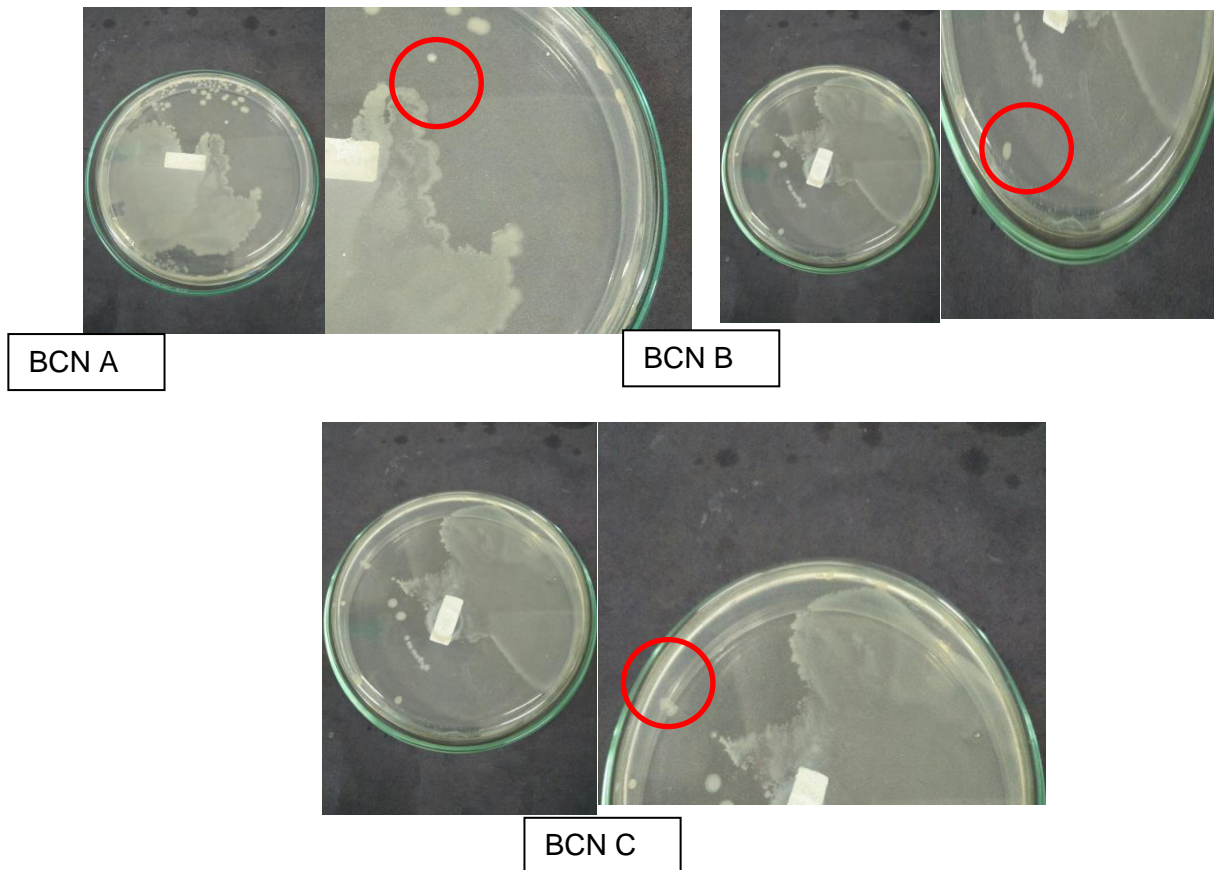


4. HASIL DAN PEMBAHASAN

Isolasi bakteri yang diperoleh dari penelitian ini berasal dari sampel sedimen Pantai Buncaran Malang Jawa Timur. Sampel sedimen diambil sebanyak 1 g. Hasil penginokulasian berdasarkan metode pengenceran bertingkat, pengenceran 10^{-3} , 10^{-4} dan 10^{-5} merupakan isolat yang cukup untuk mewakili semua koloni bakteri yang tumbuh. Dari sampel tersebut didapatkan isolat bakteri sebanyak 3 isolat yang tumbuh pada 1 cawan petri media agar LBA dapat dilihat pada Gambar 6.



