produksi Antibakteri

Sebanyak 4 ml starter dimasukkan ke dalam 20 ml MRS Broth Steril pH 4, pH 5, pH 6, pH 7, dan pH 8 kemudian diinkubasi selama 48 jam.

4.1 Preparasi antibakteri

1. Antibakteri

5 ml kultur diambil sesudah inkubasi 48 jam. Kemudian masing – masing diambil 1 ml untuk dimasukkan ke dalam microtube dan di sentrifuge dengan kecepatan 11.000 rpm selama 10 menit. Supernatan yang diperoleh adalah ekstrak antibakteri yang diuji dengan isolat bakteri uji *Salmonella* sp.

2 Antibakteri non asam

5 ml kultur diambil untuk diukur pHnya sesudah inkubasi 48 jam. Sebagian diambil 5 ml kultur lalu ditambahkan NaOH 1M dengan menggunakan pipet tetes hingga menjadi pH 7 dan sebagian diambil 5 ml kultur lagi tetapi tidak ditambahkan NaOH . Kemudian masing – masing diambil 1 ml untuk dimasukkan ke dalam microtube dan di

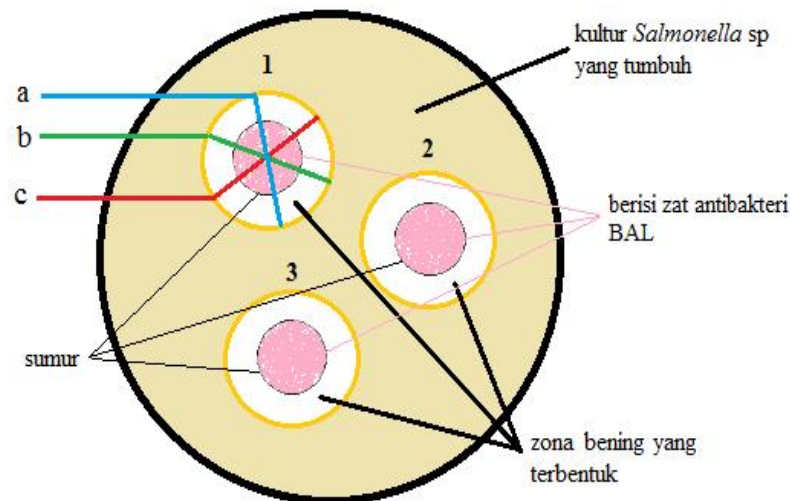
sentrifuge dengan kecepatan 11.000 rpm selama 10 menit. Supernatan yang diperoleh adalah ekstrak antibakteri yang diuji dengan isolat bakteri uji *Salmonella* sp.

3. Uji antibakteri dengan *Salmonella* sp.

Sebanyak 0,1 ml suspensi *Salmonella* sp. diinokulasi secara pour plate ke dalam cawan petri steril dan ditambahkan 20 ml media NA. Setelah media padat dibuat sumuran dengan diameter lubang 0,7 cm. Setiap cawan petri berisi tiga sumuran. Pada masing-masing sumuran, dimasukkan zat antibakteri sebanyak 0,1 ml, kemudian diinkubasi dalam inkubator suhu 40°C selama 24 jam. Kemampuan pengaruh pH terhadap antibakteri dengan *Salmonella* sp. ditunjukkan dengan adanya zona bening di sekitar sumur. Semakin besar diameter zona bening yang terbentuk, maka semakin tinggi hambatan Bakteri Asam Laktat terhadap *Salmonella* sp.

4. Penentuan diameter zona hambat antibakteri (Handayani, 2014)

Diameter zona bening yang terbentuk pada setiap sumuran diukur dari tiga sisi yang berbeda, kemudian di rata-rata (Gambar 1)



Gambar 1. cara mengukur diameter zona bening antibakteri

Keterangan:

