

BAB III

METODE PENELITIAN

1.1. Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan dalam penelitian ini yaitu jenis penelitian deskriptif. Metode penelitian deskriptif merujuk pada pemaparan hasil penelitian berupa deskripsi atau gambaran peristiwa yang terjadi selama penelitian dilakukan. Penggunaan metode penelitian deskriptif ini dimaksudkan untuk dapat menjelaskan isolasi dan karakteristik bakteri selulotik yang terdapat pada usus larva BSF yang memiliki pakan berbeda.

1.2. Populasi dan Sampel

Populasi pada penelitian ini yaitu seluruh bakteri yang terdapat pada usus larva BSF yang diberi pakan berbeda yaitu dedak dan sayuran. Sedangkan sampel pada penelitian ini yaitu bakteri yang berasal dari usus larva BSF yang diidentifikasi dan diisolasi.

1.3. Alat dan Bahan

1.3.1. Alat

Alat yang digunakan pada penelitian ini yaitu inkubator, oven, autoclave, timbangan analitik, colony counter, mikroskop binokuler, magnetic stirrer with hot plate, vortex, mikropipet, pipet tetes, lemari pendingin dan peralatan laboratorium mikrobiologi seperti cawan petri (Petri Dish), tabung reaksi, gelas ukur, rak tabung, tabung Durham, dan gelas Durham.

1.3.2. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu usus larva BSF, medium kaldu nutrisi agar (KNA), medium SIM (*Sulfide Indole Motility*), medium agar lipid, medium Simmons Citrate, medium agar pati, medium MR-VP, medium gelatin, dan medium fermentasi karbohidrat yaitu fermentasi glukosa, laktosa, sukrosa, dan dextrosa. Kemudian larutan fisiologis berupa larutan NaCl 0,9%, larutan H₂O₂, lugol, alkohol 70%, larutan alkohol 96%, methyl red, kristal violet, larutan Alpha-naphthol, reagen

Kovac's, Bromocresol purple (BCP), pH universal, aquades, alumunium foil, plastik tahan panas, kapas, plastik wrap, dan kertas label.

1.4. Prosedur Penelitian

1.4.1. Tahap Persiapan

1. Persiapan Alat dan Bahan

Seluruh alat dan bahan yang digunakan dalam penelitian ini disiapkan, diperiksa ketersediaan dan fungsinya. Alat dan bahan yang digunakan dibungkus menggunakan plastik tahan panas, kemudian dilakukan sterilisasi menggunakan autoclave dengan suhu 121°C, tekanan sebesar 1,5 atm selama 15 menit. Tahap persiapan ialah persiapan alat dan bahan yang akan digunakan selama penelitian. Alat dan bahan yang akan digunakan disterilisasi terlebih dahulu sebelum digunakan. Alat yang akan disterilisasi dibungkus dengan kertas hingga rapat selanjutnya dibungkus dengan plastik dan bahan yang perlu disterilisasi dimasukkan ke dalam wadah kaca setelah itu dibungkus dengan kertas hingga rapat selanjutnya dibungkus dengan plastik. Sterilisasi dengan cara dimasukkan ke dalam *Autoclave* selama 15-20 menit pada suhu 121°C dan tekanan 1 atm (Lay & Hastowo, 1992). Kegiatan ini dilakukan di Laboratorium Riset Departemen Pendidikan Biologi FPMIPA UPI dan Laboratorium Mikrobiologi Balai Pusat Penelitian Tanaman Sayuran (Balitsa) Lembang..

2. Pembuatan Media Uji Biokimia

Pembuatan media nutrisi agar (NA) dilakukan pemasukan seluruh bahan dan separuh jumlah aquades yang akan digunakan, kecuali Agar dan CMC ke dalam gelas beaker. Kemudian gelas beaker yang berisi sebagian bahan media CMC dipanaskan dengan heater dan diaduk dengan magnetic stirrer atau batang kaca pengaduk. Lalu diatur tingkat keasamannya dengan NaOH 1 M atau H₂SO₄ 1 M. Terakhir, dimasukkan Agar, lalu CMC secara sedikit demi sedikit dan aduk hingga tercampur rata. Media cair CMC mudah merangkap gas, sehingga perlu panas yang tidak terlalu tinggi untuk mengurangi jumlah gelembung yang telalu banyak.

