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 meliputi karakteristik makroskopis dan mikroskopis dari masing-masing genus bakteri asam laktat yang berhasil diisolasi dari usus halus itik Mojosari (*Anas plathyrinchos*).

3.2 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian tentang isolasi dan identifikasi bakteri asam laktat pada usus halus itik Mojosari ini dilaksanakan pada bulan Juni sampai September 2011. Isolasi bakteri asam laktat dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi jurusan Biologi Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam negeri Maulana Malik Ibrahim Malang dan identifikasi bakteri asam laktat dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.

3.3 Alat dan Bahan Penelitian

3.3.1 Alat Penelitian

Alat-alat yang digunakan adalah cawan petri, erlenmeyer, tabung reaksi, timbangan analitik, gelas ukur, *beaker glass*, tip, *eppendorf*, inkubator, pipet tetes, *autoklaf*, oven, *shaker water bath*, *laminar air flow*, mikroskop, gunting, bunsen,

jarum ose, lemari es, mikropipet, pemanas (kompor) dan kamera untuk dokumentasi.

3.3.2 Bahan Penelitian

Sampel yang digunakan untuk isolasi bakteri asam laktat adalah usus halus itik Mojosari. Media yang digunakan dalam penelitian ini adalah media *De Man, Rogosa and Sharpe* (MRS) agar, MRS broth (MRSB), aquadest, alkohol 70 % untuk desinfektan, spirtus, alumunium foil, kantong plastik tahan panas plastik wape, kertas label, *blue tip*, *tissue* dan kapas secukupnya.

3.4 Cara Kerja

3.4.1 Tahap Persiapan

Alat penelitian berupa cawan petri, tabung reaksi, Erlenmeyer, blue tip sebelum digunakan disterilkan terlebih dahulu dalam autoklaf pada suhu 121 ^{0}C selama 15 menit. Semua bentuk kegiatan dilakukan secara aseptis.

3.4.2 Tahap Pembuatan Media

3.4.2.1 Media MRSA

Pembuatan media MRS agar 200 ml, yaitu mengukur 200 ml aquades kemudian menimbang MRS agar sebanyak 13,64 gram. Dipanaskan sampai mendidih sambil diaduk hingga larut, kemudian media tersebut dimasukkan ke dalam erlenmeyer dan ditutup kapas, kemudian disterilisasi dalam autoklaf dengan suhu 121 ^{0}C selama 15 menit.

3.4.2.1 Media MRSB

Pembuatan media MRS *broth* 300 ml, yaitu mengukur 300 ml aquades kemudian menimbang MRS *broth* sebanyak 15,66 gram. Dipanaskan sampai mendidih sambil diaduk hingga larut, kemudian media tersebut dimasukkan ke dalam erlenmeyer dan ditutup kapas, kemudian disterilisasi dalam autoklaf dengan suhu 121 ^{0}C selama 15 menit.

3.4.3 Tahap Pengambilan Sampel

Pengambilan usus dilakukan dengan cara itik disembelih dan diambil ususnya. Digesta yang berada di dalam usus dikeluarkan dengan cara ditekan dengan menggunakan ibu jari (*finger tumb*). Usus tersebut kemudian diletakkan di atas aluminium foil. Seluruh proses pengambilan sampel dilakukan secara aseptis di dekat api bunsen.

3.4.4 Tahap Isolasi Bakteri Asam Laktat (BAL)

Sampel usus seberat 5 gram dimasukkan ke dalam 45 ml media cair *De Man, Rogosa and Sharpe* (MRS) steril dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu ruang untuk mengadaptasikan bakteri asam laktat yang terdapat pada usus dengan media MRS cair. Setelah dilakukan inkubasi, dilakukan pengenceran berseri hingga 10^{-10} dengan cara sampel dalam MRS cair diambil sebanyak 1 ml dan dimasukkan ke dalam 9 ml aquades steril. Hasil pengenceran 10^{-3} samapi 10^{-10} ditanam ke dalam media MRS agar dengan metode tuang (*pour plate*) dan diinkubasi selama 48 jam pada suhu ruang. Setelah 48 jam, dilakukan pengamatan

morfologi koloni berdasarkan bentuk, tepian, elevasi, struktur dalam dan warna. Koloni bakteri asam laktat ditentukan berdasarkan perubahan warna media menjadi kuning muda di sekitar lokasi tumbuh koloni bakteri. Koloni tersebut kemudian dimurnikan dengan metode *quadrant streak* pada media MRS agar dan diinkubasi kembali selama 48 jam pada suhu ruang. Selanjutnya dilakukan subkultur koloni tunggal yang diperoleh pada media MRS agar miring pada tabung reaksi sebagai stok isolat untuk uji selanjutnya. Tiap jenis isolat (bakteri hasil isolasi) diidentifikasi karakter fisiologisnya menggunakan uji pewarnaan gram, uji katalase dan pewarnaan endospora dan motilitas.

