

BAB III

METODE PENELITIAN

Penelitian ini dilakukan di laboratorium Biokimia dan laboratorium Mikrogenetika Universitas Diponegoro serta laboratorium Penelitian Asam Nukleat dan Molekul Genetik Institut Teknologi Bandung. Pada penelitian ini dilakukan isolasi dan identifikasi bakteri termofilik dari sumber air panas Baturaden. Identifikasi bakteri dilakukan dengan uji morfologi, yaitu pewarnaan gram dan uji mikroskopis, identifikasi gen 16S rRNA dan identifikasi enzim ekstraseluler. Sampel yang diperoleh dari sumber air panas Pancuran Pitu, Batu Raden dikultivasi pada media $\frac{1}{2}$ LB (Luria-Bertani). Selanjutnya DNA kromosom bakteri diisolasi dan diamplifikasi secara *in vitro* dengan metode PCR. Setelah itu urutan nukleotida fragmen 16S rRNA ditentukan dengan metode sekuensing dan dibandingkan dengan *database GenBank* untuk mengetahui jenis bakteri sampel.

3.1 Alat dan Bahan

3.1.1 Sampel

Sampel yang digunakan pada percobaan ini adalah air dari sumber air panas Pancuran Pitu, Baturaden, Banyumas, Jawa Tengah.

3.1.2 Alat-alat

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini meliputi neraca analitik (Kern 444-45), labu erlenmeyer (Pyrex), cawan petri (Schott), tabung reaksi (Pyrex), tabung mikro (*microtube*) (Eppendorf), pipet tetes, pipet mikro (Eppendorf), jarum ose, *spreader*, autoklaf (Clinical autoclave Prestige Medical series 2100), lemari pendingin (Sanyo SR-LV239N), inkubator (Mettler model 300), *slide glass*, kaca preparat, lampu spiritus, incase, mikrosentrifus (Eppendorf Centrifuge 5417C), mesin *GeneAmp PCR System 2400* (Perkin Elmer), Mini *subTM DNA Electrophoresis Cell* (biorad), pH meter, *shaker incubator*, lampu UV seri 9814-312 nm (Cole Palmer), mikroskop, spektroskop UV-Vis dan kuvet.

3.1.3 Bahan-bahan

Bahan-bahan yang dibutuhkan pada penelitian ini antara lain *bacto tryptone* (Conda), ekstrak *yeast* (Conda), natrium klorida (Merck), dan *bacto agar* (Conda) untuk pembuatan media.

Pada pewarnaan gram dibutuhkan kristal ungu, iodin, etanol absolut, safranin, dan minyak imersi.

Untuk isolasi DNA bakteri digunakan *Sodium dodecylsulphate* (SDS), proteinase-K (100 mM tris-Cl pH 8, 50 mM EDTA pH 8, dan 500 mM NaCl) (USB corporation, Cleveland, Ohio, USA), etilendiamintetraasetat (EDTA) (J.T. Baker), buffer lisozim (100 mg/mL lisozim dan 10 mM tris-Cl pH 8), etanol absolut, natrium asetat, kloroform, isoamil alkohol, primer, kalium klorida,

Identifikasi enzim β -galaktosidase memerlukan K_2HPO_4 , HCl, ONPG (Merck), *bacto tryptone* (Conda), ekstrak *yeast* (Conda), natrium klorida (Merck).

3.2 Cara Kerja

3.2.1 Penyiapan Sampel

Sampel diambil dari sumber air panas Pancuran Pitu, Baturaden, Banyumas, Jawa Tengah. Sebanyak 1-5 mL sampel ditambahkan ke dalam 100 mL media cair yang telah dipersiapkan. Setelah itu sampel diinkubasi pada suhu 65 °C selama 24-48 jam.

3.2.2 Inokulasi Bakteri

Inokulasi bakteri pada media cair dilakukan dengan cara menambahkan 1 mL inokulum ke dalam media cair. Inokulasi bakteri ke media padat dilakukan dengan metode *spread* dan *streak*. Pada metode *spread*, sebanyak satu tetes bakteri dari kultur cair dituangkan ke media padat, kemudian diratakan dengan menggunakan spreader, sedangkan dengan metode *streak* dengan menggunakan jarum ose yang telah berisi biakan selanjutnya digoreskan pada permukaan agar (Souza dan Martien, 2001). Kultur di inkubasi pada 65 °C selama 24- 48 jam.

