

4. HASIL DAN PEMBAHASAN

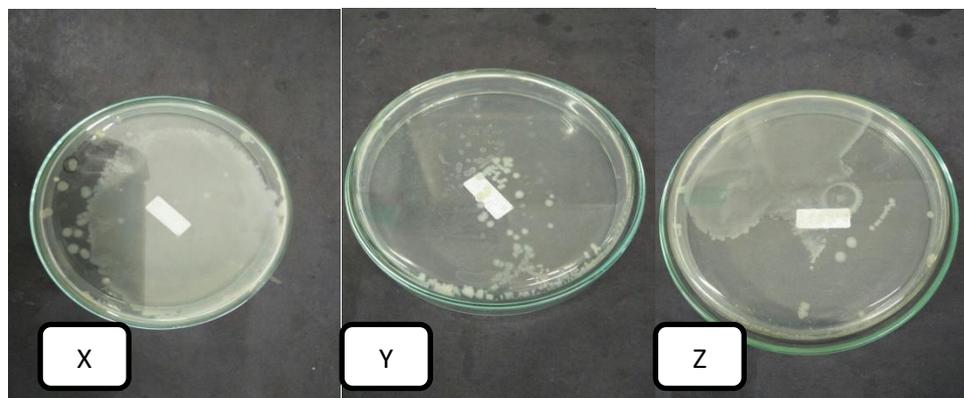
4.1. Hasil Isolasi Endapan Sedimen

Endapan sedimen dari pantai Ngudel yang telah dikeringkan, kemudian dilakukan pengenceran dari 10^{-1} hingga 10^{-5} kemudian dilakukan penanaman pada media LBA. Penanaman dilakukan pada pengenceran 10^{-3} , 10^{-4} , dan 10^{-5} lalu dilakukan inkubasi selama 24 jam.

Tabel 3. Keterangan Sampel

Kode Bakteri	Keterangan
X	Penanaman dan pengenceran 10^{-3}
Y	Penanaman dan pengenceran 10^{-4}
Z	Penanaman dan pengenceran 10^{-5}

Setelah dilakukan inkubasi dengan metode sebar maka akan tumbuh koloni bakteri yang dapat dilihat pada gambar.



Gambar 3. Hasil Inkubasi dari Metode Sebar

Hasil inkubasi yang ditunjukkan gambar 4. Terdapat koloni-koloni yang tumbuh. Hal ini sesuai dengan pernyataan Hadioetomo (1990), Metode sebaran merupakan metode isolasi dengan cara menyebarkan sampel cair yang mengandung mikroorganisme pada permukaan media agar dalam petridish steril menggunakan *spreader* atau *hockey glass*. Setelah inkubasi, pada permukaan

media akan tumbuh koloni-koloni terpisah sehingga didapatkan biakan murni. kemudian dilakukan pemurnian koloni dengan pola zig-zag sehingga didapatkan isolat bakteri yang steril, sesuai dengan pernyataan Pelczar dan Chan (1986), *streak kuadran* bertujuan untuk mendapatkan suatu biakan murni tanpa adanya kontaminasi dari mikroorganisme yang lain yang tidak diinginkan.

