

III. METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan September sampai dengan Desember 2013 di Laboratorium Budidaya Perikanan, Program Studi Budidaya Perairan, Fakultas Pertanian, Universitas Lampung. Uji Biokimiawi dan Morfologi bakteri penghasil enzim amilase dilakukan di Balai Krantina Ikan Pengendalian Mutu dan Penyakit Hasil Perikanan Kelas I Panjang. Sedangkan sampel usus ikan gurame diperoleh dari 5 lokasi yaitu Langkapura, Labuhan Ratu, Natar, Kemiling, dan Way Halim, Provinsi Lampung.

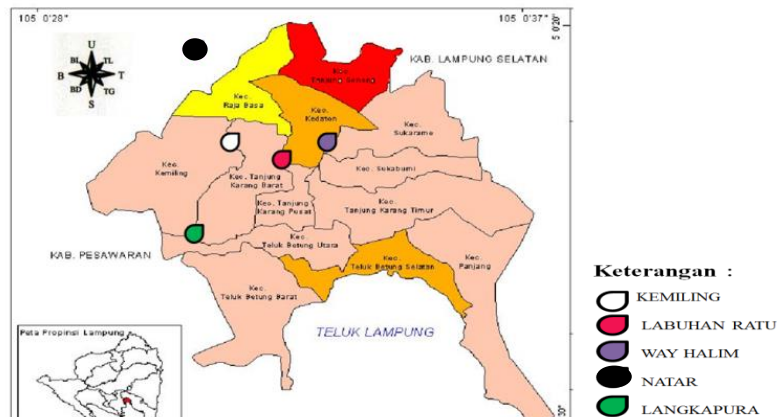
3.2 Alat dan Bahan

Alat yang digunakan antara lain cawan petri, bunsen, jarum ose, *spreader*, vortex, autoklaf, timbangan digital, parafilm, tabung reaksi, kertas label, kertas buram, inkubator, mikropipet, *hot plate stirrer*, tabung erlenmeyer, botol sempel, rak tabung reaksi, pipet tetes, dan tub 5ml. Bahan yang digunakan yaitu Ikan Gurame yang berukuran sekitar 250 g/ekor, larutan fisiologis (NaCl0,9%), TSA (*Trypticase Soy Agar*) Oxoid™, TSB (*Trypticase Soy Broth*) Oxoid™, alkohol 70%, akuades, tepung kanji, tepung terigu.

3.3 Pengambilan Sampel

Sampel yang digunakan diambil dari usus 15 ekor ikan yang didapat dari 5 lokasi yang berbeda yaitu Langkapura, Labuhan Ratu, Natar, Kemiling, dan Way Halim, Provinsi

Lampung (Gambar 5). Sampel diambil dengan cara membedah tubuh masing-masing ikan hingga organ tubuh bagian dalam terlihat, pisahkan bagian usus ikan lalu isi usus digerus dan ditimbang sebanyak 1 g. Isi usus dimasukkan ke dalam botol sampel dan tambahkan 9 ml larutan fisiologis (NaCl 0,9%). Pengenceran dilakukan hingga 10^6 untuk mendapatkan hasil koloni yang menyebar dan tidak begitu rapat dan dihomogenkan dengan *vortex* (Aslamyah, 2009).



Gambar 5. Lokasi Pengambilan Sampel
(sumber: www.google.com)

3.4 Tahapan Penelitian

3.4.1 Isolasi dan Pemurnian Kandidat Bakteri

Bakteri diisolasi dari usus ikan gurame berukuran sekitar 250 g/ekor yang berasal dari lima lokasi budidaya. Pengenceran dilakukan sampai 10^6 agar koloni yang terbentuk tidak terlalu rapat. Bakteri dikultur dengan metode sebar (*spread*) pada media TSA dengan cara mengambil sebanyak 25-50 μ l sampel dengan menggunakan mikropipet, dan disebar dalam cawan petri berisi TSA. Kultur ini kemudian diinkubasi pada suhu ruang $27-28^{\circ}\text{C}$ selama 24-48 jam sampai koloni bakteri dapat tumbuh. Koloni bakteri yang telah tumbuh dimurnikan berdasarkan perbedaan warna, bentuk dan ukurannya. Setiap isolat yang memiliki karakter berbeda selanjutnya disimpan pada media TSA miring. Kemudian isolat diinkubasi pada suhu ruang selama 24 jam.

3.4.4 Uji Potensi Enzim Amilase

Bakteri hasil isolasi diuji kemampuannya dalam menghidrolisis karbohidrat dengan cara membuat media TSA yang telah ditambahkan sumber karbohidrat yaitu tepung terigu dan tepung kanji yang masing-masing sebanyak 10%, kemudian media kultur TSA yang telah mengandung pati dimasukkan ke dalam cawan petri. Media kultur pada setiap cawan petri dibagi menjadi 5 bagian. Inokulasi isolat yang akan diuji ke dalam media TSA dengan cara menempatkan 1 ose biakan dibagian yang telah disediakan, kemudian inkubasi selama 24 jam. Setelah 24 jam jika terjadi proses hidrolisis pati akan terlihat daerah atau zona bening di sekeliling koloni mikroba. Diameter zona bening yang terbentuk kemudian diukur (Aslamsyah *et al.*, 2008).

3.4.6 Identifikasi Bakteri

Identifikasi bakteri dilakukan jika terdapat isolat terpilih dengan melakukan serangkaian uji morfologi dan biokimianya secara bertahap berdasarkan *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. Pada tahap awal identifikasi, dilakukan uji pewarnaan Gram, uji katalase, uji Oksidase-Fermentasi, uji TSIA, uji TIO, uji SIMON CITRAT, uji LIA, dan uji MIO (lampiran 3) (Holt dan Kreig, 1984).