

## IV. METODA PENELITIAN

### A. Lokasi Penelitian.

Penelitian dilakukan di laboratorium Bioteknologi, Program Studi Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Diponegoro, Semarang.

### B. Bahan Dan Alat.

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian antara lain :

1. Sampel tanah yang diambil dari tanah tempat pembuangan limbah tapioka di daerah Kajen, Pati.

2. Media.

a. Medium untuk isolasi dan pemeliharaan isolat bakteri yang berupa nutrien agar.

b. Media untuk pengujian sifat-sifat fisiologis berupa :

1. Medium agar pati untuk uji hidrolisis pati.

uji ini juga merupakan uji untuk seleksi bakteri yang mampu menghasilkan enzim amilase.

2. Medium untuk uji fermentasi karbohidrat, meliputi medium fermentasi glukosa cair, sukrosa cair, laktosa cair, mannitol cair, arabinosa cair.

3. Medium untuk uji hidrolisis protein, berupa medium tripton cair untuk pembentukan indol, medium susu skim agar untuk hidrolisis kasein, medium TSIA (Triple Sugar Iron Agar) untuk

pembentukan gas  $H_2S$ , medium nutrien gelatin untuk pencairan gelatin

4. Medium nutrien agar untuk uji reaksi katalase
5. Medium nitrat cair untuk uji reduksi nitrat
6. Medium merah metil cair untuk reduksi merah metil.
7. Medium merah metil cair untuk uji Voges Proskauer (V-P test)
8. Medium Simmons Citrat Agar untuk uji penggunaan sitrat

3. Reagen yang diperlukan antara lain.:

- a. Bahan untuk pengecatan sel, berupa seperangkat pewarnaan Gram (Gram A, Gram B, Gram C dan Gram D), pewarnaan spora bakteri (Klein A, Klein B dan Klein C) dan pewarna tahan asam (ZN A, ZN B, ZN C).
- b. Biru Bromthymol untuk uji fermentasi Karbohidrat.
- c. Hidrogen peroksida 3% untuk uji reaksi katalase.
- d. Larutan lugol-Jod (gram B) untuk uji hidrolisis amilum.
- e. Reagen kovac untuk uji pembentukan indol.
- f. Asam sulfanilat dan  $\alpha$ -naftilamin untuk uji reduksi nitrat.
- f. Larutan  $\alpha$ -naphtol dan KOH 40% untuk uji V-P test.
- g. Larutan merah metil untuk uji reduksi merah metil.

Alat-alat yang digunakan antara lain :

1. Otoklaf untuk sterilisasi alat-alat dan bahan.

2. Timbangan analitik untuk menimbang bahan-bahan.
3. Seperangkat mikroskop dan peralatan untuk memotret morfologi sel bakteri.
4. Inkubator sebagai tempat inkubasi kultur bakteri.
5. An aerobic jar (BBL Gas Pak anaerobic system) sebagai inkubator kultur bakteri pada keadaan anaerob.
6. Cawan petri, tabung reaksi, tabung ukur pipet serologis, pembakar bunsen, lup inokulasi, erlenmeyer.

### C. Cara Kerja.

1. Tahap isolasi bakteri dari tanah.

- a. Pengambilan sampel tanah.

Sampel tanah yang digunakan sebagai sumber isolat bakteri diambil dari 3 lokasi pembuangan limbah tapioka. Ketiga lokasi tersebut ditandai sebagai lokasi A, lokasi B, dan lokasi C. Setiap lokasi dilakukan tiga kali pengambilan secara random. Masing-masing sampel dimasukkan dalam botol sampel yang steril dan diberi label untuk dianalisa di laboratorium.

- b. Isolasi bakteri dari sampel tanah.

Dua puluh lima gram sampel tanah disuspensikan ke dalam 225 ml air steril. (Sheriff, 1975). Bagian atas dari suspensi dipisahkan dan dipanaskan selama 30 menit pada suhu 80°C. Suspensi bakteri tersebut diencerkan seencer mungkin, maksudnya supaya nantinya terjadi koloni- koloni yang dapat terpisah,

sehingga dengan mudah dapat diisolasi. satu mili liter suspensi pengenceran tersebut diinokulasikan pada cawan dan ditambahkan medium nutrisi agar. Pemanasan dilakukan agar isolat bakteri yang diperoleh hanyalah bakteri yang mampu membentuk endospora. Kultur bakteri tersebut dikubaskan selama 96 jam pada suhu  $37^{\circ}\text{C}$  dan  $50^{\circ}\text{C}$ , sehingga bakteri yang tumbuh kemungkinan besar adalah bakteri yang bersifat mesofil dan termofil aerob (Brock *et al.*, 1984).

