

3. METODE PENELITIAN

3.1 Alat dan Bahan

3.1.1 Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini yaitu tabung reaksi, rak tabung reaksi, beaker glass, erlenmeyer, bunsen, gunting, LAF, spatula, inkubator, korek, panci, *sprayer*, *triangle*, jarum ose, jarum loop, cawan petri, timbangan digital, *mikropipet*, *hotplate*, lemari pendingin, nampan, *washing bottle*, gelas ukur, kain hitam, corong, jerigen, kamera, kompor gas, gunting, bola hisap, pipet volume, pipet serologis, spatula dan autoklaf.

3.1.2 Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain sampel sedimen pantai. Media pertumbuhan yang digunakan adalah LBA (*yeast ekstrak* 5gr/liter, pepton 10gr/liter, NaCl 10 gr/liter, Agar 15 gr/liter), media gelatin (pepton 5 gr/liter, *beef ekstrak* 3 gr/liter, gelatin 120 gr/liter), lap kering, tisu, kertas label, kapas, akuades, spiritus, aluminium foil, plastik wrap, NaFis 0.9%, bakteri, plastik PP, alkohol 70%, kertas bekas atau koran, air, pulpen, spidol, masker, sarung tangan dan tali kasur.

3.2 Metode Penelitian

Metode dalam penelitian ini menggunakan metode deskriptif eksploratif. Deskriptif eksploratif merupakan metode penelitian yang digunakan untuk mendeskripsikan suatu keadaan berdasarkan tahapan penelitian yang dilakukan tanpa melakukan pengujian terhadap hipotesa tertentu, tetapi hanya menggambarkan apa adanya suatu variabel dan keadaan (Arikunto, 2002). Dalam hal ini, penelitian ini untuk mengumpulkan data dengan melakukan

sebuah penelitian. Penelitian ini diawali dengan pengambilan sampel sedimen di daerah Pantai Jabon, Kabupaten Sidoarjo, Jawa Timur yang akan diteliti sebagai sampel utama apakah memiliki bakteri penghasil enzim gelatinase atau tidak. Dengan tahap penelitian yaitu isolasi, kultur bakteri, uji gelatin, dan uji *microbact*.

3.3 Prosedur Penelitian

Penelitian ini memiliki 2 (dua) tahap prosedur penelitian, diantaranya adalah sebagai penelitian tahap 1 yaitu sampling dan tempat lokasi dan sebagai penelitian tahap 2 yaitu penelitian yang terakhir.

3.3.1 Pengambilan Sampel di Lapang (Penelitian Tahap 1)

Sampel yang digunakan berasal dari sedimen pantai Jabon, Kabupaten Sidoarjo, Jawa Timur. Sampel yang sudah diambil diberi perlakuan pada suhu 4⁰C sampai dilakukan uji lebih lanjut di laboratorium. Pantai Jabon terletak di daerah Kecamatan Jabon, Kabupaten Sidoarjo. Kabupaten Sidoarjo adalah salah satu kabupaten di provinsi Jawa Timur. Kabupaten Sidoarjo terletak antara 112 5' dan 112 9' Bujur Timur dan antara 7,3' dan 7,5' Lintang Selatan. Luas wilayah keseluruhan 71.424,25 Ha, dari jumlah keseluruhan tersebut. Kabupaten Sidoarjo memiliki wilayah dengan karakteristik tersendiri, karakteristik yang dimiliki Kabupaten Sidoarjo terbagi ke dalam tiga wilayah. Pertama, daerah dengan persentase 40,81% merupakan daerah yang terletak di bagian tengah dan berair tawar. Kedua, daerah yang berada pada sisi timur yang merupakan daerah pantai (salah satunya Pantai Jabon) dan pertambakan dengan persentase 29,99%. Terakhir, daerah yang terletak di bagian barat yang mempunyai persentase wilayah sebesar 29,20%. Peta lokasi pengambilan sampel dapat dilihat pada Gambar 2.