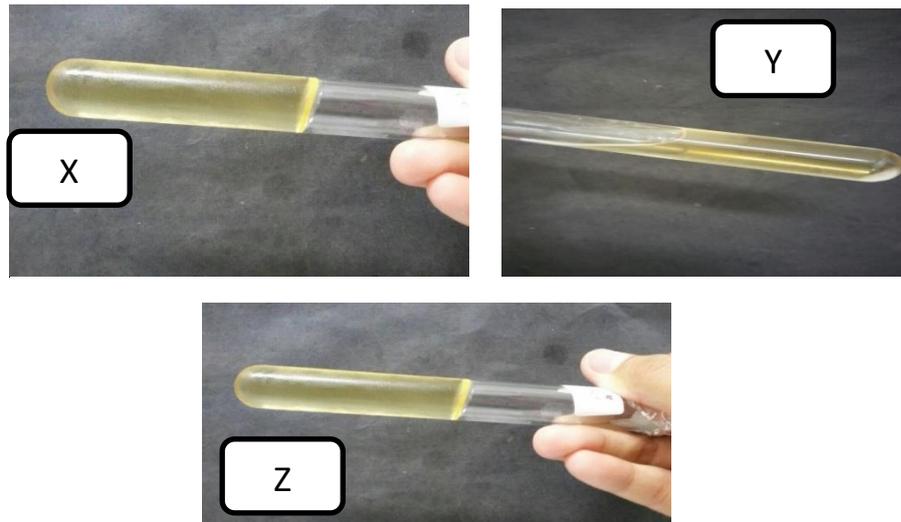
Isolat bakteri yang terdapat pada cawan kemudian dipindahkan pada agar miring. Pemindahan isolat bakteri pada agar miring bertujuan untuk menyimpan isolat bakteri dalam jangka waktu lama agar bisa diamati. Untuk memperlama masa simpan, dilakukan peremajaan dengan tujuan untuk mengaktivasi isolat bakteri dan mengoptimalkan pertumbuhan bakteri tersebut.



Gambar 4. Hasil Setelah Pemindahan Agar Miring

4.2. Skrining Bakteri Penghasil Enzim Gelatinase

Pada tahap selanjutnya adalah isolat bakteri dari proses sebelumnya yang kemudian diinokulasi ke media skrining Gelatinase yaitu dengan cara melakukan uji gelatinase. Pengujian dilakukan dengan memperhatikan tingkat kekentalan media skrining Gelatinase. Semakin kental media skrining tersebut menandakan semakin sedikit atau tidak mengandung enzim gelatinase.



Gambar 5. Hasil Skringing

Tabel 4. Hasil Penilaian Bakteri Penghasil Gelatinase

No	Kode	Pengamatan pada media skringing
1.	X	-
2.	Y	+
3.	Z	-

Keterangan: - : tidak terdapat aktivitas enzim gelatinase
 + : terdapat aktivitas enzim gelatinase

Perubahan media gelatin menjadi cair setelah proses penyimpanan dalam lemari pendingin disebabkan karena adanya aktivitas enzim gelatinase. Pengujian gelatin dilakukan dengan cara mengamati perubahan yang terjadi. Indikasi tumbuhnya bakteri penghasil gelatinase adalah media gelatin yang tetap mencair setelah proses penyimpanan di dalam lemari pendingin (Cruz dan Jeremy, 2012).

Dari gambar 5, dapat disimpulkan bahwa pada tabung reaksi kode Y mempunyai larutan yang cair yang menandakan bahwa bakteri pada media tabung Y mengandung enzim gelatinase. Dan pada tabung X dan Z tidak mengandung enzim gelatinase, yang ditandai dengan tidak mencairnya larutan uji tersebut. Dari hasil percobaan diatas, tabung dengan kode Y akan digunakan untuk mengidentifikasi mikroorganisme dengan uji *microbact*.

4.3. Identifikasi Mikroorganisme

Pada langkah identifikasi mikroorganisme ini, mikroba berukuran sangat kecil, tidak kasat oleh mata sehingga diperlukan alat bantu untuk mengamatinya. Namun demikian, penggunaan alat bantu tersebut hanya untuk mengamati morfologinya. Masih diperlukan metode lain untuk mampu 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 spesies.

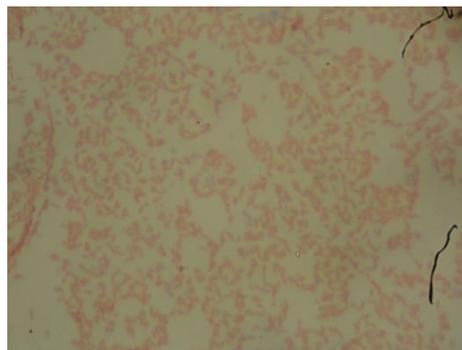
4.3.1. Uji Pewarnaan Gram

Tujuan pengujian pewarnaan gram adalah untuk mengetahui apakah bakteri tersebut merupakan bakteri gram positif atau gram negatif. Dari hasil pengujian tersebut bakteri gram positif memiliki warna ungu karena bakteri tersebut mengikat kompleks zat kristal warna-ungu violet, sedangkan bakteri gram negatif berwarna merah karena bakteri tersebut mengikat zat warna sekunder yaitu safranin.