3.4.5 Tahap Identifikasi

3.4.5.1 Pewarnaan Gram

Uji pewarnaan gram dilakukan untuk mengetahui jenis bakteri tersebut termasuk gram positif atau negatif. Pewarnaan gram 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 dengan menggunakan jarum ose dan disuspensikan dengan aquades steril yang ada di gelas obyek. Suspensi difiksasi dengan cara melewatkan gelas obyek tersebut di atas api bunsen sampai kering. Ditetesi larutan kristal violet (gram A) sebanyak 2-3 tetes dan dibiarkan selama 1 menit. Preparat dibilas dengan air mengalir dan dikeringanginkan. Kemudian preparat ditetesi larutan iodin (gram B) selama 1 menit, dilanjutkan dengan pemberian larutan alkohol (gram C) selama 30 detik

atau hingga warna hilang kemudian dibilas dengan air mengalir dan dikeringanginkan. Preparat ditetesi dengan larutan safranin (gram D) selama 30 detik dan dibilas dengan air mengalir kemudian dikeringanginkan. Preparat diamati dengan mikroskop perbesaran 1000x yang sebelumnya telah ditetesi minyak emersi. Bakteri gram negatif akan berwarna merah sedangkan bakteri gram positif akan berwarna ungu.

3.4.5.2 Uji Katalase

Uji katalase dilakukan untuk mengetahui apakah bakteri tersebut memiliki enzim katalase untuk mereduksi efek toksik H_2O_2. Uji katalase dilakukan dengan cara gelas obyek disemprot dengan etanol 70% sampai tidak terbentuk lapisan minyak. Gelas obyek diolesi dengan aquades steril sebanyak dua tetes. Biakan murni bakteri yang berumur 24 jam diambil sedikit secara aseptis dengan menggunakan jarum ose dan disuspensikan dengan aquades steril sebanyak dua ose. Biakan murni bakteri yang berumur 24 jam diambil sedikit secara aseptis dengan menggunakan jarum ose dan disuspensikan dengan aquades steril yang ada di gelas obyek. Suspensi ditetesi dengan larutan H_2O_2 3% selanjutnya diamati pembentukan gelembung udara (positif) yang terjadi pada koloni dan sekitarnya. Terbentuknya gelembung menandai bahwa bakteri tersebut bersifat aerobik.

3.4.5.3 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 72 jam diambil sedikit secara aseptis dengan menggunakan jarum ose dan disuspensikan dengan aquades steril yang ada di gelas obyek. Suspensi difiksasi dengan cara melewatkan gelas obyek tersebut di atas api bunsen sampai kering. Ditetesi *malachite green* dan ditutup preparat dengan kertas isap, 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.

3.4.5.4 Identifikasi dengan *Microbact 12B*

Satu koloni bakteri yang telah diinkubasi selama 18-24 jam diambil dengan menggunakan ose kemudian dilarutkan ke dalam 3-6 ml garam fisiologis pada tabung reaksi steril hingga homogen. Larutan bakteri yang telah homogen diteteskan ke dalam sumur *Microbact* sebanyak 100 UI (4 tetes), untuk sumur Lysin, Omitin, dan H_2S ditambah dengan tetesan *mineral oil* sebanyak 1-2 tetes. Setelah itu *Microbact* diinkubasi pada suhu 37 ^{0}C selama 18-24 jam. *Microbact* yang telah diinkubasi diambil kemudian diteteskan reagent 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. 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*). Nama bakteri dilihat dengan komputer berdasarkan angka *oktal* yang didapat.

