

BAB IV

METODOLOGI PENELITIAN

A. Tempat dan Waktu Penelitian

1. Tempat Penelitian

Pengambilan sampel sedimen dilakukan di hutan mangrove di Teluk Awur Jepara, Jawa Tengah. Isolasi, identifikasi dan karakterisasi serta uji aktifitas enzim isolat bakteri dilakukan di Laboratorium Mikrobio-Genetika Jurusan Biologi FMIPA Universitas Diponegoro Semarang.

2. Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan pada bulan Juli 2000-Agustus 2001

B. Bahan dan Alat Penelitian

1. Bahan Penelitian

Bahan utama yang digunakan dalam penelitian ini adalah sampel sedimen mangrove Teluk Awur Jepara, sedangkan bahan penunjang yang digunakan terdiri dari akuades, medium "Cellulolytic Agar with Sea Salt" (CAWSS), medium "Cellulolytic Broth with Sea Salt" (CBWSS), medium "Nutrient Agar" (NA), alkohol 70%, spirtus, larutan pewarnaan Gram (Gram A, Gram B, Gram C dan Gram D), larutan pengecatan spora bakteri (Klein A, Klein B dan Klein C), vaselin, H₂O₂ 3%, medium oksidasi/fermentasi glukosa (Hugh & Leifson medium), medium fermentasi karbohidrat (medium "Nutrien Broth"/NB) dan glukosa), larutan buffer sitrat, larutan "Carboxymethyl Cellulose" (CMC) 1%, NaOH, glukosa, larutan "Bovine Serum Albumin"

(BSA), larutan pereduksi asam 3,5-dinitrosalisilat (DNS), larutan reagen penentu kandungan protein metode Lowry-Folin (reagen A, reagen B, reagen C, reagen D dan reagen E).

2. Alat Penelitian

Alat yang dipergunakan dalam penelitian ini adalah “dredger”, termometer, refraktometer, pH meter, waskom, centong plastik, termos es, plastik, tabung reaksi dan rak tabung reaksi, lampu spiritus, batang pengaduk, sendok plastik, ose tumpul, neraca Ohaus, timbangan analitis Sartorius, aluminium foil, kapas, cawan petri, pipet ukur, pipet tetes, “hand counter” dan “colony counter”, gelas benda, gelas penutup, gelas benda dengan cekungan tunggal, mikroskop, tabung Durham, labu erlenmeyer, autoklaf, inkubator, oven, “rotary agitator”, sentrifugator, “hot plate” dan “magnetic stirrer”, penangas, labu ukur, corong gelas, spektrofotometer (Spectronic 20) dan kuvet spektrofotometer, “water bath”, “laminar air flow” (LAF), batang oksidase (“oxydase stick”), batang pH (“pH stick”), tabung ependorff.

C. Cara Kerja

1. Pengambilan Sampel Sedimen

Tiga stasiun (titik sampling) ditentukan terlebih dahulu, selanjutnya tiap stasiun dilakukan tiga kali pengambilan sedimen dengan menggunakan “dredger”. Bagian permukaan atas dari sedimen diambil dengan menggunakan centong plastik, dan sedimen dari sembilan kali pengambilan dicampur dalam waskom. Sedimen yang sudah tercampur kemudian dimasukkan dalam plastik,

dan dimasukkan ke dalam termos es (Soedibjo, 1991). Salinitas perairan diukur dengan refraktometer dan pH perairan diukur dengan pH meter.

2. Isolasi dan Identifikasi Isolat Bakteri

2.1. Isolasi Bakteri

Sampel sedimen ditimbang sebanyak 5 gram, dimasukkan ke dalam labu erlenmeyer yang berisi 45 ml akuades steril. Sampel sedimen yang telah berupa cairan kental/suspensi dengan ose tumpul digoreskan ke medium "Cellulolytic Agar with Sea Salt" (CAWSS) pada cawan petri beberapa garis yang sejajar, kemudian ose dipijarkan lagi dan setelah dingin digoreskan lagi beberapa garis yang sejajar pada cawan petri dan yang memotong garis-garis yang terdahulu, setelah itu diinkubasi selama 24-48 jam pada suhu 37⁰ C. Koloni yang tumbuh diamati di bawah mikroskop dan tiap koloni yang berbeda dipindahkan dengan ose secara aseptis ke medium NA miring, diinkubasi pada suhu 37⁰ C selama 24 jam. Tiap koloni dilakukan pengecatan Gram (Hastowo dan Lay, 1994). Biakan murni yang telah diperoleh selanjutnya dilakukan serangkaian uji untuk mengetahui ciri morfologi dan biokimia dari isolat bakteri tersebut (Anonim, 1984 dalam Apriyanto, 2000).

