

III. METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilakukan pada bulan Februari sampai September 2017. Pengambilan sampel penelitian di lokasi pantai nudel yaitu desa Malang Selatan Kecamatan Kabupaten Malang pada Agustus 2017. Penelitian laboratorium dilaksanakan di Laboratorium Keamanan Hasil Perikanan, Laboratorium Perekayasaan Hasil Perikanan dan Laboratorium Sentral Ilmu Hayati, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Brawijaya, Malang.

3.2 Alat dan Bahan

3.2.1 Alat

Alat yang digunakan pada penelitian ini adalah spatula, *beaker glass*, *hot plate*, cawan petri, triangle, gelas ukur, erlenmeyer, pipet tetes, pipet volume, pipet serologis, mikropipet, bunsen, korek api, autoklaf manual, autoklaf digital, *washing bottle*, serbet, kompor, panci, inkubator, tabung reaksi, rak tabung reaksi, timbangan analitik, timbangan digital, mortal, alu, *sprayer*, bola hisap, *freezer*, lemari pendingin.

3.2.2 Bahan

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah sampel mangrove (batang, akar, daun), Media pertumbuhan yang digunakan adalah media LBA (yeast ekstrak 0.5 %, pepton %, NaCl 1 %, agar 1,5 %), media gelatin (pepton 5 g/liter, beef extract 3 g/liter, gelatin 120 g/liter), NaFis 0.9 %, aquades, alkohol, kapas, tissue.

3.3 Metode Penelitian

Metode penelitian ini menggunakan metode deskriptif eksploratif. Metode deskripsi adalah suatu metode yang digunakan untuk menggambarkan atau menganalisis suatu hasil penelitian tetapi tidak digunakan untuk membuat kesimpulan yang lebih luas. Metode deskriptif adalah pencarian fakta dengan interpretasi yang tepat. Sedangkan metode eksploratif bertujuan untuk memperoleh pengetahuan tentang gejala, sehingga diharapkan setelah melakukan observasi, masalah dapat dirumuskan (Arikunto, 2002)..

Pada metode deskriptif eksploratif digunakan untuk mendeskripsikan hasil yang didapat secara deskriptif dan sejelas jelasnya. mendapatkan data dan hasil yang didapat digambarkan dengan kata-kata secara deskriptif sehingga pembaca hasil penelitian ini dapat dengan mudah memahami hasil dari penelitian ini. Penelitian ini terbagi menjadi beberapa tahap yaitu isolasi bakteri, skrining bakteri penghasil enzim, pewarnaan gram, identifikasi secara molekuler.

3.4 Prosedur Penelitian

Pada penelitian ini terdapat beberapa tahapan prosedur penelitian yaitu diantaranya adalah sampling dan lokasi , peneltiian Tahap 1, dan yang terakhir adalah penelitian Tahap 2.

3.4.1 Penelitian tahap 1

3.4.1.1 Sampling dan Peta Lokasi

Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah sampel yang berasal dari endofit mangrove, yakni: daun, batang, akar, dan buah mangrove. Sampel diambil dari pantai bajul mati, Malang Jawa Timur dapat dilihat pada Gambar 4.



Gambar 4. Peta Lokasi Pengambilan Sampel di Pantai Bajul Mati, Malang

3.4.1.2 Preparasi Sampel (Hwanhlem, *et al.* 2014)

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah mangrove yang diambil dari pantai Malang yang terletak pada koordinat $8^{\circ} 26' 1''$ S dan $112^{\circ} 38' 11''$ E. Sampel yang diambil dari titik lokasi dalam keadaan segar, kemudian sampel dimasukkan kedalam kantong plastik kedap udara agar tidak terkontaminasi dengan kotoran dari luar. Kemudian, sampel dalam plastik tersebut dimasukkan kedalam *coolbox* yang sudah terlebih dahulu dimasukkan es batu yang telah dihaluskan dan ditutup rapat. Tujuan penambahan es batu yang sudah dihaluskan terlebih dahulu agar kesegaran sampel tetap terjaga sampai dilaboratorium. Pengambilan sampel dilakukan secara aseptis dengan tujuan bakteri yang ada di dalam mangrove tetap terjaga dan tidak terkontaminasi. Sampel dibawa menuju Malang menggunakan transportasi darat.

