

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Jenis Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksplorasi yang dilakukan dengan cara identifikasi bakteri dari probiotik yang berpotensi sebagai bahan biodekomposer.

3.2 Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi dan optik Jurusan Biologi Fakultas Saintek UIN Maulana Malik Ibrahim Malang mulai bulan April-Juli 2010.

3.3 Obyek Penelitian

Obyek dari penelitian ini adalah identifikasi bakteri probiotik yang berpotensi sebagai biodekomposer.

3.4 Alat dan Bahan

3.4.1 Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah autoklaf, inkubator, oven, LAF, lemari es, tabung reaksi, rak tabung reaksi, bunsen, timbangan digital, mikroskop optik, tusuk gigi, karet pentil, plastik tahan panas, botol menses, botol selai, kertas label, kertas pembungkus, aluminium foil, plastik wrapping, obyek glass, deck glass, kapas, jarum ose, spreader, gelas ukur, cawan petri, pipet hisap,

termometer, erlenmeyer, beaker glass, mikropipet, mikro tip, stirer, pemanas listrik dan panci.

3.4.2 Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain produk probiotik dari Laboratorium Mikrobiologi Jurusan Hama Penyakit Tanaman Fakultas Pertanian Universitas Brawijaya, media NA, media EMB, media PSI, Media TCBSA, media MRSA, larutan pepton 0,05%, alkohol 95%, spiritus, aquades, methilen blue, iodium, safranin, malacnite green 5%, amonium oxalate, pottasium iodine, sodium bicarbonate, KOH 3%, K_2O_2 dan crystal violet.

3.5 Prosedur Kerja

3.5.1 Sterilisasi Alat dan Bahan

Sterilisasi alat dilakukan sebelum semua peralatan digunakan, yaitu dengan cara membungkus semua peralatan dengan menggunakan kertas cokelat kemudian dimasukkan ke dalam autoklaf untuk di sterilisasi dengan suhu $121^{\circ}C$ dan tekanan 15 psi (per square inchi) selama 15 menit. Untuk alat yang tidak tahan terhadap panas tinggi cukup disterilisasi dengan alkohol 70%.

3.5.2 Uji Pendahuluan

3.5.2.1 Pembuatan Media NA

Cara kerja untuk pembuatan medium NA yaitu menyiapkan bahan-bahan yang digunakan untuk pembuatan media ini, antara lain beef ekstrak 3 g, pepton 5 g, agar-agar 17 g dan aquades 1000 ml, memasukan semua bahan tersebut kedalam tabung erlenmeyer dan dipanaskan hingga homogen, menutup dengan kapas, dibekukan dan di sterilisasi menggunakan autoklaf dengan suhu 121°C, tekanan 15 psi selama 15 menit kemudian diinkubasi pada suhu kamar selama 24 jam.

3.5.2.2 Pembuatan Pepton 0,05%

Cara kerja untuk pembuatan pepton 0,05% yaitu menyiapkan 0,5 g pepton dan 1000 ml aquades, keduanya dimasukkan kedalam labu Erlenmeyer, dihomogenkan dengan panas sedang kemudian dituang masing-masing 9 ml kedalam tabung reaksi dan media kembali dsterilisasi.

3.5.2.3 Skrining

Cara kerja untuk skrining yaitu menyiapkan media pepton 0,05% 9 ml sebanyak 10 tabung, melakukan pengenceran mulai 10^{-1} s/d 10^{-10} secara aseptis, hasil pengenceran diinkubasi pada suhu 37°C selama 1 jam, selanjutnyadisiapkan cawan petri berisi media NA sebanyak 30 buah, sampel yang telah diencerkan masing-masing diambil 100 μ l dengan menggunakan mikropipet kemudian dituang kedalam cawan petri dan dihomogenkan menggunakan metode cawan

tebar, masing-masing pengenceran diulang sebanyak 3 kali dan diinkubasi selama 24 jam.

3.5.2.4 Isolasi

Cara kerja untuk isolasi yaitu menghitung dan menandai mikroba yang tumbuh dari hasil skrining, menyiapkan cawan petri berisi media NA, masing-masing cawan petri dibagi menjadi empat zona dan ditandai, selanjutnya mikroba yang sudah ditandai sesuai urutan diambil menggunakan tusuk gigi dan dipindahkan kedalam cawan petri dengan metode spot technique, hasil isolasi diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.

3.5.2.5 Purifikasi

Cara kerja untuk purifikasi yaitu mengamati pertumbuhan koloni mikroba hasil isolasi dan ditandai masing-masing koloni yang dianggap berbeda; memurnikan koloni mikroba yang telah ditandai dengan metode streak technique untuk selanjutnya diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.