2.2. Pengecatan Gram

Gelas benda dibersihkan dengan alkohol 70% dan difiksasi dengan cara dipanaskan di atas lampu spiritus dan diberi satu tetes akuades steril. Satu ose isolat bakteri umur 24 jam ditambahkan dan disuspensikan, kemudian difiksasi di atas lampu spiritus. Gram A sebanyak 2-3 tetes diteteskan pada isolat bakteri yang telah berupa preparat ulas tersebut dan didiamkan selama 1 menit, lalu dicuci dengan air mengalir dan dikeringanginkan. Gram B (larutan Mordan)

diteteskan pada preparat ulas selanjutnya didiamkan selama 1 menit, dicuci dengan air mengalir dan dikeringanginkan. Preparat dicuci dengan Gram C (larutan peluntur) selama 30 detik, dicuci dengan air mengalir dan dikeringanginkan, setelah itu diberi Gram D (larutan cat penutup), didiamkan selama 2 menit, dicuci dengan air mengalir dan dikeringanginkan. Preparat diamati dengan mikroskop perbesaran kuat. Gram positif berwarna ungu/violet, Gram negatif berwarna merah dan Gram variabel berwarna merah/ungu (Salle, 1974).

2.3. Pengecatan Spora Bakteri

Gelas benda dibersihkan dengan alkohol 70%, kemudian satu ose isolat bakteri umur 72 jam diambil dan diletakkan pada gelas benda dan difiksasi., setelah itu ditetesi larutan Klein A, diuapi sampai tampak uap tetapi tidak mendidih, didiamkan selama 5 menit, kemudian dicuci dengan air mengalir. Klein B ditetaskan sampai warna cat luntur, dicuci dengan air mengalir, selanjutnya ditetesi Klein C dan didiamkan selama 2 menit dan dikeringkan. Letak spora, bentuk spora dan ukuran spora terhadap sel bakteri diamati di bawah mikroskop dengan perbesaran kuat. Spora akan berwarna hijau dan sel berwarna merah (Salle, 1974).

2.4. Pengamatan Motilitas Bakteri dengan Cara Tetes Gantung ("Hanging Drop")

Gelas benda dan gelas penutup dibersihkan dengan alkohol 70%, diberi vaselin pada sudut-sudut gelas penutup dengan tusuk gigi, kemudian diletakkan dua mata ose suspensi biakan isolat bakteri dari media NB yang berumur 24 jam di bagian tengah gelas penutup. Gelas benda dengan cekungan tunggal

diletakkan di atas gelas penutup, kemudian dibalikkan dengan cepat, lalu diamati di bawah mikroskop (Hastowo dan Lay, 1994).

3. Pengujian Karakteristik Biokimiawi Isolat Bakteri

3.1. Uji Katalase

Gelas benda dibersihkan dengan alkohol 70%, lalu satu tetes H_2O_2 3% ditetaskan pada gelas benda. Satu ose isolat bakteri umur 24 jam diambil dan diletakkan pada gelas benda tersebut. Gelembung udara yang terjadi dalam tetesan H_2O_2 diamati. Hal ini menunjukkan reaksi positif (Hastowo dan Lay, 1994).

3.2. Uji Oksidase

Batang indikator uji oksidase ("oxydase stick") pada bagian ujung yang berwarna coklat ditempelkan pada koloni isolat bakteri umur 24 jam. Perubahan warna yang terjadi diamati. Perubahan warna coklat menjadi ungu menunjukkan reaksi oksidase positif yang berarti bahwa bakteri tersebut mampu menghasilkan enzim oksidase (Apriyanto, 2000).