Sampel yang didapat dari lokasi kemudian dilakukan perlakuan, sampel yang berupa mangrove kemudian diambil dengan cara disayat menggunakan pisau. Sampel diambil sebanyak yang dimau untuk dilakukan penghalusan . Tujuannya agar memudahkan pada saat pengenceran . Kemudian dilakukan pengenceran dari 10^{-1} sampai 10^{-6} . Langkah pertama adalah dengan membuat

larutan NaFis 0,9 % yang terdiri dari 9 gram nacl dilarutkan dengan 1000 mL akuades didalam beaker glass 1000 mL kemudian dihomogenkan dengan spatula. Pengenceran yang dikakukan adalah dengan menggunakan perbandingan 1:9. Sampel sebanyak 1 gram kemudian dilarutkan kedalam 9 ml NaFis dan didapatkan pengenceran 10^{-1} . Sebelumnya disiapkan tabung reaksi yang berisi NaFis sebanyak 5 (untuk lima pengenceran) masing-masing tabung di isi 9 mL NaFis dan diberi kode 10^{-1} ; 10^{-2} ; 10^{-3} ; 10^{-4} ; 10^{-5} , 10^{-6} . sampel ditimbang sebanyak 1 gram menggunakan timbangan digital, setelah ditimbang kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi 10^{-1} menggunakan sendok bahan kemudian di pilin agar homogen, kemudian diambil 1 mL menggunakan mikropipet dari tabung 10^{-1} untuk dilakukan pengenceran dan dimasukkan ke dalam tabung 10^{-2} di homogenkan kembali, pengenceran ini dilakukan sampai 10^{-6} (Romadhon, *et al.* 2012).

3.4.1.2 Pembuatan Media LBA dan Penanaman

Pembuatan media LBA pertama –tama yang harus dilakukan adalah menyiapkan semua bahan yang diperlukan adalah *yeast extract* 0,5 %, NaCl 1 %, pepton 1 %, dan agar bakteriologi 2 %. Lalu, yang dilakukan adalah persiapan bahan yang akan digunakan. Cawan yang digunakan sebanyak 15 cawan x 20 ml = 300 mL media LBA. Sehingga pembuatan agar dibuat sebanyak 300 mL. Dengan jumlah komposisi bahan 1,5 gram *yeast extract*, 3 gram NaCl, 3 gram pepton, dan 4,5 gram agar bakteriologi. Semua bahan dimasukan ke dalam erlenmayer 500 mL dan dilarutkan dengan 300 mL akuades kemudian di homogenkan dan ditutup dengan kapas dan alumunium foil dan direbus didalam air mendidih selama 15 menit untuk tujuan mengaktifkan agar. Selanjutnya di sterilisasi dengan menggunakan autoklaf selama 15 menit, suhu 121°C , tekanan

1 atm, setelah itu ditunggu hingga media LBA yang sudah steril siap digunakan (Sholihat, 2005).

Kemudian media LBA yang sudah disterilisasi kemudian dituang ke dalam cawan satu persatu dengan estimasi media 20 mL per cawan. Sebelum memulai penanaman media diletakkan ke dalam LAF (*Laminer Air Flow*) yang sudah disinasri UV selama kurang lebih 30 menit agar kondisi LAF lebih aseptis. Media dibiarkan hingga suhu menjadi hangat kuku sehingga suhu tidak terlalu panas. Untuk mulai penanaman, penuang media juga dilakukan di LAF (*Laminer Air Flow*). Dengan tujuan agar kondisi tetap selalu aseptis. Kemudian masing – masing pengenceran diambil sebanyak 200 μ L kemudian di masukkan ke dalam media dan diratakan dengan menggunakan triangle sampai merata diseluruh permukaan media. Setelah semua selesai kemudian ditutup dengan plastik *wrap* dan diinkubasi didalam inkubator selama 24 jam (Todorov dan Dicks, 2004).

3.4.1.3 Isolasi Bakteri dari Mangrove

Cawan petri yang berisi media LBA yang telah diinkubasi selama 24 jam diamati dan dilihat koloni yang tumbuh baik dan tidak spreader, jika ada koloni tunggal yang tumbuh segera dilakukan inokulasi ke media baru dengan menggunakan metode gores kuadran dengan ketentuan 3 kuadran di cawan petri ber isi media LBA setelah itu diinkubasi dengan suhu 37 °C selama 24 jam. Tujuan dari metode ini adalah agar mendapatkan koloni yang benar – benar terpisah dari koloni yang lain sehingga proses hasil identifikasinya akan lebih mudah dilakukan (Yulvizar, 2013).

Goresan yang dilakukan pada media dilakukan 4 kali dengan membentuk pola zig – zag. Jarum ose yang digunakan pada penggoresan media pada sumber isolat dan kemudian di goreskan secara zig – zag pada media baru dibagian cawan pertama. Lalu jarum ose kembali dipanaskan pada bunsen dan

digunakan untuk menggores goresan sebelumnya pada sisi cawan kedua namun tidak sederajat goresan pertama dan begitu dilakukan seterusnya hingga bagian keempat cawan. Pada metode ini, goresan sisi pertama diharapkan kloni tumbuh padat dan berhimpitan sedangkan pada goresan sisi kedua koloni mulai tampak jarang dan begitu selanjutnya. Sehingga hasilnya akan didapatkan koloni yang tumbuh secara terpisah dengan koloni lain. Selanjutnya koloni yang tunggal yang tumbuh segera diinokulasikan ke media agar miring LBA dengan komposisi yang sama dan diinkubasi selama 1 – 2 hari pada suhu 37 °C (Yulvizar, 2013). Hasilnya akan didapatkan stok bakteri murni pada setiap pengenceran dan disimpan di lemari pendingin dan setiap 3 sampai 4 minggu sekali dilakukan peremajaan.