Gambar 1. Hasil Isolat Bakteri (ditandai dengan lingkaran merah)

Tabel 1. Morfologi koloni bakteri Sedimen Pantai Buncaran

No	Isolat	Bentuk	Tepi	Warna	Elevasi
1	BCN A	Bulat	Rata	Krem	Cembung
2	BCN B	Elip	Rata	Krem	Cembung
3	BCN C	Tidak beraturan	Bergerigi	Krem	Cembung

Isolat bakteri pada cawan kemudian dipindahkan ke agar miring. Hal tersebut dilakukan dengan tujuan untuk menyimpan isolat bakteri sehingga dapat digunakan dalam jangka waktu yang lama. Peremajaan dilakukan secara berkala dimana tujuan peremajaan adalah untuk mengaktivasi isolat bakteri dan mengoptimalkan pertumbuhan bakteri agar nutrisinya tetap terjaga. Isolat bakteri pada agar miring dapat dilihat pada Gambar 7.



Gambar 2. Stok Isolat agar miring

4.1 Penapisan Bakteri Penghasil Gelatinase

Selanjutnya ada sebanyak 3 isolat bakteri yang berhasil diisolasi dari sedimen pantai Buncaran dan masing-masing isolat tersebut diinokulasi pada media penapisan gelatinase dengan cara melakukan uji gelatinase. Media ini berfungsi untuk penapisan bakteri yang dapat menghasilkan gelatinase. Hasil isolat bakteri positif (+) gelatinase ditandai dengan perubahan bentuk media gelatin dari padat menjadi cair dan didapatkan hasil yang tertera di Tabel 5.

Tabel 2. Isolat Bakteri yang Positif Gelatinase

No	Kode	Pertumbuhan pada medium penapisan
1.	BCN A	+
2.	BCN B	-
3.	BCN C	-

Keterangan :

+ :Tumbuh

- : Tidak tumbuh

Dari tabel diatas didapatkan satu hasil isolat bakteri yang positif gelatinase yaitu sampel BCN A yang terlihat pada Gambar 8.



Gambar 3. Isolat yang positif Gelatinase

Isolat yang positif gelatinase dapat diketahui dengan cara meletakkan isolat kedalam lemari es atau suhu yang rendah. Lalu ditunggu hingga 15-30 menit. Apabila isolat tersebut tetap cair saat suhu rendah, maka isolate tersebut positif gelatinase.

Isolat gelatin yang negatif gelatinase akan tetap membentuk gel setelah didinginkan dalam lemari es, sedangkan isolat gelatinase yang positif, media gelatin akan tetap cair meskipun didinginkan, karena bakteri isolat memiliki gelatinase yang mampu menguraikan media gelatin (Huda *et al.*, 2012).

4.2 Identifikasi Mikroorganisme

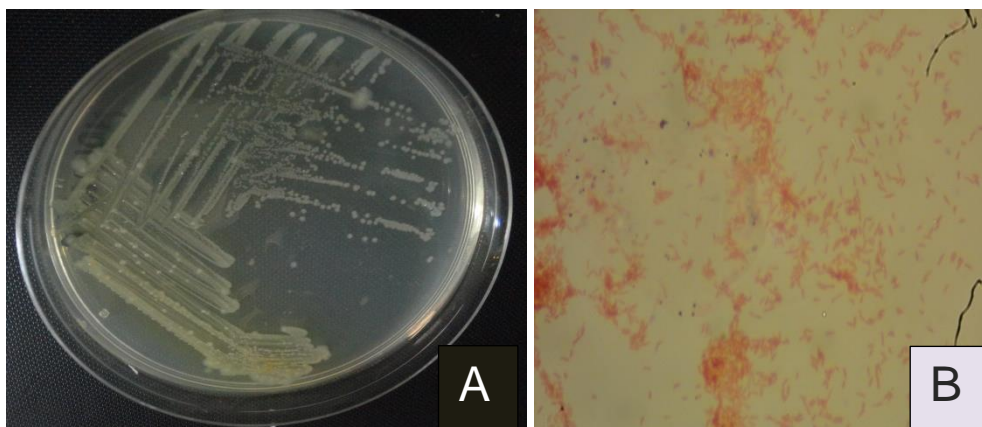
Pada proses identifikasi mikroorganisme, mikroba berukuran sangat kecil, sehingga diperlukan alat bantu untuk mengamatinya. Namun demikian,

penggunaan alat bantu tersebut hanya untuk mengamati morfologinya. Masih diperlukan metode lain untuk mengidentifikasinya. Identifikasi mikroba berguna untuk mempelajari secara detail karakter fisik, kimiawi, dan biologis mikroba sehingga dapat diketahui dan dimanfaatkan secara optimal. Identifikasi mikroorganisme dilakukan dengan dua tahapan yang pertama uji pewarnaan Gram sehingga diketahui bakteri Gram positif atau Gram negatif kemudian dilakukan uji lanjutan yaitu uji *microbact system* yang bertujuan untuk mengetahui sifat biokimia pada bakteri sehingga dapat ditentukan jenis dan spesiesnya.

