

BAB IV

METODOLOGI PENELITIAN

A. Lokasi Dan waktu Penelitian

Pengambilan sampel substrat hutan mangrove dilakukan di Desa Kemujan, Karimunjawa dan pengamatan dilakukan di Laboratorium Mikro-Bio-Genetika Jurusan Biologi Fakultas MIPA. Penelitian dilaksanakan dari bulan Agustus 1999 sampai Agustus 2000.

B. Alat Dan Bahan

1. Alat

Dredge, termos es, pH meter, refraktosalinometer, autoclave, oven, inkubator, pipet, gelas ukur, timbangan, tabung reaksi, cawan petri, pipet ukur, labu reaksi, gelas benda dan penutup, bunsen, ose, LAF ("Laminar Air Flow"), "water bath", sentrifuse, kertas saring Whatman no.42, spektrofotometer, inkubator, blender, "vortex".

2. Bahan

Alkohol, akuades, Klein A, Klein B, Klein C; glukosa; fruktosa, sukrosa, lar. Gram A, Gram B, Gram C, Gram D, lar. H_2O_2 , lar. α -naphthol, lar. P-aminodimethylalanin-oxalat, lar. medium kaldu nitrat, asam sulfonilat, lar. dimetil α -naftilamin, lar. CMC ("Carboxy Methyl Celullosa") 1%, pereduksi DNS, asam sitrat, Na. Sitrat, merthiolate, NaOH, Na_2CO_3 , $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, K/Na-Tartrat; pereaksi Foine-ciocalteu, serum albumin.

C. Cara Kerja

C.1. *Isolasi dan Identifikasi Bakteri*

C.1.1. Pengambilan Sampel.

Dilakukan pengambilan sampel substrat hutan mangrove dengan menggunakan “dredge” dengan kedalaman 10-15 cm pada tiga tempat yang berbeda, kemudian dimasukkan ke dalam waskom. Masing-masing sampel substrat diambil pada bagian tengah dengan centong plastik dijadikan satu dalam kantong plastik. Sampel tersebut kemudian dimasukkan ke dalam termos es (Austin, 1988).

C.1.2. Isolasi Bakteri.

Satu gram substrat lumpur mangrove dimasukkan dalam tabung reaksi, diencerkan dengan akuadest sampai volume 10 ml. Kemudian dari pengenceran pertama diambil 1 ml larutan dan diencerkan dalam tabung reaksi sampai volume 10 ml (konsentrasi 10^{-2}), hingga sampai didapat pengenceran 10^{-7} . Kemudian dari tiap-tiap pengenceran tersebut ditanam sebanyak 1 ml dalam medium “Cellulolytic Agar with Sea Salt” dalam cawan petri secara duplo. Selanjutnya diinkubasi dengan suhu kamar selama 48 jam. Diamati terbentuknya koloni-koloni bakteri yang tumbuh. Koloni yang tumbuh kemudian dipisah-pisahkan pada cawan petri yang berbeda yang berisi medium selulosa sehingga didapat kultur murni (Salle, 1973).

C.1.3. Identifikasi Isolat Bakteri

a. Pengecatan Gram.

Gelas benda dibersihkan dengan alkohol hingga bebas lemak, kemudian dipanggang di atas bunsen. Satu ose suspensi diambil secara aseptis dan diletakkan pada gelas benda. Dikering anginkan dan kemudian dilakukan fiksasi. Setelah dingin dibubuhkan cat utama (Gram A) sebanyak 2-3 tetes dan didiamkan selama 1 menit. Dicuci dengan air mengalir, kemudian dikering anginkan. Ditetesi dengan larutan mordan (Gram B) dan dibiarkan selama 1 menit, dicuci dengan air mengalir dan dikering anginkan. Kemudian ditetesi dengan larutan peluntur (Gram C) selama ± 30 detik, kemudian dicuci dengan air mengalir dan dikering anginkan. Diberi larutan cat penutup (Gram D) selama 2 menit, dicuci dengan air mengalir dan dikering anginkan. Diamati preparat dengan mikroskop perbesaran kuat dengan minyak imersi. Gram (-) berwarna merah dan Gram (+) berwarna ungu (violet), gram variabel dapat berwarna merah atau ungu (Salle, 1973).

b. Pengecatan Spora Bakteri.

Satu ose suspensi diletakkan pada gelas benda dan difiksasi kemudian ditetesi larutan Klein A diuapi sampai nampak uap namun tidak mendidih, didiamkan selama 5 menit. Dicuci dengan air mengalir. Kemudian ditetesi Klein B sampai warna cat luntur, dicuci dengan air mengalir. Sesudah itu ditetesi dengan Klein C, didiamkan selama 2 menit kemudian dikeringkan. Setelah itu diamati dan digambar mengenai letak spora, bentuk spora dan

ukuran spora terhadap sel bakteri. Hasil pengecatan spora akan terlihat berwarna hijau, sel berwarna merah (Salle, 1973).

c. Pengamatan Motilitas Isolat Bakteri dengan Cara "Hanging Drop".

