

### **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 April 2011 hingga Agustus 2011.

#### **B. Alat dan Bahan**

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain mikroskop, tabung reaksi, gelas objek, tabung anaerobic jar, cawan petri dengan diameter 15 dan 30 cm, erlenmeyer ukuran 500 ml, 250 ml, 100ml dan 50 ml, gelas ukur, ose, spatula, bunsen, voertex mixer, neraca analitik, kompor listrik, autoklaf, *laminar air flow*, inkubator dengan suhu 37<sup>0</sup>C, mikrotube, tip, mikropipet, pH meter, pipet tetes, dan peralatan lainnya.

Bahan-bahan yang digunakan adalah isolat bakteri usus itik (B1, B2, B3, B4, B5, B6, B7, B8, B9, B10, B11, B12 dan B13), biakan *Staphylococcus aureus* dan *Bacillus subtilis* yang diperoleh dari koleksi biakan Laboratorium Mikrobiologi FMIPA Unila, media *deMan Rogosa and Sharpe (MRS) Broth*,

media *Nutrient Broth* (NB), *bacteriological agar*, aquades, aluminium foil, kasa, kapas, minyak imersi.

### **C. Metode Penelitian**

Penelitian ini dilakukan 2 tahapan. Pertama, penentuan uji daya hambat dengan menggunakan metode difusi antibiotik sumuran. Kemampuan zat antibakteri ditentukan berdasar diameter daya hambat yang dihasilkan. Kedua, yaitu penentuan pola pertumbuhan isolat bakteri usus itik dengan menghitung langsung jumlah sel bakteri selama 24 jam dengan interval waktu 1 jam.

### **D. Prosedur Kerja**

#### **1. Peremajaan Bakteri**

Isolat bakteri usus itik dibiakkan dengan cara digores pada media MRS agar miring diinkubasi pada anaerobic jar selama 48 jam, sedangkan untuk bakteri uji dibiakkan dengan cara digores pada NA miring.

#### **2. Pembuatan Starter**

Isolat yang telah diinkubasi dari peremajaan, diambil masing-masing 1 ose dimasukkan ke dalam 12 ml MRS *Broth* steril kemudian diinkubasi lagi selama 48 jam. Hasil inkubasi ini digunakan sebagai starter.

### 3. Produksi Senyawa Antibakteri

Sebanyak 10% dari starter diambil dan dimasukkan kedalam 10,8 ml MRS *Broth* steril, kemudian diinkubasi selama 2 hari. Setelah 2 hari masa inkubasi, setiap harinya diambil kultur sebanyak 1 ml dimasukkan kedalam microtube lalu sentrifuge. Kultur disentrifuge dengan kecepatan 11.000 rpm selama 10 menit. Supernatan yang diperoleh dari sentrifuge merupakan ekstrak antibakteri yang diduga mengandung senyawa antibakteri yang dapat menghambat bakteri Gram positif.

### 4. Uji Daya Hambat Antibakteri

Bakteri uji diinokulasi sebanyak 1 ose ke dalam tabung reaksi yang berisi 9 ml aquades steril sampai diperoleh kekeruhan yang sama dengan StandarMac Farlan ( $3 \times 10^8$  CFU/ml). Kemudian sebanyak 1 ml bakteri uji dimasukkan ke dalam cawan petri steril dan ditambahkan 25 ml media NA steril. Cawan petri diputar sesuai angka delapan sebelum media NA memadat agar bakteri menyebar rata pada media. Setelah media memadat, di dalam media dibuat lubang membentuk sumur dengan diameter 1 cm. Larutan antibakteri dimasukkan ke dalam sumur sebanyak 100  $\mu$ l. Kultur diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Kemudian diameter daya hambat diukur sesuai dengan garis yang telah dibuat.

### 5. Perhitungan Sel Bakteri Secara Langsung (Mikroskopis)

Perhitungan bakteri dilakukan secara langsung di bawah mikroskop dengan cara mengambil 1 ose isolat bakteri usus itik yang telah dihomogenkan kemudian diletakkan di atas gelas objek yang berukuran 1

cm x 1 cm dan dilakukan pengecatan gram. Perhitungan kepadatan sel bakteri secara langsung dilakukan dengan melihat jumlah sel pada luas lapang pandang mikroskop. Penentuan luas lapang pandang mikroskop dilakukan dengan mengukur diameter areal pandang mikroskop menggunakan mikrometer objektif yang mempunyai skala terkecil 0,01 mm. Setelah nilai diameter areal pandang mikroskop diketahui kemudian dibagi 2 untuk mencari jari-jari dan dimasukkan ke dalam rumus berikut :

