

BAB IV METODOLOGI PENELITIAN

4.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini akan dilaksanakan pada bulan Oktober 2009 di Laboratorium Mikrobiologi Jurusan Biologi FMIPA Universitas Riau.

4.2 Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini terdiri dari: Akuades, Gelas benda, Gelas penutup, Kertas label, Kapas, Alumunium foil, Spritus, Pinset, Scalpel, (autoklaf, incubator, oven, timbangan digital, alat gelas).

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah Medium *PBS*, Medium *MRS*, Medium *Nutrient Agar*, Medium *F-4*, Zat warna Kristal Violet, Iodine, Alcohol 70%, Zat warna Safranin

4.3. Metode Pengolahan Sampel

4.3.1 Pengambilan Sampel Pekasam Ikan

Pekasam yang masih segar di ambil dan diukur pHnya secara insitu. Sampel kemudian di bawa kelaboratorium dalam keadaan dingin untuk di analisa kandungan BALnya.

4.3.2 Isolasi bakteri asam laktat

Dari lima gram sampel diambil 45 ml secara aseptis ke dalam 66mM phosphate buffered saline (PBS), pH 6.8 dan kocok kuat selama 5 menit. Sesuaikan dengan PBS, kemudian ambil 0.1 ml campuran sampel oleskan pada *MRS* agar dan *Nutrient Agar* (NA) plate. Plate diinkubasi secara aerob pada suhu 30°C hingga 24 jam, dan koloni akan terbentuk pada isolat. Koloni pada *MRS* agar dan NA agar plate dimurnikan

menggunakan Brom Cresol Purple Plate Count agar, Nissui (BCP). Koloni bakteri asam laktat akan terlihat koloni berwarna kuning dan untuk MRS broth digunakan untuk tes identifikasi.

4.3.3 Identifikasi bakteri asam laktat

Pengujian taksonomi isolat dan identifikasi disesuaikan dengan *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 8th Edition (Buchanan and Gibson, 1976) dan *Testing Methods in Food Microbiology* (Kiss, 1984). Untuk identifikasi genus, penentuan warna Gram, tes motility, produksi hasil katalase, bentuk asam dan gas dari glukosa, variasi temperatur tumbuh, pertumbuhan pada 6.5% NaCl, produksi amonia dari arginin dan bentuk asam atau gas dari sisa laktosa.

4.3.3.1 Uji pewarnaan gram

Cara kerja:

1. Dibersihkan objek glass dari lemak dengan menggunakan alcohol kemudian keringkan.
2. Ditetesi objek glass dengan aquades, kemudian oleskan biakan bakteri yang berusia 18 – 24 jam pada objek glass secara aseptis.
3. Difiksasi sebanyak tiga kali, lalu tetesi dengan kristal violet sebanyak 2 – 3 tetes, diamkan hingga 1 menit.
4. Setelah 1 menit, cuci dengan air mengalir dan keringkan.
5. Kemudian ditetesi dengan lugol, diamkan selama 2 menit, dicuci dengan air mengalir dan keringkan.
6. Dichelupkan kedalam alcohol 95% selama 30 detik, dicuci dengan air mengalir.

7. Ditetesi dengan safranin 2 – 3 tetes, diamkan selama 30 detik. Cuci dengan air mengalir dan keringkan.
8. Amati dengan mikroskop.
9. Lakukan ke semua biakan bakteri.

4.3.3.2 Uji Katalase

Cara kerja:

1. Disediakan 5 buah kultur bakteri dan 5 buah objek glass yang telah dibersihkan dengan alcohol.
2. Diambil kultur bakteri dengan menggunakan jarum ose, lalu diletakkan di atas objek glass.
3. Kemudian ditetesi dengan larutan H_2O_2 .
4. Amati terjadinya gelembung udara, adanya gelembung menunjukkan hasil positif.

4.3.3.3 Uji Motilitas

Cara Kerja:

1. Teteskan aquades diatas objek glass.
2. Ambil isolat bakteri uji dengan menggunakan ose dan letakkan pada tetesan larutan aquades.
3. Tutup dengan cover glass.
4. Amati pergerakan bakteri dibawah mikroskop, jika ada pergerakan maka motilitas positif.