BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian yang digunakan adalah rancangan penelitian deskriptif kualitatif. Data yang diperoleh disajikan secara deskriptif meliputi karakteristik makroskopis, mikroskopis dan identifikasi secara biokimia, identifikasi spesies dengan mikrobact dan aktivitas enzim amilase dari jenis bakteri amilolitik terpilih yang berhasil diisolasi dari sumber air panas Pacet Mojokerto.

3.2 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di laboratorium Mikrobiologi, jurusan Biologi Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang, serta di Laboratorium Mikro Universitas Brawijaya pada bulan Maret sampai September 2014.

3.3 Alat dan Bahan Penelitian

3.3.1 Alat Penelitian

Alat-alat yang digunakan adalah Mikroskop, hot plate stirrer, mikropipet, inkubator, cawan petri, Erlenmeyer, tabung reaksi, timbangan analitik, gelas ukur, *beaker glass*, *autoklaf*, *laminar air flow*, blue tip, gunting, bunsen, ose, lemari es, termos, dan termometer.

3.3.2 Bahan Penelitian

Sampel air yang digunakan untuk isolasi bakteri amilolitik adalah air dari sumber air panas Pacet Mojokerto. Media yang digunakan dalam penelitian ini adalah media selektif amilolitik (pati 10 g, yeast ekstrak 2 g, bacto pepton 5 g, $MgSO_4.7H_2O$ 0,5 g, NaCl 0,5 g, $CaCl_2.2H_2O$ 0,15 g, agar 20 g dalam 1000 ml aquades), aquades, spirtus, alumunium foil, kertas label, plastik tahan panas dan tissue secukupnya.

3.4 Cara Kerja

3.4.1 Pembuatan Media Selektif Amilolitik

Media selektif amilolitik (pati 10 g, yeast ekstrak 2 g, bacto pepton 5 g, $MgSO_4.7H_2O$ 0,5 g, NaCl 0,5 g, $CaCl_2.2H_2O$ 0,15 g, agar 20 g dalam 1000 ml aquades). Larutan dipanaskan dalam autoklaf selama 15 menit pada suhu 121°C, kemudian di tuang kedalam cawan petri steril sebanyak 15 ml (Ginting, 2009).

3.4.2 Pengambilan Sampel

Sampel yang digunakan berupa air panas yang berasal dari sumber air panas Pacet Mojokerto. Sampel air di ukur suhunya sebelum sampel di masukkan ke dalam termos, selanjutnya sampel air di bawa ke laboratorium mikrobiologi UIN Malang.

3.4.3 Isolasi dan Seleksi Bakteri Amilolitik Termofilik

Sampel air panas sebanyak 10 ml dimasukkan ke dalam Erlenmeyer yang berisi 90 ml media selektif amilolitik cair (pengeceran 10^{-1}) kemudian di inkubasi dalam inkubator pada suhu 50°C selama 24 jam, selanjutnya dilakukan pengenceran bertingkat sampai 10^{-10} dengan mengambil 1 ml dari pengenceran

sebelumnya lalu diencerkan dengan 9 ml aquadest steril. Pengenceran 10^{-1} sampai 10^{-10} diambil 1 ml dan dimasukkan ke dalam cawan petri untuk ditanam secara *pour plate* menggunakan media selektif, kemudian diinkubasi pada suhu 50°C selama 24 jam.

Koloni yang dihasilkan dari isolasi diamati morfologinya dan koloni yang terpisah dipindahkan pada agar miring untuk pemurnian. Pemurnian dilakukan dengan cara mengambil satu ose isolat mikroba dan menumbuhkan pada media *selektif amilolitik agar* dengan metode *streak kuadran*. Isolat murni yang didapatkan disimpan pada media miring *selektif amilolitik* untuk perlakuan selanjutnya.

