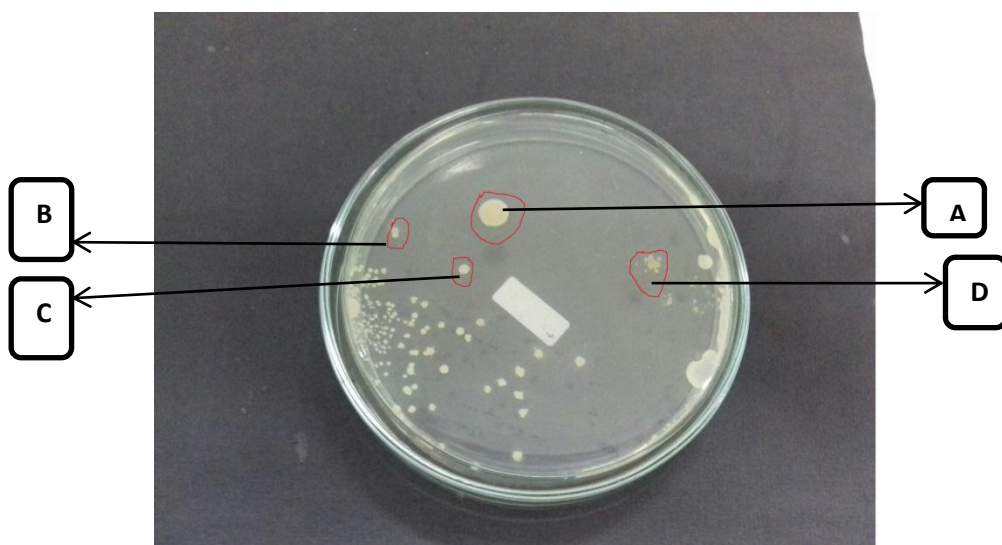


IV. PEMBAHASAN

4.1 Isolasi Bakteri Penghasil Enzil Gelatinase

Isolasi bakteri gelatinase yang diperoleh dari penelitian ini berasal dari sampel endofit mangrove *Sonneratia alba* yang diambil dari pantai bajul mati Malang Jawa Timur. Sampel endofit mangrove adalah dari bagian daun, batang akar dan buah untuk diambil 1 gram. Yang kemudian dilakukan pengenceran bertingkat dari 10^{-1} sampai 10^{-6} , yang kemudian pengenceran 10^{-4} sampai 10^{-6} merupakan isolat yang cukup untuk mewakili semua koloni bakteri yang tumbuh. Hasil isolat itu kemudian ditanam pada media LBA, dan diinkubasi selama 24 jam. Setelah diinkubasi selama 24 jam, koloni yang tumbuh kemudian diambil yang terbaik dan yang paling terpisah dari koloni lainnya dan tidak terjadi spreader. Pada hasil penanaman bakteri didapatkan 4 isolat bakteri yang diisolasi dapat dilihat pada Gambar 2. Setiap isolat bakteri diberikan kode untuk membedakannya dapat dilihat pada Tabel 1.



Gambar 5. Hasil Penanaman Bakteri (A) DSA 1, (B) DSA 2, (C) DSA 3, (D) DSA

Koloni bakteri kemudian dimurnikan dengan cara menggunakan metode *streak plate* dilakukan untuk mendapatkan bakteri yang lebih murni yang terpisah dari koloninya. 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} merupakan isolat yang cukup untuk mewakili semua koloni bakteri yang tumbuh. Dari sampel tersebut didapatkan isolat bakteri sebanyak 4 isolat yang tumbuh pada media agar LBA dengan kode DSA1, DSA2, DSA 3, DSA 4 yang dapat diisolasi. Isolasi bakteri adalah pengambilan atau memindahkan mikroba dari lingkungannya didalam dan menumbuhkannya sebagai biakan murni dalam medium buatan. Isolasi dilakukan untuk mendapatkan koloni tunggal. Hasil isolasi dapat dilihat pada Tabel 1 dan Lampiran 6 Gambar D.