Hasil pewarnaan gram menyatakan bakteri gram positif adalah bakteri yang dapat mempertahankan zat warna metal ungu saat diamati di bawah mikroskop, sedangkan bakteri gram negatif tidak dapat mempertahankan zat warna metal ungu dan bakteri gram negatif akan berwarna merah muda saat diamati dibawah mikroskop. Perbedaan klasifikasi antara kedua jenis bakteri ini terutama didasarkan pada perbedaan struktur dinding sel bakteri (Pelezar dan Chan, 1986).

Perbedaan reaksi kedua golongan bakteri tersebut terhadap pewarnaan gram disebabkan bakteri gram positif memiliki dinding sel tebal yang akan menyusut pada saat pembilasan alkohol, sehingga pori-porinya menutup dan mencegah keluarnya kompleks pewarna primer pada saat pemucatan. Sedangkan dinding sel bakteri gram negatif mengandung banyak lipid yang larut dalam alkohol pada saat pembilasan. Larutnya lipid memperbesar pori-pori dinding sel dan proses pemucatan berlangsung cepat (Cappucino,1983).

Untuk hasil bakteri dari endapan sedimen pantai ngudel Malang, bahwa sel bakteri yang diamati termasuk dalam golongan bakteri gram negatif. Bakteri tersebut memiliki bentuk basil dengan motilitas motil. Memiliki diameter koloni 2, 19 mm.



Gambar 6. Hasil Pewarnaan Gram

4.3.2. Uji *Microbact System*

Langkah berikutnya setelah dilakukan uji pewarnaan gram dan diketahui bahwa isolate bakteri merupakan jenis bakteri gram negatif, maka dilakukan tahap identifikasi bakteri dengan menggunakan *microbact system*, sebelum dilakukan uji *microbact system* dilakukan uji oksidase terlebih dahulu, apabila uji oksidase yang telah dilakukan hasilnya positif maka menggunakan *microbact 24E*, dan apabila hasil dari uji oksidase tersebut negatif maka menggunakan *microbact 12E*

Perbandingan antara uji *microbact* yang dilakukan di laboratorium mikrobiologi fakultas kedokteran universitas Brawijaya dengan *Bergey's manual* dapat dilihat pada tabel berikut:

Tabel 5. Perbandingan Hasil Pengujian dari Bakteri *Proteus mirabilis*

No.	Uji Biokimia	Hasil Uji <i>Microbact</i>	<i>Bergey's Manual</i>	O'hara <i>et al.</i> , 2000
1.	Spora	-	Tidak diuji	Tidak diuji
2.	Oksidase	+	-	Tidak diuji
3.	Motilitas	+	+	Tidak diuji
4.	Nitrat	+	+	Tidak diuji
5.	Lysin	+	Tidak diuji	-
6.	Ornithin	+	+	+
7.	H ₂ S	+	+	Tidak diuji
8.	Glukosa	+	+	+
9.	Manitol	-	-	Tidak diuji
10.	Xylosa	+	+	+
11.	ONPG	+	-	Tidak diuji
12.	Indole	+	-	-
13.	Urease	+	+	+
14.	V-P	-	d	d
15.	Sitrat	+	d	d
16.	Malonat	-	-	-
17.	Inositol	-	Tidak diuji	-
18.	Rhamnosa	-	Tidak diuji	-
19.	Sukrosa	-	[-]	[-]
20.	Lactosa	-	-	-
21.	Arabinosa	-	-	-
22.	Adonitol	-	-	-
23.	Arginin	-	-	-
24.	Katalase	-	+	Tidak diuji
25.	Koagulase	-	Tidak diuji	Tidak diuji

Keterangan:

+ : 90-100% positive

- : 0-10% positive

[-] : 11- 25% positive

d : 26-75% positive

Dari pengujian yang telah dilakukan di laboratorium mikrobiologi fakultas kedokteran universitas Brawijaya Malang, didapatkan hasil bahwa bakteri yang didapatkan sebagai bakteri penghasil enzim gelatinase adalah bakteri *Proteus mirabilis* dan didapatkan hasil uji *microbact* sebagai berikut: oksidase positif, spora negatif, motilitas positif, nitrat positif, lisin positif, ornithin positif, H₂S positif, glukosa positif, manitol negatif, xylosa positif, ONPG positif, indole positif, urease

positif, V-P, negatif, sitrat positif, TDA positif, malonat negatif, inositol negatif, rhamnosa negatif, sukrosa negatif, laktosa negatif, arabinosa negatif, adonitol negatif, salicin negatif, arginin negatif, dan katalase negatif

Proteus mirabilis bersifat gram negatif, berbentuk batang pendek, tidak berspora, umumnya bergerak dengan flagella peritrikus, koloni menyebar pada media agar. Tumbuh dan menghasilkan H₂S pada media Salmonella Shigella Agar, *Proteus mirabilis* tidak memfermentasi laktosa akan tetapi memfermentasi glukosa dengan adanya gas (Manos dan Belas, 2006).

Dari hasil pengujian diatas dapat dijelaskan sebagai berikut:

- Oksidase

Pada uji oksidase, bakteri *Proteus mirabilis* hasilnya positif, tidak sesuai dengan hasil pada *Bergey's Manual* yang hasilnya negatif. *Proteus mirabilis* menghasilkan oksidase ditandai dengan berubahnya sumur yang telah berisi kit menjadi warna biru hal ini menandakan adanya enzim oksidase pada bakteri. Menurut Jawetz *et al.* (2008), beberapa organisme menghasilkan enzim oksidase yang berperan dalam mengkatalis proses oksidasi dan reduksi elektron.

- Motilitas

Pada uji motilitas bakteri *Proteus mirabilis* hasilnya positif, sesuai dengan hasil pada *Bergey's Manual* hasilnya positif. *Proteus mirabilis* bersifat gram negatif, berbentuk batang pendek umumnya bergerak dengan flagella peritrikus (Manos dan Belas, 2006). Menurut Pelczar dan Chan (1986), pengujian terhadap motilitas bakteri untuk mengetahui ada tidaknya pergerakan sel tersebut.

- Nitrat

Pada uji nitrat, bakteri *Proteus mirabilis* hasilnya positif, sesuai dengan hasil pada *Bergey's Manual* hasilnya positif. *Proteus mirabilis* dapat mengubah nitrat mejadi nitrit. Nitrat merupakan unsur yang mudah sekali terbawa air dan masuk ke saluran air, sungai, air tanah. Nitrat dapat diubah menjadi nitrit oleh bakteri (Yuliasuti, 2006).

- Lysin

Pada uji lysin, bakteri *Proteus Mirabilis* hasilnya positif, tidak sesuai dengan dengan penelitian O'hara *et al.*, (2000), yang hasilnya negatif, *Proteus mirabilis* yang diuji dapat mengubah sumur test kit dari ungu menjadi kuning dan kembali ke ungu. Lysin adalah suatu asam diamino monokarboksilat. Lysin dapat memberikan amino kepada asam amino lain, tetapi tidak dapat dibentuk lisin kembali artinya tidak dapat terjadi proses reaminasi setelah lisin mengalami reaksi deaminasi (Poedjiadi, 1994).

- Ornithin

Pada uji Ornithin bakteri *Proteus mirabilis* hasilnya positif, sesuai dengan *Bergey's Manual* dan penelitian yang dilakukan oleh O'hara *et al.*,(2000) yang juga bernilai positif. Uji ornitin bertujuan untuk mengetahui kemampuan bakteri dalam mengurai ornitin (asam amino) menjadi amino. Hasil positif jika media berwarna ungu dan hasil negatif jika warna berubah menjadi kuning atau kekuningan(Usman, 2015).

- H₂S

Pada uji H₂S bakteri *Proteus mirabilis* hasilnya positif, sesuai dengan hasil pada *Bergey's Manual* yang hasilnya positif. Bakteri yang menghasilkan desulfurase yang diinokulasikan pada media yang kaya

sistein akan membentuk H_2S serta menghasilkan senyawa FeS yang berwarna hitam (Lay, 1994).

