

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **3.1 Rancangan Penelitian**

Rancangan penelitian yang digunakan adalah rancangan penelitian deskriptif kualitatif. Data yang diperoleh disajikan secara deskriptif meliputi karakteristik makroskopis, mikroskopis, uji *Screening* dan identifikasi secara biokimia dari jenis bakteri selulolitik terpilih yang berhasil diisolasi dari feses kambing.

#### **3.2 Tempat dan Waktu Penelitian**

Penelitian ini dilaksanakan di laboratorium Mikrobiologi, jurusan Biologi Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang. Mulai bulan Juli sampai November 2011.

#### **3.3 Alat dan Bahan Penelitian**

##### **3.3.1 Alat Penelitian**

Alat-alat yang digunakan adalah Mikroskop (Olympus), *Shaker inkubator* (Barnstead MAXQ 7000), *mikropipet* (BIO-RAD), *Vortex mixer*, cawan petri, *Erlenmeyer*, tabung reaksi, timbangan analitik, gelas ukur, *beaker glass*, *autoklaf*, *laminar air flow*, gunting, bunsen, ose, lemari es, oven, block hitter (pemanas).

### **3.3.2 Bahan Penelitian**

#### **3.3.2.1 Bahan Feses**

Bahan feses kambing diambil dari Laboratorium Peternakan Lapang Sumber Sekar Kota Batu

#### **3.3.2.2 Bahan Media**

Sampel yang digunakan untuk isolasi bakteri selulolitik adalah feses kambing. Media yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Natrium Agar* (NA) (Criterion), *Carboxil Methil Cellulosa* (CMC) agar dan *Carboxil Methil Cellulosa* (CMC) *broth* (Oxoid) (2 g CMC, 0,04 g MgSO<sub>4</sub>, 0,15 g KNO<sub>3</sub>, 0,1g K<sub>2</sub>HPOH, 0,004 g Cacl<sub>2</sub>, 0,4 g *Beef extract*, 3,4 g Agar), kongo merah 1 % (1 gram kongo merah dalam 100 ml aquades), NaCl, aquades, spirtus, alumunium foil, kertas label, blue tip, tissue dan kapas secukupnya.

### **3.4 Cara Kerja**

#### **3.4.1 Pembuatan Media**

##### **3.4.1.1 Media *nutrient agar***

*Nutrient agar* ditimbang sebanyak 8 gram, kemudian semua bahan dicampur dengan aquadest sebanyak 200 ml, dipanaskan sampai mendidih sambil diaduk hingga larut, kemudian media tersebut dimasukkan ke dalam Erlenmeyer 250 ml, kemudian disterilisasi dalam autoklaf dengan suhu 121<sup>0</sup>C selama 15 menit.

### 3.4.1.2 Media CMC

Media yang digunakan untuk pertumbuhan bakteri selulolitik adalah media CMC agar dan CMC broth yang terdiri dari 2 g CMC, 0,04 g MgSO<sub>4</sub>, 0,15 g KNO<sub>3</sub>, 0,1g K<sub>2</sub>HPOH, 0,004 g CaCl<sub>2</sub>, 0,4 g Beef extract. Semua bahan dicampur dengan aquadest sebanyak 200 ml, dipanaskan sampai mendidih sambil diaduk hingga larut, kemudian media tersebut dimasukkan ke dalam Erlenmeyer dan ditutup kapas, kemudian disterilisasi dalam autoklaf.

### 3.4.2 Isolasi dan Seleksi Bakteri

#### 3.4.2.1 Isolasi Bakteri dari Feses Kambing

Feses sebanyak 5 gram dimasukkan ke dalam erlenmeyer 45 ml dan divortex (pengenceran 10<sup>-1</sup>), selanjutnya dilakukan pengenceran bertingkat sampai 10<sup>-10</sup> dengan mengambil 1 ml dari pengenceran sebelumnya lalu diencerkan dengan 9 ml aquadest steril. Pengenceran 10<sup>-3</sup> sampai 10<sup>-10</sup> diambil 1 ml dan dimasukkan ke dalam cawan petri untuk ditanam secara *pour plate* menggunakan media NA, kemudian diinkubasi pada suhu ruang selama 24 jam. Pengenceran dilakukan untuk mengurangi kepadatan koloni yang tumbuh pada media isolasi sehingga memudahkan proses isolasi.

