

### III. METODE PENELITIAN

#### A. Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilakukan dari Bulan April sampai dengan Juli 2011, di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Lampung.

#### B. Alat dan Bahan

##### 1. Alat

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini adalah Cawan petri, tabung reaksi, mikropipet, rak tabung reaksi, *autoclave*, jarum ose, mikrotip, *microtube*, tisu, *laminair air flow*, lemari es, gelas ukur, kompor listrik, *beaker glass*, Erlenmeyer, kapas, pembakar spiritus, kertas kopi, aluminium foil, inkubator bakteri, *anaerobic jar*, *Vortex mixer* dan alat-alat pendukung lainnya.

##### 2. Bahan

Bahan-bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah Nutrient Agar (NA), MRS broth (*de man rogosa sharpe*), CMC Selulosa, glukosa broth, laktosa broth, congored, *Skim milk*, 1 M NaCl, akuades, 13 isolat bakteri dari usus itik (koleksi Sutrisna, 2010) yang diremajakan, isolat bakteri uji berupa *Escherichia coli* dan *Salmonella pullorum* umur 24 jam, alkohol 70%, spiritus, lilin, cat Gram A,B,C, dan D. EMBA (Eosin Methylen Blue Agar), Mac Conkay, Larutan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3%.

#### C. Metode Penelitian

Metode yang dipakai untuk penelitian ini adalah dengan melakukan karakterisasi terlebih dahulu terhadap ketiga belas isolat yang diperoleh dari usus itik yang merupakan koleksi Sutrisna ( 2010 ) yang telah diremajakan. Lalu membiakkan masing-masing isolat bakteri usus itik ke dalam media MRS broth untuk memproduksi zat antibakteri, kemudian ekstrak antibakteri tersebut diujikan terhadap bakteri uji *E. coli* dan *Salmonella pullorum*. Pengujian daya hambat bakteri menggunakan metode sumur oleh Carson dan Relay 1995 (Meidiana dkk., 2006), parameter yang diamati yaitu diameter zona bening yang terbentuk disekitar sumuran. Data besar zona hambat yang diperoleh dianalisis secara deskriptif dengan histogram.

#### **D. Prosedur Kerja**

Prosedur kerja pada penelitian ini terdiri dari : Peremajaan, karakterisasi, pembuatan starter, produksi zat antibakteri dan uji daya hambat isolat bakteri terhadap *E. coli* dan *Salmonella pullorum*.

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

Untuk peremajaan, pada tabung reaksi yang berisi media MRS padat miring, di-*streak* satu ose setiap isolat bakteri usus itik, kemudian di inkubasi di dalam *anaerobic jar* selama 48 jam.

##### **2. Karakterisasi**

Karakterisasi isolat bakteri usus itik dilakukan untuk memastikan bahwa bakteri yang diperoleh adalah bakteri asam laktat dengan *Genus Lactobacillus*. Hal ini

dilakukan dengan cara melakukan uji katalase, pengecatan Gram, uji motilitas, uji fermentasi gula, dan pengaruh suhu terhadap pertumbuhan bakteri, serta uji protease dan selulase.

- a. Uji katalase, dilakukan dengan cara mengambil masing-masing satu ose isolat bakteri usus itik, lalu diletakkan di atas gelas preparat yang sebelumnya telah diberi dua ose akuades, kemudian diratakan, ditetesi H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3%. Jika terbentuk gelembung gas maka hal itu menandakan bahwa bakteri bersifat katalase positif. Apabila tidak terbentuk gelembung gas, maka bakteri itu bersifat katalase negatif. Bakteri asam laktat terutama *Lactobacillus* bersifat katalase negatif.
- b. Pengecatan Gram, dilakukan dengan cara mengambil satu ose dari masing-masing isolat bakteri usus itik, lalu diletakkan pada gelas preparat, diratakan, lalu difiksasi sebentar di atas api bunsen ( $\pm$  5 detik). Setelah itu isolat bakteri ditetesi larutan Gram A 3 tetes dan didiamkan selama 1 menit, lalu di bilas dengan akuades, kemudian ditetaskan kembali dengan larutan Gram B 3 tetes dan didiamkan selama 1 menit, lalu di bilas. Setelah itu ditetaskan larutan Gram C 3 tetes, diamkan selama 30 detik, lalu di bilas dengan akuades. Lalu ditetaskan dengan larutan Gram D 3 tetes, diamkan selama 2 menit, setelah itu dibilas dengan akuades dan di kering anginkan. Dikatakan Gram positif jika hasil pengecatan berwarna ungu, dan Gram negatif jika berwarna merah. *Lactobacillus* bersifat Gram positif atau berwarna ungu.
- c. Uji motilitas, dilakukan dengan mengambil satu ose masing-masing isolat bakteri usus itik dengan ose runcing, lalu di tusukkan secara lurus atau vertikal pada media MRS padat yang telah disiapkan pada tabung reaksi, kemudian diinkubasi 2 hari dalam *Anaerobic Jar*. Dikatakan motil jika pertumbuhan

koloni bakteri menyebar, sedangkan non-motil jika pertumbuhan koloni bakteri tidak menyebar. *Lactobacillus* bersifat motil.

