

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **A. Jenis Penelitian**

Penelitian ini merupakan jenis penelitian dasar dengan menggunakan metode deskriptif. Metode deskriptif adalah suatu penelitian untuk membuat deskripsi, gambaran atau lukisan secara sistematis, faktual dan akurat mengenai fakta-fakta, sifat-sifat serta hubungan antar fenomena yang diselidiki (Nazir, 1988)

#### **B. Sampel Penelitian**

Sampel dalam penelitian ini berupa sampah organik pertanian dari wilayah pertanian, sampah organik pasar dari wilayah pasar dan sampah organik rumah tangga dari wilayah pemukiman. Sampling dilakukan dari masing-masing wilayah dengan tiga titik pengambilan sampel.

#### **C. Waktu dan Lokasi Penelitian**

Penelitian ini dimulai pada bulan Juli 2011 sampai dengan Februari 2012 yang dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi Universitas Pendidikan Indonesia, Jalan Dr. Setiabudhi No.229 Bandung.

#### **D. Alat dan Bahan Penelitian**

Peralatan yang digunakan pada penelitian ini terdapat di Laboratorium Mikrobiologi Universitas Pendidikan Indonesia. Alat-alat yang digunakan selama penelitian ini bisa dilihat pada Lampiran 2A, sedangkan daftar bahan-bahan yang digunakan pada penelitian ini bisa dilihat pada Lampiran 2B.

#### **E. Langkah Kerja**

Penelitian ini dibagi menjadi 2 tahap yaitu tahap persiapan dan tahap penelitian.

##### **1. Tahap Persiapan**

Tahap ini meliputi persiapan alat dan bahan yang selanjutnya dilakukan proses sterilisasi terlebih dahulu sebelum digunakan dalam penelitian. Bahan yang perlu disterilisasi dimasukkan ke dalam wadah kaca yang bersih dan diberi sumbat serta dibungkus oleh plastik sebelum di sterilisasi. Alat-alat kaca dan plastik yang akan digunakan dicuci terlebih dahulu dan dikeringkan. Alat kemudian dibungkus dengan kertas pembungkus setelah itu dilakukan sterilisasi panas lembab dengan cara dimasukkan ke *autoclave* selama 15-20 menit pada suhu 121°C dan tekanan 15 lb. Kegiatan ini dilakukan di dalam Laboratorium Mikrobiologi Jurusan Pendidikan Biologi FPMIPA UPI.

## 2. Tahap Penelitian

### a. Pengambilan sampel

Sampah organik dicuplik dari beberapa lokasi di Bandung yang sudah ditentukan yaitu daerah pertanian (tiga titik lokasi pengambilan sampel di sekitar Cikole-Lembang, Kabupaten Bandung Barat), pasar (Pasar Lembang, Pasar Geger Kalong Tengah, Pasar Sederhana-Sukajadi) dan wilayah pemukiman (Ledeng, Geger Kalong Girang, Cilimus). Dari masing-masing titik lokasi pengambilan diambil 500 gram sampah organik berupa sampah sayuran, buah-buahan, sisa makanan dan daun pembungkus makanan. Kemudian sampah dicacah kecil-kecil dan dihancurkan dengan belender untuk selanjutnya dilakukan pengenceran sebelum diinokulasikan pada media isolasi Agar *Carboxy Methyl Cellulose* (CMC).

### b. Pemiakan Isolat Bakteri

Isolasi bakteri selulolitik dilakukan dengan metode cawan sebar (cawan tuang). 10 gram sampel yang sudah dihancurkan dengan belender diencerkan ke dalam 90 ml akuades steril secara aseptik, selanjutnya dibuat seri pengenceran sampai pengenceran  $10^{-6}$ . Setelah itu dari seri pengenceran  $10^{-6}$  diambil satu milliliter dan diinokulasikan pada media isolasi (Hasibuan, 2005 dan Syulami, dkk. 2009). Media isolasi yang digunakan adalah Agar CMC dan diinkubasi selama  $7 \times 24$  jam pada suhu  $30^{\circ}\text{C}$ .