3.2.3 Pewarnaan Gram

Pewarnaan gram dilakukan dengan menambahkan pewarna gram secara bertahap. Kaca preparat yang akan digunakan dibersihkan dengan alkohol

kemudian dipanaskan di dekat nyala api. Selanjutnya isolat bakteri diambil dengan menggunakan jarum ose dan diratakan pada kaca preparat, kemudian dipanaskan di dekat api sambil digoyang-goyangkan hingga isolat kering. Pada saat pemanasan diusahakan agar tidak terkena api langsung. Setelah itu isolat bakteri ditetesi dengan kristal ungu, didiamkan selama 1 menit, dicuci dengan akuades dan dikeringkan dengan cara diangin-anginkan. Hasil pewarnaan kristal ungu ditetesi dengan iodin, didiamkan selama 1 menit, dicuci dengan akuades dan dikeringkan. Hasil pewarnaan iodin ditetesi dengan *decolorize agent* (etanol absolut), didiamkan selama 30 detik, dicuci dengan akuades dan dikeringkan. Langkah yang terakhir, hasil yang diperoleh dari pewarnaan dengan *decolorize agent* ditetesi dengan safranin, kemudian dicuci dengan akuades. Setelah itu dikeringkan dan hasilnya diamati dengan mikroskop (McClelland, 2001).

3.2.4 Isolasi DNA Kromosom dari Bakteri Termofil

Koloni tunggal bakteri yang memiliki sifat unik berdasarkan uji mikrobiologi konvensional diisolasi dan dibiakkan kembali ke medium cair. DNA dapat diperoleh dengan melisis sel bakteri kemudian memisahkan DNA dari bagian sel lainnya. Tahap isolasinya adalah sebagai berikut: sebanyak 2 mL kultur bakteri dimasukkan ke dalam *microtube* 1,5 mL (2 kali penambahan, tiap penambahan 1 mL) kemudian disentrifus dengan kecepatan 4000xg selama 5 menit untuk memperoleh pelet sel. Supernatan dibuang dan pelet sel yang diperoleh ditambahkan dengan 200 μ L bufer lizozim. Inkubasi pada 37 °C selama 1 jam. Selanjutnya ditambah dengan 200 μ L bufer lisis dan diinkubasi pada 55 °C

selama 30 menit. Setelah 30 menit, kemudian ditambahkan dengan 200 μL isoamil alkohol-kloroform (1:24) dan disentrifus selama 5 menit. Supernatan yang dihasilkan dipindahkan ke *microtube* yang baru dan ditambah dengan 200 μL kloroform-isoamil alkohol kemudian disentrifus selama 5 menit. Larutan bagian atas diambil dan dipindahkan ke *microtube* baru selanjutnya di campur dengan 805 μL etanol absolut dan 45 μL natrium asetat 3 M. Kemudian disimpan dalam freezer dengan temperatur $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ selama semalam, lalu disentrifus dengan kecepatan 16000xg selama 10 menit. Supernatannya dibuang, selanjutnya pada pelet DNA dicuci dalam 50 μL bufer pencuci kemudian disentrifus kembali selama 10 menit dengan kecepatan 16000xg. Kemudian buang supernatan, pelet DNA yang dihasilkan di keringkan kemudian ditambahkan 50 μL ddH₂O untuk melarutkan DNA dan diinkubasi dalam es selama 1 jam (Kljin *et al.*, 1991).

3.2.5 Identifikasi DNA Kromosom

3.2.5.1. Identifikasi DNA Kromosom dengan Elektroforesis

DNA hasil isolasi selanjutnya di analisis dengan elektroforesis gel agarosa untuk mengetahui bahwa hasil yang diperoleh merupakan DNA. Elektroforesis dilakukan dengan metode elektroforesis horizontal menggunakan 1% gel agarosa. Gel padat dimasukkan ke alat elektroforesis dan ditambah bufer TAE. Kemudian campuran 2,5 μL *loading buffer* ditambah 6 μL ddH₂O dan ditambah 2 μL sampel dimasukkan ke dalam *well*. Elektroforesis dilakukan selama 60 menit dengan arus 400 mA dan tegangan 60 V. Setelah itu hasil elektroforesis dilihat pada sinar UV.

