

III. METODE PENELITIAN

A. Tempat Dan Waktu Penelitian

Isolasi *Lactobacillus* dan uji zat antibakteri *Lactobacillus* dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi dan Laboratorium Molekuler Jurusan Biologi FMIPA Unila dimulai bulan Januari 2010 sampai maret 2010.

B. Alat dan bahan

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini yaitu, tabung reaksi, cawan petri, Erlenmeyer ukuran 500 ml, 100 ml dan 50 ml, ose, spatula, neraca, gelas objek, gelas ukur, mikroskop, mikro pipet, pipet effendorf, microtube, Bunsen, laminar airflow, autoklav, inkubator dengan suhu 37⁰ C, pipet tetes, dan peralatan lainnya.

Bahan yang digunakan adalah tempoyak durian, media MRS Broth, media NB (Nutrient Broth), agar batangan, cat Gram, akuades, H₂O₂ 3%, alkohol 96% dan 70%.

C. Metode Penelitian

Ekstrak antibakteri yang dihasilkan selama 7 hari berturut-turut akan diuji daya antibakterinya. Bakteri uji dalam penelitian ini adalah *E. Coli* (Gram negatif), dan *S.aureus* (Gram positif). Metode uji daya antibakteri yang digunakan adalah metode Kirby-Bauer, yaitu metode difusi antibiotik menggunakan sumur (Nester dkk, 2009). Kemampuan zat antibakteri akan terlihat dari besar diameter zona bening yang dihasilkan.

D. Rancangan Percobaan

Rancangan percobaan yang dipakai dalam penelitian yaitu menggunakan rancangan acak kelompok dengan pengulangan 3 kali. Pengamatan dilakukan terhadap diameter zona bening yang dihasilkan pada masing-masing produksi zat antibakteri.

E. Variabel yang diamati

Variabel yang diamati atau diukur dalam penelitian ini adalah diameter zona bening yang dihasilkan ekstrak antibakteri isolat *Lactobacillus* terhadap bakteri uji.

F. Prosedur Kerja

Prosedur kerja pada penelitian ini terbagi menjadi 3 bagian yaitu, isolasi *Lactobacillus* dari tempoyak kemudian karakterisasi *Lactobacillus* dan uji zat antibakteri yang dihasilkan *Lactobacillus* terhadap bakteri uji.

1. Isolasi *Lactobacillus* dari tempoyak

Media yang digunakan untuk isolasi adalah MRS Broth dan MRS agar.

- a) Lima gram tempoyak dimasukkan dalam 45 ml MRS broth, dihomogenkan lalu diinkubasi selama 1 hari dengan suhu 37° C.
- b) Setelah inkubasi dibuat seri pengenceran 10^{-1} , 10^{-2} dan 10^{-3} menggunakan akuades steril lalu dihomogenkan.
- c) Masing-masing pengenceran diinokulasi dengan cara tabur (*pour plate*) dan sebar (*spread plate*) dalam cawan petri, kemudian diinkubasi kembali selama 1 hari pada suhu 37° C.

2. Pemurnian *Lactobacillus*

Tiap koloni hasil *pour plate* dan *spread plate* dimurnikan untuk memastikan bahwa bakteri yang didapat tidak bercampur. Pemurnian dilakukan dengan cara :

- a) Menginokulasi koloni yang dianggap *Lactobacillus* pada media MRS agar miring.
- b) Lalu diinkubasi selama 24 jam dengan suhu 37° C, koloni yang tumbuh kemudian dikarakterisasi.

3. Karakterisasi *Lactobacillus*

Tiap koloni hasil pemurnian dikarakterisasi untuk memastikan bahwa bakteri yang didapat adalah genus *Lactobacillus*. Karakterisasi *Lactobacillus* dilakukan dengan cara :

- a) Morfologi koloni. Melihat bentuk koloni dan warna koloni
- b) Uji katalase, Satu koloni diambil dengan ose dan diletakan pada gelas objek lalu ditetesi H_2O_2 3%. Jika terbentuk gelembung gas itu menandakan katalase positif. *Lactobacillus* bersifat katalase negatif maka ketika ditetaskan H_2O_2 3% tidak timbul gelembung gas.
- c) Pengecatan Gram, *Lactobacillus* adalah bakteri yang bersifat gram positif (berwarna ungu).
- d) Bentuk sel, melihat bentuk sel pada mikroskop, *Lactobacillus* berbentuk batang.
- e) Uji motilitas, satu koloni diambil menggunakan ose runcing, lalu ditumbuhkan pada media MRS tegak kemudian diinkubasi. Jika pertumbuhan koloni menyebar menunjukkan motil. *Lactobacillus* bersifat motil.
- f) Pengukuran isolat, isolat *lactobacillus* diukur menggunakan mikrometer yang ditambahkan pada mikroskop.

4. Penyiapan starter

- a) Sebanyak 1 ose isolat *Lactobacillus* dimasukan kedalam 25 ml MRS broth steril, Kemudian diinkubasi selama 1 hari pada inkubator dengan suhu 37^0 C. setelah inkubasi kultur siap digunakan sebagai starter.