3.3. Uji Fermentasi Karbohidrat (Glukosa)

Biakan murni isolat bakteri diinokulasikan ke dalam medium cair glukosa yang telah diberi sedikit indikator fenol merah, sebagai kontrol dibiarkan satu seri medium yang tidak diinokulasi dengan isolat bakteri. Semua tabung yang berisi medium glukosa diberi tabung Durham dan kemudian diinkubasi pada suhu $36^{\circ}C$ selama 48 jam. Pengamatan dilakukan terhadap perubahan warna pada medium dan ada tidaknya gelembung udara di dalam tabung Durham (Singleton, 1992).

3.4. Uji Oksidasi/Fermentasi Glukosa

Biakan murni isolat bakteri diinokulasikan dengan menggunakan ose runcing ke dalam medium semi padat OF Glukosa (Hugh & Leifson medium) dengan cara tusukan hingga mencapai setengah medium. Satu tabung yang telah diinokulasi dibiarkan tanpa penambahan minyak parafin, sedangkan satu tabung yang lain diberi minyak parafin sedalam ± 1 cm, sebagai kontrol dibiarkan satu seri medium tidak diinokulasi dengan isolat bakteri. Semua perlakuan diinkubasi pada suhu 30° C selama 14 hari. Perubahan warna yang terjadi diamati, yang menunjukkan reaksi seperti tertera pada Tabel 01 di bawah ini :

Tabel. 01. Reaksi yang terjadi pada uji OF Glukosa

Reaksi	Tabung Terbuka	Tabung Tertutup
Oksidasi	Kuning	Hijau
Fermentasi	Kuning	Kuning
Tak ada reaksi	Biru/Hijau	Hijau

Uji OF Glukosa juga dapat digunakan untuk pengujian sifat aerob dan, atau anaerob suatu isolat bakteri (Cowan dan Steel's, 1975).

4. Pembuatan Suspensi Isolat Bakteri (G1 dan G2)

Biakan isolat bakteri diinokulasikan ke dalam agar miring dan diinkubasi pada suhu 30° C selama 24 jam. Satu ose biakan diambil dan diinokulasikan ke dalam medium CBWSS, kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 30° C. Selanjutnya biakan dalam medium CBWSS tersebut dibuat pengenceran dari 10^1 - 10^6 dan dipilih pengenceran biakan bakteri yang menunjukkan kerapatan sel 10^7 sel/ml. Isolat bakteri G1 diasumsikan bahwa pada transmitansi 18,6% dengan OD sebesar 0,73049 pada $\lambda=560$ nm menunjukkan jumlah sel $2,89 \cdot 10^7$ sel/ml, dan G2 diasumsikan bahwa pada

transmitansi 25,5 dengan OD sebesar 0,59346 pada $\lambda=620$ nm dengan jumlah sel $1,82 \cdot 10^7$ sel/ml (Ismail, 1997).

5. Pengukuran Kurva Pertumbuhan dan Produksi Enzim Selulase Isolat Bakteri (G1 dan G2)

Isolat bakteri dengan kerapatan sel 10^7 sel/ml diinokulasikan sebanyak 10% v/v ke dalam media cair CBWSS. Diinkubasikan pada suhu kamar dengan kecepatan 300 rpm dengan menggunakan “rotary agitator” selama 30 jam, setiap enam (6 jam) sekali dilakukan pengukuran absorbansi (OD) yang menunjukkan jumlah sel isolat bakteri dan produksi enzim selulase dari masing-masing isolat bakteri, pengukuran juga dilakukan pada jam ke-0 (T_0) (Martien, 2000).

6. Pengukuran Aktifitas Enzim Selulase Isolat Bakteri (G1 dan G2)

6.1. Produksi Enzim Selulase

Isolat bakteri dengan kerapatan sel 10^7 sel/ml diinokulasikan sebanyak 10% v/v ke dalam media cair CBWSS yang diberi perlakuan pH 7,0. Kultur bakteri diagitasi dengan “rotary agitator” pada kecepatan 300 rpm selama 12 jam pada suhu kamar (Martien, 2000).

