

BAB III

METODE PENELITIAN

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Biokimia, Laboratorium Mikrobiogenetika Universitas Diponegoro Semarang dan Laboratorium Penelitian Asam Nukleat dan Genetik Molekul Institut Teknologi Bandung. Tahapan penelitian yang dilakukan meliputi variasi temperatur pertumbuhan bakteri, uji mikroskopis bakteri, isolasi DNA kromosom, elektroforesis DNA, amplifikasi fragmen gen 16S rRNA, sekuensing, analisis hasil sekuensing dan identifikasi enzim ekstraseluler. Pada penelitian dibutuhkan alat dan bahan sebagai berikut:

3.1 Alat dan Bahan

3.1.1 Alat-alat yang digunakan

Alat-alat yang digunakan yaitu, cawan petri (Schott), jarum ose, autoclav (clinicks), erlenmeyer (Pyrex), inkubator (Clinicks), tabung reaksi (Schott, Pyrex), micro pipet (Macro), tabung mikro (Eppendorf), lampu UV (Cole Palmer), mesin PCR (Perkin Elmer), mesin elektroforesis (Biorad), mikroskop, micro sentrifuge (Eppendorf Centrifuge 5471C), pH meter (AHC EC20), magnetik stirer (Electrogen), Spektrofotometer UV/Vis (Perkin Elmer), Gelas beker (Pyrex).

3.1.2 Bahan-bahan yang digunakan

Sampel

Air dari sumber air panas Gedong Songo, Ambarawa Jawa Tengah.

Media ½ Luria Berthani (1/2 LB)

Yeast ekstrak (Conda), bacto agar (Conda), tripton (Conda), pepton (Conda), NaCl pro analis (Merck), aquades.

Uji Gram Bakteri

Alkohol (Merck), larutan kristal ungu (Merck), reagen gram's iodine (Merck), aseton (Merck), safranin (Merck), akuades.

Ekstraksi DNA

Etanol absolut (Merck), natrium asetat (M&B), natrium sitrat (M&B), EDTA (J.T. Baker), tris-base (Pharmacia Biotech), asam asetat glasial (M&B), proteinase K (USB Corporation), sukrosa (Merck), lizozim (USB Corporation), SDS (Pharmacia Biotech), isoamil alkohol (Merck), kloroform (Merck).

Elektroforesis

Agarosa (Boehringer Mannheim), EtBr, iodine (Merck), tris-base, asam asetat glasial (M&B), 0,5 M EDTA, sukrosa, bromfenol biru (Merck).

PCR

dNTP (Nucleic PlusTM), primer P₁ (5-ATGGCTGTCGTCAGCT-3) dan P₃ (5-ACGGGCGGTGTGTAC-3), bufer PCR 10X, *Taq* DNA polimerase (Pharmacia Biotech), ddH₂O (Merck).

Sekuensing

ddNTP (Amersham Pharmacia Biotech), *A-dye terminator*, *G-dye terminator*, *C-dye terminator*, dan *T-dye terminator*, dNTP, tris-base, HCl, MgCl₂ (Merck), pirofosfat termostabil dan *Amplitaq DNA Polymerase* (Biorad).

Identifikasi amilase

Media ½ LB, pati jagung, larutan iodine (Merck).

Identifikasi Protease

Media ½ LB, gelatin (M&B), buah nanas.

Identifikasi β-galaktosidase

Media ½ LB, laktosa (Merck), ONPG (o-nitrophenil-D-galactopyranoside)

3.2 Cara Kerja

3.2.1 Pengambilan sampel dari sumber air panas

Air panas diambil dari bagian tengah kawah Gedong Songo (GS) 4 (denah pada lampiran A). Air dimasukkan kedalam jerigen steril kemudian disimpan dalam keadaan dingin ± 4 °C.

3.2.2 Inokulasi bakteri dari sumber GS-4

Ke dalam 50 mL media cair ditambahkan 10 mL air sumber GS-4. Kemudian diinkubasi pada temperatur 60 °C selama 24 jam.

3.2.3 Temperatur maksimum

Temperatur maksimum kehidupan bakteri diketahui dengan melakukan variasi temperatur inkubasi dari 60 °C – 80 °C dengan rentangan 5 °C. Bakteri diinokulasi pada media cair dan diinkubasi selama 24 jam. Pengamatan terhadap pertumbuhan bakteri dilakukan dengan melihat kekeruhan yang terjadi pada sampel kemudian membandingkan dengan kontrol negatifnya.

3.2.4 Isolasi bakteri

Bakteri yang masih hidup pada temperatur maksimum kemudian diisolasi dengan menginokulasikan bakteri pada media padat secara *spread* yang dilanjutkan dengan metode *streak* sehingga diperoleh koloni tunggal.

