

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **3.1. Lokasi dan Waktu Penelitian**

Penelitian ini akan dilaksanakan pada bulan September sampai Oktober 2022 di Laboratorium Mikrobiologi Program Studi Biologi Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Islam Negeri Sumatera Utara. Jl. Lap. Golf, Kp. Tengah, Kec. Pancur Batu, Kabupaten Deli Serdang, Sumatera Utara 20353, Indonesia

#### **3.2. Alat dan Bahan Penelitian**

##### **3.2.1. Alat-Alat penelitian**

Alat yang digunakan dalam penelitian ini yaitu timbangan analitik, inkubator, mortar dan pestle, jarum ose, mikroskop, oven, pinset, pisau, rak tabung, spatula, *erlenmeyer*, *vortex mixer*, *autoklaf*, *cover glass*, *object glass*, tabung reaksi, cawan petri, gelas ukur, pipet tetes, jarum ose, gelas piala, gelas ukur, bunsen, refraktometer, pH meter, termometer, dan meteran.

##### **3.2.2. Bahan-Bahan Penelitian**

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian adalah sampel akar napas tumbuhan *Avicennia marina*, aquades, alkohol 70%, *Rhodamine B*, air laut steril, kapas steril, *aluminium foil*, plastik wrap, *ice pack*, *ziplock*, *cotton bud*, *Zobell marine 2216E*, *Nutrient Broth (NB)*, *Sulfide Indole Motility (SIM)*, *Triple Sugar Iron Agar (TSIA)*, media *Oksidase Fermentatif (OF)*, *Simmons Citrate Agar (SCA)*, Hidrogen Peroksida ( $H_2O_2$ ), *crystal violet*, lugol, safranin, dan spirtus.

#### **3.3. Metode Penelitian**

Metode penelitian ini bersifat eksperimen laboratorium yang dirancang secara deskriptif dan melalui beberapa tahap penelitian, meliputi isolasi bakteri pada akar mangrove *Avicennia marina*, karakterisasi isolat bakteri sampai pada tingkat spesies, dan pengujian kemampuan isolat bakteri dalam mendegradasi Zat warna tekstil (*Rhodamine B*).

### **3.4. Prosedur Penelitian**

#### **3.4.1. Sterilisasi Alat dan Bahan**

Alat-alat yang digunakan dicuci menggunakan deterjen lalu dibilas, selanjutnya dibungkus kertas dan alat-alat gelas seperti erlenmeyer, dan *beaker glass* disterilkan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C tekanan 2 atm selama 15 menit. Alat-alat yang tidak tahan panas akan disterilisasi menggunakan alkohol 70%. Alat-alat logam (pinset, jarum ose, dan pisau) akan disterilkan menggunakan api bunsen sedangkan alat-alat yang tahan panas seperti cawan petri dan tabung reaksi) akan disterilisasi menggunakan oven pada suhu 170°C selama 2 jam.

Air laut disaring menggunakan saringan kapas, kemudian dituangkan ke erlenmeyer 1 L lalu ditutup dengan aluminium foil dan *cling wrap*. Air dalam erlenmeyer disterilisasi dengan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit dengan tekanan 20 psi (Wahid *et al.*, 2022). Aquades dimasukkan ke dalam erlenmeyer dan ditutup menggunakan kapas, aluminium foil, dan *plastic wrap* lalu dimasukkan ke dalam autoklaf 121°C selama 15 menit dengan tekanan 20 psi (Isyadestia *et al.*, 2022). Media *Zobell marine 2216E*, media *Nutrient Broth* (NB), media *Sulfide Indole Motility* (SIM), media *Triple Sugar Iron Agar* (TSIA), media *Oksidase Fermentatif* (OF), media *Simmons Citrate Agar* (SCA) yang digunakan dibuat sesuai dengan ketentuan yang tertera pada kemasan media.

#### **3.4.2. Penentuan Titik dan Pengukuran Parameter Pengambilan Sampel**

Penentuan titik sampel pada penelitian ini dilakukan berdasarkan kondisi tumbuhan mangrove *Avicennia marina* yang dianggap mewakili seluruh areal penelitian (Yasin, 2020). Pengukuran parameter dilakukan secara bertahap. Pertama, dilakukan pengukuran suhu menggunakan termometer. Termometer secara otomatis mencatat suhu pada perairan tersebut. Kedua, pH meter dapat digunakan untuk mengukur jumlah keasaman (pH). Terakhir, menggunakan refraktometer untuk mengukur salinitas dengan cara mengoleskan setetes sampel air ke ujungnya, kemudian mencatat hasil yang diberikan (Kholifi *et al.*, 2021).