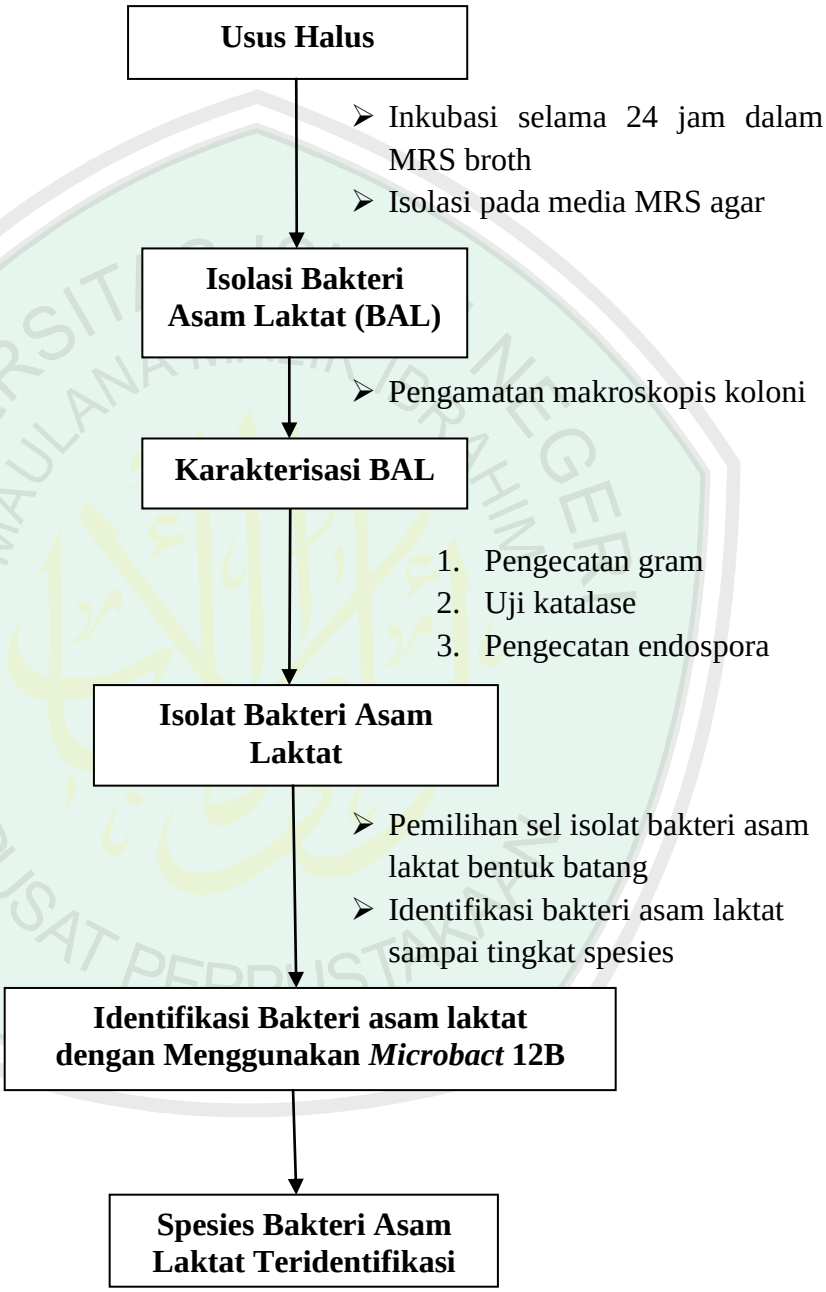
Keterangan perubahan warna hasil uji pada *Microbact 12B*

Nomor Sumur	**Nama Uji**	**Hasil**
1	Gelatin	Warna putih menunjukkan hasil uji (-) Warna hitam menunjukkan hasil uji (+)
2	Malonate	Warna kuning menunjukkan hasil uji (-) Warna biru menunjukkan hasil uji (+)
3	Inositol	Warna biru/ hijau menunjukkan hasil uji (-) Warna kuning menunjukkan hasil uji (+)
4	Sorbitol	Warna biru/ hijau menunjukkan hasil uji (-) Warna kuning menunjukkan hasil uji (+)
5	Rhamnose	Warna biru/ hijau menunjukkan hasil uji (-) Warna kuning menunjukkan hasil uji (+)
6	Sucrose	Warna biru/ hijau menunjukkan hasil uji (-) Warna kuning menunjukkan hasil uji (+)
7	Lactose	Warna biru/ hijau menunjukkan hasil uji (-) Warna kuning menunjukkan hasil uji (+)
8	Arabinose	Warna biru/ hijau menunjukkan hasil uji (-) Warna kuning menunjukkan hasil uji (+)
9	Adonitol	Warna biru/ hijau menunjukkan hasil uji (-) Warna kuning menunjukkan hasil uji (+)
10	Raffinose	Warna biru/ hijau menunjukkan hasil uji (-) Warna kuning menunjukkan hasil uji (+)
11	Salicin	Warna biru/ hijau menunjukkan hasil uji (-) Warna kuning menunjukkan hasil uji (+)
12	Arginine	Warna kuning/ hijau menunjukkan hasil uji (-) Warna biru menunjukkan hasil uji (+)

3.5 Analisis Data

Data yang diperoleh dari hasil isolasi dan identifikasi disajikan secara deskriptif meliputi karakteristik makroskopis dan mikroskopis dari masing-masing jenis bakteri asam laktat (BAL) yang berhasil diisolasi dari usus halus itik Mojosari.

UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM PUSAT PERPUSTAKAAN

3.6 Skema Penelitian

Skema penelitian dapat terangkum pada bagan dibawah ini: