

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Rancangan Penelitian dan Analisis Data

Rancangan penelitian yang digunakan adalah rancangan penelitian deskriptif. Data yang diperoleh disajikan secara deskriptif kualitatif meliputi karakteristik makroskopis dan mikroskopis dari masing-masing isolat bakteri asam laktat yang diperoleh dari fermentasi Markisa Ungu (*Passiflora edulis* var. Sims), identifikasi sampai tingkat genus dari isolat penghasil eksopolisakarida dan jumlah eksopolisakarida yang dihasilkan oleh masing-masing isolat bakteri.

3.2 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian tentang “Isolasi dan Identifikasi Bakteri Asam Laktat (BAL) Asal Fermentasi Markisa Ungu (*Passiflora edulis* var. Sims.) Sebagai Penghasil Eksopolisakarida” ini dilakukan pada bulan April 2014 yang bertempat di Laboratorium Mikrobiologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang, Laboratorium Genetika Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang, dan Laboratorium Optik Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.

3.3 Alat dan Bahan Penelitian

3.3.1 Alat-Alat Penelitian

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini adalah wadah kedap udara, autoklaf, *Laminar Air Flow*, sentrifugasi dingin, inkubator, mikropipet, vortex, *Hot Plate and Stirrer*, mikroskop, sentrifugasi dingin, timbangan analitik,

pengering, blue tip, cawan petri, beaker glass, tabung flakon, tabung reaksi, gelas ukur, erlenmeyer, dan tabung sentrifuge.

3.3.2 Bahan-Bahan Penelitian

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah buah markisa asam (*Passiflora edulis* var. Sims), daun pisang, alkohol 70%, Media MRSB, Media MRSA, pepton water, aseton teknis, TCA, kertas label, plastik wrap, aluminium foil, plastik tahan panas, karet gelang, tissue, kapas, kain kasa dan aquades.

3.4 Langkah Penelitian

3.4.1 Tahap Persiapan

Alat-alat penelitian yang akan digunakan berupa alat-alat gelas disterilkan terlebih dahulu dalam autoklaf pada suhu 121° C selama 15 menit sebelum digunakan. Semua bentuk kegiatan dilakukan secara aseptis.

3.4.2 Tahap Pembuatan Media

3.4.2.1 Media MRSA

Pembuatan media MRS agar 250 ml, yaitu mengukur 250 ml aquades kemudian menimbang MRSA sebanyak 17,05 gram. Dipanaskan hingga mendidih sambil diaduk hingga larut, kemudian media tersebut dimasukkan ke dalam erlenmeyer dan ditutup kapas. Erlenmeyer dibungkus dengan plastik tahan panas kemudian disterilisasi dalam autoklaf dengan suhu 121° C selama 15 menit.

3.4.2.2 Media MRSB

Pembuatan media MRS broth 250 ml, yaitu mengukur 250 ml aquades kemudian menimbang MRSB sebanyak 13,75 gram. Dipanaskan sambil diaduk

hingga larut, kemudian media tersebut dimasukkan ke dalam erlenmeyer dan ditutup kapas. Erlenmeyer dibungkus dengan plastik tahan panas kemudian disterilisasi dalam autoklaf dengan suhu 121° C selama 15 menit.

3.4.2.3 Media *Pepton Water*

Pembuatan media pepton water 100 ml, yaitu mengukur 100 ml aquades dan menimbang pepton water sebanyak 2,55 gram. Dipanaskan sambil diaduk hingga larut, kemudian media tersebut dimasukkan ke dalam erlenmeyer dan ditutup kapas. Erlenmeyer dibungkus dengan plastik tahan panas kemudian disterilisasi dalam autoklaf dengan suhu 121° C selama 15 menit.

3.4.3 Tahap Fermentasi (Sari, 2013)

Tahap pertama yang dilakukan adalah tahap fermentasi, dengan isi buah markisa ungu (*Passiflora edulis* var. Sims) dikeluarkan dan dibungkus dengan daun pisang, ditempatkan dalam wadah fermentasi, dikondisikan agar udara tidak masuk. Fermentasi dilakukan pada suhu ruang selama 72 jam.

3.4.4 Tahap Isolasi Bakteri Asam Laktat (Sari, 2013)

Proses isolasi BAL dari markisa ungu diawali dengan mengambil 5 gram sampel markisa asam yang telah difermentasi dan dimasukkan ke dalam 45 mL MRS Broth, lalu dihomogenkan sehingga didapatkan pengenceran 10^{-1} , kemudian diinkubasi dalam inkubator pada suhu 37° C selama 24 jam. Setelah inkubasi, sampel diencerkan menggunakan media pepton water di dalam tabung flakon. Pengenceran dilakukan secara bertingkat sampai 10^{-9} , dengan cara 1 ml dari pengenceran 10^{-1} ditambahkan ke dalam tabung flakon yang berisi 9 ml pepton water sehingga didapat pengenceran 10^{-2} , selanjutnya diambil 1 ml dari