Jenis-jenis bakteri yang tumbuh dan menunjukkan morfologi koloni yang berbeda dibuat kultur murninya (isolat) pada medium nutrisi agar miring sebagai "stock culture". Dari "stock culture" dibuat "sub-sub culture" guna pengamatan morfologi sel dengan melakukan pengecatan gram dan spora, juga untuk pengujian sifat-sifat fisiologis.

## 2. Karakterisasi bakteri pembentuk endospora aerobik (genus Bacillus).

### a. Pengamatan morfologi sel isolat bakteri.

Pengecatan Gram. Secara aseptik satu ose suspensi isolat bakteri umur 24 jam diletakkan pada gelas benda. Dikering anginkan dan difiksasi dengan panas. Setelah dingin, ditetesi dengan pewarna utama ( gram A ) selama 1 menit, dibilas dengan air, ditetesi dengan larutan mordant (gram B) selama 1

menit, dibilas dengan air, ditetesi dengan larutan peluntur (Gram C) selama 30 detik, dibilas dengan air. Kemudian ditetesi larutan cat penutup (Gram D) selama 2 menit, dibilas dengan air dan dikeringkan dengan kertas saring.

Bakteri yang berwarna ungu / biru gelap menunjukkan sifat gram positif, dan akan berwarna merah muda bila bersifat gram negatif.

Pengecatan Spora. Secara aseptik satu ose suspensi isolat bakteri umur 72 jam diletakkan pada gelas benda. Dikering anginkan dan difiksasi dengan cara pemanasan. Ditetesi dengan larutan Klein A selama 5 menit. Masuknya pewarna ke dalam endospora dibantu dengan cara memanaskannya langsung pada api, tetapi tidak sampai mendidih dan mengering. Setelah dingin, dibilas dengan air mengalir. Kemudian ditetesi dengan Klein B sampai warna cat tepat dilunturkan, dibilas dengan air. Ditetesi dengan Klein C selama 2 menit, dibilas dengan air, dan dikeringkan dengan kertas saring.

Dengan bantuan mikroskop dapat dilakukan pengamatan morfologi sel vegetatif dengan endosporanya yang berwarna merah muda.

Pengecatan Taban Asam (Acid Fast). Secara aseptik satu ose suspensi isolat bakteri umur 48 jam diletakkan pada gelas benda. Dikeringanginkan dan

difiksasi dengan cara pemanasan. Ditetesi dengan ZN A selama 5 - 10 menit dan dibantu dengan pemanasan. Setelah dingin, dibilas dengan air, kering anginkan dan ditetesi dengan larutan peluntur (ZN B) sampai zat peluntur yang mengalir tampak berwarna kemerahan. Dicuci dengan air, dikeringanginkan, kemudian ditetesi dengan cat penutup (ZN C) selama 30 detik. Dicuci dengan air mengalir dan dikeringanginkan.

Bakteri yang bersifat acid fast tampak berwarna merah sedangkan yang non acid fast berwarna biru.

Uji Motilitas. Gelas benda cekung dan penutupnya dibersihkan dengan alkohol, kemudian dipanaskan di atas api bunsen. Setelah didinginkan, diambil satu ose isolat bakteri, umur 18 jam dari kaldu nutrien dan diletakkan pada gelas penutup. Pada keempat sudut gelas penutup diolesi sedikit vaselin. Gelas benda cekung ditutupkan ke atas gelas benda penutup dengan menempatkan suspensi biakan tepat di tengahnya. Diamati di bawah mikroskop apakah terlihat adanya pergerakan bakteri.

b. Pengujian sifat-sifat fisiologis.

1. Uji hidrolisis pati.

Uji ini dapat digunakan untuk mendapatkan jenis-jenis bakteri genus *Bacillus* yang dapat menghasilkan enzim amilase.

