

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Jenis Penelitian

Jenis penelitian ini merupakan penelitian deskriptif yang akan mendeskripsikan mikroflora internal pada fase larva, pupa dan dewasa *Graphium agamemnon* dengan cara isolasi dan identifikasi.

3.2 Desain Penelitian

Penelitian ini dilakukan melalui 2 tahap yaitu tahap pra penelitian dan tahap penelitian. Pada tahap pra penelitian dilakukan persiapan alat, bahan dan spesimen. Pada tahap ini juga dilakukan pembedahan pada setiap fase objek penelitian yang digunakan yaitu fase larva, pupa dan dewasa dari *Graphium agamemnon* untuk mengetahui bagian-bagian organ pencernaan yang akan diisolasi seperti saluran pencernaan depan (*foregut*), saluran pencernaan tengah (*midgut*) dan saluran pencernaan belakang (*hindgut*) serta dilakukan isolasi mikroflora saluran pencernaan dengan metode pengenceran cawan tuang yang bertujuan untuk mengetahui pengenceran yang tepat untuk dapat digunakan dalam tahap penelitian. Pada tahap penelitian, isolasi mikroflora dilakukan dengan metode pengenceran cawan tuang pada media NA (*Nutrient Agar*) dan MCA (*MacConkey Agar*) yang selanjutnya akan dilakukan kultur murni dan identifikasi.

Identifikasi mikroflora terdiri dari identifikasi makroskopis, identifikasi mikroskopis dan uji biokimia. Identifikasi makroskopis meliputi pengamatan jumlah, bentuk, tepian, elevasi dan warna koloni. Identifikasi mikroskopis meliputi penentuan jenis Gram, uji KOH pewarnaan endospora dan bentuk sel dengan menggunakan mikroskop sedangkan untuk uji biokimia disesuaikan dengan jenis Gram. Untuk uji biokimia bakteri Gram positif meliputi uji katalase, uji oksidase, uji SIM (*Sulfide Indole Motility*), uji urease dan uji reduksi nitrat sedangkan untuk

bakteri Gram negatif uji biokimia meliputi uji oksidase, uji fermentasi karbohidrat, uji reduksi nitrat, uji MR (*Methyl Red*), uji VP (*Voges Proskauer*), uji SIM (*Sulfide Indole Motility*), uji sitrat, uji urease dan uji reduksi nitrat. Setelah isolasi dan identifikasi selesai, selanjutnya dilakukan penentuan genus dari masing-masing isolat berdasarkan karakteristik biokimia yang mengacu pada *Cowan and Steel's Manual For The Identification of Medical Bacteria* (Barrow dan Feltham, 1993), *Isolasi dan Identifikasi Bakteri Klinik* (Soemarno, 2000) dan *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (Holt dkk, 1994).

3.3 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Bioteknologi Departemen Pendidikan Biologi, Fakultas Pendidikan Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Pendidikan Indonesia. Penelitian ini berlangsung dari bulan September sampai Desember 2019.

3.4 Populasi dan Sampel

Populasi yang digunakan dalam penelitian ini yaitu mikroflora yang terdapat pada saluran pencernaan depan, saluran pencernaan tengah dan saluran pencernaan belakang *Graphium agamemnon* pada setiap fase, sementara itu sampel yang digunakan adalah masing-masing koloni mikroflora yang diisolasi dari saluran pencernaan depan, tengah dan belakang.

3.5 Alat dan Bahan

Alat dan bahan yang digunakan dalam penelitian secara lengkap terlampir pada lampiran 1.

3.6 Prosedur Penelitian

Pada tahap pra penelitian, dilakukan persiapan alat dan bahan, pembuatan bahan dan media, pengambilan spesimen, pengamatan anatomi saluran pencernaan

dan penelitian pendahuluan. Langkah kerja dari masing-masing tahapnya adalah sebagai berikut :

3.6.1 Persiapan Alat dan Bahan

Sebelum penelitian dimulai dilakukan persiapan alat dan bahan yang akan dibutuhkan saat penelitian seperti menghitung jumlah dan memastikan ketersediaan alat dan bahan pada Laboratorium Riset Bioteknologi.

3.6.2 Pembuatan Larutan dan Media

Bahan dan medium yang dibutuhkan untuk kultur mikroflora yaitu larutan NaCl, air destilasi, alkohol, medium NA dan medium MCA. Setelah bahan dan medium selesai dibuat kemudian dilakukan sterilisasi dengan autoklaf pada suhu 121 °C selama 15 menit. Proses pembuatan bahan dan media yang digunakan dalam penelitian secara lengkap terlampir pada lampiran 2.

3.6.3 Pengambilan Spesimen

Objek penelitian didapatkan secara liar dari pohon inangnya yaitu pohon glodokan (*Polyathia longifolia*) dan ditempatkan dalam wadah kemudian dengan segera dibawa ke Laboratorium Riset Bioteknologi untuk dilakukan isolasi. Pengambilan fase larva dan pupa diambil pada daun inang secara langsung sedangkan fase dewasa *Graphium agamemnon* diambil dengan menggunakan *insect net*.

3.6.4 Pengamatan Anatomi Saluran Pencernaan

Pada tahap ini dilakukan pembedahan pada setiap fase untuk lebih mengetahui bagian-bagian saluran pencernaan menggunakan gunting bedah, pinset dan pisau bedah untuk memisahkan bagian saluran pencernaan dengan bagian tubuh. Setelah terpisah dilakukan pengamatan untuk mengetahui secara detail bagian-bagian saluran pencernaannya dan kemudian saluran pencernaan dipisah dan dibagi menjadi 3 bagian yaitu saluran pencernaan depan saluran pencernaan tengah dan saluran pencernaan belakang.

3.6.5 Penelitian Pendahuluan

Pada tahap ini juga dilakukan isolasi masing-masing saluran pencernaan yang bertujuan mendapatkan pengenceran yang tepat untuk dapat digunakan pada tahap penelitian. Isolasi dilakukan dengan menggunakan metode pengenceran cawan tuang dari pengenceran 10^{-1} sampai pengenceran 10^{-6} . Dari uji pendahuluan didapatkan pengenceran yang tepat untuk digunakan dalam tahap penelitian adalah 10^{-1} dan 10^{-2} karena pada pengenceran selanjutnya tidak ditemukan kembali mikroflora yang tumbuh.

Pada tahap penelitian, dilakukan isolasi mikroflora, identifikasi makroskopis dan mikroskopis serta uji biokimia. Langkah kerja dari masing-masing tahapnya adalah sebagai berikut :

3.6.6 Isolasi Mikroflora

Pengambilan organ pencernaan dilakukan secara aseptik pada *Laminar Air Flow*. Fase larva, pupa dan dewasa *Graphium agamemnon* terlebih dahulu dimatikan dengan cara dimasukkan ke dalam *freezer* selama 1 jam. Organ pencernaan diambil dari 3 ekor pada setiap fase dengan membedah menggunakan pinset, pisau bedah dan gunting bedah yang steril pada larutan NaCl 0,9%. Sebelum pembedahan, dilakukan penyumbatan pada bagian kepala dan bagian *anal* dengan menggunakan *sewing silk* kemudian dilakukan sterilisasi permukaan tubuh dengan menggunakan alkohol 70% selama 1 menit dan dibilas menggunakan air destilasi steril. Pembedahan dilakukan dari bagian *thorax* sampai *abdomen* kemudian masing-masing bagian saluran pencernaan dipisahkan sehingga didapatkan bagian saluran pencernaan depan, tengah dan belakang kemudian diencerkan dengan menggunakan 2 ml cairan fisiologis (NaCl 0,9%) dan dihaluskan. Supernatan diambil dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi untuk dilakukan pengenceran sampai pengenceran 10^{-2} .

Sampel kemudian diisolasi dengan metode lempeng tuang pada medium NA dan MCA kemudian diinkubasi selama 24-48 jam pada suhu 28 °C. Setelah masa inkubasi dan koloni bakteri telah tumbuh pada masing-masing media, selanjutnya dilakukan identifikasi makroskopis. Masing-masing koloni dikultur kembali pada media agar miring NA untuk mendapatkan kultur murni dan sebagai stok untuk identifikasi lebih lanjut, kultur murni diinkubasi selama 24-48 jam pada suhu 28 °C.

3.6.7 Identifikasi Makroskopis dan Mikroskopis

Identifikasi makroskopis terdiri dari pengamatan morfologi koloni seperti bentuk, elevasi, tepian dan warna koloni bakteri yang tumbuh pada masing-masing media. Identifikasi mikroskopis terdiri dari pewarnaan Gram, pewarnaan endospora dan pengamatan bentuk sel. Pewarnaan Gram dilakukan dengan cara membuat sediaan mikroskopik dari isolat bakteri kemudian dituangi kristal violet dan dibiarkan selama 3 menit. Setelah itu, kelebihan warna dibuang kemudian ditambahkan larutan lugol dan dibiarkan kembali selama 1 menit kemudian sediaan dimasukkan ke dalam larutan alkohol 96% selama 1 menit. Selanjutnya sediaan dituangi safranin dan dibiarkan selama 3 menit kemudian bilas dengan air dan dikeringkan. Setelah kering, sediaan diamati menggunakan mikroskop. Hasil pewarnaan akan menunjukkan sel bewarna ungu untuk bakteri Gram positif dan merah untuk bakteri Gram negatif (Syulasmis dkk, 2017). Untuk memastikan jenis Gram, dilakukan uji KOH pada kaca objek dengan meneteskan larutan KOH 3% pada kaca objek kemudian isolat bakteri diambil dengan menggunakan ose dan dicampurkan kemudian dihomogenkan secara perlahan. Terbentuknya sel yang lengket menunjukkan jenis bakteri Gram negatif sedangkan bakteri Gram positif tidak menunjukkan sel yang lengket (Cappucino dan Sherman, 2014).

Pewarnaan endospora dilakukan menurut Wirtz Conklin (1900) yang menggunakan malakit hijau dan safranin. Pewarnaan endospora dilakukan

dengan cara membuat sediaan mikroskopik kemudian sediaan ditambahkan malakit hijau dan dipanaskan sampai keluar uap selama 3-6 menit kemudian sediaan dibilas dengan akuades. Setelah dibilas, sediaan ditambahkan safranin dan didiamkan selama 30-60 menit kemudian dibilas kembali dengan akuades kemudian sediaan dikeringkan. Setelah kering, sediaan diamati menggunakan mikroskop. Hasil pewarnaan akan menunjukkan spora yang berwarna hijau dengan badan bakteri berwarna kemerah-merahan (Soemarno, 2000).

3.6.8 Uji Biokimia

Setelah identifikasi makroskopis dan mikroskopis di dapatkan jenis Gram dari masing-masing isolat selanjutnya dilakukan pembuatan media uji biokimia. Uji biokimia terdiri dari beberapa uji yaitu uji oksidase, uji katalase, uji fermentasi karbohidrat, uji reduksi nitrat, uji MR-VP, uji SIM dan uji urease. Proses pembuatan media uji biokimia tercantum pada lampiran 2. Prosedur masing-masing uji biokimia adalah sebagai berikut :

3.6.8.1 Uji Katalase

Uji Katalase dilakukan dengan meneteskan H_2O_2 3% pada kaca objek steril kemudian isolat bakteri diambil menggunakan ose selanjutnya dicampurkan ke atas kaca objek steril yang telah ditetesi H_2O_2 3%. Hasil positif ditandai dengan terbentuknya gelembung udara (Cappuccino dan Sherman, 2014).

3.6.8.2 Uji Oksidase

Isolat bakteri diambil dengan ose dan digoreskan pada kertas *oxidase strip*. Tunggu selama 1 menit, kemudian hasil diamati. Hasil positif ditandai dengan perubahan warna menjadi biru sedangkan hasil negatif ditandai dengan tidak adanya perubahan warna pada kertas (UK SMIs, 2019).

3.6.8.3 Uji Fermentasi Karbohidrat

Isolat bakteri diinokulasi pada 1 tabung reaksi yang berisi medium phenol red laktosa, 1 tabung phenol red sukrosa dan 1 tabung phenol red dektrosa dengan tabung Durham. Kemudian diinkubasi selama 24 jam dan amati perubahan warna medium dan gelembung pada tabung Durham. Perubahan warna media menjadi berwarna kuning menunjukkan kemampuan bakteri untuk menguraikan karbohidrat (Syulasmi dkk, 2017).

3.6.8.4 Uji Reduksi Nitrat

Isolat bakteri diinokulasi pada medium nitrat dengan tabung Durham kemudian diinkubasi pada suhu 28 °C selama 24-48 jam. Setelah inkubasi, medium ditetesi reagen A (Sulfanilic acid) dan reagen B (α -naphthylamine) sebanyak 5 tetes ke dalam medium kemudian amati perubahan warna medium. Hasil positif ditandai dengan perubahan warna medium menjadi merah. Untuk medium yang tidak mengalami perubahan warna selanjutnya ditambahkan *Zinc powder*, jika terjadi perubahan warna medium menjadi merah maka reaksi menunjukkan negatif dan bila tidak menunjukkan perubahan warna, maka reaksi menunjukkan hasil positif dalam uji reduksi nitrat (Cappuccino dan Sherman, 2014).

3.6.8.5 Uji SIM

Isolat bakteri diinokulasikan pada medium SIM agar menggunakan ose dengan posisi tegak kemudian diinkubasi pada suhu 28 °C. Bakteri yang tumbuh menyebar menunjukkan bahwa bakteri tersebut bersifat motil sedangkan bakteri yang tumbuh tidak menyebar bersifat tidak motil. Untuk uji H₂S hasil positif ditandai dengan perubahan warna medium menjadi hitam sedangkan untuk uji indol hasil positif ditandai dengan adanya lapisan berwarna merah pada permukaan kultur setelah ditetesi dengan reagen Kovac (Cappuccino dan Sherman, 2014).

3.6.8.6 Uji MR-VP

Uji MR dilakukan dengan menginokulasikan bakteri ke dalam medium MR-VP broth kemudian diinkubasi pada suhu 28 °C selama 24 jam. Hasil positif ditandai dengan perubahan warna medium menjadi merah setelah ditetesi indikator MR sebanyak 5 tetes. Untuk uji VP, bakteri diinokulasikan pada medium MR-VP broth kemudian diinkubasi pada suhu 28 °C selama 24 jam. Kultur kemudian ditetesi 10 tetes Barrit A (Alfa naftol 5%) dan 10 tetes Barrit B (KOH 40%) setelah itu, didiamkan selama 15-20 menit. Hasil positif ditunjukkan dengan adanya perubahan warna medium menjadi merah (Cappuccino dan Sherman, 2014).

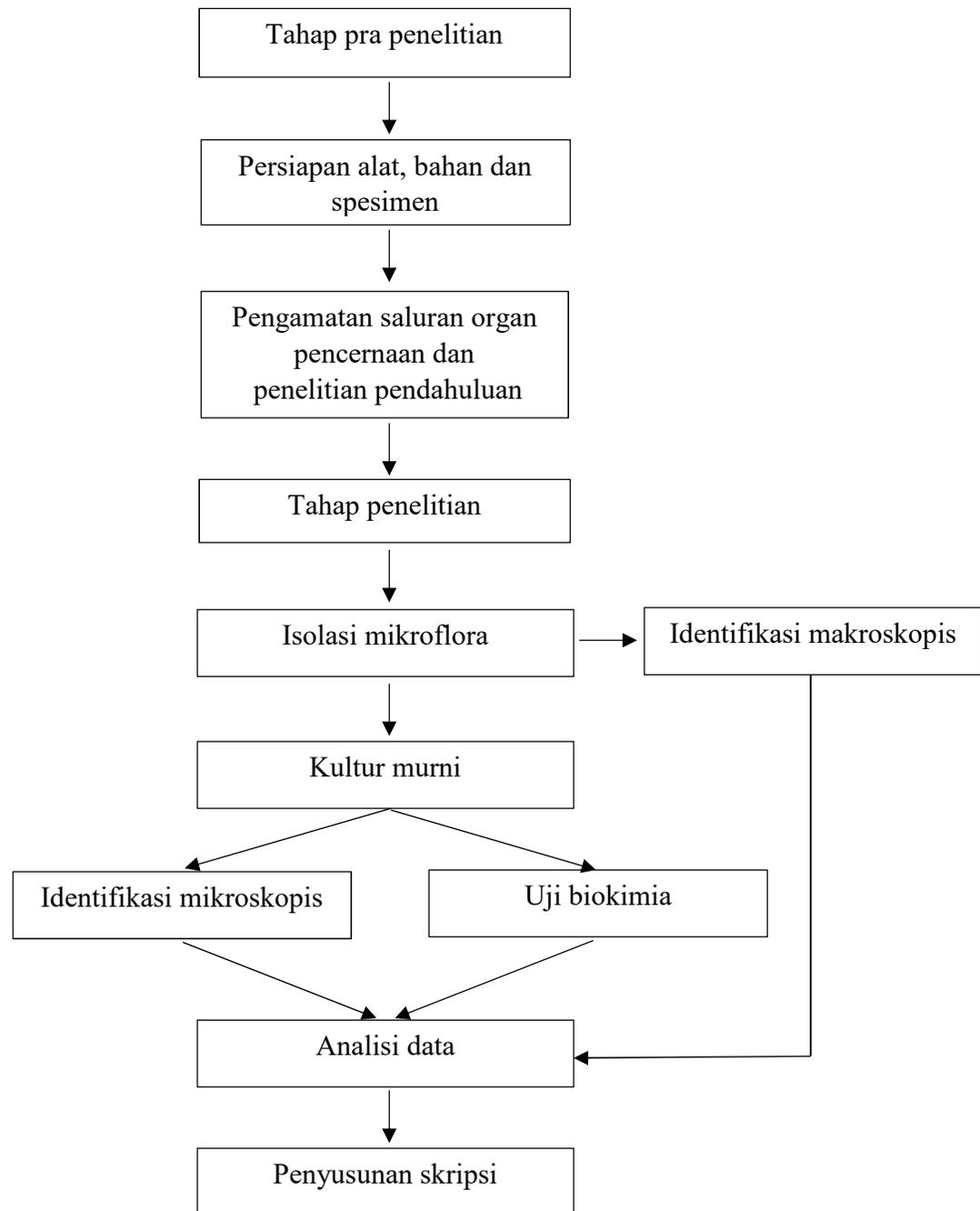
3.6.8.7 Uji Sitrat

Bakteri diinokulasikan pada medium *Simmons citrate* agar kemudian diinkubasi pada suhu 28 °C selama 24-48 jam. Hasil positif ditandai dengan adanya perubahan warna medium dari hijau menjadi biru tua (Cappuccino dan Sherman, 2014).

3.6.8.8 Uji Urease

Bakteri diinokulasikan pada medium *Christensen's urea* agar kemudian diinkubasi pada suhu 28 °C selama 24 jam. Perubahan warna medium diamati setelah 6 dan 24 jam masa inkubasi. Reaksi positif ditunjukkan dengan adanya perubahan warna medium menjadi merah muda (Brink, 2010).

3.7 Alur Penelitian



Gambar 3.1 Bagan Alur Penelitian

3.8 Analisis Data

Data yang telah diperoleh akan dianalisis dan diidentifikasi berdasarkan karakteristik mikroflora yang didasarkan pada buku *Cowan and Steel's Manual For The Identification of Medical Bacteria* (Barrow dan Feltham, 1993), *Isolasi dan Identifikasi Bakteri Klinik* (Soemarno, 2000) dan *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (Holt dkk, 1994).