4.2.1 Uji Pewarnaan Gram

Selanjutnya pada tahapan ini dilakukan uji pewarnaan Gram. Tahapan ini bertujuan untuk mengetahui apakah bakteri tersebut merupakan bakteri Gram positif atau bakteri Gram negatif, bakteri Gram positif memiliki warna ungu sedangkan bakteri Gram negatif bewarna merah, warna ungu yang dihasilkan dari bakteri Gram positif karena bakteri tersebut mengikat kompleks zat kristal warna ungu-violet, sedangkan warna merah yang dihasilkan dari bakteri negatif karena bakteri tersebut mengikat za warna sekunder yaitu safranin.

Hasil isolat bakteri BCN A dari sedimen pantai yang diamati menggunakan mikroskop dengan perbesaran 1000X termasuk dalam golongan bakteri gram negatif karena memiliki warna merah. Bakteri tersebut memiliki bentuk basil dengan motilitas motil. Adapun gambar bakteri dapat dilihat pada Gambar 9.



Gambar 4. A. Hasil goresan zig zag B. Bakteri Gram negatif (Perbesaran 1000X)

4.2.2. Uji *Microbact System*

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 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 dan terwarnai oleh pewarna lugol.

Bakteri dari sedimen Pantai Buncaran memiliki uji oksidase positif, jadi pada pengujian *microbact system* menggunakan *microbact 24E*. pada uji tersebut akan dilakukan uji meliputi uji oksidase, motilitas, ornitin, ONPG, V-P, sitrat, gelatin, sukrosa, laktosa, arabinose dan katalase. menghasilkan spesies *Pseudomonas stutzeri*. Adapun hasil identifikasi dapat dilihat pada tabel 6

Tabel 3. Hasil Identifikasi *Pseudomonas stutzeri* dengan *Microbact system*

No	Uji Biokimia	Hasil Uji	Bergeys <i>Manual</i>
1	Oksidase	+	+
2	Motilitas	+	+
3	Ornithin	+	+
4	ONPG	+	+
5	V-P	+	+
6	Sitrat	-	-
7	Gelatin	+	-
8	Sukrosa	-	+
9	Laktosa	-	-
10	Arabinosa	-	-
11	Katalase	-	-

Keterangan : (+), lemah; + ,90% atau lebih strain adalah positif; -, 90% oatau lebih strain adalah negatif

Dari hasil yang didapatkan pada tabel , dapat dijelaskan sebagai berikut :

Hasil uji karakteristik biokimia dari microbact adalah sebagai berikut: Uji oksidase positif (+), uji motilitas positif (+), uji ornitin positif (+), uji ONPG positif (+), uji V-P positif (+), uji sitrat negatif (-), Uji fermentasi gula sukrosa (-), laktosa negatif (-), arabinosa negatif (-)

- Uji Oksidase

Uji Oksidase pada sampel BCN A memberikan hasil positif, hal tersebut dengan Brenner *et al.*,(2005) yang mengatakan pada bakteri *Pseudomonas Stutzeri* memiliki hasil yang positif. Yang ditandai dengan perubahan warna pada kertas tetrametil dari putih menjadi ungu pada saat isolat bakteri di oleskan pada kertas tersebut. Perubahan warna ini terjadi karena bakteri BCN A mensekresikan oksidase sehingga mampu menguraikan zat tetrametil yang ada pada kertas. Menurut Lay (1994), bakteri yang bersifat positif pada uji oksidasi ini menunjukkan bahwa bakteri tersebut memiliki Oksidase

- Uji Motilitas

Uji Motilitas pada sampel BCN A memberikan hasil positif , hal tersebut sesuai dengan Volk (1988) dimana pada bakteri *Pseudomonas Stutzeri* ,

memiliki sifat motil, sifat ini diakibatkan oleh adanya alat pergerakan yang disebutkan flagella, sehingga bakteri dapat bergerak dalam air.