Satu ose kultur isolat bakteri umur 48 jam disuspensikan seencer mungkin. Dari suspensi pengenceran, diinokulasikan masing-masing 0,1 ml suspensi bakteri pada dua buah cawan petri. Kemudian pada masing-masing cawan dituangi medium agar dan digojok dengan hati-hati agar tercampur rata. Kemudian diinkubasikan pada suhu 37°C dan pada suhu 50°C selama 48 jam. Hal ini untuk mengetahui suhu optimum pertumbuhan isolat bakteri tersebut. Setelah diinkubasi, dituangkan 2-3 tetes larutan Lugol-Jod di atas kultur tersebut (Salle, 1971).

Aktivitas bakteri untuk menghidrolisis pati ditandai dengan terbentuknya daerah jernih disekitar koloni bakteri tersebut. Menurut Chan untuk mengetahui tingkat kemampuan amilolitik diantara isolat bakteri, daerah jernih tersebut diukur diameternya, juga diukur diameter koloni bakteri tersebut. Ratio antara diameter daerah hidrolisa dan diameter koloni bakteri (ratio aktivitas) dapat dipakai untuk memilih bakteri-bakteri amilolitik yang potensial. Semakin besar angka ratio aktivitasnya, maka bakteri tersebut semakin potensial tingkat kemampuannya dalam menghidrolisis pati (Putro, 1980). Analog dengan metode yang digunakan Mai *et*

al., ratio aktivitas amilolitik isolat bakteri yang diperoleh dibandingkan dengan Bacillus subtilis ATCC 6633 yang telah dikenal sebagai kultur yang menghasilkan amilase dengan baik.

Setelah diperoleh isolat-isolat bakteri jenis Bacillus sp yang menghasilkan enzim amilase, maka dilakukan karakterisasi spesiesnya berdasarkan metode Barkeley (Mai, Minh, and Thao, 1992) dengan menggunakan serangkaian uji biokimia atau uji fisiologis yang lain.

## 2. Uji fermentasi karbohidrat.

Isolat bakteri umur 48 jam diinokulasikan pada medium uji fermentasi karbohidrat dan diinkubasikan pada suhu kamar selama 48 jam. Kemampuan isolat bakteri untuk memfermentasi karbohidrat ditandai dengan terbentuknya gas dan atau asam pada kultur tersebut. Gas yang terbentuk akan tertampung pada tabung durham. Sedang terbentuknya asam ditandai dengan perubahan warna indikator Biru Bromthymol dari hijau menjadi kuning.

## 3. Uji hidrolisis protein.

Pembentukan Indol. Untuk menguji kemampuan isolat bakteri dalam menghidrolis triptophan menjadi indol dan asam piruvat. Sediaan isolat bakteri umur 48 jam diinokulasikan pada 6 ml



kaldu tripton ( mengandung banyak triptophan ) dan diinkubasikan pada suhu kamar selama 48 jam. Lalu ditambahkan 10-12 tetes reagen kovac. Adanya indol ditandai dengan terbentuknya cincin atau lapisan berwarna merah pada biakan.

Pembentukan H<sub>2</sub>S. Untuk menguji kemampuan isolat bakteri dalam menghidrolisis protein yang mengandung belerang pada asam amino penyusunnya dengan menggunakan asam amino tersebut sebagai sumber nutriennya. Produksi H<sub>2</sub>S merupakan langkah awal di dalam proses deaminasi. Isolat bakteri diinokulasikan pada medium TSIA, dan diinkubasikan pada suhu kamar selama 48 jam. Adanya H<sub>2</sub>S ditandai dengan warna hitam sepanjang tusukan, karena H<sub>2</sub>S yang terbentuk akan bereaksi dengan Pb asetat menghasilkan Pb sulfida..

Hidrolisis Kasein. Untuk menguji kemampuan isolat bakteri dalam menghidrolisis kasein. Isolat bakteri diinokulasikan pada medium yang mengandung protein dari bubuk skim milk dan diinkubasikan pada suhu 37°C selama 48 jam. Adanya daerah bening di atas koloni dan sekitarnya menunjukkan reaksi yang positif.