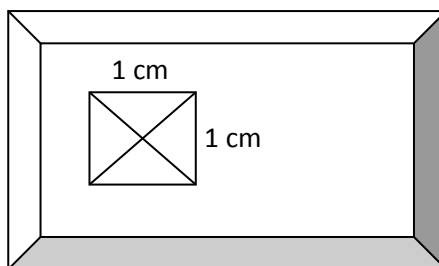
$$\text{Luas areal pandang mikroskop} = \pi r^2 \text{ mm}^2$$

$$\pi r^2 \times 10^{-2} \text{ cm}^2$$

Dimana r = jari-jari areal pandang mikroskop dalam cm, sedangkan rumus penentuan perhitungan kepadatan sel bakteri secara langsung yaitu sebagai berikut :

$$\text{Konsentrasi sel} = \frac{\bar{x}}{\text{Luas lapang pandang mikroskop (cm}^2\text{) x t (cm)}}$$

Keterangan =  $\bar{x}$  : rata-rata jumlah bakteri dan t : tinggi



**Gambar 4.** Luas area perhitungan bakteri dalam objek glass

Setelah dilakukan perhitungan sel maka dilanjutkan dengan menghitung waktu generasi sel bakteri agar dapat diketahui kecepatan sel bakteri dalam membelah. Rumus dalam menentukan waktu generasi sel adalah sebagai berikut :

$$N_t = N_0 2^n$$

$N_t$ : jumlah sel akhir,

$N_0$ : jumlah sel awal,  $n$ : jumlah generasi

$$\text{Waktu generasi} = t / n$$

$t$ : waktu pertumbuhan eksponensial,  $n$ : jumlah generasi

Dalam bentuk logaritma, rumus  $N_t = N_0 2^n$  menjadi:

$$\log N_t = \log N_0 + n \log 2$$

$$\log N_t - \log N_0 = n \log 2$$

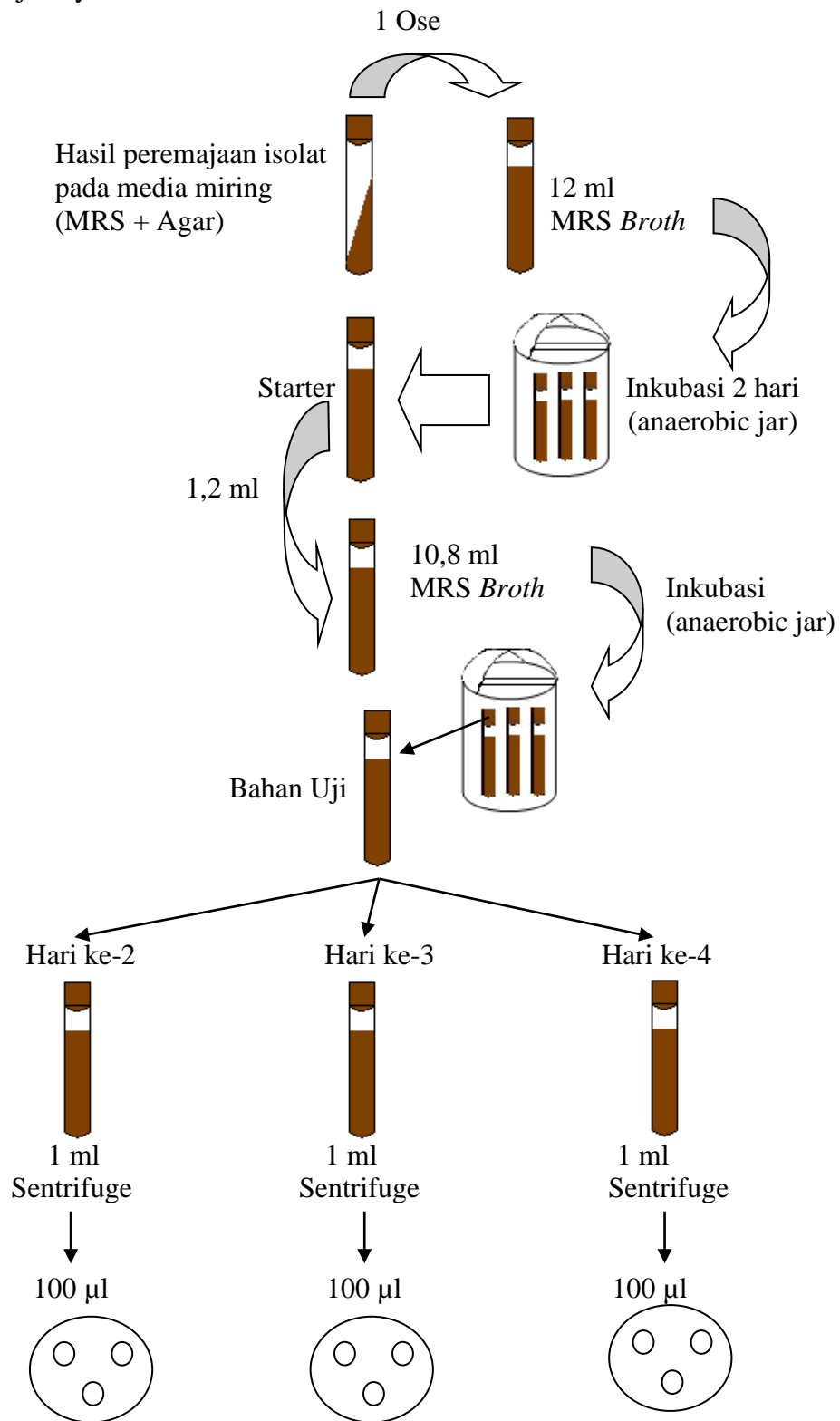
$$n \log 2 = \log N_t - \log N_0$$

$$n = \frac{\log N_t - \log N_0}{\log 2}$$

$$\log 2 = 0,301$$

## E. Diagram Alir

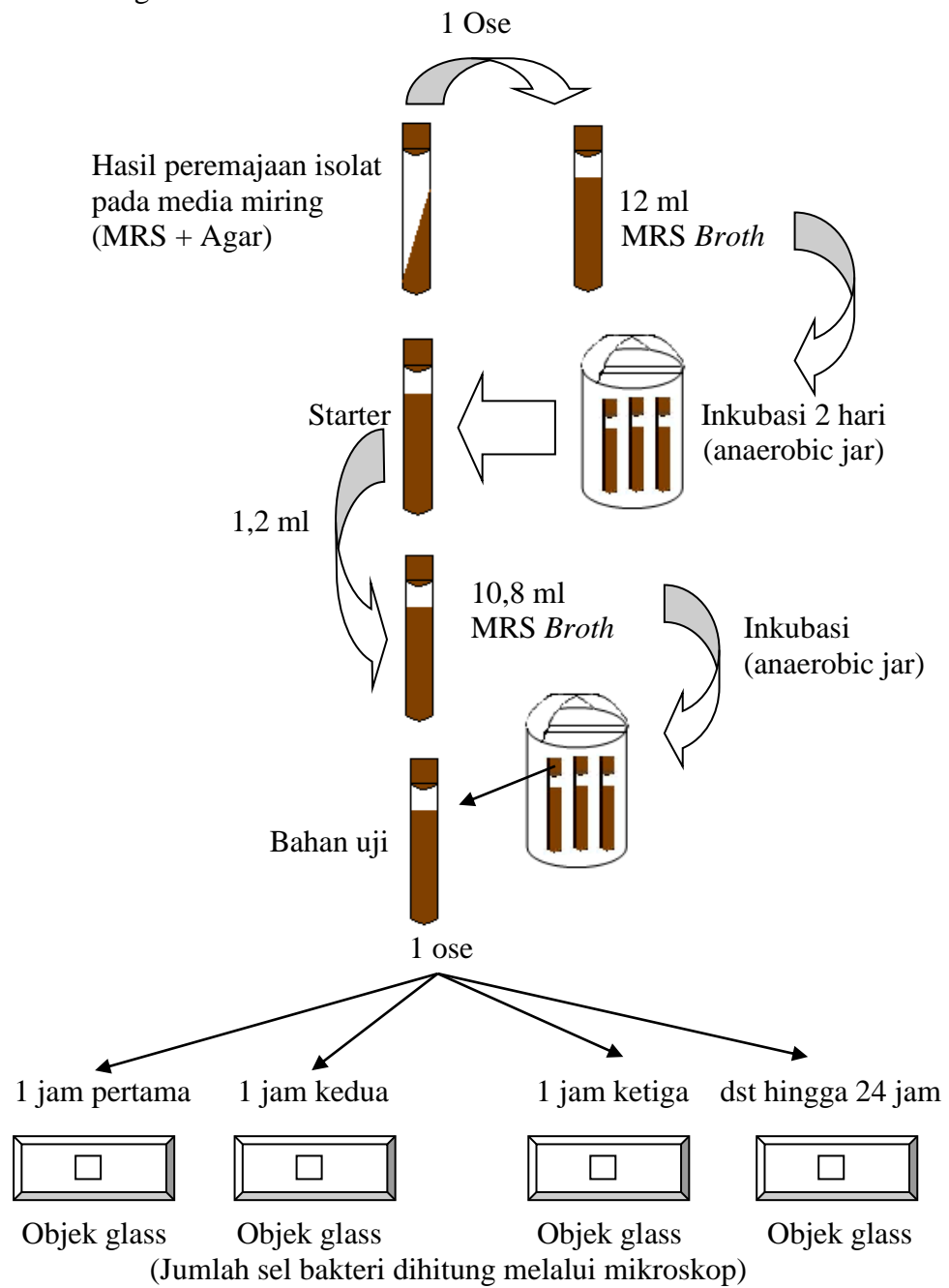
### 1. Uji Daya Hambat



(Luas diameter dari masing-masing cawan dihitung dengan penggaris)

**Gambar 5.** Diagram alir uji daya hambat

## 2. Perhitungan Jumlah Sel Bakteri



**Gambar 6.** Diagram alir perhitungan jumlah sel bakteri