pengenceran 10^{-2} ditambahkan ke dalam tabung flakon yang berisi 9 ml pepton water sehingga didapatkan pengenceran 10^{-3} dan seterusnya hingga didapatkan pengenceran 10^{-9} . Setelah itu dilakukan proses *plating*, kultur dari pengenceran 10^{-8} dan 10^{-9} diinokulasikan pada media MRS Agar dengan metode gores, lalu diinkubasi dalam inkubator pada suhu 37°C selama 48 jam. Koloni BAL tunggal yang tumbuh dimurnikan kembali dengan cara menginokulasikan koloni ke dalam media MRS Agar secara gores dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 48 jam. Isolat murni yang telah dihasilkan disimpan pada media MRS Agar miring untuk perlakuan selanjutnya.

3.4.5 Tahap Identifikasi Bakteri Asam Laktat

Karakterisasi Bakteri Asam Laktat dilakukan dengan identifikasi morfologi BAL dengan dua cara, yaitu identifikasi makroskopik dan mikroskopik yang dilakukan secara biokimia, mengacu pada *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology 9th*. Identifikasi makroskopik yang diamati adalah bentuk, warna, dan ukuran koloni BAL yang tumbuh pada media MRS Agar, sedangkan identifikasi mikroskopik yaitu bentuk sel dan identifikasi fisiologis dengan uji gram, uji katalase dan uji endospora.

3.4.5.1 Identifikasi Makroskopik

Koloni BAL tunggal yang telah dimurnikan diamati secara makroskopik. Setelah 48 jam, dilakukan pengamatan morfologi koloni berdasarkan bentuk, tepian, elevasi dan warna. Koloni bakteri asam laktat ditemukan berdasarkan perubahan warna media menjadi kuning muda (atau putih susu) di sekitar lokasi tumbuh koloni bakteri. Koloni tersebut kemudian dimurnikan dengan metode

quadrant streak pada media MRSA dan diinkubasi kembali selama 48 jam pada suhu ruang. Selanjutnya dilakukan subkultur koloni tunggal yang diperoleh pada media MRSA miring sebagai stok isolat untuk uji selanjutnya. Tiap jenis isolat (bakteri hasil isolasi) diidentifikasi karakter fisiologisnya menggunakan uji pewarnaan gram, uji katalase dan pewarnaan endospora.

3.4.5.2 Pewarnaan Gram

Identifikasi mikroskopik dilakukan dengan tahapan pewarnaan gram dengan cara mengambil sedikit isolat bakteri secara aseptik menggunakan jarum ose. Sampel dicampurkan pada 2 tetes aquades steril di atas kaca preparat, kemudian dikeringkan menggunakan api bunsen. Pewarnaan dilakukan dengan cara meneteskan larutan Kristal violet selama 1 menit, dibilas lalu diteteskan larutan iodin selama 3 menit. Preparat ditetesi dengan larutan alkohol 96% sampai warna ungu hilang. Kemudian, larutan safranin diteteskan dan dibiarkan menyerap selama 1 menit, dibilas dan dikeringkan menggunakan api bunsen. Pengamatan dilakukan di bawah mikroskop dengan perbesaran 1.000 x. Diamati bentuk sel dan warnanya. Jika bakteri berwarna merah keunguan menandakan bakteri tersebut termasuk golongan positif, dan berwarna merah muda termasuk golongan gram negatif.

3.4.5.3 Uji Katalase

Uji katalase dilakukan untuk mengetahui apakah bakteri tersebut memiliki enzim katalase untuk memproduksi efek toksik H_2O_2 . Uji katalase dilakukan dengan cara gelas obyek disemprot dengan etanol 70% sampai tidak terbentuk lapisan minyak. Biakan murni isolat BAL yang berumur 24 jam diambil sedikit

secara aseptis menggunakan jarum ose dan disuspensikan dengan aquades steril sebanyak 2 ose. Suspensi ditetesi dengan larutan H₂O₂ 3%, dan diamati pembentukan gelembung udara yang terjadi pada koloni dan sekitarnya. Terbentuknya gelembung menandai bahwa bakteri tersebut bersifat aerobik.

3.4.5.4 Pewarnaan Endospora

Pewarnaan endospora dilakukan dengan cara gelas obyek disemprot dengan etanol sebanyak 70 % sampai tidak terbentuk lapisan minyak kemudian diolesi dengan aquades steril sebanyak dua tetes. Biakan murni bakteri yang berumur 24 jam diambil sedikit secara aseptis menggunakan jarum ose dan disuspensikan dengan aquades steril yang ada di gelas obyek. Suspensi difiksasi dengan cara melewatkan gelas obyek di atas api bunsen sampai kering. Preparat kemudian ditetesi dengan malachite green dan ditutup preparat dengan kertas hisap. kemudian preparat diletakkan di atas pembakar spirtus 5-10 menit dan dijaga jangan sampai larutan kering. Diangkat kertas isap dan dicuci dengan air mengalir. Ditetesi larutan Safranin (2-3 tetes). Dibiarkan 30-45 detik, kemudian dibilas dengan air mengalir dan dikeringanginkan. Preparat diamati dengan mikroskop perbesaran 1000x yang sebelumnya telah ditetesi minyak emersi. Uji positif jika sel vegetatif berwarna merah dan spora berwarna hijau.