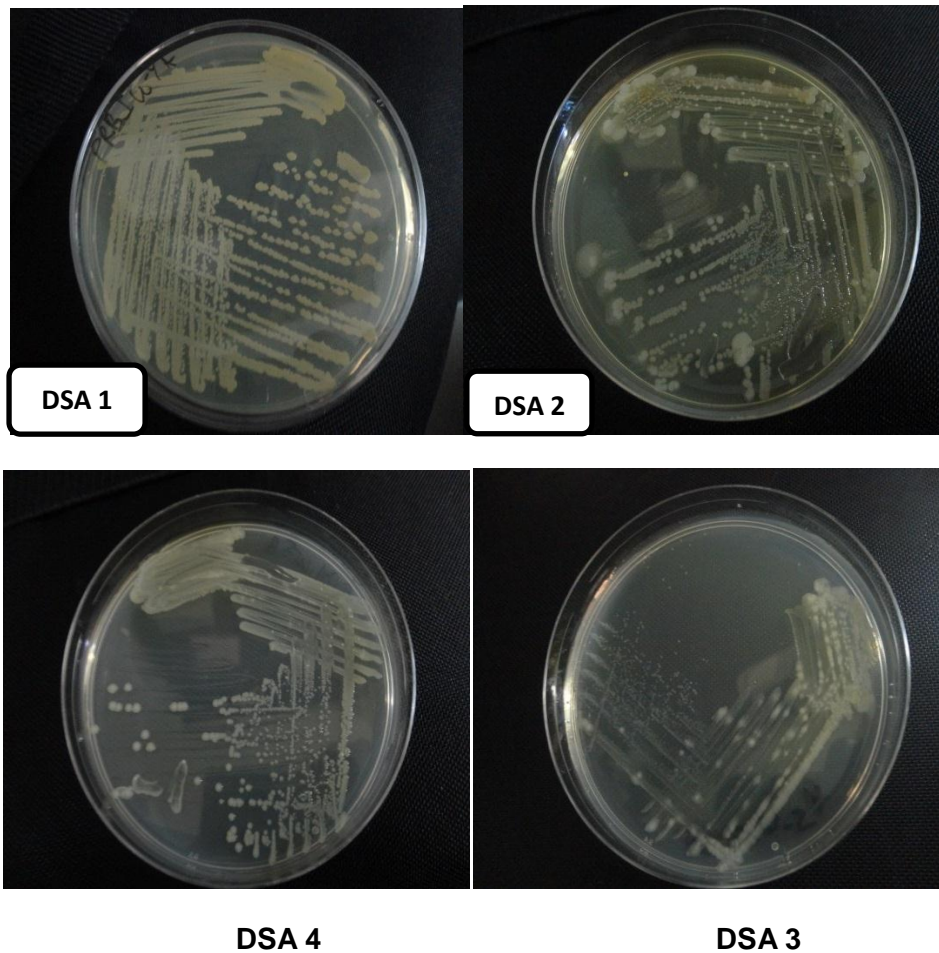
Table 1. Hasil Pengamatan Morfologi Bakteri Penghasil Enzim Gelatinase

Kode isolat	Morfologi koloni			
	Bentuk koloni	Permukaan koloni	Tepi koloni	Warna koloni
DSA 1	Elip	Tdak Rata	Utuh	Krem
DSA 2	Elip	Tidak Rata	Bergerigi	Krem
DSA 3	Bulat	Rata	Utuh	Krem
DSA 4	Bulat	Rata	Bergerigi	Krem

Pada Tabel 1. Menunjukkan bahwa diperoleh 4 isolat bakteri yang berhasil diisolasi dari endofit mangrove *Sonneratia alba* Pantai Bajul Mati, Malang dengan ciri-ciri makroskopis yang berbeda. Hasil morfologi koloni menunjukkan bahwa DSA 3 dan DSA 4 memiliki bentuk bulat, DSA 1 dan DSA 2 memiliki bentuk elip. DSA 3 dan DSA 4 memiliki permukaan koloni rata sedangkan DSA 1 dan DSA 2 memiliki permukaan koloni tidak datar. Tepi koloni pada kode DSA 1 dan DSA 3 memiliki permukaan koloni tidak datar. Tepi koloni pada kode DSA 1 dan DSA 3 memiliki tepi koloni yang utuh sedangkan dsa 2 dan DSA 4 memiliki tepi koloni bergerigi. Warna koloni SDA1, SDA 2, SDA 3 dan SDA \$ adalah krem yang ditunjukkan anak panah pada Gambar D.