Koloni yang dihasilkan dari isolasi dipindahkan pada cawan petri untuk pemurnian dan diamati morfologinya dan koloni yang terpisah. Pemurnian dilakukan dengan cara mengambil satu ose isolat mikroba dan menumbuhkan pada media *Nutrient Agar* dengan metode *streak kuadran*. Isolat murni yang didapatkan disimpan pada media miring *Nutrient agar* untuk perlakuan selanjutnya.

### 3.4.3 Identifikasi Koloni

Isolat bakteri murni kemudian dikarakterisasi dan diidentifikasi yang dilakukan secara biokimia yang mengacu pada *Bergey Manual of Determinative Bacteriology* 9<sup>th</sup> karakterisasi yang dilakukan meliputi (Dwijoseputro,2005) :

#### 3.4.3.1 Pengamatan makroskopik

Karakteristik koloni bakteri hasil inokulasi pada media NA dan CMC datar yaitu berdasarkan:

- a. Bentuk koloni (dilihat dari atas) : berupa bulat (*circulair*), berbenang (*filamentus*), tak teratur (*irregular*), serupa akar (*rhizoid*), serupa kumparan (*spindle*).
- b. Permukaan koloni/elevasi (dilihat dari samping) : rata (*flat*), timbul-datar (*raised*), timbul-melengkung (*convex*), membukit (*umbonate*),
- c. Tepi koloni (dilihat dari atas) : utuh (*entire*), berombak (*lobate*), bergerigi (*serrate*), berbenang (*filamentus*), keriting (*undunate*).
- d. Warna koloni : keputih-putihan, kelabu, kekuning-kuningan atau hampir bening.

#### 3.4.3.2 Pengamatan mikroskopik

Pengamatan mikroskopik dilakukan untuk melihat bentuk sel bakteri dan untuk melihat kemurnian dari isolat. Pengamatan mikroskopis meliputi pewarnaan gram, uji katalase, dan uji endospora. Untuk penentuan jenis bakteri dilanjutkan dengan serangkaian uji biokimia terhadap isolat yang diperoleh dengan berpedoman pada buku *Bergey's Determinative Bacteriology* (Holt *et.al*, 1994).

#### **3.4.3.2.1 Pewarnaan Gram**

Isolat bakteri diambil sedikit dengan jarum ose secara aseptis dan disuspensikan dengan dengan aquades yang ada di atas gelas objek. Preparat difiksasi diatas api bunsen sampai kering. Preparat ditetesi dengan Gram A, didiamkan selama 1 menit dan dicuci dengan air mengalir dan dikeringkan. Preparat ditetsi dengan larutan gram B dan didiamkan selama 1 menit, dicuci dengan air mengalir dan dikeringkan. Preparat ditetesi dengan larutan gram C sampai warna ungu hilang. Preparat ditetesi dengan larutan gram D dan didiamkan selama 30 detik, dicuci dengan air mengalir dan dikeringkan. Preparat ditetesi dengan minyak imersi, preparat diamati dengan mikroskop, uji gram positif jika berwarna ungu dan negatif jika berwarna merah (Hadioetomo, 1985).

#### **3.4.3.2.2 Uji Katalase**

Uji katalase dilakukan dengan cara biakan murni isolat bakteri yang berumur 24 jam diambil sedikit secara aseptis dengan menggunakan jarum ose dan disuspensikan dengan aquades steril sebanyak dua oose. Suspensi ditetesi dengan larutan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3 % selanjutnya diamati pembentukan gelembung udara (positif) yang terjadi pada koloni dan sekitarnya. Terbentuknya gelembung menandai bahwa bakteri tersebut bersifat aerobik (Pratiwi, 2008).