3.5.3 Konfirmasi

Konfirmasi jenis mikroba yang terdapat pada sampel dilakukan dengan cara melakukan beberapa uji, diantaranya :

3.5.3.1 Pewarnaan Gram

Cara kerja untuk pewarnaan gram yaitu menyiapkan kaca benda yang telah ditetesi aquades, sampel mikroba diambil menggunakan jarum ose kemudian

dihomogenkan diatas kaca benda untuk selanjutnya di fiksasi (pemanasan sampel diatas api agar mikroba yang akan diwarnai melekat ke kaca benda), sampel ditetesi dengan crystal violet, dibiarkan selama 1 menit dan dicuci dengan aquades mengalir, sampel ditetesi dengan iodine, dibiarkan selama 1 menit dan dicuci dengan aquades mengalir, sampel ditetesi dengan alkohol 95%, dicuci dengan aquades mengalir, sampel ditetesi dengan safranin, dibiarkan selama 1 menit dan dicuci dengan aquades mengalir, sisa air dilap menggunakan tissue dan dilakukan pengamatan dibawah mikroskop dengan bantuan minyak emersi. Bakteri yang biru ungu merupakan bakteri gram positif dan bakteri yang berwarna merah ungu merupakan bakteri gram negatif.

3.5.3.2 Pewarnaan Endospora

Cara kerja untuk pewarnaan endospora yaitu, disiapkan panci berisi air mendidih, menyiapkan kaca benda yang telah ditetesi aquades, sampel mikroba diambil menggunakan jarum ose, dihomogenkan, kemudian difiksasi diatas api selanjutnya sampel diletakkan diatas panci berisi air mendidih, ditetesi malacyte green 5% dan didiamkan selama 3 menit (selama didiamkan diatas air mendidih, sampel dijaga agar tidak mengering dengan meneteskan malacyte green 5% secara berkala), selanjutnya sampel dicuci menggunakan aquadest mengalir, ditetesi dengan safranin, didiamkan 3 menit dan dicuci menggunakan aquadest mengalir, sisa air dilap menggunakan tissue dan diamati dibawah mikroskop dengan bantuan minyak emersi. Bakteri dianggap memiliki endospora bila pada bagian tengah bakteri yang terwarnai safranin terdapat warna hijau.

3.5.3.3 Uji Katalase

Cara kerja untuk uji katalase yaitu menyiapkan kaca benda yang telah ditetesi K_2O_2 , mengambil sampel mikroba menggunakan tusuk gigi, mencelupkan sampel mikroba kedalam tetesan K_2O_2 , hasil positif bila terjadi reaksi gelembung dan negatif bila tidak terjadi reaksi apapun.

3.5.3.4 Uji Asam/Basa

Cara kerja untuk asam/basa yaitu menyiapkan kaca benda yang telah ditetesi aquades, mengambil sampel mikroba menggunakan jarum ose, meletakkan sampel mikroba diatas kaca benda dan dihomogenkan, melakukan fiksasi (pemanasan sampel diatas api agar mikroba yang akan diwarnai melekat ke kaca benda), setelah preparat kering, meletakkan preparat pada saringan diatas air mendidih, metesi dengan karbol fuchin, dan mendinginkan selama 3-5 menit; membilas dengan menggunakan air mengalir, menetesi preparat dengan alkohol 95% selama 10-15 detik, kemudian membilas menggunakan air mengalir, menetesi preparat dengan crystal violet, biarkan selama 1 menit kemudian bilas menggunakan air mengalir; mengelap sisa air dengan menggunakan tissue dan diamati dibawah mikroskop dengan bantuan minyak emersi, bakteri yang bersifat asam ditandai dengan warna merah muda dan bakteri yang bersifat basa akan nampak berwarna ungu.

3.5.3.5 Uji Stric Aerob/Anaerob

Cara kerja untuk stric aerob/anaerob yaitu mengisi tabung reaksi dengan Nutrien Broth (NB) masing-masing 5 ml, semua medium dan bahan lain seperti aquadest disterilisasi menggunakan autoklaf, kemudian diinkubasi selama 2x24 jam, jika medium tetap jernih berarti medium tersebut steril dan dapat digunakan, koloni bakteri yang akan diperiksa diambil secara aseptik kemudian diinokulasi kedalam medium cair. Tiap macam suspensi bakteri diinokulasi ke dalam 2 tabung medium cair sebanyak 1 ose, dihomogenkan dan diinkubasi selama 1x24 jam, bakteri yang bersifat aerob akan tumbuh dipermukaan media dan bakteri yang berifat anaerob akan tumbuh di dasar media, sedangkan bakteri yang bersifat anaerob fakultatif akan tumbuh menyebar.