- d. Uji fermentasi gula, dilakukan dengan mengambil satu ose isolat bakteri diinokulasikan pada media uji (glukosa dan laktosa). Kemudian diinkubasi selama 48 jam di dalam *Anaerobic jar*. Setelah waktu inkubasi selesai, diamati perubahan warna pada media dan terbentuknya gelembung udara pada tabung durham. Perubahan warna media menjadi kuning menunjukkan adanya fermentasi sedangkan terbentuknya gelembung udara pada tabung durham menunjukkan bahwa bakteri menghasilkan gas pada proses metabolismenya.
- e. Pengaruh suhu terhadap pertumbuhan bakteri, dilakukan dengan men-*streak* isolat bakteri usus itik pada media NA kemudian diinkubasi pada suhu 30<sup>0</sup> C, 40<sup>0</sup>C, dan 50<sup>0</sup>C. Setelah diinkubasi, dilakukan pengamatan dengan melihat pertumbuhan koloni.
- f. Uji enzim protease, dilakukan dengan cara menginokulasikan secara titik menggunakan ose pada media NA yang diperkaya protein (*skim milk*). Kemudian diinkubasi selama 48 jam pada *Anaerobic jar*. Setelah diinkubasi 48 jam diamati adanya zona jernih di sekitar koloni. Jika terlihat zona jernih di sekitar koloni bakteri, berarti bakteri mampu menghasilkan enzim protease.
- g. Uji enzim selulase, dilakukan dengan cara menginokulasikan secara titik menggunakan ose pada media yang diperkaya dengan CMC (selulosa). Kemudian diinkubasi 48 jam pada *Anaerobic jar*. Setelah 48 jam, ditetesi larutan *congo red* 1%, lalu di diamkan selama 20 menit pada suhu ruang, kemudian dicuci dengan 1 M NaCl. Jika terlihat zona jernih di sekitar koloni bakteri, berarti bakteri mampu menghasilkan enzim selulase.

### **3. Pembuatan Starter**

Bakteri yang tumbuh dari hasil peremajaan diambil satu ose dan dimasukkan ke dalam 12 ml MRS Broth steril, lalu diinkubasi selama 48 jam dalam *anaerobic jar*.

### **4. Produksi Zat Antibakteri**

Untuk produksi zat antibakteri, sebanyak 1,2 ml starter dimasukkan ke dalam 10,8 ml MRS Broth yang ditempatkan pada tabung reaksi, lalu diinkubasi selama 48 jam dalam *anaerobic jar*. Setelah 48 jam masing-masing kultur bakteri diambil 1 ml lalu dimasukkan ke dalam *microtube* untuk di uji daya antibakterinya. Setelah itu kultur yang telah dimasukkan ke dalam *microtube* di sentrifuge selama 10 menit. Supernatan yang diperoleh adalah ekstrak antibakteri yang akan di uji.

### **1. Uji Daya Antibakteri terhadap *Escherichia.coli* dan *Salmonella Pullorum***

Satu mililiter suspensi dari bakteri *E. coli* dan *Salmonella pullorum* yang berumur 24 jam dituangkan (*pour plate*) ke dalam cawan petri steril, setelah itu dimasukkan media NA, lalu digoyang membentuk angka delapan agar tercampur rata, setelah itu di tunggu hingga media padat. Media yang telah padat, dibuat sumuran dengan diameter lubang 1 cm, setiap petri berisi tiga sumuran. Pada masing-masing sumuran tersebut, kemudian dimasukkan zat antibakteri sebanyak 0,1 ml. Setelah itu diinkubasi dalam inkubator bakteri pada suhu 37<sup>0</sup> C selama 48 jam.

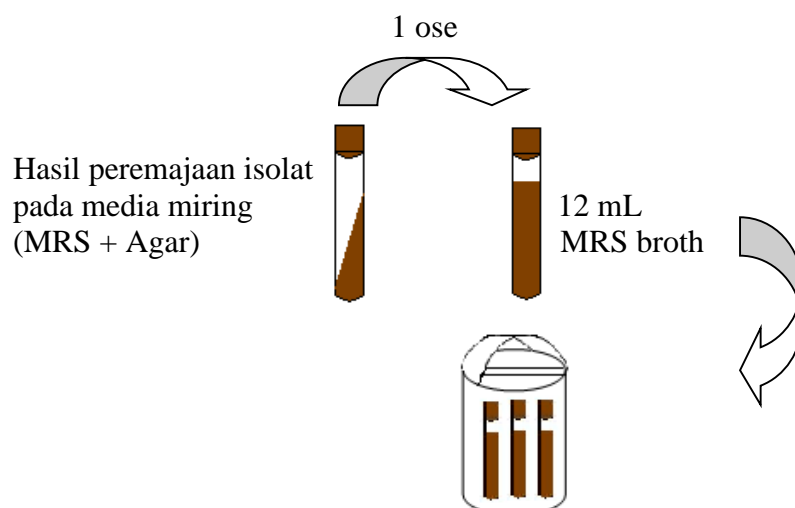
Kemampuan daya hambat antibakteri ini di tunjukkan dengan adanya zona hambat