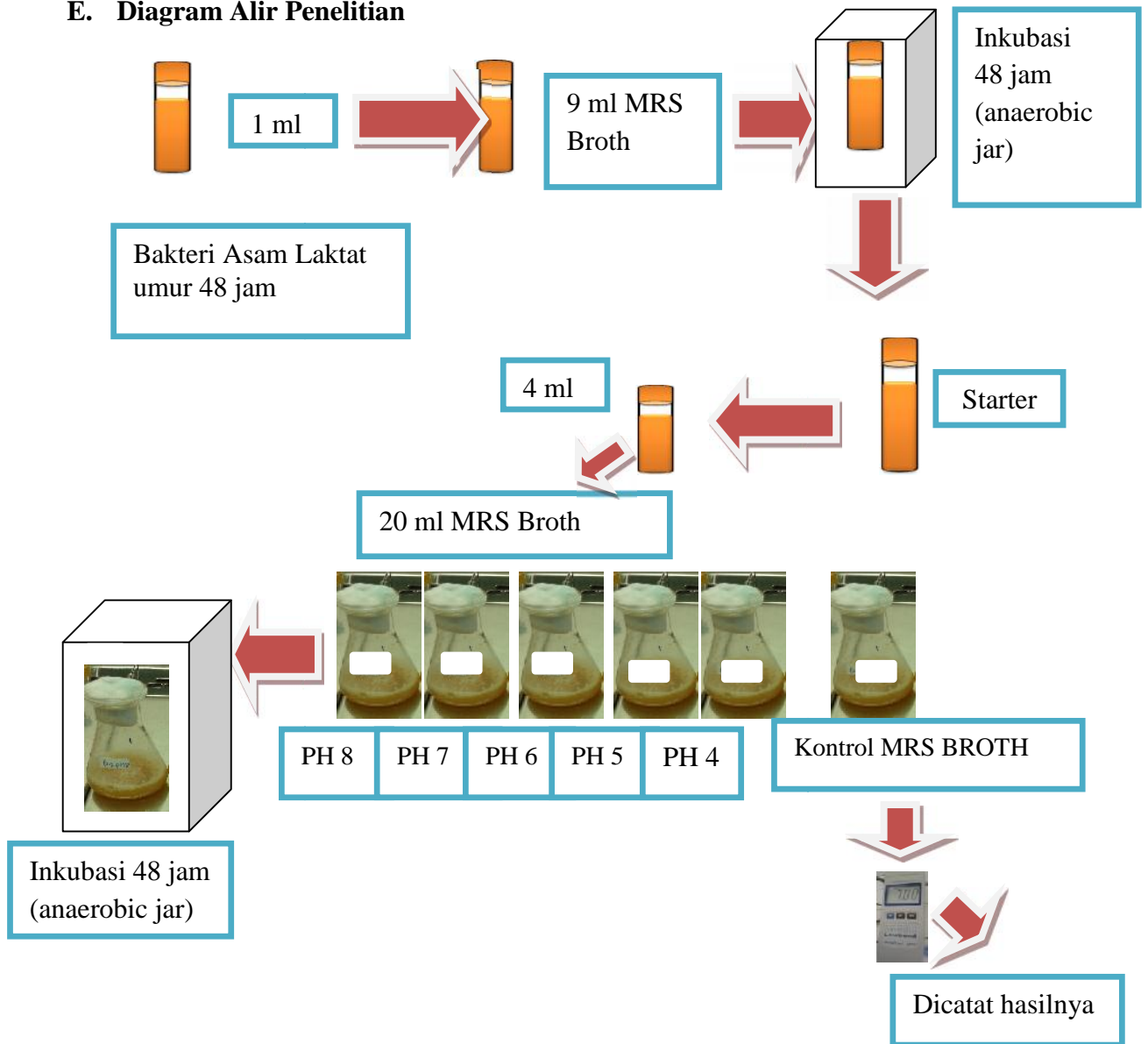
a = diameter zona bening ulangan 1

b = diameter zona bening ulangan 2

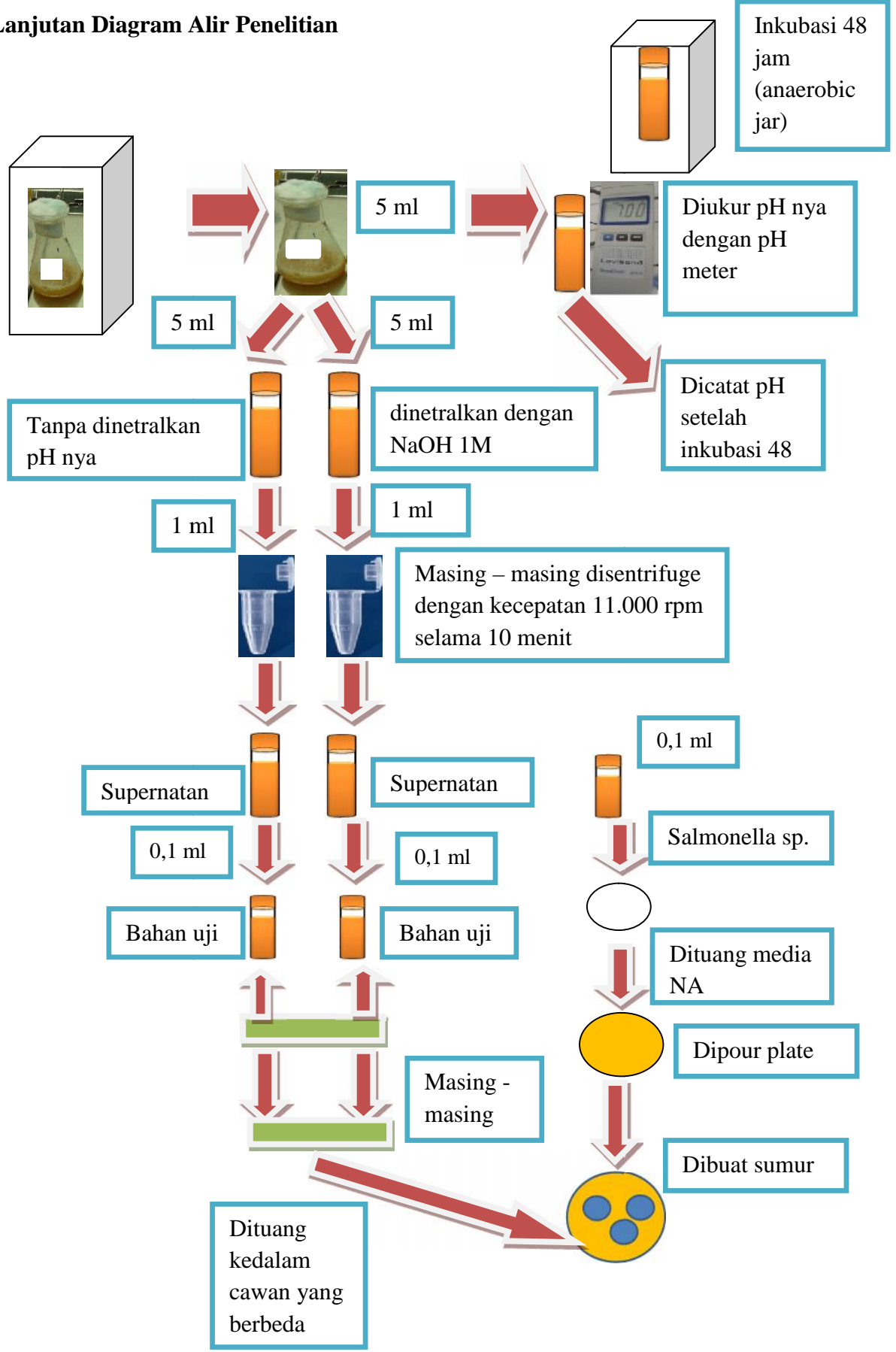
c = diameter zona bening ulangan 3