3.5 Identifikasi Menggunakan Microbact 12B

Isolat bakteri yang akan diidentifikasi disiapkan terlebih dahulu. Sebelum ditentukan menggunakan 12B/12E atau 24E, koloni bakteri dilakukan uji oksidase, jika hasil oksidase negatif menggunakan *Microbact system* 12B/12E saja, sedangkan jika hasil oksidasenya positif maka menggunakan 24E. Bakteri

gram negatif menggunakan Microbact 12E, sedangkan bakteri gram positif menggunakan Microbact 12B. Kemudian seluruh perangkat Mikrobaact 12B disiapkan, satu koloni bakteri yang telah diinkubasi selama 18-24 jam diambil kemudian dilarutkan kedalam 3-6 ml garam fisiologis pada tabung reaksi steril hingga homogen. Larutan bakteri yang telah homogen diteteskan kedalam sumur *Microbact* sebanyak 100 UI (4 tetes), untuk sumur Lysin, Omitin, dan H₂S ditambah dengan tetesan *mineral oil* sebanyak 1-2 tetes. Setelah itu *Microbact* diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam. *Microbact* yang telah diinkubasi diambil kemudian diteteskan 2 tetes reagent Nitrat A dan B pada sumur 7, pada sumur nomor 8 dengan *Indol Kovact* sebanyak 2 tetes, sumur nomor 10 dengan VP I dan VP II masing-masing satu tetes, dan sumur 12 dengan TDA sebanyak satu tetes. Perubahan warna tes pada tiap sumur yang berbeda dicatat (Oxoid, 2004; Microbiology Lab team, 2002).

Evaluasi hasil dilihat melalui sumur-sumur *microbact* apakah positif atau negatif dengan cara membandingkan dengan tabel 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*). Evaluasi hasil dilihat melalui sumur-sumur *microbact* apakah positif atau negatif dengan cara membandingkan dengan tabel warna (Oxoid, 2004 ; Microbiology Lab team, 2002).

3.6 Tahap Uji Produksi Eksopolisakarida Kasar (Modifikasi Halim, 2013)

Tahap berikutnya yang dilakukan adalah pengujian produksi Eksopolisakarida (EPS) kasar oleh BAL asal fermentasi Markisa Ungu

(*Passiflora edulis* var. Sims). Isolat BAL asal markisa asam ditumbuhkan dalam 25 mL MRSB. Dilanjutkan dengan pemisahan sel melalui proses sentrifugasi dingin 4°C 5000 rpm 30 menit. Sel bakteri akan mengendap di dasar tabung sebagai pellet dan dibuang. Supernatan diambil 10 mL untuk perlakuan selanjutnya dan didiamkan selama semalam setelah ditambah aseton teknis sebanyak 20 mL (2x volume sampel). Sentrifugasi larutan supernatan dan aseton teknis dilakukan dalam tabung sentrifuge 15 mL, sehingga digunakan 2 tabung sentrifuge untuk 1 sampel supernatan dari isolat bakteri. Tabung sentrifuge yang akan digunakan untuk sentrifugasi supernatan yang telah ditambah aseton teknis ditimbang terlebih dahulu, kemudian dilakukan proses sentrifugasi pada suhu 4°C dengan kecepatan 5000 rpm selama 30 menit. Eksopolisakarida kasar yang berada di dasar tabung dilarutkan dengan 10 mL aquades dan ditambah dengan asam trikloroasetat 80% sebanyak 250 µL untuk pengendapan dari protein yang tersisa dan didiamkan selama semalam. Dilakukan sentrifugasi kembali pada suhu 4°C dengan kecepatan 5000 rpm selama 30 menit. Pellet yang diperoleh dikeringkan pada suhu 100°C selama 15 menit dan ditimbang berat kering EPS beserta tabung. Berat tabung berisi EPS kemudian dikurangi berat tabung kosong sebelum perlakuan hingga didapatkan berat konstan, dimana selisih berat $\pm 0,02$ mg.

3.7 Analisis Data

Data yang diperoleh dari hasil identifikasi disajikan secara deskriptif kualitatif meliputi karakteristik makroskopis dan mikroskopis dari masing-masing isolat bakteri asam laktat (BAL) yang telah diisolasi dari fermentasi markisa ungu (*Passiflora edulis* var. Sims) dan nilai eksopolisakarida kasar yang dihasilkan.