Jumlah bakteri endofit tumbuhan *Sonneratia alba* lebih banyak terdapat pada bagian daun daripada bagian batang, akar dan buah. Jumlah bakteri endofit juga lebih banyak terdapat pada bagian daun daripada batang dan tumbuhan jeruk (Iecava *et al.*, 2004). Berbeda dengan Zinniel *et al.*, (2002). Menyatakan biasanya populasi bakteri lebih banyak di akar dan sedikit di daun dan batang. Jumlah bakteri endofit paling banyak berasal dari batang. Variasi jumlah bakteri endofit tergantung dari jenis tanaman, struktur tanah, umur tanah, sebaran geografis dan waktu pengambilan sampel. Jalur masuk bakteri endofit biasanya melalui akar, namun bagian tanaman yang terpapar udara langsung seperti daun (melalui stomata), bunga, batang dan kotiledon dapat juga sebagai jalur masuk bakteri endofit. Penelitian ini juga diperoleh bakteri endofit pada akar dan buah. Hal ini membuktikan bahwa bakteri endofit dapat diisolasi dari berbagai jaringan tanaman seperti akar, daun, batang dan buah (Simarmata, *et al.* 2007).

Setelah itu dilakukan pemurnian isolat dengan goresan kuadran 3 pada media LBA goresan kuadran bertujuan untuk memurnikan kembali isolat yang telah lama disimpan, selain itu untuk menghindari terjadinya kontaminasi oleh mikroba yang diinginkan. Lay (1994) menyatakan bahwa biakan murni merupakan biakan yang hanya mengandung satu jenis bakteri dari tiap koloni tersebut diambil dan lakukan pemurnian. Biakan murni hasil 3 kuadran dapat dilihat pada Lampiran 6 Gambar D.



Gambar 6. Hasil pemurnian bakteri dengan metode *streak plate* 3 kuadran

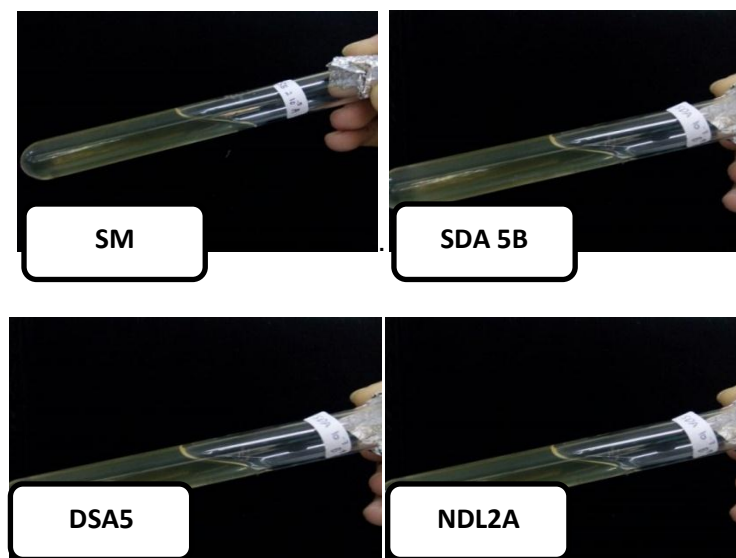
Isolat bakteri kemudian dipindah pada media agar miring untuk dilakukan peremajaan. Peremajaan isolat bakteri bertujuan untuk mencegah indukan terhindar dari kontaminasi serta menjaga ketersediaan cadangan bakteri selain itu juga untuk mengoptimalkan pertumbuhan dan daya simpan dari isolat tersebut lebih tahan lama. Pemindahan dan pemeliharaan kultur dilakukan secara berkala yaitu 4 minggu sekali ke dalam media agar miring yang baru yang bertujuan agar menjaga kualitas bakteri tersebut agar dapat disimpan pada waktu yang lebih lama dari seharusnya. Dapat dilihat pada Lampiran 6 Gambar 7.