Gelas benda dan penutup dibersihkan dengan menggunakan akuades atau alkohol kemudian dibakar di atas bunsen. Satu ose isolat diambil dan dicampur dengan sedikit akuades, kemudian suspensi isolat diletakkan di atas gelas penutup. Pada setiap sudut gelas benda diolesi dengan vaselin pada tepi cekungannya dan ditutupkan pada gelas benda penutup dengan menempatkan suspensi biakan isolat di lambung cekungan. Kemudian setelah rapat dibalik sehingga posisi menjadi menggantung pada gelas penutup. Hasil pengamatannya digambar baik bentuk atau gerakan bakteri (Salle, 1973).

d. Pengujian Karakter Biokimia Isolat Bakteri

d.1. Uji Katalase.

Diteteskan beberapa tetes larutan H_2O_2 di atas gelas benda yang bersih kemudian diambil sedikit biakan murni isolat bakteri dan diletakkan di dalam tetesan H_2O_2 . Diamati terjadinya gelembung udara di dalam tetesan H_2O_2 (Singleton, 1992).

d.2. Uji Oksidase.

Biakan murni isolat bakteri diinokulasikan ke dalam medium cair nutrient dan satu tabung sebagai kontrol. Diinkubasi $33^\circ C$ selama 24 jam. Setelah itu ditetesi 0,2 ml larutan α -naphthol 1% dan 0,3 ml larutan p-aminodimethylalnin-oxalat 1% ke dalam tabung biakan, kemudian

dikocok selama 5 menit, diamati terjadinya warna biru yang menunjukkan adanya enzim oksidase, kemudian dibandingkan dengan kontrol (Singleton, 1992).

d.3. Fermentasi Karbohidrat.

Biakan murni isolat bakteri diinokulasikan ke dalam medium cair glukosa yang telah diberi sedikit indikator fenol merah. Sebagai kontrol dibiarkan satu seri medium tidak diinokulasi dengan isolat bakteri. Semua tabung yang berisi medium cair glukosa diberi tabung durham dan kemudian diinkubasi pada suhu 36°C selama 48 jam. Dilakukan pengamatan terhadap perubahan warna pada medium dan timbul tidaknya gelembung udara di dalam tabung durham (Singleton, 1992).

d.4. Uji Oksidasi / Fermentasi Glukosa

Biakan murni isolat bakteri diinokulasikan dengan cara menusukkan pada OF medium dengan menggunakan ose secara tegak lurus dengan kedalaman ± 1 cm dari permukaan medium. Setiap isolat diinokulasikan pada 2 tabung yang berisi OF medium. Salah satu dari tabung tersebut kemudian diberi parafin oil steril sampai mencapai ketinggian ± 1 cm dari permukaan medium. Semua biakan diinkubasikan selama 14 hari pada suhu 37°C dan setiap hari dilakukan pengamatan.

Tabel Uji OF Karakterisasi Bakteri

Hasil	Tanpa parafin oil	Dengan parafin oil
<i>Oksidasi</i>	Kuning	Hijau
<i>Fermentasi</i>	Kuning	Kuning
<i>Negatif</i>	Biru /hijau	Hijau

Medium OF juga dapat digunakan untuk mendeteksi adanya motilitas pada isolat yang diinokulasikan. Hal ini ditunjukkan dengan adanya pertumbuhan isolat yang menyebar dari bekas tusukan ose pada medium.

C.2. Pengukuran Pertambahan Biomassa Isolat Bakteri

Pengukuran pertumbuhan ini untuk mengetahui kurva pertumbuhan isolat-isolat bakteri, dengan mengamati absorbansi (OD) setiap 12 jam.

Diinokulasikan isolat bakteri dengan kerapatan 10^7 - 10^8 bakteri/ml sebanyak 2,5 ml ke dalam 25 ml medium "Cellulolytic Broth with Sea Salt", digojog selama 72 jam pada suhu kamar, kemudian diukur OD ("Optical Density") dengan spektrofotometer setiap 12 jam dengan panjang gelombang disesuaikan dengan isolat bakteri yang akan diukur pertumbuhannya untuk *Bacillus sp1* 540 nm dan untuk *Pseudomonas sp* 560 nm. Hasil data OD yang diperoleh kemudian diproyeksikan pada grafik sehingga dapat membentuk sebuah kurva (Hadioetomo, 1985).

C.3. Pengukuran Aktivitas Enzim Selulase.

C.3.1. Produksi Enzim Selulase

- ◆ Suspensi isolat bakteri dengan kerapatan 10^7 - 10^8 bakteri/ml sebanyak 2,5 ml ditanam pada erlenmeyer yang berisi 25 ml medium "Cellulolytic Broth with Sea Salt" yang mempunyai pH 7,0 dan dengan sumber karbon CMC ("Carboxy Methyl Celulosa") sebanyak 15 %.
- ◆ Kemudian diinkubasikan pada suhu kamar dengan waktu inkubasi, yaitu 12, 24, 36, 48, 60 dan 72 jam.

C.3.2. Ekstraksi Enzim Selulase (Darwis, 1990).

Medium yang telah ditumbuhi bakteri kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 5000 rpm selama 10 menit, lalu disaring dengan kertas Whatman no. 42 dan filtrat yang didapat diambil untuk dianalisa aktivitas enzimnya.