- ONPG

Pada uji ONPG bakteri *Proteus mirabilis* hasilnya positif, sesuai dengan hasil dari *Bergey's Manual* yang hasilnya positif. Enzim β galaktosidase dapat menghidrolisis ONPG (*o-nitro phenyl galactopyranoside*) (Arrizal *et al.*, 2013).

- Indol

Pada uji indol bakteri *Proteus mirabilis* hasilnya positif, tidak sesuai dengan hasil dari *Bergey's Manual* dan penelitian dari O'hara *et al.*,(2000) hasilnya negatif. Hasil positif ditunjukkan dengan terbentuknya cincin warna merah pada garis pemisah, sedangkan tidak terbentuknya cincin merah antara media dan reagen menunjukkan hasil negatif. Hasil positif pada uji indol menunjukkan bahwa bakteri mengandung enzim triptofanase yang merupakan katalis pengurai gugus indol yang terkandung dalam asam amino triptofan(Ulfa *et al.*, 2016).

- Urease

Pada uji urease bakteri *Proteus mirabilis* hasilnya positif, sesuai dengan hasil pada *Bergey's Manual* dan hasil penelitian O'hara *et al.*, (2000) dengan hasil positif. *Proteus mirabilis* dapat menghasilkan enzim urease. Uji urease bertujuan untuk mengetahui kemampuan bakteri mengubah urea menjadi amoniak. Hasil positif ditunjukkan dengan adanya perubahan warna media dari warna kuning menjadi merah muda (Ulfa *et al.*, 2016).

- V-P (Voges Proskauer)

Pada uji V-P bakteri *Proteus mirabilis* hasilnya negatif, sedangkan pada *Bergey's Manual* dan penelitian O'hara *et al.*,(2000), menjelaskan bakteri *Proteus mirabilis* hanya menghasilkan presentase V-P sebesar 26%-75%. V-P adalah tes yang digunakan untuk mendeteksi asetoin dalam kultur cair bakteri. Uji ini bertujuan untuk mengetahui kemampuan bakteri dalam membentuk asetil metil karbinol (asetoin) dari hasil fermentasi glukosa. Setelah diinkubasi, pada media ditambahkan α naphthol 5% dan KOH 40% Jika setelah ditambahkan α naphthol 5% dan KOH 40% terjadi perubahan warna media menjadi merah, berarti bakteri dapat membentuk asetoin, sedangkan jika hasil negatif maka tidak terjadi perubahan warna media. (Ulfa *et al.*, 2016).

- Sitrat

Pada uji sitrat, bakteri *Proteus mirabilis* hasilnya positif, sedangkan pada *Bergey's Manual* dan penelitian O'hara *et al.*,(2000), menjelaskan bakteri *Proteus mirabilis* hanya menghasilkan presentase sitrat sebesar 26%-75%.. Pengujian ini bertujuan untuk melihat kemampuan bakteri dalam menggunakan sitrat sebagai satu-satunya sumber karbon dan energi. Hasil positif akan ditunjukkan dengan adanya perubahan warna media dari hijau menjadi biru. Hal ini disebabkan karena penggunaan sitrat oleh bakteri menyebabkan asam menghilang dari biakkan sehingga terjadi peningkatan pH dan mengubah warna media dari hijau menjadi biru.

- Fermentasi gula–gula

Pada fermentasi gula-gula, Bakteri *Proteus mirabilis* hasilnya positif pada glukosa dan xylosa sesuai dengan hasil pada *Bergey's*

Manual dan penelitian O'hara *et al.*,(2000) yang hasilnya positif. Hasil negatif pada manitol, inositol, malonat, sukrosa, laktosa, adonitol, rhamnosa, dan arabinosa, hasil ini cenderung sama dengan hasil pada *Bergey's Manual* dan penelitian O'hara *et al.*,(2000) yang hasilnya negatif. *Proteus mirabilis* dapat mendegradasi karbohidrat menjadi glukosa. Umumnya bakteri menggunakan sumber karbon yang paling sederhana untuk difermentasikan. Tidak tersedianya sumber gula sederhananya membuat bakteri memanfaatkan sumber gula yang lebih kompleks untuk difermentasikan (Yousef dan Clastrom, 2003).