6.2. Ekstraksi Enzim Selulase

Kultur bakteri yang telah tumbuh selama 12 jam tersebut dikocok dengan “shaker water bath” yang didinginkan dengan es (suhu $\pm 10^0$ C) pada kecepatan 120 rpm selama 2 jam. Setelah itu disentrifugasi dengan kecepatan 4000 rpm selama 10 menit, selanjutnya supernatan (filtrat enzim) yang didapat dianalisis aktifitas enzim dan kadar proteinnya (Yani dan Djajasukma, 1991; Saskiawan dan Sastraatmadja, 1991).

6.3. Penentuan Aktifitas Enzim Selulase dengan Metode DNS

Produksi enzim selulase ditentukan berdasarkan aktifitasnya. Penentuan aktifitas enzim selulase dilakukan dengan mengukur jumlah gula reduksi (gula pereduksi) menurut Mandels (1974 dalam Pujiyanto, 1998) dengan menggunakan larutan CMC 1% sebagai substrat dalam buffer sitrat pH 4,8. Gula reduksi yang dihasilkan dihitung sebagai glukosa dengan metode DNS (Macris, 1984 dalam Pujiyanto, 1998) dengan cara ke dalam 0,5 ml larutan enzim (supernatan) ditambahkan 0,5 ml larutan CMC 1%, diinkubasikan pada suhu 30° C, 37° C, 40° C, 50° C, 60° C dan 70° C selama 30 menit (sebagai perlakuan), sedangkan campuran enzim dan larutan CMC 1% yang langsung dipanaskan tanpa diinkubasi selama 30 menit digunakan sebagai kontrol, ke dalam campuran tersebut ditambahkan 1 ml reagen DNS dan dipanaskan selama 15 menit dalam air mendidih dengan suhu ± 100° C dan segera didinginkan. Larutan tersebut selanjutnya ditambah 8 ml akuades steril dan diukur absorbansinya pada panjang gelombang 540 nm, sebagai blanko digunakan medium steril. Kandungan gula reduksi ditentukan berdasarkan kurva glukosa standar. Satu unit aktifitas enzim selulase setara dengan jumlah enzim selulase yang dapat menghasilkan 1 mikromol glukosa dari larutan CMC selama 1 menit (Rahman, 1992).

$$\text{Aktifitas Enzim} = \frac{\text{mg gula reduksi (Glukosa)} \times 1000 \times 2}{\text{BM Glukosa} \times 30}$$

Aktifitas enzim dinyatakan dalam **unit/ml filtrat/menit**

6.4 Pembuatan Kurva Glukosa Standar

Larutan glukosa standar dengan konsentrasi yang berbeda seperti terdapat pada Lampiran 14 Tabel 19, masing-masing diambil 1 ml, kemudian ditambahkan 1 ml reagen DNS, dipanaskan dalam air mendidih dengan suhu $\pm 100^{\circ}\text{C}$ selama 15 menit, segera didinginkan dengan air mengalir. Larutan tersebut selanjutnya ditambah 8 ml akuades steril dan segera diukur absorbansinya pada $\lambda=540\text{ nm}$, sehingga diperoleh garis regresi hubungan antara absorbansi dengan konsentrasi larutan glukosa standar. Berdasarkan garis regresi ini maka aktifitas enzim selulase isolat bakteri dapat diketahui (Pujiyanto, 1998; Rahman, 1992).

7. Penentuan Protein Terlarut dengan Metode Lowry-Folin

7.1. Pengukuran Kandungan Protein Terlarut Enzim Selulase Isolat Bakteri

Supernatan/filtrat enzim sebanyak 1 ml yang telah dilakukan pengenceran 10^1 dengan buffer sitrat pH 6,0 dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambah 1 ml reagen D, segera digojog dan diinkubasi pada suhu kamar selama 15 menit. Reagen E sebanyak 3 ml ditambahkan ke dalam tabung dan segera digojog secepatnya, kemudian diinkubasi pada suhu kamar selama 45 menit dan segera diukur absorbansinya pada $\lambda=540\text{ nm}$. Warna biru yang terbentuk tetap stabil selama 45-60 menit sesudah periode inkubasi (Suhardi dan Sudarmadji, 1992).