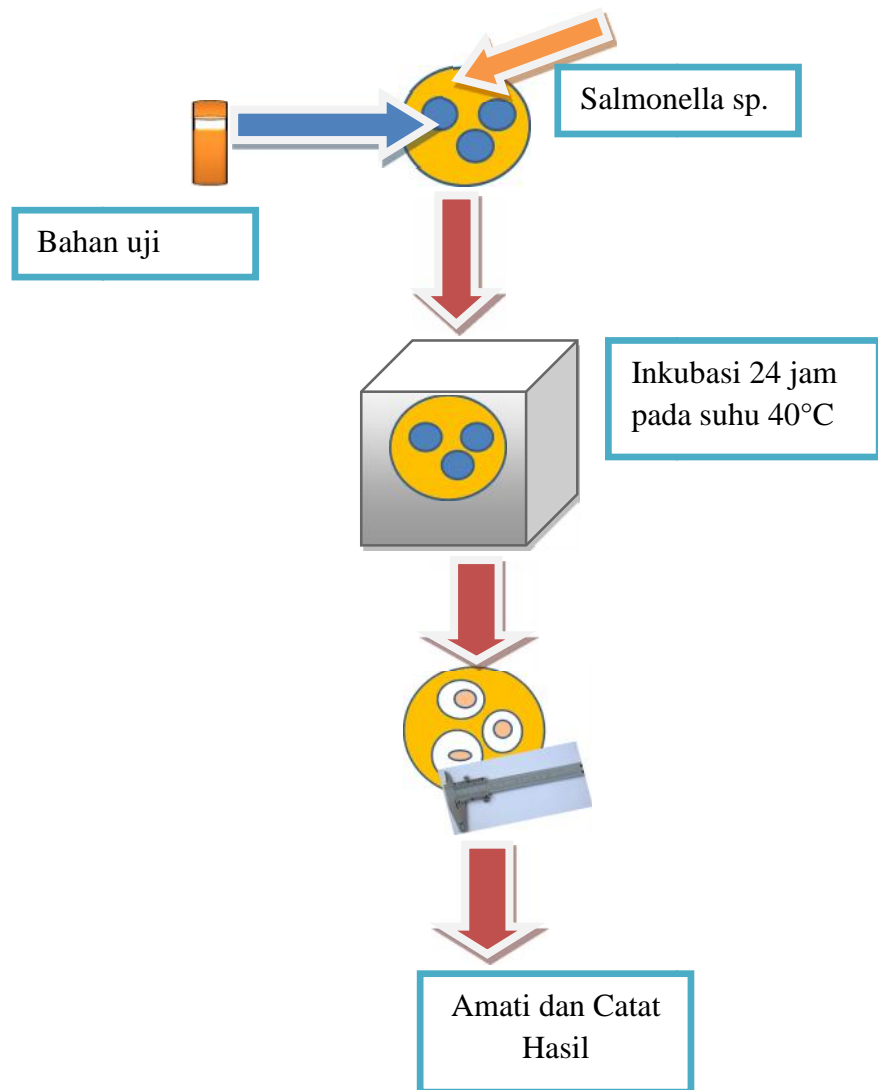
1, 2 dan 3 = sumur dengan 3 kali ulangan

E. Diagram Alir Penelitian



Lanjutan Diagram Alir Penelitian





Gambar 2. Diagram alir penelitian