### 3.4.3. Preparasi Sampel Penelitian

Metode *purposive sampling* digunakan untuk melakukan pengambilan sampel, yaitu teknik yang didasarkan pada adanya tujuan tertentu daripada strata, keacakan, atau wilayah (Sa'adah & Novitasari, 2022). Sesuai dengan kondisi pengambilan sampel, sampel akar mangrove diambil dari 2 pohon mangrove *Avicennia marina* yang berbeda. Sampel akar diambil di bagian ujung diluar permukaan sedimen dan bagian pangkal yang terbenam di dalam sedimen dengan dipotong menggunakan pisau steril sepanjang 3-5 cm. Akar mangrove dibersihkan menggunakan air laut steril dengan disemprotkan, lalu dimasukkan ke dalam *zip lock* dan disimpan dalam *cooler box* sebelum dipindahkan ke laboratorium dalam waktu  $\pm 24$  jam untuk disimpan pada  $4^{\circ}\text{C}$  sampai prosedur isolasi dilakukan (Nursyam dan Prihanto, 2018).

### 3.4.4. Isolasi dan Pemurnian Bakteri

Sampel akar napas dibersihkan memakai air laut steril dan dikeringkan lalu digerus menggunakan mortar steril sampai halus (Sa'adah & Novitasari, 2022).

Hasil penggerusan ditimbang 1g dan dimasukkan ke erlenmeyer yang berisi air laut steril 9 ml, kemudian 1 ml suspensi dimasukkan ke dalam 9 ml air laut steril untuk membuat pengenceran  $10^{-1}$ , pengenceran dilakukan hingga  $10^{-5}$  (Modifikasi Yanti *et al.*, 2021). Setiap pengenceran dihomogenkan menggunakan *vortex* dan diinokulasi sebanyak  $35\mu\text{L}$  ke dalam media Zobell 2216E agar dengan metode *spread plate*. Setelah itu, sampel dibungkus plastik wrap untuk mencegah kontaminasi dan diinkubasi selama 2 sampai 7 hari pada suhu  $30^{\circ}\text{C}$ . Koloni bakteri diamati bentuk, warna, dan teksturnya. Setiap koloni berbeda warna dan bentuk dipisahkan, dan dimurnikan (Sa'adah, 2020).

### 3.4.5. Karakterisasi Makroskopis Morfologi Isolat Bakteri

Pengamatan dilakukan dengan mengamati warna, ukuran, bentuk, dan elevasi dan tepi koloni yang tumbuh (lampiran 1 (1).) (Ramadhanty *et al.*, 2021).

#### 3.4.6. Uji Biodegradasi *Rhodamine B* Oleh Isolat Bakteri

Uji biodegradasi *Rhodamine B* dilakukan metode *overlay* (Sa'adah, 2020). Bakteri simbion diambil 1 ose dan ditumbuhkan di media *zobell* 2216E agar pada cawan petri dengan 4 titik koloni bakteri yang ditumbuhkan pada 1 cawan petri dan dibentuk menjadi bulatan kecil.

Selanjutnya diinkubasi selama 48 jam. Setelah 48 jam, pewarna *Rhodamine B* dengan konsentrasi 50 ppm (lampiran 2.) dicampur ke media agar dengan volume 200 mL. *Zobell marine 2216e* yang telah tercampur *Rhodamine B* dituangkan ke cawan petri yang telah berisi biakan bakteri yang telah diinkubasi 48 jam sebelumnya, kemudian diinkubasi kembali selama 48 jam dan diamati perkembangannya sebanyak  $5 \times 48$  jam. Jika terbentuk zona bening, maka isolat bakteri tersebut mampu mendegradasi pewarna *Rhodamine B* (Sa'adah, 2020).

#### 3.4.7. Pengukuran Zona bening

Zona bening di sekeliling isolat bakteri menunjukkan isolat bakteri berpotensi mendegradasi *Rhodamine B*. Zona bening diukur menggunakan jangka sorong dengan ketelitian 0.05 mm (Sa'adah & Novitasari, 2022).

#### 3.4.8. Karakterisasi Mikroskopis Isolat Bakteri

Pengamatan mikroskopis merupakan pengamatan bentuk sel dan pewarnaan gram yang mengikuti metode Prihanto *et al.*, (2018) yang telah dimodifikasi. Tujuan pengujian ini untuk membedakan antara bakteri gram positif dan gram negatif, bakteri dilarutkan dengan tetesan aquades steril pada *object glass*, sehingga membentuk lapisan tipis dan difiksasi. Lalu ditetesi *crystal violet* dan didiamkan selama 1 menit, lalu dicuci dengan air mengalir dan dikeringkan anginkan. Selanjutnya ditetesi lugol dan didiamkan selama 1 menit, dicuci dengan air mengalir dan dikering anginkan. Diberi larutan pemucat yaitu alkohol 95%, tetes demi tetes hingga zat warna ungu tidak terlihat lagi, lalu dicuci pada air mengalir dan dikering anginkan. Kemudian diberi safranin selama 30 detik, lalu dicuci dan dibiarkan kering di udara. Warna merah yang terbentuk menunjukkan bakteri gram negatif dan jika warna ungu menunjukkan bakteri gram positif.

### 3.4.9. Karakterisasi Fisiologis Bakteri

Mengacu pada metode Yanti *et al.*, (2021) pengamatan karakteristik fisiologis menggunakan uji biokimia dan uji kemampuan pertumbuhan bakteri.