Metode *spread*. Sebanyak 50 µL kultur bakteri dituang di atas media padat, kemudian diratakan menggunakan *spreader* steril dengan gerakan memutar sehingga merata seluruh permukaan media padat (Hattori *et al.*, 1997). Setelah itu diinkubasi pada temperatur maksimum pertumbuhannya (75 °C) selama ± 24 jam.

Metode *streak*. Koloni tunggal yang diperoleh dari inkubasi menggunakan metode *spread* diambil dengan jarum Ose steril. Kemudian diinokulasikan pada media padat secara *streak (zig-zag)* (Hattori *et al.*, 1997). Setelah itu diinkubasi selama ± 24 jam pada temperatur 75 °C

3.2.5 Uji morfologi dan gram bakteri (*Gram's Stain*)

Slide mikroskop disterilkan dengan alkohol kemudian dilewatkan di atas api dan didinginkan pada suhu kamar. Sejumlah kultur bakteri dari media cair

diletakkan di atas *slide* steril kemudian dikeringkan dengan cara melewatkan *slide* di atas api dan mengangin-anginkan *slide* sehingga diperoleh preparat. Kemudian di atas preparat ditambahkan 2-3 tetes larutan kristal ungu dan didiamkan selama 1 menit. Kemudian dicuci dengan air dan diangin-anginkan hingga kering. Kemudian setetes reagen Gram's Iodin ditambahkan, didiamkan selama 1 menit. Setelah itu, *slide* dicuci dengan air dan dikeringkan. Larutan etanol absolut ditambahkan sebanyak dua tetes. Setelah pendiaman selama 2-3 menit, *slide* dibilas dengan air kemudian ditambahkan setetes safranin dan didiamkan selama 30 detik. Pengamatan morfologi dan pewarnaan gram dilakukan di bawah mikroskop dengan perbesaran 400x (Carman, 2001).

3.2.6 Ekstraksi DNA kromosom bakteri

DNA dapat diperoleh dengan melisis sel bakteri kemudian memisahkan DNA dari substansi sel yang lain. Langkah-langkahnya adalah sebagai berikut: Kultur bakteri disentrifus (microsentrifuge) 4000x g di dalam tabung mikro 1,5 mL masing-masing selama 5 menit dengan jumlah total kultur 2 mL, sehingga diperoleh pelet sel. Supernatan dibuang, pelet sel yang diperoleh ditambah dengan 100 μ L bufer lizozim (1mL 10 mM Tris-HCl [pH 8] yang mengandung 20 % sukrosa [v/v], lizozim 2,5 mg/mL). Inkubasi dilakukan pada 37 °C selama 1 jam dengan penggojogan tiap 15 menit. Kemudian 150 μ L bufer lisis (10 mM Tris-HCl [pH 8], 1 mM EDTA, 500 mg proteinase K, 1 % SDS) ditambahkan dan inkubasi dilakukan pada 55 °C. Setelah inkubasi selama 30 menit, sebanyak 200 μ L isoamil alkohol-kloroform (1:24) ditambahkan dan campuran disentrifus selama

5 menit. Supernatan dipindahkan ke dalam tabung mikro yang baru. Kemudian ditambah dengan 200 μL kloroform-isoamil alkohol dan disentrifus selama 5 menit. Larutan bagian atas dipindahkan ke tabung mikro baru dan ditambah dengan 1 mL etanol absolut dan 60 μL natrium asetat 3 M. Kemudian campuran disimpan dalam freezer $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ selama 2 jam. Setelah itu, disentrifus dengan kecepatan 13000 rpm selama 10 menit dan supernatan dibuang. Pelet DNA dicuci dengan 50 μL bufer pencuci (70 % etanol absolut, 30 % 100 mM Tris) dan disentrifus kembali selama 10 menit dengan kecepatan 13000 rpm. Setelah supernatan dibuang, pelet DNA dikeringkan kemudian ditambah dengan 50 μL ddH₂O untuk melarutkan DNA (Klijn *et al.*, 1991).

3.2.7 Amplifikasi *in vitro* fragmen gen 16S rRNA

Amplifikasi fragmen gen 16S rRNA secara *in vitro* dengan metode PCR dilakukan dalam tabung mikro 0,2 mL dengan pereaksi terdiri atas 0,5 μL templat DNA hasil lisis, 68,178 pmol/ μL P₁, 78,361 pmol/ μL P₃, 5 μL bufer PCR 10X (500 mM KCl, 100 mM Tris-Cl (pH 8), 15 mM MgCl₂), 5 U/mL *Taq* DNA polimerase, 40 μM campuran dNTP dan ditambah ddH₂O steril hingga volumenya 50 μL . Amplifikasi dilakukan sebanyak 30 siklus dengan denaturasi DNA pada temperatur 94 $^{\circ}\text{C}$ selama 1 menit, *annealing* pada temperatur 50 $^{\circ}\text{C}$ selama 1 menit dan polimerasi pada temperatur 72 $^{\circ}\text{C}$ selama 1 menit (Klijn *et al.*, 1995).