#### **3.4.3.2.3 Pewarnaan Endospora**

Biakan murni isolat bakteri diambil sedikit kemudian disuspensikan dengan aquades steril, kemudian preparat difikasasi di atas api bunsen. Preparat diletakkan diatas kawat yang sudah dipanaskan diatas air mendidih selama 10 menit, kemudian ditetesi dengan malachit hijau. Preparat dicuci dengan hati-hati

dengan air mengalir. Preparat ditetesi dengan menggunakan safranin, didiamkan selama 1 menit, kemudian dicuci menggunakan air mengalir dan dikeringanginkan. Preparat diamati dengan mikroskop, uji positif jika sel vegetatif berwarna merah dan spora berwarna hijau (Lay, 1994).

#### **3.4.4 Uji Bakteri Selulolitik Secara Kualitatif**

Semua isolat murni yang diperoleh diuji kemampuannya untuk menghasilkan enzim selullase. Pengujian pembentukan zona bening dari semua isolat bakteri dilakukan berdasarkan metode Apun *et al* (2000) isolat-isolat bakteri diinokulasikan ke dalam media CMC agar. Kultur kemudian diinkubasi selama 48 jama pada suhu ruang 37°C. Visualisasi zona bening dilakukan dengan menambahkan *congo red* (1 mg/ml) selama 15 menit kemudian dicuci dengan NaCl 1 M. Koloni yang tumbuh diamati zona beningnya. Zona bening menunjukkan bahwa koloni bakteri tersebut menghasilkan enzim selulolitik dan mendegradasi selulosa yang ada disekitarnya. Hasil isolat-isolat yang memiliki kemampuan degredasi selulosa terbaik dilakukan peremajaan pada media agar miring untuk aplikasi lebih lanjut.

Menurut Apun *et al.* (2000). Ratio zona bening berupa perbandingan antara diameter zoan bening dan diameter koloni. Semakin besar zona bening yang terbentuk di sekitar koloni isolat, maka semakin besar aktivitas selulolitik yang dihasilkan dari pengukuran menggunakan rumus sebagai berikut :

$$\text{Ratio ZB} = \frac{\text{Diameter Zona Bening (DZB)} - \text{Diameter koloni (DK)}}{\text{Diameter Koloni (DK)}}$$

#### 3.4.5 Identifikasi dengan Menggunakan Mikrobact 12E

Isolat bakteri selulolitik yang akan diidentifikasi disiapkan terlebih dahulu. Seluruh perangkat Mikrobact 12E disiapkan, Satu koloni bakteri yang telah diinkubasi selama 18-24 jam diambil kemudian dilarutkan kedalam 3-6 ml gram fisiologis pada tabung reaksi steril hingga homogen. Larutan bakteri yang telah homogen diteteskan kedalam sumur *Mikrobact* sebanyak 100 UI (4 tetes), untuk sumur Lysin, Omitin, dan H<sub>2</sub>S ditambah dengan tetesan *mineral oil* sebanyak 1-2 tetes. Setelah itu *Mikrobact* diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam (Oxoid, 2004; Microbiology Lab team, 2002).

*Mikrobact* yang telah diinkubasi diambil kemudian diteteskan reagent pada sumur nomor 8 dengan *Indol Kovact* sebanyak 2 tetes, sumur nomor 10 dengan larutan VP I dan VP II masing-masing satu tetes, dan sumur 12 dengan TDA sebanyak satu tetes. Evaluasi hasil dilihat melalui sumur-sumur *microbact* apakah positif atau negatif dengan cara membandingkan dengan table warna dan hasilnya ditulis pada formulir *Patient Record*. Angka-angka *oktal* didapat dari penjumlahan reaksi positif saja, dari tiap-tiap kelompok (3 sumur didapatkan 1 angka *oktal*). Nama bakteri dilihat dengan komputer berdasarkan angka *oktal* yang didapat (Oxoid, 2004 ; Microbiology Lab team, 2002).

### 3.5 Analisis Data

Data yang diperoleh disajikan secara deskriptif meliputi karakteristik makroskopis dan mikroskopis dari masing-masing jenis bakteri selulolitik yang dominan berhasil diisolasi dari feses kambing.





### 3.5 Skema Penelitian

Secara diagramatis, Bagan alur penelitian ini dapat terangkum pada gambar bagan dibawah ini :