Gambar 2. Peta Lokasi Pengambilan Sampel (Google maps, 2017).

Sampel sedimen dikumpulkan dari beberapa lokasi pantai yang berbeda dengan menggunakan spatula steril. Bagian sampel yang digunakan dipindahkan secara aseptis ke kantong polietilena steril dan dipindah ke laboratorium dalam kotak es yang dipertahankan dengan suhu 4⁰C untuk studi lebih lanjut (Balan, *et al.* 2012).

3.3.2 Persiapan Sampel

Sampel diambil di daerah Pantai Jabon, Kabupaten Sidoarjo, Jawa Timur. Alat yang perlu disiapkan dalam pengambilan sampel yaitu sendok, plastik, coolbox, kamera, karet. Pertama sebelum pengambilan sampel siapkan plastik dan sendok untuk mengambil sedimen dari pantai. Pengambilan sedimen menggunakan sendok dan kemudian dimasukkan ke dalam plastik dan ikat dengan karet. Setelah sampel didapatkan, kemudian sampel yang sudah di dalam plastik dimasukkan ke dalam coolbox dan sampel harus diberikan kode pada masing-masing plastik agar tidak tertukar.

3.3.3 Sterilisasi Alat

Sterilisasi merupakan suatu proses untuk membebaskan suatu benda dari semua mikroorganisme, baik bentuk vegetatif maupun spora. Fungsi sterilisasi di antaranya pada bidang mikrobiologi untuk mencegah pencemaran organisme luar. Pada laboratorium mikrobiologi, sterilisasi merupakan bagian yang sangat penting atau keharusan, baik pada alat maupun media. (Rachmawati dan Shofyatul, 2008). Peralatan yang perlu disterilisasi adalah cawan petri, tabung reaksi, media, erlenmeyer, pipet serologis, kapas.

Sterilisasi alat dan bahan dilakukan sebelum penelitian agar alat dan bahan yang ada tidak terkontaminasi dengan mikroba lain. Sehingga dalam persiapannya, mikroba-mikroba yang ada harus dihilangkan terlebih dahulu. Cara untuk sterilisasi yaitu dengan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit tekanan 1 atm. Satu siklus sterilisasi dengan autoklaf mencakup peningkatan tekanan, sterilisasi, dan pengeluaran gas biasanya membutuhkan waktu dari tiga puluh menit hingga satu jam (Naomi, 2017).

Menurut Maryanti (2015) sterilisasi alat dan medium dilakukan dengan:

- Pembakaran bunsen digunakan untuk mensterilkan peralatan seperti ose, jarum, dan spatula dengan cara membakar ujung peralatan tersebut di atas api bunsen sampai berpijar.
- Autoklaf digunakan untuk mensterilkan tabung reaksi bertutup, medium dan erlenmeyer. Penggunaan alat ini dengan memasukkan alat-alat tersebut ke dalam autoklaf yang ditutup dengan rapat dan nyalakan autoklaf dengan suhu 121°C dan tekanan 1 atm selama 15 menit.
- Oven digunakan untuk mensterilkan cawan petri, kertas saring, beaker glass, dan alat gelas lainnya yang tidak presisi. Penggunaan alat ini dengan memasukkan alat-alat tersebut ke dalam oven dan dipanaskan dengan suhu $160\text{-}170^{\circ}\text{C}$ selama 1-2 jam.

Teknik sterilisasi dengan uap adalah metode yang paling dapat diandalkan untuk dekontaminasi pembuangan laboratorium dan sterilisasi peralatan kaca, medium, dan reagen dalam laboratorium (Maryanti, 2015).