3.2.8 Elektroforesis fragmen gen 16S rRNA

Menganalisa hasil reaksi amplifikasi pada cetakan 0,8% b/v gel agarosa. Gel agarosa dibuat dengan melarutkan sebanyak 0,275 g agarosa dalam 25 mL

bufer TAE 1X (24,2 g Tris-base, 5,7 mL asam asetat glasial, 10 mL 0,5 M EDTA pH 8). Pemanasan larutan dilakukan hingga semua agarosa larut, kemudian didiamkan pada suhu ruang. Dalam keadaan hangat, kedalam larutan ditambahkan 1 μ L larutan etidium bromida 10 μ g/mL dan dihomogenkan. Kemudian larutan dituangkan pada cetakan yang didalamnya telah diletakkan sisir pembentuk sumur gel. Setelah gel agarosa membeku, sisir dan penyekat diambil. Gel kemudian diletakkan pada alat elektroforesis yang telah berisi larutan bufer TAE 1X (pH 8) sampai permukaan agarosa terendam.

Sebanyak 7 μ L aliquot dari reaksi amplifikasi dicampur dengan 3 μ L *loading buffer* (sukrosa, bromfenol biru, EDTA) kemudian dimasukkan ke dalam sumur gel dan dihubungkan dengan arus listrik DC. Suatu *marker* (DNA λ /HindIII) sebagai pembanding ukuran dan ketebalan DNA sudah termasuk dalam gel. Hasil elektroforesis dilihat dengan penyinaran menggunakan lampu U.V dan difoto dengan Film polaroid (Yeates *et al.*,1998).

3.2.9 Analisis urutan nukleotida fragmen gen 16S rRNA

Analisis urutan nukleotida fragmen gen 16S rRNA dilakukan dengan metode sekuensing Dideoksi Sanger. Ke dalam tabung mikro 0,5 mL dimasukkan 3 μ L templat DNA, 1,2 μ L oligonukleotida primer (2,4 pmol). Kemudian dilakukan penambahan ddH₂O steril hingga volume 10 μ L dan menghomogenkannya. Selanjutnya memasukkan campuran tersebut ke mesin PCR untuk didenaturasi pada suhu 96 °C selama 30 detik. Menghentikan proses sesaat untuk menambahkan 6 μ L campuran yang mengandung *A-dye terminator*, *G-dye*

terminator, *C-dye terminator* dan *T-dye terminator*, dNTP, tris-Cl (pH 9,0), MgCl₂, pirofosfat termostabil dan *Amplitaq DNA Polymerase*. Setelah dihomogenkan dengan ujung pipet, proses PCR dilanjutkan kembali sebanyak 25 siklus. Mengkondisikan setiap siklus PCR dilakukan denaturasi pada suhu 96 °C selama 30 detik, *annealing* pada suhu 48 °C selama 15 detik dan *extension* pada suhu 60 °C (Sambrook dan Russell, 2001).

Sekuensing dianalisis secara otomatis menggunakan *ABI 310 sequencer*, menggunakan *Analysis Software* dan membandingkan hasil (BLAST) yang diperoleh dengan *GenBank* (Paillard *et al.*, 2003)

3.2.10 Identifikasi amilase ekstraseluler

Menginokulasikan secara *streak* sel bakteri atau supernatan kultur pada media padat yang diinduksi dengan pati jagung (*corn starch* 1%). Kemudian diinkubasi pada temperatur 65 °C selama 24 jam. Setelah 24 jam inkubasi, dilakukan penambahan setetes larutan iodin diatas masing-masing koloni bakteri. Keberadaan amilase diketahui jika terbentuk daerah tak berwarna disekitar koloni setelah penambahan iodin (Wang, 2004).

3.2.11 Identifikasi protease ekstraseluler

Menginokulasikan media cair nutrien gelatin (1,5 % gelatin) dengan sel bakteri yang diuji. Media kemudian diinkubasi pada 65 °C selama 24 jam. Kemudian disimpan dalam almari es selama 10 menit. Apabila media tetap cair

maka terjadi hidrolisis gelatin oleh bakteri sedangkan bila media memadat maka tidak terjadi hidrolisis gelatin oleh bakteri (Cowan dan Steels, 1974).

3.2.12 Identifikasi β -galaktosidase

Menginokulasikan bakteri pada media cair penginduksi yaitu laktosa (10% laktosa, 40% bufer pospat pH 8, 50 % media). Media kemudian diinkubasi pada 65 °C selama 24 jam. Setelah induksi, kedalam media tersebut ditambahkan larutan ONPG 0,4 % kemudian diinkubasi selama 4 jam. Perubahan warna yang terjadi diamati. Hasil positif β -galaktosidase akan membentuk warna kuning (Long *et al*, 2001).

