

## BAB III

### METODOLOGI PENELITIAN

#### 3.1. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan dalam dua tahap. Tahap pertama pengambilan sampel tanah gambut di Cagar Alam Giam Siak Kecil-Bukit Batu pada bulan Juli 2009 dan tahap kedua pengerjaan isolasi di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Riau dari bulan Juli - Desember 2009.

#### 3.2. Bahan dan Alat penelitian

Bahan yang akan digunakan dalam penelitian ini adalah sampel tanah gambut. Medium *Starch Casein Agar* (SCA), larutan garam fisiologis 0,85%, medium *Nutrient Agar* (NA), medium PCA, alkohol 70%, dan agar. Organisme uji yang digunakan adalah bakteri Gram negatif (*E. coli*) yang merupakan koleksi Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam.

Alat-alat yang akan digunakan adalah: alat-alat gelas, *pipet volume*, jarum ose, inkubatur, sendok spatula, mikroskop, *soil thermometer*, *soil tester*, refrigerator, Oven, *colony counter*, *waterbath*, neraca analitik, vortex, autoklaf, lampu Bunsen, kertas label, aluminium foil, kapas, kain kasa, tissue, cangkul dan plastik sampel.

#### 3.3. Rancangan Penelitian

Tahap awal penelitian ini adalah pengambilan sampel tanah gambut Selanjutnya dihitung total populasi mikroba dari tanah gambut tersebut hingga pengenceran  $10^{-4}$  pada medium PCA. Setelah itu dilakukan isolasi aktinomistes dengan teknik *pour plate* menggunakan medium SCA. Selanjutnya dilakukan pemurnian isolat aktinomisetes dengan metode *streak plate*. Isolat aktinomisetes yang sudah murni selanjutnya dilakukan uji daya hambatnya terhadap bakteri uji menggunakan metode *agar disk* terhadap *E. coli*. Aktinomisetes yang memiliki aktivitas ditandai dengan adanya zona bening di sekitar koloni.

### **3.4. Cara Kerja**

#### **3.4.1. Pengambilan Sampel Tanah Gambut**

Tanah gambut diambil dari empat lokasi berbeda, yaitu: Lokasi 1. Perkebunan karet dan kelapa sawit, 2. Hutan Tanaman Industri yang terletak di desa Sukajadi Bukit Batu, 3. Hutan Pasca Kebakaran dan 4. Zona Inti (*core area*). Pengambilan sampel tanah gambut dilakukan secara random dari kedalaman 5-15 cm untuk tiap-tiap titik sampel yang berukuran 1x1 m. Masing-masing sampel tanah sebanyak 0,25 kg dimasukkan ke dalam plastik yang steril. Sampel yang diambil lalu disimpan pada refrigerator sebelum dilakukan isolasi (Oskay *et al.*, 2004).

#### **3.4.2 Penentuan Suhu dan pH Sampel Tanah Gambut**

Sebelum tanah gambut diambil, dilakukan pengukuran suhu dan pH tanah. Suhu tanah diukur dengan menggunakan *soil temperature* dengan cara membenamkan termometer tersebut ke dalam tanah, sedangkan pH tanah diukur dengan menggunakan pH tanah (*soil tester*) yang dibenamkan ke dalam tanah sehingga didapatkan pH tanah.

### **3.5. Pembuatan Medium**

#### **3.5.1 Larutan Nistatin**

Larutan nistatin dibuat dengan menggunakan 0,25 mg nistatin ke dalam 1 pelarut DMF dan ditambahkan ke dalam 1000 ml medium yang digunakan (Oskay *et al.*, 2004).

#### **3.5.2 Medium Plate Count Agar (PCA)**

Medium PCA dibuat dengan melarutkan tripton 5 g, ekstrak yeast 2,5 g, glukosa 1 g, agar 15 g, air suling 1 liter. Semua bahan dicampur dan dipanaskan sampai mendidih sambil diaduk. Kemudian didinginkan sampai mencapai suhu 45° C-60° C. Kemudian disterilisasi pada autoklaf selama 15 menit pada suhu 121° C (Sutedjo, 1996).

