

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, uji screening, mikroskopis, identifikasi secara biokimia, identifikasi spesies dengan mikrobact dan aktivitas enzim selulase dari jenis bakteri selulolitik yang berhasil diisolasi dari mata air panas.

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. Mulai bulan Maret sampai September 2014. Pengambilan sampel air panas dilakukan di kawasan wisata mata air panas Pacet Mojokerto.

3.3 Alat dan Bahan Penelitian

3.3.1 Alat Penelitian

Alat-alat yang digunakan adalah Mikroskop, *micropipet*, cawan petri, *Erlenmeyer*, tabung reaksi, timbangan analitik, gelas ukur, *beaker glass*, *autoclave*, *laminar air flow*, , shaker inkubator, *vortex*, kuvet, *spectrofotometer uv-vis*, gunting, bunsen, jarum ose, pipet tetes, inkubator, hot plate stirer, lemari es, termos, penggaris kompor dan panci.

3.3.2 Bahan Penelitian

3.3.2.1 Bahan Air Panas

Bahan air panas bersuhu 45°C-50°C yang diambil dari sumber mata air panas kawasan wisata Ubalan Pacet Mojokerto.

3.3.2.2 Bahan Media

Sampel yang digunakan untuk isolasi bakteri selulolitik adalah air panas. Media yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Carboxil Methil Cellulosa* (CMC) agar dan *Carboxil Methil Cellulosa* (CMC) broth (2 g CMC, 0,04 g MgSO₄, 0,15 g KNO₃, 0,1g KH₂PO₄, 0,004 g CaCl₂, 0,4 g *Beef extract*, 3,4 g Agar), kongo merah 1% (1 gram kongo merah dalam 100 ml aquades), reagen pewarnaan gram (*Crystal violet*, *Safranin* , alkohol 70 %), minyak imersi, H₂O₂, *green malachite*, reagen 3,5-dinitrosalisilat (DNS), K-Na-Tartrat 40% (garam *rochelle*), NaCl, aquades, plastik, spirtus, alumunium foil, kertas label, blue tip, tissue dan kapas secukupnya.

3.4 Cara Kerja

3.4.1 Pembuatan Media dan Reagen

3.4.1.1 Media *Carboxil Methil Cellulosa* (CMC)

Media yang digunakan untuk pertumbuhan bakteri selulolitik adalah media CMC agar dan CMC broth yang terdiri dari 2 g CMC, 0,04 g MgSO₄, 0,15 g KNO₃, 0,1g K₂HPOH, 0,004 g CaCl₂, dan 0,4 g *Beef extract* dan untuk media CMC agar bahan-bahan tersebut ditambah 3,4 gram agar. Semua bahan dicampur dengan aquadest sebanyak 200 ml, dipanaskan sampai mendidih sambil diaduk hingga larut pada alat hotplate dan stirer, kemudian media tersebut dimasukkan ke dalam

Erlenmeyer dan ditutup kapas, kemudian disterilisasi dalam autoklaf suhu 121°C selama 15 menit.

3.4.1.2 Reagen DNS

Sebanyak 0,5 gram DNS, 0,1 gram fenol, 0,025 sodium sulfit (Na_2SO_3) dan 0,5 gram NaOH dilarutkan dalam 50 mL aquades, diaduk dengan pengaduk bermagnet (magnetic stirrer). Setelah larut, larutan disimpan dalam botol warna gelap.

3.4.1.3 Reagen KNa-Tartrat 40 %

Sebanyak 20 gram KNa-Tartrat dilarutkan dalam 50 mL aquades di erlenmeyer. Kemudian diaduk dengan pengaduk bermagnet (*magnetic stirrer*). Setelah larut, larutan disimpan dalam botol warna gelap.

3.4.2 Pengambilan Sampel

Sampel air panas diukur suhunya dan sampel dengan suhu 45°C-50°C diambil dengan termos air panas. Termos berisi sampel air panas dibawa ke laboratorium mikrobiologi UIN MALIKI Malang guna proses selanjutnya..

3.4.3 Isolasi Bakteri dari Air Panas

Diambil air panas dari termos yang bersisi air panas dari sumber mata air Pacet Mojokerto. Air panas sebanyak 10 ml dimasukkan ke dalam Erlenmeyer yang berisi 90 ml CMC broth (pengenceran 10^{-1}) kemudian diinkubasi 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 CMC agar, kemudian diinkubasi didalam inkubator suhu 50°C selama 48 jam (Hartanti, 2010).

Koloni yang dihasilkan dari isolasi diamati morfologinya dan koloni yang terpisah dipindahkan pada agar cawan untuk pemurnian. Pemurnian dilakukan dengan cara mengambil satu ose isolat mikroba dan menumbuhkan pada media CMC agar dengan metode *streak kuadran* kemudian diinkubasi dalam inkubator suhu 50°C selama 48 jam. Isolat murni yang didapatkan disimpan pada media agar miring CMC di dalam lemari es untuk perlakuan selanjutnya.