### **c. Pengamatan Karakteristik Morfologi Koloni dan Isolasi Biakan Murni Bakteri**

Pengamatan morfologi dilakukan 7×24 jam masa inkubasi. Pengamatan morfologi bakteri merujuk kepada Cappuccino (2005), ciri morfologi koloni yang diamati mulai dari bentuk, warna, kenampakan bakteri (mengkilat atau suram), kenaikan permukaan (elevasi), kepekatan koloni dan tepian. Koloni-koloni yang tumbuh pada cawan Petri yang berisi medium Agar CMC 1% merupakan biakan campuran bakteri selulolitik yang tumbuh dari sampah organik. Setiap koloni dipindahkan 1 ose ke dalam tabung reaksi berisi Medium CMC 1% miring agar sehingga diperoleh biakan murni. Hal tersebut dilakukan untuk mempermudah dalam tahap identifikasi selanjutnya.

### **d. Seleksi dan Uji Aktivitas Selulase Bakteri Selulolitik**

Setelah mendapatkan isolat murni selanjutnya isolat bakteri diuji aktivitas selulasenya dan diuji pertumbuhannya pada suhu 50°C (Meryandini, 2009). Setiap isolat dari Medium Agar CMC 1% ditotolkan pada cawan petri yang berisi Medium Agar CMC 1%, kemudian di inkubasi 48 jam dan setelah masa inkubasi berakhir selanjutnya dilakukan pewarnaan *congo red* untuk memperjelas zona bening yang terbentuk dengan menggunakan *congo red* 0,01%, didiamkan selama 15 menit dan bilas dengan Larutan NaCl 1M . Jika ada daerah bening di sekitar koloni menandakan adanya hidrolisis selulosa oleh enzim selulase (Jalgaonwala,et al, 2011). Bila hasil dari kedua uji ini positif

maka selanjutnya isolat diuji dengan uji-uji selajutnya sebagai dasar identifikasinya.

#### **e. Pewarnaan Gram**

Pewarnaan Gram dilakukan untuk memastikan karakteristik dan bentuk sel bakteri. Pembuatan preparat dengan metode pewarnaan Gram. Masing-masing isolat dari kultur murni bakteri yang telah berumur 24 jam dibuat sediaan mikroskopiknya, kemudian sediaan digenangi karbol kristal violet. Setelah dibiarkan selama tiga menit, kelebihan zat warna dibuang dan ditetesi lugol hingga menggenangi sediaan selama 45-60 detik. Selanjutnya sediaan dimasukkan ke dalam *staining jar* berisi alkohol 96%, digoyang selama satu menit lalu dibilas dengan aquades dan dikeringkan dengan kertas isap. Safranin dituangkan di atas sediaan yang telah kering dan dibiarkan selama tiga menit. Setelah itu dicuci dengan aquades menggunakan botol semprot dan dikeringkan di udara. Sediaan yang akan diamati, diberi minyak imersi terlebih dahulu. Pengamatan dilakukan di bawah mikroskop dengan menggunakan perbesaran 1000 kali. Hasil pewarnaan berwarna ungu jika sel bakteri berjenis Gram positif dan berwarna merah jika berjenis Gram negatif (Cappuccino & Sherman, 2005).

#### **f. Pewarnaan Endospora**

Pewarnaan Endospora dilakukan untuk memastikan karakteristik ada tidaknya endospora dan letak endospora pada sel bakteri. Dari setiap isolat murni bakteri yang telah berumur 16 jam dibuat sediaan mikroskopik, kemudian difiksasi

panas, lalu ditetesi dengan larutan malakit hijau di atas sediaan mikroskopik yang telah dialasi kertas isap pada permukaan sediaan. Kegiatan tersebut dilakukan secara terus menerus selama 5 menit di atas penangas dan dijaga agar pewarna tidak kering. Kelebihan pewarna dicuci dengan air mengalir dan dikeringkan. Selanjutnya, sediaan tersebut digenangi kembali dengan safranin selama 1 menit, lalu dicuci dengan air mengalir, dan dibiarkan kering. Sediaan yang akan diamati, diberi minyak imersi terlebih dahulu. Pengamatan dilakukan dibawah mikroskop dengan menggunakan perbesaran 1000 kali. Endospora akan terlihat berwarna hijau, sedangkan sel vegetatif berwarna merah (Cappuccino & Sherman, 2005).

#### **g. Uji Biokimiawi**

##### **1) Uji Fermentasi Karbohidrat**

Uji ini dilakukan untuk mengetahui kemampuan isolat bakteri dalam memfermentasi karbohidrat dengan menggunakan tiga jenis gula, yaitu: glukosa, laktosa dan sukrosa sebagai mediumnya yang telah ditambahkan indikator *brom cressol purple* (bcp). Cara pengujiannya adalah dengan menginokulasikan isolat ke dalam medium lalu diinkubasi selama 1-2x24 jam pada suhu 30°C. Warna kuning dan adanya gelembung/gas pada tabung Durham menunjukkan hasil yang positif (Cappuccino & Sherman, 2005).

## 2) Uji Hidrolisis Pati, Lipid, Gelatin dan Kasein

### a) Hidrolisis Pati

Hidrolisis pati menggunakan Medium Agar Pati. Pati dapat dihidrolisis oleh mikroorganisme tertentu dengan hasil akhir dekstrin. Medium Agar Pati dicairkan dalam penangas air, dinginkan suhunya sampai 45°C. Medium dituangkan ke dalam cawan Petri steril. Setelah medium membeku, masing-masing isolat bakteri diinokulasikan ke dalam Medium Agar Pati dan diinkubasi pada suhu 30°C selama 24 jam. Setelah terlihat adanya pertumbuhan, larutan iodium/lugol diteteskan di sekitar koloni bakteri pada medium tumbuh dan dibiarkan selama beberapa menit. Jika terbentuk daerah bening di sekitar koloni menandakan terjadinya hidrolisis pati oleh enzim amilase (Cappuccino & Sherman, 2005).

### b) Hidrolisis Lipid

Hidrolisis lipid menggunakan Medium Lipid Agar. Medium Lipid Agar yang telah ditambahkan indikator *Neutral red*, dicairkan dalam penangas air, didinginkan suhunya sampai 45°C. Medium dituangkan ke dalam cawan Petri steril. Setelah medium membeku, masing-masing isolat bakteri diinokulasikan ke dalam Medium Lipid Agar dan diinkubasi pada suhu 30°C selama 24 jam. Kemudian pertumbuhan di sekitar koloni diamati. Hasil uji hidrolisis lipid positif apabila terdapat zona bening di sekitar koloni dan perubahan medium lipid menjadi warna merah pada bagian

bawah koloni bakteri. Hal ini disebabkan terbentuknya asam lemak mengakibatkan pH medium menurun (Cappuccino & Sherman, 2005).

### c) Hidrolisis Gelatin

Hidrolisis Gelatin menggunakan Medium *Nutrient* Gelatin. Masing-masing isolat bakteri diinokulasikan ke dalam Medium *Nutrient* Gelatin kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 30°C, kemudian disimpan pada inkubator dengan suhu 4°C selama 30 menit. Gelatin yang telah dihidrolisis akan tetap cair meskipun disimpan pada suhu 4°C. Beberapa mikroorganisme mampu menghidrolisis gelatin karena dapat menghasilkan eksoenzim proteolitik yang disebut gelatinase (Cappuccino & Sherman, 2005).

### d) Hidrolisis Kasein

Hidrolisis kasein menggunakan Medium Susu Skim Agar. Medium Susu Skim Agar dicairkan dalam penangas air, didinginkan suhunya sampai 45°C. Kemudian medium dituangkan ke dalam cawan Petri steril. Setelah medium membeku, masing-masing isolat bakteri diinokulasikan ke dalam Medium Susu Skim Agar dan diinkubasi pada suhu 30°C selama 24 jam. Pertumbuhan di sekitar koloni bakteri diamati. Hasil uji hidrolisis kasein positif apabila terdapat zona bening di sekitar koloni (Cappuccino & Sherman, 2005).

### 3) Uji Katalase

Uji katalase menggunakan Medium Kaldu Nutrien Agar (KNA). Medium KNA dicairkan dalam penangas air, dinginkan suhunya sampai 45°C. Medium dituangkan ke dalam cawan Petri steril. Setelah medium membeku, masing-masing isolat bakteri diinokulasikan ke dalam Medium KNA dan diinkubasi pada suhu 30°C selama 24 jam. Setelah terlihat adanya pertumbuhan, larutan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3% diteteskan di atas permukaan koloni dan dibiarkan selama beberapa menit. Jika terdapat gelembung udara di atas permukaan koloni, maka mikroorganisme tersebut menghasilkan enzim katalase (Cappuccino & Sherman, 2005).

### 4) Uji Motilitas

Isolat bakteri diinokulasikan pada Medium *Sulfide Indol Motily* (SIM) Agar dengan cara stab kemudian dilihat pertumbuhannya, jika bakteri tersebut bersifat motil maka terdapat pertumbuhan di sekitar strip bakteri yang diinokulasi dan medium menjadi keruh, sedangkan apabila bakteri tidak bersifat motil maka tidak terlihat pertumbuhan sama sekali di sekitar strip dari inokulasi bakteri tersebut (Cappuccino & Sherman, 2005).

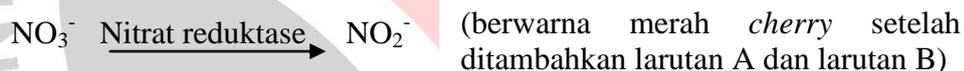
### 5) Uji Produksi H<sub>2</sub>S

Isolat bakteri diinokulasikan ke dalam Medium *Sulfide Indol Motily* (SIM) Agar kemudian diinkubasi pada suhu 30°C selama 1-2x 24 jam. Hasil positif

(terbentuknya  $H_2S$ ) ditandai dengan perubahan warna medium menjadi hitam (Cappuccino & Sherman, 2005).

## 6) Uji Reduksi Nitrat

Isolat bakteri diinokulasikan ke dalam Medium *Trypticase Nitrate Broth*. Setelah itu diinkubasi pada suhu  $30^\circ C$  selama 1 x 24 jam. Kemudian medium ditetesi 3-4 tetes larutan A (asam sulfanilik) dan larutan B (*alpha-naphthylamin*) di atas permukaan kultur, didiamkan beberapa menit kemudian lihat perubahan yang terjadi. Perubahan warna medium putih kekuningan menjadi merah *cherry* menunjukkan reaksi positif uji reduksi nitrat. Berikut ini adalah reaksi yang terjadi:



Untuk medium yang tidak mengalami perubahan warna, selanjutnya ditambahkan *zinc powder* secukupnya, dan diamati perubahan yang terjadi. Pada kultur yang tidak mengalami perubahan warna setelah ditambahkan larutan A dan larutan B, *zinc powder* bisa mereduksi nitrat yang ada menjadi nitrit. Sehingga, jika terjadi perubahan warna medium putih kekuningan menjadi merah *cherry*, maka reaksi menunjukkan negatif karena hal itu membuktikan bahwa nitrat pada kultur tersebut tidak direduksi oleh bakterinya. Sedangkan, bila tidak menunjukkan perubahan warna, maka reaksi menunjukkan positif dalam uji reduksi nitrat (Cappuccino & Sherman, 2005).

## 7) Uji Urease

Uji urease menggunakan *Medium Urea Base*. Masing-masing isolat bakteri diinokulasi ke dalam *Medium Urea Base* kemudian diinkubasi pada suhu 30°C selama 1-2x 24 jam. Reaksi positif ditunjukkan dengan adanya perubahan warna medium dari kuning menjadi pink yang sangat pekat (Cappuccino & Sherman, 2005).

## 8) Uji IMViC

Uji IMViC digunakan untuk membedakan bakteri enterik (Family Enterobacteriaceae, seperti *E. coli* dan *Enterobacter*). Terdiri dari Uji Indol, Uji Methyl Red dan Voges-Proskauer (MR-VP), serta uji sitrat. Uji IMViC tersebut dipaparkan sebagai berikut:

### a) Uji Indol

Uji ini dilakukan untuk mengetahui apakah bakteri dapat membentuk indole dari degradasi asam amino tryptophan karena tidak semua bakteri mampu mendegradasi tryptophan menjadi bentuk indol. Medium yang digunakan untuk pengujian ini adalah medium *tryptone broth*, uji ini dilakukan dengan cara menginokulasi masing-masing isolat bakteri ke dalam *tryptone broth* lalu diinkubasi selama 1x24 jam. Setelah inkubasi, kemudian ditambahkan beberapa tetes *reagen Kovac's* pada kultur broth tersebut. Pada pengujian ini kultur broth yang telah di tetesi *reagen Kovac's* tidak perlu dihomogenkan. Hasil positif menunjukkan warna merah muda pada permukaan *broth* sedangkan hasil negatif menunjukkan warna kuning

atau cokelat pada permukaan broth. Warna merah muda ini terbentuk karena indole yang dihasilkan oleh bakteri bereaksi dengan para dimetilaminobenzaldehyd (p-dimetilaminobenzaldehyd) yang terkandung dalam reagen Kovac's (Cappuccino & Sherman, 2005).

#### **b) Uji Methyl Red (MR)**

Medium yang digunakan untuk pengujian ini adalah medium MR-VP broth. Uji Methyl Red (MR) digunakan untuk menentukan apakah glukosa dapat diubah menjadi produk asam seperti asam laktat, asam asetat, atau asam format. Uji ini dilakukan dengan cara menginokulasi masing-masing isolat bakteri ke dalam MRVP broth lalu diinkubasi selama 1x24 jam. Setelah diinkubasi kemudian ditambahkan 3-5 tetes *methyl red* pada masing-masing tabung reaksi lalu dihomogenkan. Hasil positif menunjukkan warna merah muda pada broth. Hasil negatif menunjukkan warna kuning (Cappuccino & Sherman, 2005).

#### **c) Uji Voges-Proskauer (VP)**

Medium yang digunakan untuk pengujian ini adalah medium MR-VP broth. Uji Voges-Proskauer (VP) digunakan untuk menentukan apakah glukosa dapat diubah menjadi asetil metil karbinol. Uji ini dilakukan dengan cara menginokulasi masing-masing isolat bakteri ke dalam MRVP broth lalu diinkubasi selama 1x24 jam. Setelah diinkubasi kemudian ditambahkan 5 tetes reagen VP A (yang mengandung naphtol) dan ditambahkan pula 5

tetes reagen VP B (yang mengandung KOH), kemudian dikocok hingga homogen. Sebelum memvonis hasilnya, dibiarkan dahulu selama 15-20 menit agar bereaksi. Reaksi positif akan terlihat dengan adanya perubahan warna menjadi pink atau merah yang mengindikasikan adanya kehadiran aseton. Sedangkan reaksi negatif pada broth adalah tidak berubahnya warna medium atau menjadi warna tembaga (Cappuccino & Sherman, 2005).

**d) Uji *Simmon's* sitrat**

Medium yang digunakan untuk pengujian ini adalah medium *Simmon's* sitrat agar. Uji ini dilakukan untuk mengetahui apakah bakteri tersebut dapat mengonversi sitrat (salah satu senyawa antara dalam siklus *Kreb's*) menjadi oksaloasetat. Caranya adalah dengan menggesekan 1 ose isolat murni pada agar miring sitrat lalu inkubasi selama 24-48 jam. Interpretasi setelah inkubasi: reaksi positif adalah berubahnya warna medium dari hijau menjadi warna biru. Sedangkan reaksi negatif terjadi apabila tidak terjadi perubahan warna pada medium (tetap hijau) (Cappuccino & Sherman, 2005).