1.4.2. Tahap Penelitian

1. Ekstraksi Saluran Pencernaan Larva BSF

Sepuluh larva BSF yang berusia Instar 4 diambil dari stok larva BSF yang berukuran cukup besar, lalu dibilas dengan akuades steril selama 10 menit. Setelah dilakukan pembilasan dengan akuades, dilakukan pembilasan dengan alkohol 70% untuk mematikan mikroba yang terdapat pada kulit larva. Setelah itu, dibilas kembali dengan akuades steril untuk menghilangkan alkohol 70% pada kulit larva BSF.

Ekstrak bakteri didapatkan dengan cara melakukan pemotongan dengan silet/pisau bedah/cutter di bagian ruas ketiga dari bagian mulut larva. Setelah bagian kepala terpisah dari badannya, keluarkan bagian sistem pencernaannya dengan cara menahan bagian tersebut lalu ditarik dengan ujung pisau/cutter hingga bagian tersebut terpisah dengan bagian tubuh lainnya. Perlu diperhatikan bahwa setelah melakukan pembedahan, perlu mencuci bagian pisau/cutter/silet agar tidak tumpul, atau mengganti dengan yang baru.

2. Pemiakan Murni Isolasi Bakteri

Isolasi bakteri diawali dengan pengenceran cawan tuang. Prinsipnya yaitu pengenceran bertingkat. Pada penelitian ini dilakukan lima kali pengenceran. Pengenceran pertama diambil 100 µl suspensi mikroba dan dimasukkan ke vial 1.5 mL yang berisi 900 µl ddH₂O dan dihomogenkan, selanjutnya dilakukan pengenceran dengan mengambil 100 µl suspensi mikroba dari hasil pengenceran sebelumnya dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi baru yang berisi 900 µl ddH₂O dan terus berulang hingga tiga kali pengenceran dan menghasilkan pengenceran 10⁻³. Suspensi mikroba hasil pengenceran 10⁻¹, 10⁻², 10⁻³ dan dituangkan sebanyak 100 µl pada cawan petri, selanjutnya ditambahkan medium kaldu nutrisi agar 900 µl yang masih cair ke dalam cawan petri tersebut. Medium ditunggu hingga membeku. Cawan petri yang berisi medium ditutup dengan cawan petri yang lebih besar, lalu dibungkus dengan kertas dan plastik untuk mencegah terjadinya kontaminasi. Cawan petri berisi medium dan bakteri diinkubasi pada suhu 37°C selama 24-48 jam. Biakan campuran yang tumbuh pada hasil

Faiz Rosyad, 2023

ISOLASI DAN IDENTIFIKASI BAKTERI SELULOTIK DARI SISTEM PENCERNAAN LARVA LALAT BLACK SOLDIER FLY (HERMATIA ILLUCENS) DENGAN MENGGUNAKAN METODE UJI BIOKIMIA

Universitas Pendidikan Indonesia | repository.upi.edu | perpustakaan.upi.edu

pengenceran diambil yang paling memungkinkan yaitu yang tidak terlalu menumpuk dan tidak sedikit (Marista, 2013).

3. Uji Aktivitas Biokimia

1) Hidrolisis Pati

Uji ini digunakan untuk melihat kemampuan enzim amilase dalam isolat bakteri dalam menghidrolisis pati (amilum). Isolat bakteri lalu digoreskan pada media agar pati kemudian diinkubasi selama 24 jam, setelah itu kultur bakteri ditetesi dengan iodin selama beberapa menit lalu iodin dibuang.. zona bening yang terbentuk di sekitar koloni bakteri uji pada pati yang telah ditetesi iodin/lugol menandakan hasil positif dari uji ini, sementara hasil berwarna biru kehitaman menandakan bahwa amilum tidak terurai oleh enzim amilase (Chuniasih et al., 2023).

2) Hidrolisis Lipid

Uji ini digunakan untuk melihat kemampuan enzim lipase dalam isolat bakteri dalam menghidrolisis lipid (lemak) menjadi gliserol dan asam lemak. Isolat bakteri lalu digoreskan pada media agar lipid kemudian diinkubasi selama 24 jam, setelah itu kultur bakteri ditetesi dengan minyak.. zona bening yang terbentuk di sekitar koloni bakteri dan hilangnya minyak menandakan bahwa bakteri tersebut memiliki enzim lipase yang dapat menguraikan lipid.

3) Hidrolisis Casein

Uji ini digunakan untuk melihat kemampuan enzim proteolitik dalam isolat bakteri dalam menghidrolisis protein menjadi asam amino. Isolat bakteri lalu digoreskan pada media agar casein kemudian diinkubasi selama 24 jam, setelah itu kultur bakteri ditetesi dengan susu skim. zona bening yang terbentuk di sekitar koloni bakteri dan hilangnya minyak menandakan bahwa bakteri tersebut memiliki enzim proteolitik yang dapat menguraikan protein pada susu.

