

BAB III

TATA KERJA

3.1 Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian adalah spektrofotometer UV-Vis (*Shimadzu*), Inkubator (*mammert*), *laminar airflow* (*ERSA Scientific*), Autoklaf (*GEA LS-50 LJ My Life MA 678GE*), *shaker*, *vortex* (*Barnstead thermolyne*), pH meter (*Mettler Toledo Seven*), Neraca analitik (*oxhaus*), lemari pendingin (*GEA*), oven, chamber alat-alat gelas (*pyrex*), kawat ose), Mikropipet, Blue tip, Yellow tip, falcon (*Nest tube*), plat KLT dan Pipa kapiler

3.2 Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian adalah isolat bakteri *Staphylococcus epidermidis* dan *Exigobacterium profundum* yang ada di Laboratorium Mikrobiologi STFI, medium *Nutrient Agar* (NA) (oksid), *Nutrient Borth* (NB) (oksid), *Blood Base Agar* (BBA) (oksid), *Mueller Hinton Agar* (oksid), minyak kelapa, darah Kuda segar, akuades, Alkohol 70 %, ninhidrin, kloroform, metanol, aseton dan spirtus.

3.3 Metode Penelitian

3.3.1 Peremajaan Isolat Bakteri

Peremajaan dilakukan dengan memindahkan satu sampai empat ose tiap mikroba ke dalam medium NA baru di dalam tabung reaksi dalam bentuk miring. Kemudian digoreskan pada medium NA diinkubasi pada suhu 35-37°C selama 24 jam (Anggraini, *et. al.*, 2013).

3.3.2. Penapisan Isolat Bakteri Penghasil Biosurfaktan

A. Uji hemolisis

Sebanyak 24,5 ml darah kuda segar steril dipipet ke dalam labu Erlenmeyer yang berisi 350 ml media *Blood Base Agar* kemudian dihomogenkan. Setelah itu, media agar darah dituang ke cawan petri steril ditunggu sampai memadat. Kemudian isolat bakteri digoreskan pada *blood* agar dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 48 - 72 jam. Apabila terdapat zona bening menandakan bakteri tersebut memiliki aktivitas biosurfaktan.

Adapun tipe zona bening yang dihasilkan yaitu α -hemolisis zona bening berwarna kehijauan, β -hemolisis zona bening berwarna putih dan γ -hemolisis ketika tidak ada medium di sekitar koloni bakteri (Saravanan & Vijayakumar, 2012)

B. Teknik *Oil spreading*

Minyak kelapa dipipet sebanyak 10 μ L kemudian ditambahkan aquadest steril 40 mL pada cawan petri, selanjutnya ditambahkan 10 μ L kultur bakteri di tengah lapisan minyak. Apabila menghasilkan zona bening menandakan adanya aktivitas biosurfaktan. Zona bening ini berkolerasi dengan aktivitas surfaktan (Walter, *et. al.*, 2010).

3.3.3 Produksi Biosurfaktan

Suspensi bakteri *Staphylococcus epidermidis* dan *Exigobacterium profundum* diperoleh dari subkultur dalam media cair NB yang sudah diinkubasi pada suhu 36⁰C selama 48 jam. Selanjutnya 1 ml suspensi bakteri diinokulasi ke dalam 100 ml media NB mengandung 3,3 ml minyak kelapa sebagai sumber substrat. Kultur bakteri ditumbuhkan selama 7 hari dengan pengocokan konstan dengan variasi waktu pengamatan hari ke 0, 1, 3, 5, dan hari ke 7 pada waktu tersebut dilakukan uji emulsifikasi (Sari *et al*, 2015).

3.3.4 Uji aktivitas Biosurfaktan dengan uji emulsifikasi

2 mL suspensi bakteri ditambahkan 2 mL hidrokarbon minyak kemudian campuran tersebut divortex kecepatan dengan kecepatan tinggi selama 2 menit dan dibiarkan selama 24 jam. Selanjutnya dihitung indeks emulsi yaitu (Saravanan & Vijayakumar, 2012):

$$\text{Emulsifikasi Indeks} = \frac{\text{Tinggi emulsi}}{\text{Tinggi total}} \times 100\%$$

3.3.5 Karakteristik Biokimia Biosurfaktan dengan Kromatografi lapis tipis

Kultur bakteri dari produksi biosurfaktan di pisahkan antara sel dengan supernatan dengan cara sentrifugasi 3600 rpm selama 20 menit. Selanjutnya dibuat fase gerak kloroform, metanol dan air dengan perbandingan (65:25:4) dan dimasukkan ke dalam chamber tunggu sampai fase gerak jenuh. Supernatan di totolkan pada plat KLT dan di elusi. Hasil spot yang terbentuk divisualisasi dengan lampu UV 254 dan 366 nm, kemudian plat disemprot

LAMPIRAN

dengan penampak bercak ninhidrin dan di oven pada suhu 100⁰C (Das et al.,2009).

3.3.6. Uji Aktivitas Antibakteri

a. Pembuatan Kontrol Positif

Kontrol positif dibuat dari sediaan obat kapsul kloramfenikol 250 mg. Satu kapsul kloramfenikol dibuka cangkang kapsulnya kemudian serbuk dalam kapsul ditimbang sebanyak 30 mg, Kemudian serbuk dilarutkan dalam metanol 5 mL untuk memperoleh larutan stok kloramfenikol 250µg/50µL (Sari *et al*, 2015).

b. Uji aktivitas antimikroba dengan metode difusi agar

Bakteri uji yang digunakan *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus* kultur bakteri dipindahkan ke media miring Na secara aseptis dan di inkubasi pada suhu 37⁰C selama 24 jam kemudian diinokulasi ke media NB secara aseptis dan di inkubasi pada suhu 37⁰C selama 18 jam, dilakukan pengecekan kekeruhan dengan spektrofotometri UV diperoleh % transmittan sebesar 25 %. Kemudian 1 mL suspensi bakteri uji dituang ke dalam cawan petri dan ditambahkan media MHA (*Mueller Hinton Agar*) kurang lebih sebanyak 15 mL, ditunggu sampai memadat. Kertas cakram yang berisi 20 µl supernatan bakteri *Staphylococcus epidermidis* dan *Exigobacterium profundum* diletakkan di atas lapisan media MHA (*Mueller Hinton Agar*) yang telah memadat. Kultur diinkubasi pada suhu 37⁰C selama 24 jam, amati pembentuk kan zona hambat di sekitar kertas cakram (Sari *et al*, 2015).