3.4.4 Identifikasi Koloni

Bakteri murni yang telah diisolasi kemudian dikarakterisasi dan diidentifikasi yang dilakukan secara biokimia yang mengacu pada *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology,* karakterisasi yang dilakukan meliputi :

3.4.4.1 Pengamatan makroskopik

Karakteristik koloni bakteri hasil isolasi pada media selektif amilolitik yaitu berdasarkan (Dwijoseputro, 2005) :

a. Bentuk koloni (dilihat dari atas) : berupa titik-titik, bulat, berbenang, tak teratur, serupa akar, serupa kumparan.
b. Permukaan koloni (dilihat dari samping) : rata, timbul-datar, melengkung, membukit, serupa kawah.
c. Tepi koloni (dilihat dari atas) : utuh, berombak, berbelah, bergerigi, berbenang, keriting.

d. Warna koloni : keputih-putihan, kelabu, kekuning-kuningan atau hampir bening.

3.4.5 Uji Bakteri Amilolitik Secara Kualitatif

Semua isolat murni yang diperoleh diuji kemampuannya untuk menghasilkan enzim amilase. Untuk memastikannya dilakukan uji iodine dengan cara meneteskan iodine diatas permukaan agar yang berisi isolate, bila terdapat zona bening pada media mengindikasikan enzim amilase diproduksi oleh isolat. Kemudian zona bening di ukur menggunakan penggaris (Cappucino,1983).

Uji bakteri amilolitik secara kualilatif adalah perbandingan antara diameter zona bening dengan diameter koloni (Sudiana dkk, 2002).

$$Zona\ Bening = Diameter\ Total - Diameter\ Koloni$$

3.4.6 Pengamatan Mikroskopik Dengan Pewarnaan Gram

Pengamatan mikroskopik dilakukan untuk melihat bentuk sel bakteri dan untuk melihat kemurnian dari isolat. Untuk penentuan jenis bakteri dilanjutkan dengan serangkaian uji biokimia terhadap isolat yang diperoleh dengan berpedoman pada buku *Bergey's Manual Determinative Bacteriology* (Holt, dkk., 1994).

Bakteri amilolitik diambil sedikit dengan jarum ose secara aseptis dan disuspensikan dengan aquades yang ada di atas gelas objek. Preparat difiksasi diatas api bunsen sampai kering. Preparat ditetesi dengan larutan kristal ungu, didiamkan selama 1 menit dan dicuci dengan air mengalir dan dikeringkan. Preparat ditetesi dengan larutan iodin dan didiamkan selama 1 menit, dicuci dengan air mengalir dan dikeringkan. Preparat ditetesi dengan larutan alkohol

96% sampai warna ungu hilang. Preparat ditetesi dengan larutan safranin dan didiamkan selama 30 detik, dicuci dengan air mengalir dan dikeringkan. Preparat ditetesi dengan minyak imersi, preparat diamati dengan mikroskop, uji gram positif jika berwarna ungu dan negatif jika berwarna merah (Hadioetomo, 1985).

3.4.7 Identifikasi dengan Menggunakan Mikrobact

Prinsip kerja dari *Microbact* yaitu dengan mereaksikan suspensi isolat ke dalam sumur-sumur yang telah berisi sumber karbon dan senyawa-senyawa biokimia lain yang berjumlah 12 jenis. Isolat bakteri yang berumur 24 jam diambil dengan menggunakan ose kemudian dilarutkan kedalam 5 ml garam fisiologis 0,9% pada tabung reaksi streil dan divortex hingga homogen yang sebelumnya dilakukan uji gram dan uji oksidase, jika hasil uji gram positif maka dilakukan beberapa pengujian secara manual hingga menemukan hasil identifikasi sampai tingkat spesies. Kalau hasil uji menunjukkan bahwa isolat termasuk gram negatif maka hasil dari angka-angka oktal yang dimasukkan ke software akan menunjukkan hasil identifikasi sampai tingkat spesies. selanjutnya larutan bakteri yang telah homogen tadi diteteskan kedalam sumur *Microbact* sebanyak 100 µl (4 tetes), untuk sumur Lysin, Omitin, dan H_2S ditambah dengan tetesan *mineral oil* sebanyak 1-2 tetes. Setelah itu *Microbact* diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam. *Microbact* yang telah diinkubasi diambil kemudian diteteskan 2 tetes reagent Nitrat A dan B pada sumur7, pada sumur nomor 8 dengan *Indol Kovact* sebanyak 2 tetes, sumur nomor 10 dengan VP I dan VP II masing-masing satu tetes, dan sumur 12 dengan TDA sebanyak satu tetes. Perubahan warna tes pada tiap sumur yang berbeda dicatat. Evaluasi hasil dilihat melalui sumur-sumur

microbact apakah positif atau negatif dengan cara membandingkan dengan table warna dan hasilnya ditulis pada formulir *Patient Record.* Angka-angka *oktal* didapat dari penjumlahan reaksi positif saja, dari tiap-tiap kelompok (3 sumur didapatkan 1 angka *oktal*). Nama bakteri dilihat dengan komputer berdasarkan angka *oktal* yang didapat (Oxoid, 2004).