3.3.4 Pembuatan Media *Luria Bertani Agar (LBA)*

Pembuatan media LBA dilakukan dengan menimbang yeast ekstrak 0.5 gr, pepton 1 gr, NaCl 1 gr, agar 1.5 gr. Semua bahan dilarutkan dalam 100 ml akuades dan dilanjutkan dengan penghomogenan. Selanjutnya ditutup kapas dan aluminium foil. Kemudian dilakukan perebusan dengan menggunakan kompor selama 15-20 menit, kemudian dilakukan sterilisasi menggunakan *autoklaf* dengan suhu 121⁰C tekanan 1 atm selama 15 menit, kemudian setelah sterilisasi selesai dimasukkan anti jamur ke dalam erlenmeyer dan dihomogenkan.

Untuk menghitung jumlah media yang dibutuhkan dalam penelitian, dihitung terlebih dahulu jumlah cawan petri yang digunakan dimana diasumsikan tiap cawan berisi 20 ml media. Penanaman dilakukan secara duplo, penanaman dimulai pada tabung 10⁻³, 10⁻⁴, 10⁻⁵. Sehingga pembuatan media dibuat sebanyak 120 ml. Pembuatan media dilakukan di dalam erlenmeyer 250 ml. Erlenmeyer yang berisi media dipanaskan diatas *hot plate* dan diaduk sampai rata selama 10-15 menit. Setelah homogen, erlenmeyer ditutup menggunakan kapas dan aluminium foil, agar tidak terkontaminasi dari udara luar. Kemudian dilakukan sterilisasi menggunakan autoklaf dengan suhu 121⁰C tekanan 1 atm selama 15 menit, kemudian setelah sterilisasi selesai dimasukkan anti jamur ke dalam erlenmeyer dan dihomogenkan. Kemudian dilakukan penuangan media ke dalam cawan petri. Sebelum melakukan penuangan media, harus menggunakan masker dan sarung tangan. Penuangan dilakukan secara aseptis dengan menyemprotkan alkohol 70% di daerah tempat melakukan penuangan dan juga

pada tangan. Ketika penuangan media, cawan petri dibuka di dekat bunsen agar tetap aseptis. Selanjutnya media ditutup tapi tidak rapat agar tidak terjadi pengembunan, ditunggu sampai media di dalam cawan dingin, kemudian dibalik.

3.3.5 Pembuatan NaFis

Siapkan alat dan bahan yang akan digunakan dalam pembuatan NaFis yaitu tabung reaksi, bola hisap, pipet volum, tabung reaksi, kapas, aluminium foil. Larutkan NaCl 9 gram dalam 1 liter akuades dan dihomogenkan sehingga larutan NaCl larut dalam akuades. Selanjutnya diambil sebanyak 9 ml dengan menggunakan pipet volum masukkan ke dalam tabung reaksi, ditutup dengan menggunakan kapas dan aluminium foil dan terakhir disterilisasi menggunakan autoklaf dengan suhu 121°C tekanan 1 atm selama 15 menit.

3.3.6 Pengenceran dan Penanaman Sampel

Proses pengenceran dilakukan dengan menyiapkan 20 tabung reaksi yang berisi 9 ml larutan NaCl fisiologis untuk masing-masing sampel membutuhkan 5 tabung reaksi. Proses pengenceran dimulai dengan pengenceran 10^{-1} yang masing-masingnya terdiri dari 10 ml NaCl fisiologis, kemudian dari 10^{-2} - 10^{-5} berisi 9 ml NaCl fisiologis. Pada tabung 10^{-1} dimasukkan sampel sebanyak 1 gr yang sudah dikeringkan dari tiap sedimen, kemudian digojog/dipilin agar homogen, kemudian dilakukan pengenceran dengan mengambil sebanyak 1 ml sampel dari tabung reaksi 10^{-1} menggunakan pipet serologis dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi 10^{-2} sambil di pilin/digojog, dilakukan pengenceran bertingkat sampai pada tabung yang ke 10^{-5} . Pengenceran dilakukan untuk mengurangi kepadatan mikroba sehingga diharapkan saat kultur atau penanaman bakteri tidak ada yang TBUD atau sprider.

