

BAB III

PELAKSANAAN PENELITIAN

III.1 Alat dan Bahan yang Digunakan

Alat yang digunakan adalah alat – alat gelas, cawan petri, centrifugator (*Model DKC-1006T*), enkas, inkubator (*Memmert*), jangka sorong (*Tricle Brand*), *Laminar Air Flow* (*Envirco*), lemari pendingin (*Pannasonic*), autoklaf (*All American*), oven (*WTB Binder type E115*), paper disk, sentrifuge (*DSD 154*), shaker (*Gemmy orbit model VRN-480*), spektrofotometer UV – Vis dan timbangan analitik (*Chyo JL 200*).

Bahan-bahan yang digunakan adalah air suling, etanol 70%, larutan NaCl fisiologis, mikroba uji (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Candida albicans*) ATCC 1023, medium SNA (*Starch Nitrate Agar*), medium PDA (*Potato Dextrose Agar*), medium NA (*Nutrien Agar*), medium SNB (*Starch Nitrate Broth*), medium produksi dan sampel tanah.

III.2 Metode Kerja

III.2.1 Sterilisasi Alat

Alat-alat yang digunakan dicuci bersih dengan detergen lalu dibilas dengan air mengalir dan terakhir dengan air suling. Selanjutnya dikeringkan, dibungkus dan disterilkan. Tabung reaksi dan labu Erlenmeyer terlebih dahulu disumbat dengan kapas bersih. Alat yang terbuat dari gelas disterilkan dalam oven pada suhu 180°C selama 2 jam,

sedangkan alat-alat yang tidak tahan pemanasan tinggi dan berskala disterilkan dalam otoklaf pada suhu 121°C , tekanan 2 atm selama 15 menit. Jarum ose disterilkan dengan cara pemanasan langsung hingga memijar dengan menggunakan api bunsen. (24,25)

III.2.2 Pembuatan Medium

Bahan-bahan yang disiapkan untuk pembuatan medium NA (*Nutrien Agar*), medium PDA (*Potato Dextrose Agar*), medium produksi, medium SNA (*Starch Nitrate Agar*), medium SNB (*Starch Nitrate Broth*), medium glukosa, mediul laktosa, medium sukrosa, medium oksidasi fermentasi, medium FTM, medium indol, medium starch agar, ditimbang sesuai dengan komposisi medium yang akan dibuat, lalu dilarutkan dengan air suling steril, dan dipanaskan serta disterilkan dengan menggunakan outoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit. (26,27)

III.2.3 Pengambilan dan Penyiapan Sampel

III.2.3.1 Pengambilan Sampel

Sampel tanah diambil di sekitar pembuangan limbah pabrik gula tebu Takalar di wilayah kecamatan Polombangkeng Utara Kabupaten Takalar dengan menggunakan pipa paralon yang telah disemprot alkohol 70% pada kedalaman 5 - 20 cm dari permukaan tanah. Sampel yang telah diambil kemudian dimasukkan ke dalam botol steril dan disimpan dalam *coolbox*.

III.2.3.2 Pra-Perlakuan Sampel

Sampel tanah yang diambil dipanaskan dalam oven pada suhu 60 °C selama 4 jam (28).

III.2.3.3 Pembuatan Suspensi Sampel

Dalam pembuatan suspensi sampel dilakukan 2 perlakuan yaitu sampel yang dilakukan pra perlakuan dan sampel yang tidak dilakukan pra perlakuan. Sampel tanah ditimbang sebanyak 10 gram lalu dimasukkan ke dalam botol pengencer dan dicukupkan dengan air suling steril hingga 100 ml. Sampel yang telah dilarutkan dalam 100 ml air steril diambil 10 ml (pengenceran 10^{-1}). Suspensi sampel pengenceran 10^{-1} kemudian dibuat pengenceran 10^{-2} sampai pengenceran 10^{-3} .

III.2.4 Pembiakan Mikroba dan Isolasi Biakan

III.2.4.1 Pembiakan Mikroba

Suspensi sampel dari setiap pengenceran diambil 1 ml secara aseptis, kemudian dimasukkan kedalam cawan petri, lalu ditambahkan 20 ml medium Starch Nitrate Agar (SNA) dan medium Potato Dextrose Agar (PDA) lalu homogenkan. Kemudian diinkubasi selama 1 minggu pada suhu 28 °C.