- Arginin

Pada uji arginin bakteri *Proteus mirabilis* hasilnya negatif, sesuai dengan *Bergey's Manual* dan O'hara *et al.*, (2000), hasilnya negatif. *Proteus mirabilis* tidak dapat menghidrolisis asam amino arginin. Arginin termasuk asam amino non esensial kelompok dua atau kadang disebut sebagai asam amino semi esensial dengan rumus kimia $C_6H_{14}O_2N_4$. Di samping berfungsi dalam sintesis protein dan perantara siklus urea, arginin merupakan substrat pembentukan NO dan sintesis fosfokreatin, juga sebagai prekursor glutamat, prolin, dan putresin melalui pembentukan ornitin. Arginin merupakan salah satu komponen penting dalam regulasi fungsi makrofag sebagai antibakteri dan antitumor. Arginin merupakan sumber NO yang mempunyai aktifitas antimikroba, karena bersifat toksik terhadap bakteri (Sukmanityas, 2003).

- Katalase

Pada uji katalase bakteri *Proteus mirabilis* hasilnya negatif, tidak sesuai dengan *Bergey's Manual* hasilnya positif, *Proteus mirabilis* tidak dapat menghasilkan katalase. Katalase adalah enzim yang

mengkatalisasikan penguraian hidrogen peroksida (H₂O₂) menjadi air dan O₂. Hidrogen peroksida terbentuk sewaktu metabolisme aerob, sehingga mikroorganisme yang tumbuh dalam lingkungan aerob dapat menguarikan zat toksik tersebut (Lay, 1994).

- Koagulase

Pada uji koagulase bakteri *Proteus mirabilis* hasilnya negatif. *Proteus mirabilis* tidak menghasilkan enzim koagulase. Enzim koagulase adalah suatu enzim yang dapat menggumpalkan plasma yang mengandung oksalat atau sitrat. Enzim koagulase berikatan dengan protrombin yang terdapat dalam plasma, bersama-sama keduanya menjadi aktif secara enzimatik dan mengubah fibrinogen menjadi fibrin (Jawetz et al., 2008).

4.4. *Proteus mirabilis*

Klasifikasi *Proteus mirabilis* diklasifikasikan sebagai berikut:

Kingdom : *Bacteria*
 Phylum : *Proteobacteria*
 Class : *Gamma Proteobacteria*
 Order : *Enterobacteriales*
 Family : *Enterobacteriaceae*
 Genus : *Proteus*
 Species : ***Proteus mirabilis***

Proteus mirabilis adalah bakteri Gram negatif anggota famili *Enterobacteriaceae* yang terdapat dalam saluran pencernaan manusia dan hewan. Bakteri ini berbentuk batang (1.5 x 2.0 µm), tidak membentuk spora, bergerak sangat aktif dengan flagella peritrik (Jacobsen *et al.* 2008). Bakteri *Proteus mirabilis* tumbuh optimum pada suhu 35-37 °C, berbentuk batang

pendek dengan 6-10 flagella peritrik jika ditumbuhkan di dalam media cair (Manos dan Belas 2006).

Bakteri *Proteus mirabilis* sebagai salah satu flora normal ditemukan hidup pada saluran pencernaan mamalia dalam jumlah yang kecil, namun tetap memiliki peranan untuk mencegah kolonisasi bakteri lain melalui kompetisi bakteri dan mencegah melekatnya mikroorganisme patogen pada mukosa usus (Collins dan Gibson 1999).

Infeksi *Proteus mirabilis* dapat ditransmisikan melalui sumber nosokomial seperti dari makanan rumah sakit dan peralatannya, melalui cairan intravena dan kontak dengan permukaan kulit yang terkontaminasi. Kateter yang dipasang dalam waktu yang lama merupakan salah satu sumber utama dari kolonisasi dan infeksi *P. mirabilis* (Stickler dan Hughes 1999). Bakteri *P. mirabilis* memiliki flagella peritrik yang memungkinkannya bergerak dan pindah ke sel lain lalu membentuk koloni (Jansen et al. 2003).