4) Hidrolisis Gelatin

Uji ini digunakan untuk melihat kemampuan enzim amilase dalam isolat bakteri dalam menghidrolisis pati (amilum). Isolat bakteri lalu digoreskan pada media agar pati kemudian diinkubasi selama 24 jam, setelah itu kultur bakteri ditetesi dengan iodin

Faiz Rosyad, 2023

ISOLASI DAN IDENTIFIKASI BAKTERI SELULOTIK DARI SISTEM PENCERNAAN LARVA LALAT BLACK SOLDIER FLY (HERMATIA ILLUCENS) DENGAN MENGGUNAKAN METODE UJI BIOKIMIA

Universitas Pendidikan Indonesia | repository.upi.edu | perpustakaan.upi.edu

selama beberapa menit lalu iodine dibuang.. zona bening yang terbentuk di sekitar koloni bakteri uji pada pati yang telah ditetesi iodine/lugol menandakan hasil positif dari uji ini, sementara hasil berwarna biru kehitaman menandakan bahwa amilum tidak terurai oleh enzim amilase (Chuniasih et al., 2023).

5) Hidrolisis Gula

Uji hidrolisis gula pada bakteri digunakan untuk melihat kemampuan bakteri dalam menghidrolisis gula menjadi senyawa yang lebih sederhana, seperti glukosa atau fruktosa. Uji ini dapat dilakukan dengan menumbuhkan bakteri pada media yang mengandung gula, seperti glukosa, laktosa, atau sukrosa, dan mengamati terbentuknya gas atau asam yang dihasilkan dari proses hidrolisis Uji ini dapat membantu dalam mengidentifikasi kemampuan bakteri dalam menghasilkan enzim hidrolase yang dapat memecah gula menjadi senyawa yang lebih sederhana Uji hidrolisis gula pada bakteri dapat digunakan untuk mengidentifikasi bakteri yang memiliki kemampuan hidrolitik atau kemampuan untuk menghidrolisis gula (Choirunnisa et al., 2018)

6) Uji Katalase

Uji Katalase dilakukan dengan meneteskan hidrogen peroksida (H_2O_2) 3% pada gelas objek yang berisi koloni bakteri. Cuplik koloni bakteri dengan menggunakan lup ose, lalu diletakan pada gelas objek bersih. Ratakan sebaran larutan H_2O_2 dengan menggunakan lup Ose. Amati apakah terjadi pembentukan gelembung udara atau tidak. Bakteri dikatakan positif uji katalase jika terjadi pembentukan gelembung gas yang merubah H_2O_2 menjadi Oksigen dan Air.(Reiner, 2010)

7) Uji H₂S, Indol dan Motilitas

Uji H₂S dan uji Motilitas dilakukan secara bersamaan dalam satu medium uji yaitu medium uji SIM (*Sulfide Indole Motility*). Medium ini terdiri dari peptone, agar, beef extract, ferro amonium sulfat dan sodium thiosulfat dalam aquades. Sebanyak satu ose isolat bakteri ditusukkan kedalam medium uji SIM dan diinkubasi pada suhu 35°C selama 24 jam.

Uji indole yaitu menggunakan medium yang digunakan pada uji SIM. Bakteri yang diuji diambil sebanyak 1 loop menggunakan jarum ose dan di inokulasi pada media kaldu tryptone. Dilakukan inkubasi pada suhu 35°C selama 18-24 jam.

Faiz Rosyad, 2023

ISOLASI DAN IDENTIFIKASI BAKTERI SELULOTIK DARI SISTEM PENCERNAAN LARVA LALAT BLACK SOLDIER FLY (*HERMATIA ILLUCENS*) DENGAN MENGGUNAKAN METODE UJI BIOKIMIA

Universitas Pendidikan Indonesia | repository.upi.edu | perpustakaan.upi.edu

Kemudian tambahkan 1-2 tetes reagen Kovac's kedalam tabung medium dan aduk atau homogenkan selama 10 menit. Hasil positif ditandai dengan adanya cincin berwarna merah pada permukaan medium (Volk dan Wheeler, 1993).