Gambar 7. Hasil Isolat Bakteri Pada Agar Miring

4.2 Hasil Skrining Bakteri Penghasil Enzim Gelatinase

Hasil dari skrining enzim gelatinase 4 isolat bakteri dari sampel sedimen dapat dilihat pada tabel 3 dan aktivitas enzim gelatinase dapat dilihat pada gambar 8



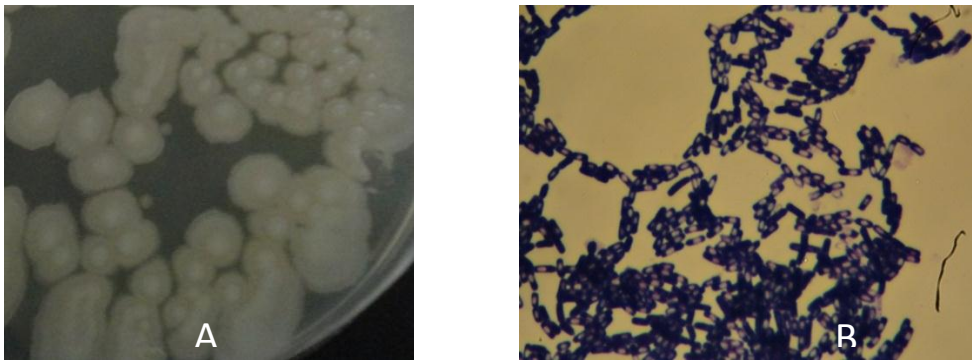
Gambar 8. Hasil Skrining Enzim Gelatinase Sampel Endofit Mangrove

Berdasarkan dari Gambar 8. Dapat dilihat bahwa 4 sampel tersebut memiliki aktivitas gelatinase akan berbentuk cair setelah dimasukkan kedalam lemari pendingin selama 15-30 menit, hal ini dikarenakan adanya aktivitas enzim gelatinase yang mendegradasi kandungan gelatin yang berada didalam media. Sehingga meskipun dimasukkan kedalam lemari pendingin media akan tetap mencair (Leboffe dan Pierce, 1999). Kehadiran enzim gelatinase dapat dideteksi menggunakan media *Nutrient Gelatin*. *Nutrient Gelatin* berbeda dengan media padat lainnya sehingga aktivitas enzimatik dapat dilihat melalui tingkat kesolid-an media. Akibatnya saat mikroorganisme yang mengandung enzim gelatinase diinokulasikan kedalam media *Nutrient Gelatin*, sekresi dari enzim gelatinase akan mencairkan media tersebut. Sedangkan organisme yang tidak mengandung enzim gelatinase tidak mensekresikan enzim yang dapat memecah gelatin sehingga media tetap solid (mengegel). Aktivitas enzim gelatinase terkadang sangat lambat, hanya menghasilkan pencairan setelah 7 hari inkubasi (Sopiah *et al.*, 2011).

4.3 Hasil Uji Identifikasi Bakteri

Identifikasi yang dilakukan meliputi pengamatan visual, pewarnaan gram dan uji biokimia. Pengamatan visual dilakukan dengan mengamati bentuk dan warna koloni yang akan diidentifikasi. Pewarnaan gram yang dilakukan untuk mengetahui morfologi sel bakteri serta untuk membedakan bakteri gram positif dan gram negatif. Prosedur pewarnaan gram dimulai dengan pemberian pewarna basa, kristal violet dan penambahan larutan iodine, kemudian semua bakteri akan terwarnai biru pada fase ini dan kemudian akan diberi alkohol. Sel gram positif akan tetap mengikat senyawa kristal violet-iodine alkohol. Sebagai langkah terakhir, *counter strain* misalnya seperti safranin yang berwarna merah ditambahkan sehingga sel gram negatif yang tidak berwarna akan mengambil