3.4.2 Penelitian Tahap II

3.4.2.1 Penapisan (*screening*) enzim Gelatinase

Skrinning atau seleksi bakteri penghasil enzim gelatinase dilakukan didalam cawan petri menggunakan media gelatin dengan metode gores menggunakan jarum ose. Bahan – bahan yang digunakan dalam pembuatan media ini adalah pepton 5 gram/liter, beef ekstrak 3 gram/liter, gelatin 120 gram/liter. Kemudian media yang telah dihomogenkan disterilisasi menggunakan autoklaf dengan suhu 121 °C selama 15 menit dengan tekanan 1 atm. Setelah media disterilisasi dan media sudah dalam keadaan tidak panas, media dituang ke dalam cawan pada LAF yang sudah diberi sinar UV dan ditunggu media hingga menggegel dan dingin. Kemudian perlakuan ini dilakukan di dalam Laminar Air Flow, setelah bakteri tertanam semua di cawan kemudian cawan ditutup dengan plastik wrap dan diinkubasi selama 3 sampai 4 hari untuk melihat perubahan.

3.4.2.2 Identifikasi bakteri secara *Microbact*

Pada proses identifikasi bakteri terdapat beberapa tahap dan beberapa jenis uji. Beberapa di antara pengujian identifikasi bakteri antara lain adalah uji pewarnaan gram, dan uji *microbact system*. Tahap awal adalah pengambilan koloni murni dengan menggunakan jarum ose yang sebelumnya dipanaskan terlebih dahulu pada bunsen. Selanjutnya satu ose bakteri diletakkan pada preparat dan dibuat semiran. Langkah ini dilakukan sebanyak 3 kali sehingga pada setiap preparat terdapat 3 semiran yang diberi kode yang berbeda. Sebelum diberikan semiran, preparat diberi akuades terlebih dahulu agar mempermudah pemberian semiran pada preparat. Hasil semiran yang didapat di *blower* sampai kering sehingga dapat mempermudah proses pewarnaan gram. Preparat yang telah kering difiksasi agar bakteri pada preparat mati tetapi tidak merusak struktur selnya. Kemudian ditetesi kristal ungu dan ditunggu satu menit. Pemberian kristal ungu adalah sebagai pewarna primer. Setelah ditunggu 1 menit preparat dibilas untuk mencuci sisa kristal ungu yang ada. Lalu diberi iodine untuk memperkuat warna dan didiamkan kembali satu menit dan dibilas. Kemudian diberi alkohol 70 % untuk melarutkan lemak dan dibilas dengan air untuk menghilangkan sisa alkohol yang tidak terpakai. Tahap berikutnya adalah pemberian safranin sebagai pewarna sekunder dan dibiarkan selama 30 menit dan dibilas dengan air dan ditetesi minyak imersi untuk memperjelas indeks bias, preparat yang telah diwarnai kemudian diamati dengan mikroskop (Sardiani, *et al.* 2015).

Identifikasi mikroorganisme menggunakan *Microbact System* meliputi uji oksidase, mobilitas, nitrat, lisin, ornitin, H₂S, glukosa, mannitol, silosa, ONPG, indol, urease, V-P, sitrat, TDA, gelatin, malonase, inositol, sorbitol, rhamnosa, sukrosa, lactose, arabinosa, adonitol, raffinosa, salicin dan arginin. Uji *Microbact System* merupakan uji yang digunakan untuk mengidentifikasi mikroorganisme

anaerob fakultatif aerobik dan bakteri gram negatif. Prinsip dari uji tersebut adalah sistem mikro-substrat standar yang dirancang untuk mengidentifikasi basil gram negative (Murtiningsih, 1997). Pengujian tergantung dari hasil uji oksidase yang telah dilakukan. Jika hasil oksidasi positif maka di ujikan menggunakan *microbact* 24E, dan jika hasil oksidasi negatif maka diujikan menggunakan *microbact* 12E. tahapan pada uji tersebut yaitu pertama isolate murni akan disentrifuse dengan kecepatan 3000rpm selama 15 menit. Dari hasil sentrifuse akan diperoleh supernatan dan residu namun yang digunakan hanya residunya saja. selanjutnya residu ditambahkan dengan Na-fis sebanyak 5ml. kemudian dimasukkan pada sumur *microbact* 24E sebanyak 0.1ml, kemudian diinkubasi selama 24jam pada suhu 37⁰C. tahap terakhir diamati perubahan warna yang terjadi pada sumur *microbact* 24E. Evaluasi hasil dilihat dengan melalui sumur *microbact*. Apakah positif atau negatif dengan cara membandingkan dengan table warna dan hasilnya ditulis pada formulir *Patient Record*. Angka-angka *octal* didapat dari penjumlahan reaksi positif saja dari tiap-tiap kelompok. Dari angka total ini selanjutnya dapat diketahui spesies bakteri yang dimaksud dengan memasukkannya ke dalam software komputer (Ballows *et al.*, 1991).