#### 3.4.9.1. Uji Biokimia

##### 3.4.9.1.1. Uji Katalase

Uji katalase dilakukan dengan cara mengoleskan isolat bakteri pada object glass menggunakan jarum ose, diteteskan hidrogen peroksida ( $H_2O_2$ ) 3% sebanyak 1-2 tetes. Hasil reaksi positif jika terdapat gelembung gas ( $O_2$ ).

##### 3.4.9.1.2. Uji TSIA (*Triple Sugar Iron Agar*)

Uji TSIA dilakukan dengan menginokulasi isolat bakteri pada media dengan metode tusuk dan gores yang selanjutnya diinkubasi selama 48 jam. Hasil reaksi TSIA dilihat dari 2 bagian, yaitu *slant* (permukaan miring) dan *butt* (dasar). Hasil uji positif memfermentasi glukosa apabila *slant* berwarna merah dan *butt* kuning, memfermentasi laktosa dan sukrosa jika *slant* dan *butt* berwarna kuning.

##### 3.4.9.1.3. Uji Sitrat

Isolat bakteri diinokulasikan pada media SCA dengan metode gores, kemudian diinkubasi selama 48 jam untuk dilakukan uji sitrat. Jika media berubah warna dari hijau menjadi biru maka uji afirmatif (Yanti *et al.*, 2021).

##### 3.4.9.1.4. Uji Motilitas

Media SIM digunakan untuk uji motilitas dengan menusukkan jarum ose lurus yang terdapat isolat bakteri ke dalam tabung berisi 10 ml media SIM, yang kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37 °C. Bakteri dinyatakan motil jika media menjadi keras karena bakteri tumbuh menyebar menjauh garis inokulasi (Yanti *et al.*, 2021).

#### **3.4.9.1.5. Uji Oksidatif Fermentatif**

Uji oksidatif fermentasi (O/F) dilakukan dengan menginokulasi isolat bakteri pada 2 tabung reaksi yang salah satu permukaannya ditutup parafin. Bakteri positif memetabolisme karbohidrat secara fermentatif jika tabung yang terdapat parafin berubah warna dari hijau ke kuning, sedangkan bakteri positif memetabolisme karbohidrat secara oksidatif jika media tanpa parafin berwarna kuning (Yanti *et al.*, 2021).

#### **3.4.9.2. Uji Ketahanan Kemampuan Pertumbuhan**

##### **3.4.9.2.1. Uji ketahanan Salinitas**

Uji salinitas dilakukan dengan cara membuat suspensi bakteri dengan aquades yang disetarakan konsentrasi 0,5 Mc Farland. Lalu diambil 1 ml suspensi yang ditambahkan NaCl dengan kadar berbeda, yaitu 0%, 10%, 20%, dan 30%, masing-masing ditambahkan pada media NB dan dihomogenkan menggunakan *vortex mixer*. Kemudian media NB yang telah berisi media biakan diinkubasi selama 24 jam pada suhu kamar (Islamiah *et al.*, 2017).

##### **3.4.9.2.2. Uji ketahanan pH**

Uji pH dilakukan dengan cara membuat suspensi bakteri dengan aquades yang disetarakan konsentrasi 0,5 Mc Farland. Kemudian diambil 1 mL suspensi bakteri dan ditambahkan dengan media NB yang telah diatur pH 5, 6, 7 dan 8. Selanjutnya dihomogenkan menggunakan *vortex*. Selanjutnya, media NB yang telah berisi media biakan diinkubasi selama 24 jam pada suhu kamar (Islamiah *et al.*, 2017).

#### **3.4.10. Uji Identifikasi Bakteri**

Bakteri yang diperoleh dari akar napas tumbuhan *Avicennia marina* selanjutnya diidentifikasi mengacu pada buku *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology 7<sup>th</sup>ed* dan *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology 2<sup>nd</sup>ed*, berdasarkan ciri morfologi dan fisiologis bakteri, meliputi bentuk sel, ciri gramatikal bakteri, uji biokimia, dan uji fisiologis (lampiran 1(1), 1(2)), bentuk

koloni, warna koloni, tinggi koloni, dan batas koloni (Kurniatuhadi dan Fani, 2022). Identifikasi molekuler dilakukan menggunakan metode DNA *barcoding* dengan primer 16S rRNA (Setiawan *et al.*, 2017), bertujuan mengidentifikasi bakteri hingga tingkat spesies pada isolat bakteri yang paling berpotensi dalam mendegradasi *Rhodamine B*. Data yang diperoleh dianalisis berdasarkan hasil *blast*, karakterisasi dan identifikasi (Fani dan Kurniatuhadi, 2022).

#### 3.4.11. Analisis Data

Data hasil penelitian dianalisis secara deskriptif dengan menampilkan tabel, gambar dan deskripsi hasil penelitian berdasarkan data karakter morfologis (lampiran 1.) dan fisiologis, serta kemampuan dalam mendegradasi *Rhodamine B*.



UNIVERSITAS ISLAM NEGERI  
SUMATERA UTARA MEDAN