warna kontras, sedangkan sel gram positif terlihat dalam warna biru keunguan (violet). Perbedaan ini terjadi karena perbedaan penyusun peptidoglikan pada struktur dinding selnya. Pewarnaan gram digunakan untuk mengetahui morfologi sel bakteri serta untuk membedakan bakteri gram positif dan gram negatif. Jika dilihat dibawah mikroskop, bakteri gram positif akan berwarna ungu dikarenakan dinding sel dapat menahan kompleks pewarna primer (CGV-Lugol), sedangkan bakteri Gram negatif berwarna merah karena pada pewarna primer (CGV-Lugol) hilang akibat pembilasan dengan alkohol yang terwarnai oleh pewarna air fuksin, identifikasi dengan *microbact identification kit* dilakukan menggunakan *microbact* 24E karena hasil oksidasinya positif. Pengamatan morfologi pada isolat bakteri DSA5 penghasil enzim gelatinase pertama-tama dilakukan dengan pengamatan visual. Bakteri tersebut memiliki spora berwarna krem dan bentuk koloni bulat. Sel bakteri ini berbentuk basil diameter koloni 3,82 μm , tepi koloni tidak rata, mempunyai elevansi koloni yang datar, konsistensi basah dan tergolong dengan bakteri gram positif. Hasil ini menunjukkan kesamaan dengan buku bergeys (1986) bahwa bakteri *Bacillus megaterium* termasuk kedalam golongan bakteri gram positif, memiliki warna krem atau kuning, bentuk koloni bulat dan diameter koloni $>1 \mu\text{m}$. Berikut adalah gambar koloni dan hasil pewarnaan gram (1000X) dapat dilihat pada Gambar 9.



Gambar 9. A. Foto Koloni dan B..Foto Sel *Bacillus Megaterium* Pada Perbesaran 1000X

Identifikasi bakteri isolat SBM5 menggunakan *Microbact identification kit* sistem GNB 12B dan 12E atau disebut juga uji biokimia. Pengujian *Microbact identification kit* ini dilakukan di laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Dari pengujian tersebut didapatkan hasil di antara lain adalah uji biokimia . pengujian biokimia ini meliputi uji katalase, uji oksidase, uji uji MIO (Motility, Indole, Ornithine), uji O/F, uji triple sugar iron agar (TSIA), uji LIA (Lysin Iron Agar), uji O/F, uji triple sugar iron agar (TSIA), uji LIA (Lysin Iron Agar), uji MIO (Motility, Indole, Ornithine), c laktosa, sukrosa, arabinosa, manitol, inositol, maltosa, trehalose, dulcitol dan xylose). Hasil pengamatan uji biokimia dapat dilihat pada Tabel 2. sebagai berikut:

Table 2. Hasil perbandingan dari hasil Uji Biokimia isolate bakteri dengan pustaka (*Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*)

No.	Ujibiokimia	Isolate	BukuBergey's	Keterangan
1	Spora	+	+	Cocok
2	Katalase	-	+	Tidakcocok
3	Oksidase	+	+	Cocok
4	Nitrat	+	+	Cocok
5	Lysin	-	-	Cocok
6	V-P	-	-	Cocok
7	H ₂ S	-	-	Cocok
8	Indol	-	-	Cocok
9	Motilitas	-	+	TidakCocok
10	Ornithin	-	-	Cocok
11	Arginin	-	-	Cocok
12	Urease	-	Td	
13	Sitrat	-	+	TidakCocok
14	Koagulase	+	Td	
15	ONPG	+	Td	
16	TDA	-	Td	
	Uji Gula-gula =			
	- Glukosa	+	+	
	- Arabinosa	-	-	
	- Xylosa	-	+	Tidak Cocok
	- Manitol	-	+	Cocok
	- Adonitol	-	Td	Cocok
17	- Inositol	-	Td	TidakCocok
	- Lactosa	+	Td	TidakCocok
	- Rafinosa	-	Td	
	- Ramnosa	-	Td	
	- Salicin	-	Td	
	- Sukrosa	-	Td	
	<i>Hidrolisis =</i>			
18	- <i>Gelatine</i>	+	+	Cocok
	- <i>Starch</i>	+	+	Cocok
	- <i>Casein</i>	+	+	Cocok
19	Malonate	-	Td	
20	Hemolisa	Beta	Beta	Cocok
21	Uji sensitive Novobiosin	TDK	TDK	Cocok

Keterangan: td = Tidak ada dalam pustaka

Dari hasil pengamatan morfologi dan uji biokimia yang dibandingkan dengan buku *bergey's manual of Determinate Bacteriology* (Sneath, et al.1986) sehingga didapatkan kecocokan karakteristik dengan beberapa genus bakteri. Dari hasil pengujian biokimia yang dilakukan, isolat bakteri DSA 4 memiliki kecocokan dengan bakteri *Bacillus megaterium* sebesar 71,4%.