III.2.4.2 Seleksi dan Isolasi Biakan

Setelah diinkubasi dilakukan pengamatan terhadap koloni yang tumbuh. Koloni ini selanjutnya diisolasi dan dipindahkan pada medium yang sama. Isolasi dilakukan berulang-ulang hingga diperoleh biakan

murni yang hanya terdiri dari satu macam koloni. Biakan murni tersebut lalu dipindahkan pada agar miring sebagai stok.

III.2.5 Penentuan Aktivitas Antibiotik Isolat Mikroba

III.2.5.1 Penentuan Aktivitas Antibakteri

Identifikasi awal dari mikroba yang menghasilkan senyawa antibiotik dilakukan dengan uji hayati sebagai berikut : semua isolat bakteri ditumbuhkan kedalam media SNA, kemudian cakram mikroba yang berumur 7 hari inkubasi pada media SNA ditempat dipermukaan media NA yang telah berisi bakteri uji. Kemudian diinkubasi pada suhu 37^oC selama 1 x 24 jam. Masing-masing isolat diamati kemampuannya menghambat bakteri uji yang ditandai dengan terbentuknya zona bening disekitar cakram uji dan di evaluasi : >20 mm (penghambatan kuat), 5-10 mm (penghambatan sedang) and <5 mm (penghambatan lemah). Isolat bakteri yang stabil membentuk zona jernih pada 3 kali pengujian dipilih sebagai isolat untuk pengujian selanjutnya.

III.2.5.2 Penentuan Aktivitas Antifungi

Identifikasi awal dari mikroba yang menghasilkan senyawa antibiotik dilakukan dengan uji hayati sebagai berikut : semua isolat jamur ditumbuhkan kedalam media PDA, kemudian cakram jamur yang berumur 7 hari inkubasi pada media PDA, ditempat dipermukaan media PDA yang telah berisi jamur uji. Kemudian diinkubasi pada suhu 25^oC selama 3 x 24 jam. Masing-masing isolat diamati kemampuannya menghambat bakteri uji yang ditandai dengan terbentuknya zona jernih disekitar cakram uji dan

di evaluasi : >20 mm (penghambatan kuat), 5-10 mm (penghambatan sedang) and <5 mm (penghambatan lemah). Isolat yang stabil membentuk zona jernih pada 3 kali pengujian dipilih sebagai isolat untuk pengujian selanjutnya. (29)

III.2.6 Fermentasi Biakan Murni

Isolat aktif dibuat prekulturr pada labu erlenmeyer 50 ml yang mengandung 10 ml medium cair SNB, lalu diinkubasi pada suhu kamar selama 3 x 24 jam dan dikocok dengan menggunakan shaker dengan kecepatan 150 rpm. Prekultur (starter) sebanyak 10 ml dipindahkan kedalam gelas erlenmeyer yang berisi 100 ml medium produksi, diinkubasi pada suhu kamar 28^oC selama 11 hari pada kondisi tergojok pada laju penggojokan 150 rpm. Hasil fermentasi disonikasi selama 15 menit, kemudian di sentrifuge 3000 rpm selama 15 – 30 menit lalu disaring. Hasil filtrat tersebut kemudian di uji. (29)

III.2.7 Penyiapan Mikroba Uji

III.2.7.1 Peremajaan Mikroba Uji

Bakteri uji berupa *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* masing-masing diambil satu ose lalu diinokulasi dengan cara digoreskan pada medium NA miring lalu diinkubasi pada suhu 37^oC selama 1 x 24 jam.