Penanaman dilakukan menggunakan media LBA dengan hasil pengenceran 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} . Setiap tabung hasil pengenceran tersebut diambil 1 ml dan dimasukkan ke dalam cawan petri yang berisi media LBA dengan metode tuang dengan menggunakan triangle, setelah ditanam cawan petri yang berisi media LBA dan hasil pengenceran di wrap. Penanaman dilakukan di ruang LAF. Kemudian diinkubasi selama 24-72 jam dalam inkubator dengan suhu 37°C . Koloni bakteri yang telah tumbuh pada media, kemudian dimurnikan ke dalam media LBA lain. Kemudian dilakukan pemurnian sampai diperoleh isolat murni (tunggal). Selanjutnya dipindahkan ke dalam media LBA dengan metode streak 3 kuadran yang digunakan sebagai stok kultur, disimpan pada suhu 4°C . Koloni yang mempunyai ciri makroskopis yang berbeda selanjutnya dimurnikan dengan cara streak kuadran untuk mendapatkan koloni tunggal (Pelczar dan Chan, 2006). Kemudian setelah didapatkan bakteri dari streak kuadran pada cawan petri, bakteri dimurnikan kembali pada media agar miring. Penanaman pada media ini semuanya dilakukan menggunakan jarum loop untuk memudahkan mengambil bakterinya dari media.

Peremajaan bakteri dilakukan dengan mengambil dari stok bakteri dalam agar miring *Nutrient Agar* (NA) diremajakan kembali pada *Nutrient Agar* (NA) miring baru dengan cara menggoreskan masing-masing bakteri menggunakan jarum ose yang telah disterilkan dengan cara memijarkan pada api bunsen. Bakteri yang sudah digoreskan pada medium NA baru kemudian diinkubasi pada suhu 35°C selama 24 jam. Pengerjaan dilakukan dalam kondisi steril di dalam *Laminar Air Flow* (Maryanti, 2015).

3.3.7 Skrining Bakteri Enzim Gelatinase (Penelitian Tahap 2)

Skrining bakteri dimulai dengan penyiapan media yaitu dari menimbang pepton 0.25 gr, *beef ekstrak* 0.15 gr, dan gelatin 6 gr kemudian dilarutkan dalam

50 ml akuades dan dihomogenkan dengan digojog, kemudian ditutup kapas dan aluminium foil. Setelah itu direbus selama 15-20 menit di atas kompor. Kemudian disterilisasi selama 15 menit pada autoklaf 121⁰C yang selanjutnya dituang ke dalam tabung reaksi. Kemudian lakukan penanaman pada media stok isolat dengan di tusuk pada bagian tengah media gelatin dan diletakkan pada suhu ruang selama 24-72 jam, kemudian di letakkan di dalam kulkas untuk menentukan apakah mengandung bakteri penghasil enzim gelatinase atau tidak, jika positif maka media gelatinnya akan cair, tetapi jika negatif maka media gelatinnya akan padat.

3.3.8 Identifikasi Bakteri

– Pewarnaan Gram

Kebanyakan mikroorganisme tidak berwarna, maka untuk dapat melakukan pengamatan di bawah mikroskop cahaya diperlukan pewarnaan mikroorganisme dengan menggunakan pewarna. Sebelum mikroorganisme dapat diwarnai, mikroorganisme tersebut harus terlebih dahulu difiksasi agar terikat (menempel) pada kaca objek. Tanpa adanya fiksasi, maka pemberian zat warna pada mikroorganisme yang dilanjutkan dengan prosedur pencucian zat warna dengan air mengalir dapat menyebabkan mikroorganisme ikut tercuci (Maryanti, 2015).

Isolat bakteri diambil satu ose dengan jarum ose secara aseptis dan disuspensikan dengan akuades yang ada di atas gelas objek. Preparat difiksasi diatas api Bunsen sampai kering. Preparat ditetesi dengan garam A (gentian violet), didiamkan selama satu menit dan dicuci dengan air mengalir dan dikeringkan. Preparat ditetesi dengan larutan garam B (larutan Lugol) dan didiamkan selama satu menit, dicuci dengan air mengalir dan dikeringkan. Preparat digenangi dengan larutan garam C (Aseton alkohol) sampai warna ungu

hilang. Preparat ditetesi larutan garam D (Safranin) dan didiamkan selama 30 detik, dicuci dengan air mengalir dan dikeringkan. Preparat ditetesi dengan minyak imersi, preparat diamati dengan mikroskop, uji gram positif jika berwarna ungu dan negatif jika berwarna merah (Hadiotomo, 1993).

