

II METODOLOGI PENELITIAN.

2. 1 Waktu dan tempat.

Penelitian ini dilaksanakan pada Bulan Juli – Desember 2000 yang dilakukan dalam dua tahap. Tahap pertama adalah pengambilan sample di kawasan hutan mangrove Stasiun Kelautan Dumai. Tahap Kedua adalah analisis sample yang dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Laut. Stasiun Kelautan Dumai.

2.2. Bahan dan Alat.

Bahan-bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah : Media Agar non selektif TSA (Tryptone Soya Agar), Difco, MR-VP Broth, ragen methyil red, TSI (Triple sugar Iron) agar, bahan untuk uji pewarnaan gram (crystal violet, lugol iodine, safranin, etil alcohol 95% dan aquades), hydrogen peroksida (H₂O₂), larutan naftol (1 gram per 100 ml etil alcohol) dan larutan Phenilendiamin (1 gram per 100 ml air destilasi).

Alat-alat yang digunakan antara lain : incubator, autoclap, Erlenmeyer pemanas, aluminium foil, lampu Bunsen, cawan petri, neraca Ohaus dengan ketelitian 0,1 gram, gelas ukur, tabung reaksi, kapas, motor steril, pipet (0,1, 1,0 dan 10 ml) dan pro popet, janke dan kunkel, mikroskop binokuler, objek glas, glass spreader, jarum oase dan colony counter.

2.3 Metode penelitian.

Metode yang digunakan adalah metode survei, dimana hutan mangrove stasiun kelautan Dumai dijadikan sebagai lokasi pengamatan dan pengambilan sample, analisis dan identifikasi bakteri pada sample dilakukan di laboratorium, pelaksanaan penelitian ini terdiri dari empat tahap pekerjaan :

a. Pengambilan dan penanganan sample .

Sampel yang diambil berupa serasah daun mangrove yang terdiri dari jenis *Bruguiera sp*, *Cerips sp*, *Avicenna sp* dan *Sonneratia sp*) mula dari daun yang baru jatuh masih segar sampai yang sudah membusuk, kemudian dimasukkan ke dalam plastik steril dan selanjutnya dibawa ke laboratorium.

b. Isolasi bakteri

Sampel berupa serasah daun mangrove yang berasal dari berbagai jenis spesies, kemudian diambil dari tiap jenisnya sebanyak 10 gram, dihancurkan dan dimasukkan ke dalam air laut steril sebanyak 90 ml. Dari prosedur ini diperoleh pengenceran 10^{-1} , selanjutnya dibuat pengenceran 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} dan 10^{-7} . Dari setiap pengenceran diinokulasi pada media TSA. Inokulasi dilakukan dengan menggunakan metode sebar (*spread Plate methode*). Seluruh

- Pengamatan bentuk sel.

Bentuk sel diketahui dengan cara pengamatan di bawah mikroskop dengan menggunakan lensa pembesaran yang lebih tinggi. Sel bakteri diamati dengan seksama dan dibedakan berbentuk bulat, batang, spiral atau lainnya.

-Uji katalase.

Penentuan adanya katalase diuji dengan menggunakan larutan 3% H₂O₂ (hydrogen peroksida) pada koloni terpisah. Kemudian 1 tetes larutan H₂O₂ ditetaskan diatas permukaan koloni. Pada bakteri yang bersifat katalase positif terlihat adanya pembentukan gelembung gas disekitar koloni dan jika tidak terbentuk berarti katalase negatif.

- Uji oksidase cytochrome.

Uji oksidase dilakukan pada satu koloni bakteri ditetaskan larutan naftol (1gram per 100 ml etil alcohol), kemudian ditetaskan (3 tetes) larutan Phenilendiamine (1 gram per 100 ml air destilasi). Reaksi bersifat oksidase positif jika warna koloni berubah dalam 2 menit.

- Tipe pergandengan sel

Pengamatan terhadap tipe pergandengan sel diamati dibawah mikroskop, dimana akan terlihat apakah sel-sel bakteri bergandengan membentuk rantai, dua-dua sel, bergandengan tidak beraturan, terpisah dan lain sebagainya.

- Sifat halofilik.

Koloni yang tumbuh pada media diinokulasikan kedalam 3 buah tabung dengan masing-masing tabung mengandung 0,3%, 0,7% dan 1% NaCl. Kemudian diinkubasi pada suhu 37oC selama 24 – 48 jam, selanjutnya diamati pada konsentrasi berapa koloni bakteri tumbuh subur.

- Uji methyl red.

Dalam uji ini digunakan media MR-VP Broth dan reagent methyl red untuk menentukan adanya fermentasi asam campuran. Koloni yang tumbuh pada media diinokulasi ke dalam tabung yang berisi media MR-VP, selanjutnya diinkubasi pada suhu 35⁰C selama 24 jam. Setelah lewat masa inkubasi, media ini ditambahkan reagen methyl red sebanyak 5 tetes. Uji bersifat positif jika media berwarna merah dan negatif jika media berwarna kuning atau jingga setelah penambahan reagens.

hasil inokulasi sample pada media ini kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 – 48 jam dengan menggunakan inkubator. Koloni bakteri yang tumbuh pada media agar dibedakan menurut warna, bentuk dan ukurannya.

c. Identifikasi bakteri.

Selain dari morfologi, maka bakteri juga dibedakan atas sifat kimia dan biokimia menurut Alcamo 1983.

- Pewarnaan Gram.

Respon isolat terhadap Gram diuji dengan menggunakan metode Hucker. Sel bakteri yang masih muda berumur 24 – 48 jam, dioleskan pada kaca preparat dan dikeringkan dengan cara mengering – udarakan serta memanaskan bagian belakang preparat tersebut dengan lampu Bunsen. Kemudian preparat ditetesi dengan larutan crystal violet dan didiamkan selama 1 menit, serta dibilas dengan aquades. Selanjutnya preparat ditetesi dengan larutan iodine dan didiamkan selama 1 menit, kemudian dibilas dengan aquades. Ditetskan lagi dengan etil alcohol 95% dan digoyangkan selama 15 detik, selanjutnya dibilas dengan aquades, dikering-udarakan dan akhirnya diperiksa dibawah mikroskop. Bakteri gram positif berwarna ungu atau violet sedangkan bakteri gram negatif berwarna merah jambu atau kemerah-merahan.

-Uji H₂S

Uji ini dilakukan dengan menginokulasi bakteri yang tumbuh pada media ke dalam tabung yang berisi medium TSI (triple Sugar Iron) agar, selanjutnya diinkubasi pada suhu 35°C selama 24 jam, pembentukan H₂S ditunjukkan dengan adanya endapan hitam pada media.

4. Perhitungan jumlah sel bakteri

Pertumbuhan bakteri yang baik adalah jika jumlah koloni tiap cawan petri antara 30 – 300 koloni. Jika tidak ada yang memenuhi syarat maka dipilih jumlah yang mendekati 30 – 300 koloni per cawan petri. Perhitungan ini merujuk pada Ruyitno (1991).