Dan untuk khamir / fungi uji yaitu *Candida albicans* diambil satu ose lalu diinokulasi dengan cara digoreskan pada medium PDA miring, lalu diinkubasikan pada suhu 25^oC selama 3 x 24 jam. (29)

III.2.7.2 Pembuatan Suspensi Mikroba Uji

Mikroba uji yang telah diremajakan disuspensikan dengan larutan NaCl fisiologis steril lalu diukur transmitannya pada 25% T menggunakan spektrofotometer. Sebagai blanko digunakan larutan NaCl fisiologis, sedangkan untuk mikroba uji khamir dibuat suspensi dengan cara yang sama tetapi dengan pengukuran transmittan pada 75%. (29)

III.2.8 Pengujian Aktivitas Antibiotik

Suspensi mikroba uji sebanyak 1 ml dimasukkan ke dalam 15 ml medium NA yang telah didinginkan sekitar 35°C, dihomogenkan kemudian dibiarkan hingga setengah memadat. Setelah itu diletakkan paper disk yang sudah ditetesi dengan filtrat hasil fermentasi secara aseptis sebanyak 20 µl. Diinkubasi pada suhu 37°C selama 1 x 24 jam.

Dan untuk khamir / fungi uji digunakan medium PDA dan diinkubasi pada suhu 25°C selama 3 x 24 jam. Daerah hambatan berupa zona bening disekitar paper disk. (29)

III.2.9 Karakterisasi Mikroba

III.2.9.1 Pengamatan Morfologi dengan Pewarnaan Gram

Objek glass dibersihkan dengan alkohol 75% kemudian fiksasi, selanjutnya diambil 1 ose bakteri secara aseptis dan digores diatas obyek glass lalu diratakan. Difiksasi kembali diatas lampu spiritus. Setelah dingin ditetaskan cat Gram A (Kristal violet) 2-3 tetes selama 1 menit, kemudian dicuci dengan air mengalir dan dikeringkan. Setelah itu ditetesi dengan Gram B (Iodium) selama 1 menit, dicuci dengan air mengalir dan

dikeringkan. Kemudian ditetesi dengan Gram C (alkohol 96%) selama 30 detik, dicuci dengan air mengalir dan dikeringkan. Terakhir ditetesi dengan Gram D (Safranin) selama 45 detik, lalu dicuci dengan air mengalir dan kelebihan air dihilangkan dengan tissue. Diamati bentuk dan warna sel dibawah mikroskop.

III.2.9.2 Uji Glukosa, laktosa, Sukrosa

Dengan ose steril pertumbuhan mikroba diambil dan diinokulasikan kedalam medium Glukosa, Laktosa dan Sukrosa. Selanjutnya diinkubasi selama 3x24 jam pada suhu 37⁰ C. Perubahan warna dari hijau menjadi kuning menyatakan hasil positif.

III.2.9.3 Uji Katalase

Gelas objek ditetesi dengan 2 tetes hidrogen peroksida 3% kemudian secara aseptik diinokulasikan dengan biakan murni dan dicampur dengan baik. Hasil positif ditandai dengan terbentuknya gelembung udara.

III.2.9.4 Uji Oksidasi Fermentasi

Dengan ose steril pertumbuhan mikroba diambil dan diinokulasikan kedalam medium Oksidasi fermentasi. Selanjutnya diinkubasi selama 4x24 jam pada suhu 37⁰ C. Perubahan warna menjadi kuning menyatakan hasil positif.

III.2.9.5 Uji Hidrolisis Polisakarida

Dengan ose steril pertumbuhan mikroba diambil dan diinokulasikan ke dalam medium starch agar (SA). Selanjutnya diinkubasi selama 3x24

jam pada suhu 37⁰ C. setelah diinkubasi ditambahkan iod pada medium. Hasil positif jika terdapat zona bening pada bekas goresan.

III.2.9.6 Uji Produksi Indol

Dengan ose steril pertumbuhan mikroba diambil dan diinokulasikan kedalam medium tripton 1%. Selanjutnya diinkubasi selama 2x24 jam pada suhu 37⁰ C. setelah diinkubasi diteteskan 1-2 tetes reagen kovac. Hasil positif jika terdapat cincin merah.

III.2.9.7 Uji FTM

Dengan ose steril pertumbuhan mikroba diambil dan diinokulasikan kedalam medium FTM Selanjutnya diinkubasi selama 3x24 jam pada suhu 37⁰ C. Hasil positif jika terdapat kekeruhan pada medium yang menandakan tumbuhnya bakteri.