5. Produksi zat antibakteri *Lactobacillus*

- a) Sebanyak 5 ml starter dimasukkan ke dalam 45 ml MRS broth pada Erlenmeyer 100 ml.
- b) Lalu diinkubasi pada inkubator dengan suhu 37⁰ C.
- c) Setelah itu setiap harinya selama 7 hari diambil kultur sebanyak 1 ml kemudian dimasukkan kedalam microtube.
- d) Kultur disentrifuge dengan kecepatan 11000 rpm selama 5 menit.
- e) Supernatan yang didapat adalah ekstrak antibakteri yang akan diuji.

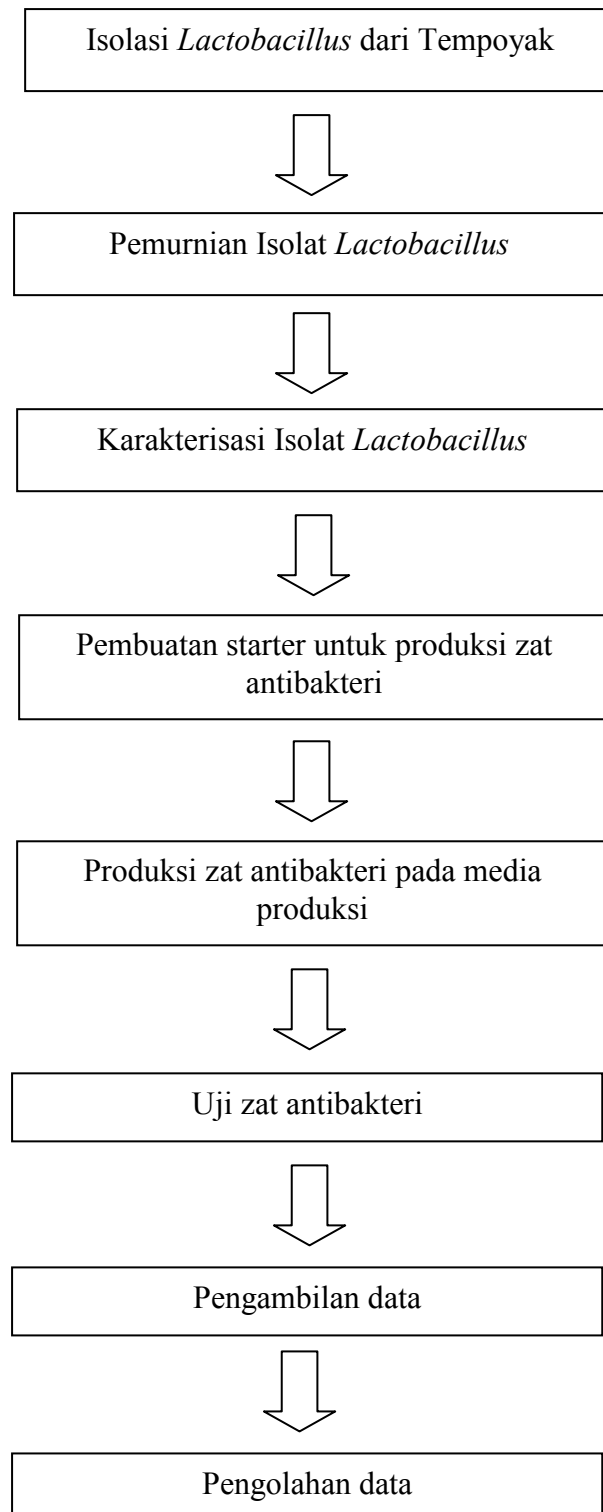
6. Uji zat antibakteri

Setelah didapat supernatan, lalu diuji terhadap bakteri uji.

- a) Satu ose bakteri uji diinokulasi ke dalam tabung reaksi yang berisi 5 ml aquades steril, kemudian divortek.
- b) Kemudian sebanyak 1 ml bakteri uji dimasukkan pada cawan petri setelah itu ditambahkan 25 ml NA steril, dihomogenkan, lalu tunggu media hingga padat.
- c) Setelah padat dibuat lubang untuk sumur dengan diameter 1 cm. Lalu dibuat tiga buah garis diluar cawan petri yang melintang daerah tengah diameter sumur. Kemudian dimasukkan sebanyak 100 µl supernatan antibakteri.
- d) Kultur diinkubasi selama 1 hari pada suhu 37⁰ C, setelah itu diukur diameter zona bening yang dihasilkan pada garis yang telah dibuat menggunakan penggaris.
- e) Kegiatan a sampai d dilakukan selama 7 hari produksi antibakteri.

G. Analisis Statistika

Data yang diperoleh dianalisis dengan Analisis Ragam dan apabila terdapat perbedaan Nyata ($p < 0,01$ & $0,05$) diantara perlakuan, maka di uji dengan uji BNT.

Diagram Alir

Gambar 1. Bagan alur penelitian