### 3.5.3. Medium *Starch Casein Agar* (SCA)

Larutan SCA dibuat dengan mencampurkan 10 g pati, 0,3 g kasein, 2 g  $\text{KNO}_3$ , 2 g  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0,05 g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,02 g  $\text{CaCO}_3$ , 0,01 g  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 2 g  $\text{NaCl}$ , 18 g agar yang dilarutkan dalam 1000 ml akuades. Kemudian dipanaskan sambil diaduk dengan magnetic stirrer hingga homogen. Setelah itu, disterilkan di autoklaf selama 15 menit pada suhu  $121^\circ\text{C}$  (Pandey *et al*, 2002).

### 3.5.4. Medium *Nutrient Agar* (NA)

Medium NA dibuat dengan melarutkan ekstrak daging 3 g, pepton 5 g, agar 20 g dan akuades 1.000 ml. Semua bahan dicampur dan dipanaskan selama 20-30 menit hingga semua agar mencair dan larut. Ditambahkan akuades untuk menggantikan yang hilang selama pemanasan sampai volume seperti semula. Media disaring dalam keadaan panas dengan kertas saring. Kemudian disterilisasi dalam autoklaf pada suhu  $121^\circ\text{C}$  selama 20 menit.

## 3.6. Penghitungan Total Populasi Mikroba

Sampel tanah gambut diambil sebanyak 1 gram dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi berisi 9 ml larutan garam fisiologis 0,85% (pengenceran  $10^{-1}$ ) disuspensikan sampai homogen, diambil 1 ml dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi berisi 9 ml larutan garam fisiologis 0,85% (pengenceran  $10^{-2}$ ) dan dilanjutkan hingga pengenceran  $10^{-4}$ . Secara aseptis dipipet 1 ml sampel dari setiap pengenceran, dimasukkan ke cawan steril (setiap pengenceran 2 *petridish*), kemudian dituangkan media PCA, dihomogenkan dan dibiarkan memadat. Media yang sudah memadat diinkubasi 1-2 hari pada suhu ruang. Selanjutnya dihitung jumlah koloni bakteri, jamur dan aktinomisetes yang tumbuh pada masing-masing media. Penghitungan total populasi mikroba dilakukan sebanyak tiga kali ulangan.

## 3.7. Isolasi Aktinomisetes

Isolasi aktinomisetes dari sampel tanah dilakukan dengan teknik *pour plate* menggunakan medium *Starch Casein Agar*. Sebanyak 1 g sampel tanah gambut di encerkan dalam 9 ml larutan garam fisiologis 0,85% hingga pengenceran  $10^{-3}$ , kemudian di vortex. Sampel dipipet sebanyak 1000  $\mu\text{l}$  dari

pengenceran  $10^{-2}$  dan  $10^{-3}$  dan dituang ke dalam cawan Petri kosong kemudian ditambahkan 20 ml medium SCA pada kondisi suhu sekitar  $50^{\circ}\text{C}$  yang mengandung 0,25 mg/ml nistatin. Kemudian dilakukan rotasi dengan perlahan-lahan pada cawan petri dan dibiarkan memadat. Kemudian biakan diinkubasi selama 7-14 hari pada suhu kamar. Selanjutnya dilakukan pengamatan morfologi dari isolat yang tumbuh, meliputi bentuk koloni, tepian, elevasi, warna koloni, konsistensi dan bau. Selanjutnya dilakukan pemurnian terhadap koloni yang tumbuh untuk mendapatkan isolat murni (Oskay *et al*, 2004).

### **3.8. Peremajaan Isolat Aktinomisetes**

Isolat aktinomisetes yang telah berhasil dimurnikan diinokulasi kembali pada medium SCA yang baru. Peremajaan dilakukan dengan melakukan penggosokan pada medium SCA, Kemudian biakan tersebut diinkubasi pada suhu kamar selama 9 hari atau sampai koloni tumbuh, sehingga kultur murni dari koloni aktinomisetes tetap terjaga.