3.5.3.6 Uji Oksidase Test

Cara kerja untuk oksidase test yaitu sebanyak 1 ose koloni bakteri diambil dari medium NA, kemudian digoreskan pada kertas oksidase test strip, perubahan warna yang terjadi pada test strip tadi diamati setelah didiamkan selama 20-60 detik, apabila terjadi perubahan warna menjadi biru violet maka oksidase test dinyatakan positif. Sedangkan bila tidak terjadi perubahan warna maka oksidase test dinyatakan negatif.

3.5.3.7 Uji Gugus Fermentasi

Cara kerja untuk gugus fermentasi yaitu menginokulasi bakteri pada setengah bagian medium lempeng agar, sedangkan setengah bagian yang tersisa dipakai untuk kontrol. Kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 2 x 24 jam, selanjutnya larutan fermentasi dituang ke permukaan medium dan diperhatikan warna yang terjadi di sekeliling goresan garis inokulasi. Bagian jernih di sekeliling koloni bakteri menunjukkan adanya gugus fermentasi oleh bakteri tersebut, sedangkan bagian lainnya berwarna gelap.

3.5.4 Uji Pemastian Menggunakan Media Selektif

3.5.4.1 EMB

Cara kerja untuk skrining menggunakan media EMB yaitu menyiapkan media pepton 0,05% 9 ml sebanyak 10 tabung, melakukan pengenceran sampel mulai 10^{-1} s/d 10^{-10} secara aseptis, hasil pengenceran diinkubasi pada suhu 37°C selama 1 jam, selanjutnya disiapkan cawan petri berisi media EMB sebanyak 30 buah, diambil sampel yang telah diencerkan masing-masing diambil 100 μ l dengan menggunakan mikropipet kemudian dituang ke dalam cawan petri dan dihomogenkan menggunakan metode cawan tebar, masing-masing pengenceran diulang 3 kali dan diinkubasi selama 24 jam, koloni yang tumbuh dihitung menggunakan colony counter.

3.5.4.2 TCBSA

Cara kerja untuk skrining menggunakan media TCBSA yaitu menyiapkan media pepton 0,05% 9 ml sebanyak 10 tabung, melakukan pengenceran sampel mulai 10^{-1} s/d 10^{-10} secara aseptis, hasil pengenceran diinkubasi pada suhu 37°C selama 1 jam, selanjutnya disiapkan cawan petri berisi media TCBSA sebanyak 30 buah, diambil sampel yang telah diencerkan masing-masing diambil $100\mu\text{l}$ dengan menggunakan mikropipet kemudian dituang ke dalam cawan petri dan dihomogenkan menggunakan metode cawan tebar, masing-masing pengenceran diulang 3 kali dan diinkubasi selama 24 jam, koloni yang tumbuh dihitung menggunakan colony counter.

3.5.4.3 MRSA

Cara kerja untuk skrining menggunakan media MRSA yaitu menyiapkan media pepton 0,05% 9 ml sebanyak 10 tabung, melakukan pengenceran sampel mulai 10^{-1} s/d 10^{-10} secara aseptis, hasil pengenceran diinkubasi pada suhu 37°C selama 1 jam, selanjutnya disiapkan cawan petri berisi media MRSA sebanyak 30 buah, diambil sampel yang telah diencerkan masing-masing diambil $100\mu\text{l}$ dengan menggunakan mikropipet kemudian dituang ke dalam cawan petri dan dihomogenkan menggunakan metode cawan tebar, masing-masing pengenceran diulang 3 kali dan diinkubasi selama 24 jam, koloni yang tumbuh dihitung menggunakan colony counter.

3.5.4.4 PSI

Cara kerja untuk skrining menggunakan media PSI yaitu menyiapkan media pepton 0,05% 9 ml sebanyak 10 tabung, melakukan pengenceran sampel mulai 10^{-1} s/d 10^{-10} secara aseptis, hasil pengenceran diinkubasi pada suhu 37°C selama 1 jam, selanjutnya disiapkan cawan petri berisi media PSI sebanyak 30 buah, diambil sampel yang telah diencerkan masing-masing diambil $100\mu\text{l}$ dengan menggunakan mikropipet kemudian dituang ke dalam cawan petri dan dihomogenkan menggunakan metode cawan tebar, masing-masing pengenceran diulang 3 kali dan diinkubasi selama 24 jam, koloni yang tumbuh dihitung menggunakan colony counter.

3.6 Pengumpulan dan Analisis Data

Data secara kualitatif diperoleh dengan cara melakukan identifikasi bakteri probiotik yang berpotensi menjadi bahan biodekomposer selanjutnya data akan dianalisis menggunakan analisis deskriptif.