7.2. Pembuatan Kurva “Bovine Serum Albumin” (BSA) Standar

Larutan BSA standar dengan konsentrasi yang berbeda seperti yang terdapat pada Lampiran 16 Tabel 20, masing-masing diambil 1 ml dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambah 1 ml reagen D, segera digojog dan diinkubasi pada suhu kamar selama 15 menit. Reagen E sebanyak 3 ml ditambahkan ke dalam tabung, segera digojog secepatnya, kemudian diinkubasi pada suhu kamar selama 45 menit dan segera diukur absorbansinya pada $\lambda=540$ nm sehingga diperoleh garis regresi maka hubungan antara absorbansi dengan konsentrasi protein (larutan BSA standar). Berdasarkan garis regresi ini kandungan protein sampel dapat diketahui (Suhardi dan Sudarmadji, 1992)

8. Penentuan Aktifitas Spesifik Enzim Selulase

Aktifitas spesifik enzim selulase dihitung dengan cara membagikan antara jumlah produk yang dihasilkan selama 1 menit per setiap mg protein yang terkandung. Semakin besar aktifitas spesifik enzim selulase yang dihasilkan, semakin murni enzim tersebut dan semakin besar pula aktifitasnya dalam menghidrolisis selulosa.

Aktifitas Spesifik Enzim = Unit/ mg Protein

$$= \frac{\mu \text{ mol substrat yang dihasilkan/menit}}{\text{mg Protein}}$$

(Wirahadikusumah dan Rahwono, 1990)

9. Penentuan Berat Kering Sel Isolat Bakteri

Biomassa sel bakteri diukur dengan metode gravimetri menggunakan

tabung ependorff 1,5 ml yang sebelumnya telah ditimbang berat tabung

tersebut dengan neraca Sartorius. Isolat bakteri diinokulasikan ke dalam media cair CBWSS yang mempunyai pH 7,0, kemudian dikocok dan pada saat itu juga diambil 1 ml dengan pipet steril, dimasukkan ke dalam tabung ependorff, selanjutnya disentrifugasi pada kecepatan 3000 rpm selama 15 menit, supernatan dibuang sedangkan pelet yang didapat dicuci kembali dengan akuades steril hingga volume 1 ml untuk kemudian disentrifugasi lagi. Terakhir kembali pelet dikeringkan dalam oven pada suhu 80° C hingga mencapai berat yang konstan (\pm 24 jam) dan ditimbang berat keringnya dengan neraca Sartorius. Hal yang sama juga dilakukan terhadap kultur bakteri yang telah diagitasi selama 12 jam. Dicatat pula derajat keasaman (pH) pada awal dan akhir fermentasi (Kusdiyantini, 2001).

D. Parameter

Parameter utama yang diamati adalah jenis-jenis isolat bakteri selulolitik yang didapatkan dan aktifitas enzim selulase yang dihitung dalam unit/ml filtrat/menit dari masing-masing perlakuan yang diukur dengan menggunakan metode dinitrosalisilat (DNS), sedangkan parameter pendukung meliputi kandungan protein terlarut menurut metode Lowry-Folin, aktifitas spesifik enzim selulase, berat kering sel dan derajat keasaman (pH).

E. Analisis Data

Penelitian yang dilakukan menggunakan rancangan dasar RAL (Rancangan Acak Lengkap) pola faktorial. Faktor pertama adalah suhu inkubasi terhadap aktifitas enzim selulase yaitu 30° C (S1), 37° C (S2), 40° C (S3), 50° C

(S4), 60° C (S5) dan 70° C (S6), sedangkan faktor kedua adalah jenis isolat bakteri yang didapatkan, masing-masing diulang sebanyak tiga kali. Data yang diperoleh selanjutnya dianalisis dengan menggunakan Analisis Sidik Ragam pada taraf uji 5% dan jika terdapat pengaruh perlakuan maka dilanjutkan dengan uji jarak berganda Duncan pada taraf uji 5% (Steel dan Torry, 1991).

Tabel. 02. Kombinasi perlakuan suhu inkubasi dengan jenis isolat bakteri

Jenis Isolat Bakteri	Suhu Inkubasi (° C)					
	30 (S1)	37 (S2)	40 (S3)	50 (S4)	60 (S5)	70 (S6)
G1	G1S1	G1S2	G1S3	G1S4	G1S5	G1S6
G2	G2S1	G2S2	G2S3	G2S4	G2S5	G2S6

Keterangan : G = jenis isolat bakteri
S = suhu inkubasi