- Uji Ornithin

Pada uji ini, isolat bakteri bernilai positif hal itu ditandai dengan perubahan warna menjadi ungu. Hal tersebut sesuai dengan (Habibie *et al.*, 2014) yang menyatakan bahwa *ornithin dekarboxylase* positif apabila daerah anaerob media berwarna ungu dan biru. Ornithin dekarboxylase negatif apabila daerah anaerob media berwarna kuning.

- Uji ONPG

Pada uji ONPG bakteri bernilai positif yang ditandai dengan terbentuknya warna kuning pada media tabung apabila reaksi positif, artinya bakteri ini memiliki enzim β -galactoside

- Uji Voges-Proskauer (V-P)

Pada Hasil uji V-P, menunjukkan hasil yang positif, dimana pada uji terbentuk warna merah pada medium setelah ditetesi reagen barrit A dan barrit B. hal tersebut dikarenakan Menurut Norman (2005), hasil positif pada uji Voges Proskauer (VP) menunjukkan bahwa bakteri mampu mengkonversi glukosa menjadi asetonin. Menurut Lay (1994) uji ini digunakan untuk mengidentifikasi mikroorganisme yang melaksanakan fermentasi 2,3 butanadiol. Bila bakteri memfermentasikan karbohidrat menjadi 2,3 butanadiol sebagai produk utama, akan terjadi penumpukkan bahan tersebut dalam media pertumbuhan. warna kuning pada medium.

- Uji Sitrat

Pada hasil uji Sitrat menunjukkan hasil yang negatif ditandai dengan tidak adanya perubahan warna dari hijau menjadi biru. Hal tersebut dikarenakan isolat bakteri tidak mampu menguraikan sitrat, tidak adanya penghilangan asam yang ada pada media biakan.

Adanya perubahan warna dari hijau menjadi biru, hal ini menandakan bahwa semua isolat mampu menggunakan sitrat sebagai satu-satunya sumber karbon. Perubahan warna ini terjadi karena di dalam media Simon's Citrat terdapat pH indikator brom thymol blue. Menurut Lay (1994) bila mikroorganisme mampu menguraikan sitrat, maka asam akan dihilangkan dari medium biakan, sehingga menyebabkan pH dan mengubah warna medium dari hijau menjadi biru.

- Uji Gelatin

Pada Uji Gelatin menunjukkan hasil yang positif ditandai dengan kemampuan isolat bakteri tersebut dalam membuat gelatin tetap cair. Menurut (Hadioetomo,1993) . Larutan gelatin bersifat cair pada suhu ruang atau suhu kamar dan padat apabila berada di dalam lemari es. Jika gelatin telah dihidrolisis oleh jasad renik maka akan tetap berifat cair meskipun berada di dalam suhu es yang menunjukkan reaksi positif.

- Uji Katalase

Pada Uji Katalase hasil yang didapatkan adalah negatif yang artinya bakteri ini tidak mempunyai enzim katalase, sehingga bakteri ini tidak mampu mengubah hydrogen peroksida menjadi oksigen dan air. Bakteri yang positif katalase merupakan bakteri yang memerlukan oksigen menghasilkan hydrogen peroksida yang sebenarnya beracun bagi mikroba itu sendiri, namun bisa tetap hidup dikarenakan adanya antimetabolit tersebut. Karena mereka menghasilkan enzim katalase yang mampu mengubah hydrogen peroksida menjadi oksigen dan air (Volk,1993).

- Uji Fermentasi Gula

Dari uji *microbact* 24E, isolat bakteri dari sedimen pantai Buncaran Malang . Adapun fermentasi gula-gula yang dihasilkan (laktosa, sukrosa, arabinosa) tidak ada yang bernilai positif (+)

Perbedaan hasil dapat terjadi karena bakteri merupakan makhluk hidup yang dapat berubah karena dipengaruhi oleh faktor lingkungan sehingga hasil yang didapatkan tidak selalu sama persis. Selain faktor lingkungan juga dipengaruhi saat melakukan tahap isolasi dan identifikasi bakteri tersebut.