Pencairan Gelatin. Untuk menguji kemampuan isolat bakteri dalam mencairkan gelatin. Isolat bakteri umur 48 jam ditusukkan pada medium

gelatin tegak, diinkubasikan pada suhu kamar selama 48 jam. Pencairan gelatin dapat diketahui setelah dimasukkan dalam alat pendingin dengan suhu di bawah 20°C.

#### 4. Uji reaksi katalase.

Kebanyakan bakteri aerobik dan anaerob fakultatif yang menggunakan oksigen menghasilkan Hidrogen peroksida yang sesungguhnya bersifat racun bagi sistem-sistem enzimnya sendiri. Namun mereka dapat tetap hidup dengan adanya anti metabolit tersebut karena dihasilkannya enzim katalase yang dapat mengubah Hidrogen peroksida menjadi air dan Oksigen.

Sediaan isolat bakteri umur 48 jam diinokulasikan pada kaca obyek yang telah ditetesi 2-3 tetes Hidrogen peroksida 3%. Aktivitas enzim katalase ditandai dengan terbentuknya gelembung-gelembung udara.

#### 5. Uji reduksi nitrat.

Uji ini digunakan untuk mengetahui kemampuan isolat bakteri dalam mereduksi nitrat menjadi nitrit. Sediaan isolat bakteri umur 48 jam diinokulasikan pada 10 ml medium kaldu nitrat dan diinkubasikan selama 72 jam pada suhu kamar. Kemudian dituangkan 3 tetes asam sullfanilat dan  $\alpha$ -naftil amin pada kultur tersebut dan digojok.

Reduksi nitrat oleh isolat bakteri ditandai dengan terbentuknya warna merah pada kultur tersebut.

6. Uji reduksi merah metil.

Untuk mengetahui kemampuan isolat bakteri yang mampu memfermentasi glukosa dan menghasilkan banyak sekali asam laktat, asetat, suksinat, dan format disamping  $\text{CO}_2$ ,  $\text{H}_2$  dan etanol. Sediaan isolat bakteri umur 48 jam diinokulasikan pada medium uji reduksi merah metil dan diinkubasikan pada suhu kamar selama 48 jam. Kultur ditetesi dengan 5 tetes indikator merah metil. Reaksi positif ditandai dengan terbentuknya warna merah pada kultur tersebut, karena adanya akumulasi asam-asam yang menurunkan pH medium menjadi 5.0 atau kurang.

7. Uji Voges-Proskauer.

Bila pengujian merah metil menunjukkan hasil negatif, maka mungkin sekali organisme yang teruji tidak menghasilkan asam, melainkan 2,3 butandiol atau etanol. Untuk menguji kemampuan bakteri dalam menghasilkan 2,3 butandiol digunakan uji VP. Sediaan isolat bakteri umur 48 jam diinokulasikan pada medium merah metil cair dan diinkubasikan pada suhu kamar selama 72 jam. Kemudian dituangkan 1,5 ml  $\alpha$ -naftol dan 0,5 ml

KOH 40% pada kultur tersebut dan digojok selama 1 menit. Reaksi positif ditandai dengan terbentuknya warna merah pada kultur setelah didiamkan selama beberapa jam ( $\pm$  1-2 jam).

8. Uji penggunaan sitrat.

Sediaan isolat bakteri umur 48 jam diinokulasikan pada medium uji penggunaan sitrat dan diinkubasikan pada suhu kamar selama 7 hari. Kemampuan isolat bakteri untuk menggunakan sitrat sebagai sumber karbonnya ditandai dengan adanya pertumbuhan pada permukaan agar miring yang digores dan berubahnya warna indikator dari hijau menjadi biru.

7. Uji pertumbuhan anaerobik.

Isolat bakteri umur 48 jam diinokulasikan pada cawan yang berisi medium nutrisi agar, diinkubasikan secara anaerob dalam anaerobik jar pada suhu 35°C selama 48 jam. Kemampuan bakteri tumbuh pada keadaan anaerob diketahui dari tumbuhnya koloni pada medium.

(Salle, 1962; Hadioetomo, 1985; Hendarko Sriani, Isworo, Agung, dan Triadiati, 1990; Pelczar and Chan, 1977).

Untuk karakterisasi bakterinya digunakan buku Bergey's Manual Of Determinative Bacteriology edisi kedelapan.