### **3.9. Pembuatan Inokulum Bakteri Target**

Sebanyak 1 ose bakteri target dimasukkan ke dalam 6 ml larutan garam fisiologis steril 0,85% dengan nilai kerapatan optik mencapai  $\text{OD}_{600} \geq 0,500$  (Doring *et al*. 2001). Inokulum masing-masing kultur digunakan untuk uji daya hambat.

### **3.10. Uji Daya Hambat Isolat Aktinomisetes terhadap Bakteri**

Sebanyak 2 ml dari masing-masing stok inokulum bakteri target dimasukkan ke dalam 200 ml medium NA ( $45^{\circ}\text{C}$ ), dan masing-masing disebar ke dalam cawan Petri. Setelah mengeras ditotolkan 4 isolat aktinomistes dari sampel yang berbeda, kemudian diinkubasi pada suhu kamar selama 24 jam atau hingga terbentuk zona bening. Adanya zona bening tersebut menunjukkan adanya hambatan/aktivitas terhadap pertumbuhan baktri target oleh isolat aktinomistes. Semakin besar ukuran zona bening yang terbentuk menunjukkan besarnya potensial antimikrobia isolat uji terhadap isolat target (Madigan *et al*, 2003).

### 3.11. Analisis Data

Data hasil isolasi aktinomistes asal tanah gambut GSK-BB disajikan dalam bentuk tabel dan gambar. Kemudian data dianalisis secara deskriptif berdasarkan pengamatan makroskopik yang meliputi bentuk koloni, tepian, elevasi, warna, konsistensi, dan bau. Kemudian dilakukan pengamatan zona bening yang terbentuk disekitar isolat. Isolat-isolat tersebut kemudian diurutkan berdasarkan uji nilai tengah (median) dari zona bening yang terbentuk.

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi, Universitas Riau, Pekanbaru, Riau.

Tabel 4. Hasil uji aktivitas antibakteri dari genus *Streptomyces* dan *Actinomyces* terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* pada tanah gambut GSK-BB

No	Isolat	Streptomyces CFU/gambut	Zone diameter	Zone diameter
1	Streptomyces sp. 1	1.2 x 10 <sup>7</sup>	40	20
2	Streptomyces sp. 2	1.5 x 10 <sup>7</sup>	35	15
3	Streptomyces sp. 3	1.8 x 10 <sup>7</sup>	30	10
4	Actinomyces sp. 1	2.0 x 10 <sup>7</sup>	25	5

Keterangan: Zone diameter

Dari Tabel 4 dapat dilihat bahwa uji aktivitas antibakteri dari genus *Streptomyces* dan *Actinomyces* terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* pada tanah gambut GSK-BB. Hasil uji aktivitas antibakteri menunjukkan bahwa isolat *Streptomyces* sp. 1 memiliki aktivitas antibakteri yang paling tinggi terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* dengan diameter zona bening yang terbentuk masing-masing 40 mm dan 20 mm. Kemudian isolat *Streptomyces* sp. 2 memiliki aktivitas antibakteri yang kedua tertinggi terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* dengan diameter zona bening yang terbentuk masing-masing 35 mm dan 15 mm. Kemudian isolat *Streptomyces* sp. 3 memiliki aktivitas antibakteri yang ketiga tertinggi terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* dengan diameter zona bening yang terbentuk masing-masing 30 mm dan 10 mm. Kemudian isolat *Actinomyces* sp. 1 memiliki aktivitas antibakteri yang keempat tertinggi terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* dengan diameter zona bening yang terbentuk masing-masing 25 mm dan 5 mm.

Hasil uji aktivitas antibakteri dari genus *Streptomyces* dan *Actinomyces* terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* pada tanah gambut GSK-BB menunjukkan bahwa isolat *Streptomyces* sp. 1 memiliki aktivitas antibakteri yang paling tinggi terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* dengan diameter zona bening yang terbentuk masing-masing 40 mm dan 20 mm.