3.4.8 Pembuatan Inokulum

Sebanyak 2 ose biakan isolat terpilih yang berumur 24 jam dimasukkan ke dalam 50 mL media selektif cair steril untuk perangsang pembentukan amilase. Media yang mengandung kultur bakteri diinkubasi pada suhu 50 ^{o}C selama 72 jam pada *shakerinkubator* dengan kecepatan 150rpm (Ajayi, 2007).

3.4.9 Ekstrak Enzim Dari Kultur Cair Bakteri

Setelah diinkubasi selama 72 jam, kultur bakteri di sentrifuge dengan kecepatan 5000 rpm selama 15 menit pada suhu 4 °C, supernatan yang diperolah adalah ekstrak kasar enzim (Asadullah, 2014).

3.4.10 Pembuatan Kurva Standar Glukosa

Disiapkan 6 tabung, masing-masing diisi dengan larutan glukosa dengan konsentrasi 0, 200, 400, 600, 800 dan 1000 ppm. Setelah itu diambil 1 mL dari masing-masing konsentrasi dan dimasukkan kedalam tabung reaksi. Kemudian ditambahkan ke dalam tabung reaksi 1 mL reagen DNS dan dihomogenkan. Ditutup mulut tabung dengan alumunium foil dan dipanaskan dalam air mendidih selama 5-15 menit sampai larutan berwarna merah-coklat. Kemudian ditambahkan 1 mL larutan K-Na-Tartrat 40 %. Tabung reaksi didinginkan dan ditambahkan dengan aquades hingga volumenya menjadi 10 mL dan dihomogenkan.

Selanjutnya diukur absorbansinya dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 540 nm.

3.4.11 Uji Aktivitas Enzim Amilase

Sebanyak 0,5 ml ekstrak kasar enzim hasil sentrifugasi dicampur dengan 0,5 ml substrat (pati terlarut 1 % dalam buffer fosfat 0,2 M pH 7) lalu diinkubasi selama 30 menit pada suhu 50º C. Reaksi dihentikan dengan penambahan 1 mL asam 3,5 dinitrosalisilat (DNS) kemudian dikocok kuat-kuat dan ditutup mulut tabung dengan alumunium foil dan dipanaskan dalam air mendidih selama 5 menit (Shaw *et al.*, 1955). Kemudian ditambahkan 1 mL larutan K-Na-Tartrat 40 %. Tabung reaksi didinginkan dan ditambahkan dengan aquades hingga volumenya menjadi 10 mL dan dihomogenkan. Selanjutnya diukur absorbansinya dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 540 nm.

Aktivitas amilase ditentukan dengan mengkonversi nilai absorbansi yang diperoleh dari konsentrasi glukosa standart, kemudian dihitung dengan menggunakan rumus (Kombong, 2004):

$$AE = \frac{C}{BM\ glukosa\ x\ t}\ x\ \frac{H}{E}$$

Dimana:

AE = Aktifitas enzim (Unit/mL)

C = Konsentrasi glukosa

BM = Berat Molekul Glukosa = 180 g/mol

t = Waktu Inkubasi (menit)

H = Volume total enzim-substrat (mL)

E = Volume enzim (mL)

3.5 **Analisis Data**

Data yang diperoleh disajikan secara deskriptif meliputi karakteristik makroskopis dan mikroskopis serta hasil hasil diidentifikasi sampai tingkat spesies dari uji mikrobact serta uji aktivitas enzim amilase secara kuantitatif dari masing-masing jenis bakteri amilolitik yang berhasil diisolasi dari sumber air panas Pacet Mojokerto.

UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM PUSAT PERPUSTAKAAN