8) Uji Metil Red dan Voges-Prokauer

Inokulasi satu ose bakteri menggunakan jarum ose dilakukan ke dalam media *Methyl Red* (MR). inkubasi dilakukan pada suhu 35°C selama 48 jam. Kemudian tambahkan reagen MR ke dalam tabung MR dan lakukan inkubasi kembali selama 48 jam. Hasil positif ditandai dengan perubahan warna medium menjadi merah, yang berarti asam dan hasil negatif ditandai dengan tidak terjadi perubahan warna pada media (Sudarsono, 2008). Bakteri yang akan diuji dilakukan inokulasi ke dalam kaldu medium MR – VP dan dilakukan inkubasi selama 48 jam dengan suhu 35°C. Tambahkan tetesan alpha-naphthol 0,6 ml ke dalam medium tersebut lalu homogenkan dan tambahkan 0,2 ml KOH 40%. Hasil positif ditunjukkan dengan perubahan warna menjadi warna merah.

9) Uji Simmon Citrate

Medium simon citrate terdiri dari media agar, sodium sitrat NaCl, K₂HPO₄, (NH₄) H₂PO₄, MgSO₄.7H₂O dan *Bromothymol blue* didalam larutan aquades. Lakukan inokulasi bakteri satu ose isolat secara zig-zag di permukaan agar miring pada media simmon sitrat da inkubasi pada suhu 35°C selama 24 jam. Hasil positif ditandai dengan berubahnya warna menjadi biru dan hasil negatif ditandai dengan tidak adanya perubahan warna pada media (Sudarsono, 2008).

10) Seleksi Bakteri Selulolitik pada Media *Carboxymethyl Cellulose* (CMC)

Pengamatan pada bakteri selulolitik media CMC dilakukan dengan melihat koloni bakteri yang tumbuh pada media dengan melakukan pengamatan terhadap ciri-ciri termasuk warna koloni, bentuk koloni, dan bentuk tepi koloni. Dilakukan pencatatan untuk jumlah koloni total dan total koloni tunggal dan melakukan inokulasi pada media baru untuk mendapatkan biakan murni. Koloni yang tumbuh selanjutnya diwanai oleh *Congo Red* 0,1% dan dibiarkan 20 menit kemudian dibilas dengan larutan NaCl 1%. Zona bening yang terbentuk diukur menggunakan penggaris untuk dihitung Indeks Selulolitik (IS) (Rahayu *et al.*, 2014).

Faiz Rosyad, 2023

ISOLASI DAN IDENTIFIKASI BAKTERI SELULOTIK DARI SISTEM PENCERNAAN LARVA LALAT BLACK SOLDIER FLY (*HERMATIA ILLUCENS*) DENGAN MENGGUNAKAN METODE UJI BIOKIMIA

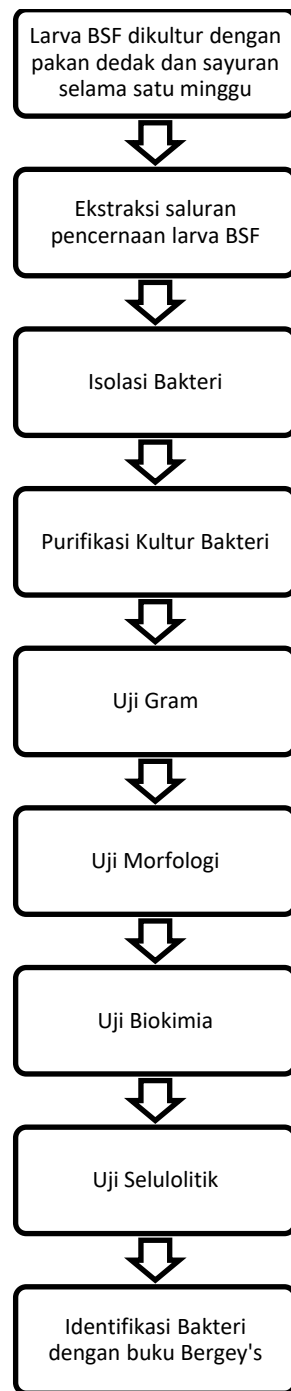
Universitas Pendidikan Indonesia | repository.upi.edu | perpustakaan.upi.edu

$$\text{Indeks selulolitik} = \frac{\text{Diameter zona bening} - \text{Diameter koloni}}{\text{Diameter koloni}}$$

1.5. Analisis Data

Data yang didapatkan dilakukan analisis secara deskriptif untuk mendeskripsikan temuan dari hasil penelitian yang sudah dilakukan secara sistematis dan ilmiah. Hasil uji terhadap isolat bakteri yang diperoleh dilakukan sebagai upaya untuk mengidentifikasi bakteri berdasarkan karakter biokimia dengan merujuk pada buku “*Bergey’s Manual of Determinative Bacteriology 9th edition*”. (Bergey dan Holt, 2000)

1.6. Bagan Alir Penelitian



Bagan 1. Bagan Alir Penelitian