C.3.3. Penentuan Aktivitas Enzim Selulase Dengan Metode Dinitrosalisilat (DNS) (Darwis, 1990).

Produksi enzim selulase ditentukan berdasarkan aktivitasnya. Penentuan aktivitas enzim selulase dilakukan dengan mengukur jumlah gula pereduksi. Untuk medium pertumbuhan menggunakan "Cellulolytic Broth with Sea Salt". Gula pereduksi yang dihasilkan dihitung sebagai glukosa dengan metode DNS. Ke dalam 0,5 ml larutan enzim ditambahkan 0,5 ml larutan CMC, diinkubasi pada suhu 50°C selama 30 menit. Ke dalam campuran tersebut ditambahkan 1 ml pereaksi DNS dan dipanaskan pada suhu 100°C selama 5 menit dan segera didinginkan pada suhu kamar. Selanjutnya ditambahkan 8 ml buffer sitrat 0,5 M pH 4,8 dan diukur absorbansinya pada panjang gelombang 540 nm.

Pada saat pengukuran banyaknya gula reduksi yang dihasilkan dengan menggunakan spektrofotometer digunakan larutan blanko yang dibuat dengan cara mencampurkan 0,5 medium "Cellulolytic Broth with Sea Salt", 0,5 lar. CMC 1% dan 1 ml DNS kemudian ditambahkan 8 ml buffer sitrat 0,5 M pH 4,8.

Kandungan gula pereduksi ditentukan berdasarkan kurva standar glukosa. Kurva standar glukosa dibuat dengan konsentrasi 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 dan 1 mg/ml. Satu unit aktivitas enzim selulase setara dengan jumlah enzim selulase yang dapat menghasilkan 1 mikro mol glukosa dari larutan CMC selama 1 menit.

$$\begin{aligned} \text{Aktivitas enzim} &= \text{unit / ml substrat / menit} \\ &= \frac{\text{mg gula reduksi} \times 1000 \times 2}{\text{BM Glukosa} \times 30} \end{aligned}$$

C.4. Penentuan Protein Terlarut dengan Metode Lowry – Folin (Suhardi dan S. Sudarmadji, 1992)

- Dimasukkan filtrat enzim sebanyak 1,0 ml dalam tabung reaksi kemudian ditambahkan 1 ml reagen D, segera digojog dengan “vortex” dan diinkubasi pada suhu kamar selama 15 menit.
- Ditambahkan 3 ml reagen E ke dalam tabung filtrat enzim dan segera digojog “vortex” secepatnya, kemudian diinkubasi pada suhu kamar selama 45 menit dan segera diukur absorbansinya pada 540 nm. Warna biru yang terbentuk tetap stabil selama 45–60 menit sesudah periode inkubasi.
- Dibuat kurva standar serum albumin dengan konsentrasi 0,06; 0,12; 0,18; 0,4; dan 0,3 mg/ml sehingga diperoleh garis regresi hubungan antara absorbansi dengan konsentrasi protein. Berdasarkan garis regresi ini kandungan protein cuplikan dapat diketahui (reagen D dan E dapat dilihat pada lampiran 10).

C.5. Penentuan Aktivitas Spesifik Enzim Selulase (Clark dan Robert, 1977).

Aktivitas spesifik enzim selulase dihitung dengan cara membagikan antara jumlah produk yang dihasilkan selama 1 menit per setiap mg protein yang terkandung. Semakin besar aktivitas spesifik enzim selulase yang dihasilkan, semakin murni enzim tersebut dan semakin besar pula aktivitasnya dalam menghidrolisa selulosa.

$$\begin{aligned} \text{Aktivitas spesifik enzim} &= \text{unit / mg protein} \\ &= \frac{\mu \text{ mol substrat yang dihasilkan / menit}}{\text{mg protein}} \end{aligned}$$

D. Parameter

Parameter yang diamati adalah :

1. Jenis isolat bakteri selulolitik yang ditemukan .
2. Produksi enzim selulase yang dihitung berdasarkan aktivitas enzim selulasenya dan dihitung dalam unit/ml filtrat/menit dari masing-masing perlakuan yang diukur dengan menggunakan metode DNS.
3. Pertambahan biomassa bakteri selama masa inkubasi
4. Kandungan protein yang terkandung dalam enzim selulase agar dapat digunakan untuk menentukan aktivitas spesifik enzim selulase.

E. Analisis Data

Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap Faktorial menggunakan 2 faktor yaitu waktu inkubasi (12, 24, 36, 48, 60 dan 72 jam) dan jenis isolat bakteri (*Bacillus sp1* dan *Pseudomonas sp*) dengan ulangan sebanyak 4 kali. Data aktivitas enzim selulase yang diperoleh selanjutnya dianalisa dengan analisa sidik ragam atau ANOVA dengan tingkat kesalahan 1 %. Jika F hitung lebih besar dari F tabel dilanjutkan dengan uji beda rata-rata dengan uji Beda Nyata Terkecil (BNT) pada $\alpha = 1 \%$.