Pewarnaan gram bertujuan untuk membedakan bakteri menjadi dua kelompok yaitu, bakteri gram positif dan bakteri gram negative. Bakteri yang digunakan yaitu bakteri yang berumur kurang dari 20 jam (Irfan, 2014). Bakteri dikelompokkan sebagai Gram Positif apabila selnya berwarna keunguan, dan Gram negatif apabila selnya terwarnai merah (Dewi, 2013).

– **Identifikasi menggunakan *Microbact System***

Menurut Murtiningsih (1997), uji *microbact system* adalah uji yang digunakan untuk mengidentifikasi mikroorganisme. Pengujian tersebut tergantung pada hasil uji oksidase yang dilakukan sebelumnya. Apabila hasil oksidasenya positif maka dilakukan dengan menggunakan *microbact* 24E, dan jika hasil yang diperoleh negatif maka akan menggunakan *microbact* 12E.

- Sebelum ditentukan menggunakan 12A/12E atau 24E, koloni bakteri dilakukan uji oksidase, jika hasil oksidase negative menggunakan *Microbact system* 12A/12E saja, sedangkan jika hasil oksidasenya positif maka menggunakan 24E.
- Satu koloni bakteri yang telah diinkubasi selama 18-24 jam diambil dengan menggunakan ose kemudian dilarutkan kedalam 5 ml garam fisiologis 0,9% pada tabung reaksi steril dan divortex hingga homogen.
- Larutan bakteri yang telah homogen diteteskan kedalam sumur *Microbact* sebanyak 100 UI (4 tetes), untuk sumur Lysin, Omitin, dan H₂S ditambah dengan tetesan *mineral oil* sebanyak 1-2 tetes. Setelah itu *Microbact* diinkubasi pada suhu 37 °C selama 18-24 jam.

- *Microbact* yang telah diinkubasi diambil kemudian diteteskan 2 tetes reagent Nitrat A dan B pada sumur 7, pada sumur nomor 8 dengan *Indol Kovact* sebanyak 2 tetes, sumur nomor 10 dengan VP I dan VP II masing-masing satu tetes, dan sumur 12 dengan TDA (Tryptophan Daeminase) sebanyak satu tetes.
- Untuk Uji fermentasi karbohidrat pada *microbact* 12B, tanpa ada penambahan reagen yaitu hasil dari sumuran langsung bisa dibaca hasilnya, yaitu jika fermentasi positif menunjukkan warna kuning, sedangkan hasil negatif tidak ada perubahan warna tetap biru.

Evaluasi hasil dilihat melalui sumur-sumur *microbact* apakah positif atau negatif dengan cara membandingkan dengan table warna standar. Berdasarkan dari hasil data positif negatif akan didapatkan angka oktal, jika menggunakan kit 12A maka angka oktal adalah 4 digit, sedangkan jika menggunakan 24E angka oktalnya 8 digit. Kemudian angka oktal yang diperoleh dimasukkan kedalam *software Microbact*, maka akan keluar genus dan spesies dari sampel bakteri yang diidentifikasi beserta prosentase kemiripannya.

Sebagai catatan bahwa *software Microbact* ini khusus untuk jenis-jenis bakteri gram negatif . sedangkan untuk sampel bakteri gram positif, identifikasi menggunakan kit *microbact* 24E, tetapi evaluasi hasil tidak bisa menggunakan *software Microbact* karena tidak ditemukan dalam data base *microbact*, sehingga sebagai acuannya kita gunakan "*Bergeys manual*".