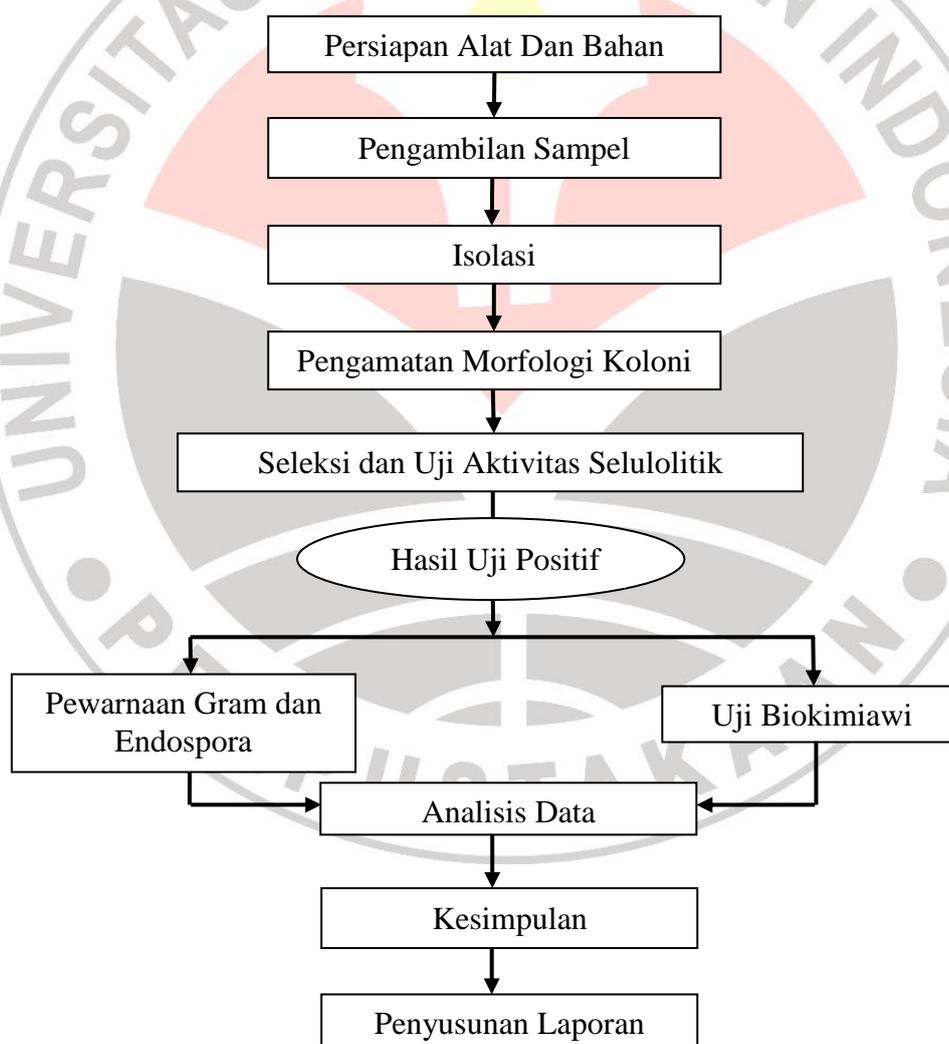
**F. Analisis Data**

Setelah sampling sampah organik dari beberapa sumber selesai dilakukan dan dihasilkan isolat murni pada medium agar miring, maka kultur bakteri dari sampah organik kemudian diuji aktivitas selulase serta diuji pertumbuhannya pada suhu 50°C dan selanjutnya diidentifikasi melalui reaksi pewarnaan Gram, pewarnaan endospora, dan uji biokimia sehingga diketahui karakteristik bakteri

selulolitik pengurai sampah organik. Identifikasi bakteri berpedoman pada Buku *Cowan and Steel's Manual for the Identification of Medical Bacteria Third Edition* (1993) dan *Bergey's Manual Of Systematic Bacteriology Ninth Edition* (1994).

### G. Alur Penelitian

Alur penelitian dapat dilihat pada Gambar 3.1



**Gambar 3.1** Alur penelitian