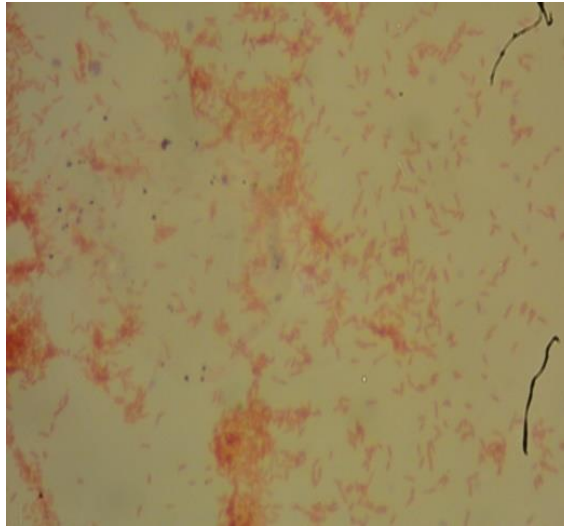
Didalam identifikasi suatu jenis bakteri yang belum diketahui dari suatu isolasi, tidak cukup dengan hanya mengamati sifat morfologinya. Perlu juga dilakukan penelitian sifat fisiologi dan kimianya (Soetarto *et al.*, 2008)

4.3.3 *Pseudomonas stutzeri*

Pseudomonas Stutzeri merupakan bakteri yang memiliki sel berbentuk lurus atau sedikit berlekuk. Bakteri ini memiliki flagela, bersifat motil, merupakan bakteri aerob, yaitu tipe bakteri yang membutuhkan oksigen. Termasuk bakteri Gram negatif, banyak ditemukan di tanah dan banyak dijumpai di sungai dan menyerang ikan air tawar (Hardhianto, 2010). *P.Stutzeri* pertama kali diisolasi dari cairan tulang belakang manusia dan didistribusikan secara luas di lingkungan. (Sung *et al.*, 2012)

Pseudomonas Stutzeri dapat bertahan hidup di tanah,berkoloni di permukaan dan menyerbu lapisan dangkal dari akar koteks. Hal inilah yang dapat disebut endofit, dilaporkan bahwa analisis dari genom yang komplit dan dibandingkan dengan spesies *Pseudomonas* lainnya. Survey genom juga mengungkapkan kehadiran sejumlah kluster gen yang menarik dan dapat dilibatkan di kompetensi rrhizosfer dan kolonisasi induk. (Dohler *et al.*, 1987)

Pseudomonas stutzeri terlihat pada gambar 10.



Gambar 5. *Pseudomonas stutzeri*

Menurut Dohler *et.al.*, (1987) klasifikasi bakteri *Pseudomonas Stutzeri* adalah sebagai berikut :

Kingdom	: Bacteria
Phylum	: Proteobacteria
Class	: Gammaproteobacteria
Order	: Pseudomonadales
Family	: Pseudomonadaceae
Genus	: Pseudomonas

Species : *P. stutzeri*

Pseudomonas jarang menyebabkan infeksi pada manusia. Bakteri ini juga dikaitkan dengan tingkat penghapusan kateter yang lebih tinggi dan konversi menjadi hemodialisis dibandingkan dengan mikroorganisme umum (Siva et al., 2009).

Bakteri Gram-negatif adalah bakteri yang tidak dapat mempertahankan zat warna kristal violet sewaktu proses pewarnaan Gram sehingga akan berwarna merah bila diamati dengan mikroskop. Disisi lain, bakteri Gram positif akan berwarna ungu. Perbedaan keduanya didasarkan pada perbedaan struktur dinding sel yang berbeda dan dapat dinyatakan oleh prosedur pewarnaan Gram. (Madigan dan Martinko,2006) Di sisi lain, bakteri Gram negatif memiliki sistem

membran ganda di mana membran pasmanya diselimuti oleh membran luar permeabel. Bakteri ini mempunyai dinding sel tebal berupa peptidoglikan, yang terletak di antara membran dalam dan membran luarnya. (Cooper dan Hausman,2007).

Banyak spesies bakteri Gram negatif yang bersifat patogen, yang berarti mereka berbahaya bagi organisme inang. Sifat patogen ini umumnya berkaitan dengan komponen tertentu pada dinding sel Gram negatif, terutama lapisan lipopolisakarida (dikenal juga dengan LPS atau endotoksin) (Presscott *et al.*, 2002).