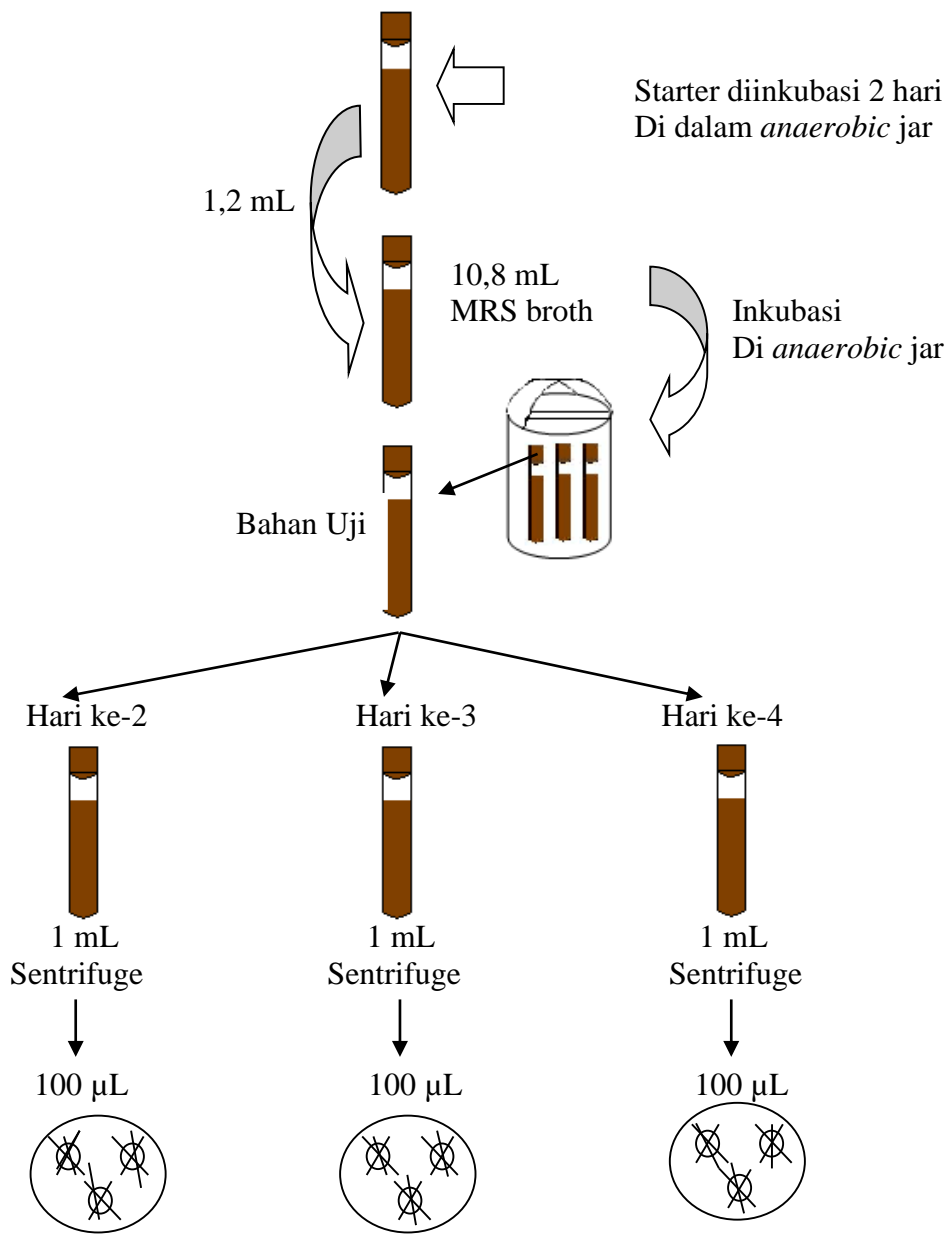
di sekitar sumur. Semakin besar diameter zona hambat yang terbentuk, maka semakin tinggi daya hambat bakteri tersebut.

## 6. Cara Mengukur Diameter Zona Hambat Antibakteri

Pengukuran diameter zona hambat dilakukan dengan menggunakan penggaris ukuran centimeter. Kemudian zona hambat yang terbentuk pada setiap sumuran diukur besar diameternya dengan tiga kali pengulangan dari sisi yang berbeda antar ketiganya, kemudian dari ketiga hasil pengukuran tersebut di jumlahkan lalu di rata-rata. Setelah itu hasil rata-rata pengukuran pada setiap sumuran tadi dijumlahkan dan di rata-rata kembali. Hasil akhir rata-rata pengukuran inilah yang menjadi besar zona hambat isolat yang diuji.

### E. Diagram Alir Uji Daya Hambat Antibakteri





**Gambar 4. Diagram alir uji daya hambat antibakteri**