3.4.4 Uji Bakteri Selulolitik Secara Kualitatif

Semua isolat murni yang diperoleh diuji kemampuannya untuk menghasilkan enzim selullase. Pengujian pembentukan zona bening dari semua isolat bakteri dilakukan berdasarkan metode Apun dkk, (2000) isolat-isolat bakteri diinokulasikan ke dalam media CMC agar. Kultur kemudian diinkubasi dalam inkubator selama 48 jam pada suhu 50°C. Visualisasi zona bening dilakukan dengan menambahkan *congo red* (1 mg/ml) selama 15 menit kemudian dicuci dengan NaCl 1 M. Koloni yang tumbuh diamati dan diukur zona beningnya sebagai selisih diameter total koloni zona bening dengan diameter koloni. Zona bening menunjukkan bahwa koloni bakteri tersebut menghasilkan enzim selulolitik dan mendegradasi selulosa yang ada disekitarnya. Hasil isolat-isolat yang memiliki kemampuan degradasi selulosa dilakukan peremajaan pada media agar miring kemudian diambil satu ose untuk ditumbuhkan dalam media CMC cair yang mengandung substrat CMC 1% dengan diinkubasi suhu 50°C selama 24 jam.

3.4.5 Identifikasi Isolat Bakteri

Isolat bakteri murni kemudian dikarakterisasi dan diidentifikasi yang dilakukan secara biokimia. Karakterisasi yang dilakukan meliputi:

3.4.5.1 Pengamatan makroskopik

Pengamatan karakteristik koloni bakteri hasil isolasi pada media CMC agar datar yaitu berdasarkan:

- 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.

3.4.5.2 Pengamatan mikroskopik dengan Pewarnaan Gram

Pengamatan mikroskopik dilakukan untuk melihat bentuk sel bakteri dan untuk melihat kemurnian dari isolat serta pengidentifikasian isolat hingga mencapai genus. Pengamatan mikroskopis yang dilakukan adalah pewarnaan gram karena pengidentifikasian spesies isolat bakteri dengan *Microbact*.

Cara kerjanya yaitu bakteri selulolitik 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 iodine 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, 1999).

3.4.6 Identifikasi dengan Menggunakan *Microbact*

Pengidentifikasi isolat bakteri hingga tingkat spesies dibantu dengan *microbact*. 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 ke dalam 5 ml garam fisiologis 0,9% pada tabung reaksi steril dan divortex hingga homogen yang sebelumnya dilakukan uji gram dan uji oksidase, selanjutnya larutan bakteri yang telah homogen ditetaskan ke dalam sumur *Microbact* sebanyak 100 µl (4 tetes), untuk sumur Lysin, Omitin, dan H₂S 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 ditetaskan 2 tetes reagent Nitrat A dan B pada sumur 7, 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 dan bila bakteri termasuk gram positif maka hasil uji tidak dimasukan program komputer tapi dijadikan rujukan dalam bagan pengidentifikasian spesies dalam buku *Bergey's Manual Determinative Bacteriology* (Lampiran 6) (Holt,1994), (Oxoid, 2004).

3.4.7 Uji Bakteri Selulolitik Termofilik Secara Kuantitatif

3.4.7.1 Produksi Ekstrak Kasar Enzim Selulase

Isolat bakteri selulolitik termofilik diinokulasikan sebanyak 2 ose dalam 50 mL media CMC Broth dan diinkubasi pada shaker inkubator dengan kecepatan 125 rpm pada suhu 50°C selama 18 jam, inokulum kemudian diambil sebanyak 5 mL medium CMC Broth dan diinkubasi pada shaker inkubator pada suhu 50°C selama 24 jam(Hartanti, 2010). Ekstrak kasar enzim diperoleh dengan mensentrifugasi kultur pada kecepatan 3000 rpm selama 15 menit pada suhu 4°C, supernatan yang diperoleh adalah ekstrak kasar enzim selulase dan digunakan untuk penentuan aktivitas enzim.

3.4.7.2 Pengukuran Aktivitas Ekstrak Kasar Enzim Selulase dengan Metode DNS (Miller, 1959)

3.4.7.2.1 Pembuatan Kurva Standar Glukosa

Untuk membuat kurva standar terlebih dahulu dibuat larutan glukosa dengan konsntrasi 0, 200, 400, 600, 800, dan 1000 ppm. Setelah itu diambil 1 ml dari

masing-masing konsentrasi dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Kemudian ditambahkan ke dalam tabung reaksi 1 ml reagen DNS dan dihomogenkan. Ditutup mulut tabung dengan aluminium foil dan dipanaskan dalam air mendidih selama 5-15 menit sampai larutan berwarna merah-coklat. Kemudian ditambahkan 1 ml larutan KNa-Tartrar 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.

3.4.7.2.2 Pengukuran Aktivitas Ekstrak Kasar Enzim Selulase Berdasarkan Kadar Glukosa

Sebanyak 1 ml ekstrak kasar enzim selulase dicampur dengan 1 ml substrat (CMC 1% , dalam buffer pH 7) lalu diinkubasi pada suhu 50°C selama 40 menit. Dari campuran larutan diambil 1 ml dan ditambahkan dengan 1 ml reagen DNS dan dihomogenkan. Ditutup mulut tabung reaksi dengan aluminium foil dan dipanaskan dalam air mendidih selama 5-15 menit sampai larutan berwarna merah-coklat. Kemudian ditambahkan 1 ml larutan KNa-Tartar 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.

Satu unit aktivitas selulase didefinisikan sebagai jumlah enzim yang menghasilkan 1 μmol glukosa per menit pada kondisi tertentu (Dybkaer, 2001). Aktivitas selulase ditentukan dengan mengkonversi nilai absorbansi yang diperoleh

dari konsentrasi glukosa standart, kemudian dihitung dengan menggunakan rumus (Kombong, 2004) :

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

Keterangan :

AE : Aktivitas Enzim

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 kualitatif meliputi karakteristik makroskopis dan mikroskopis serta hasil diidentifikasi sampai tingkat spesies dari uji mikrobact dari masing-masing jenis bakteri selulolitik yang berhasil diisolasi dari air panas Pacet Mojokerto.