Bacillus megaterium adalah bakteri gram positif, berbentuk batang pembentuk endospora. Bakteri ini termasuk dalam bakteri aerobik, tetapi bakteri ini juga mampu tumbuh di bawah kondisi anaerobik bila diperlukan. Bakteri tumbuh pada suhu 15°C - 45°C, reaksi gula-gula positif pada glukosa xylosa, manitol, sukrosa, maltose dan arabinosa dan negatif pada laktosa, media tumbuh positif pada *Nutrient Broth* (NB) dan negative pada media MCA, citrate, indol, MR, VP, motilitas positif, tidak menghidrolisis pati, sensitif terhadap penisilin, reaksi dengan β hemolisa, katalase positif, oksidase positif, tidak mereduksi nitrat dan methylen blue (Bergey's, 2005).

Isolat bakteri *Bacillus megaterium* memiliki ciri yaitu selnya berbentuk basil (batang), mempunyai spora, mampu memfermentasi gula – gula (glukosa, manitol sukrosa, arabinosa, dan xylosa), positif membentuk β -hemolisa, tidak resisten terhadap Novobiocin, mengkatalase dan menghidroksidase *hydrogen* untuk menghasilkan oksigen (Fithriyah, 2015).

Menurut Brook (2001), klasifikasi dari *Bacillus megaterium* adalah sebagai berikut :

Kingdom	: <i>Prokaryota</i>
Divisi	: <i>Protophyta</i>
Class	: <i>Schizomycetes</i>
Ordo	: <i>Eubacteriales</i>
Family	: <i>Bacillaceae</i>
Genus	: <i>Bacillus</i>
Spesies	: <i>Bacillus megaterium</i>

Bacillus megaterium merupakan bakteri non-patogen dan biasanya ditemukan pada tanah dan sumber air panas. Spesies ini menjadi menarik karena mampu memproduksi enzim yang menjanjikan dalam bidang bioteknologi, produksi rekombinan protein, dan produksi rekombinan fragmen antibodi. Disisi lain bakteri ini tidak mampu untuk memproduksi protease (Malle,et al.2012).

Beberapa golongan *Bacillus* sp. Seperti megaterium merupakan bakteri aerob, gram positif, berbentuk batang dengan ukuran diameter 1,2 – 1,5 µm dan panjang 2,0 – 2,4 µm, bentuk sel-sel silindris sampai oval dan bentuk pear, dan motil endospora. Selain itu bakteri ini juga ditemukan dari beberapa perairan dan mangrove *Avicennia marina*, *Rhizophora apiculata*, *Avicennia alba* dan *Sonneratia alba* (Yahya,et al.2014).

Hasil identifikasi pada penelitian ini dibandingkan dengan buku panduan manual Menurut Bergey's (1986), mengenai karakteristik *Bacillus megaterium* menunjukkan beberapa perbedaan hasil meliputi uji motilitas, uji manitol, uji xylitol, uji gelatin dan uji katalase. Pada penelitian ini uji motilitas, uji manitol, uji xylitol. Perbedaan hasil tersebut dapat terjadi karena bakteri merupakan makhluk hidup yang dapat berubah karena dipengaruhi oleh faktor lingkungan sehingga hasil yang didapatkan tidak selalu sama persis. Selain itu faktor lingkungan juga dipengaruhi saat melakukan tahap isolasi dan identifikasi bakteri tersebut.

Berdasarkan pengamatan identifikasi, morfologi, pewarnaan Gram dan uji biokimia dan dibandingkan dengan buku panduan manual bergey's (1986) dapat disimpulkan bahwa bakteri penghasil enzim gelatinase pada endofit mangrove berasal dari genus *Bacillus*, dengan spesies *Bacillus megaterium*