Adanya DNA akan ditunjukkan dengan munculnya pita-pita yang terpisah sesuai dengan ukuran DNA tersebut (Sambrook dan Russel, 2001).

3.2.5.2. Amplifikasi *In Vitro* Fragmen 16S rRNA dengan Metode PCR

DNA yang diperoleh selanjutnya diamplifikasi secara *in vitro* dengan metode PCR. Pada masing-masing sampel ditambah *master mix* yang berisi Taq Polimerase 25 u, 2,5 μL bufer, 1 μL primer 1, 1 μL primer 2, 1 μL dNTP (10 mM dATP, 10 mM dTTP, 10 mM dCTP dan 10 mM dGTP), 2,5 μL MgCl_2 , 7,5 μL DNA templat dan ddH₂O sebagai pelarut. Sampel dimasukkan ke dalam tabung PCR dan diberi mineral oil (Alam *et al.*, 2002). Setelah itu tiap sampel dimasukkan ke alat PCR (Innis *et al.*, 1990).

PCR dilakukan dengan 3 tahap, yang pertama yaitu tahap denaturasi. Tahap ini dilakukan pada suhu 95 °C selama 1 menit. Tahap kedua, *annealing*, dilakukan pada suhu 50 °C selama 1 menit. Tahap terakhir, yaitu tahap polimerisasi dilakukan pada suhu 72 °C selama 1 menit. Proses PCR dilakukan sebanyak 30 siklus (Curi *et al.*, 2002).

3.2.6 Analisis Urutan Nukleotida dengan Sekuensing

DNA hasil PCR ditentukan urutan nukleotidanya dengan sekuensing. Ke dalam *microtube* 0,5 mL dimasukkan DNA templat ($\approx 1 \mu\text{g}/\mu\text{L}$) sebanyak 1 μL , primer oligonukleotida ($\approx 1 \text{ ng}/\mu\text{L}$) sebanyak 3 μL , kemudian ditambah H₂O sampai volumenya 10 μL . Larutan diinkubasi pada suhu 65 °C selama 2 menit, kemudian *microtube* didinginkan selama 3-5 menit.

Setelah itu ditambahkan 2,5 μL dari masing-masing ddNTP (Sambrook dan Russel, 2001) (0,5 mM ddTTP; 0,5 mM ddGTP; 0,5 mM ddATP dan 0,25 mM ddCTP) (Sanger *et al*, 1977) ke dalam *microtube* 0,5 mL. Larutkan AmpliTaq DNA polimerase dalam buffer sekuensing 1x sampai konsentrasinya menjadi 0,5-1 $\text{u}/\mu\text{L}$. Sebanyak 1 μL enzim tersebut ditambahkan ke dalam *microtube*.

Microtube dimasukkan ke dalam *thermocycler* (Sambrook dan Russel, 2001). Sekuensing dilakukan sebanyak 30 siklus dengan tahap denaturasi pada suhu 95 °C selama 1 menit, *annealing* pada suhu 50 °C selama 1 menit dan *extension* pada suhu 72 °C selama 1 menit untuk setiap siklus (Nascimento dan Rossi, 2001). Reaksi dihentikan dengan menambahkan 5 μL formadida *loading buffer* ke setiap siklus reaksi sekuensing (Sambrook dan Russel, 2001).

Analisis data urutan nukleotida dilakukan dengan menggunakan ABI Prism 377 DNA sequencers (Applied Biosystem). Urutan nukleotida yang diperoleh dibandingkan dengan data pada *GeneBank* untuk mengetahui jenis bakteri termofilik yang diisolasi tersebut (Henne *et al*, 2004).

3.2.7 Identifikasi Enzim Protease Ekstraselular

Uji protease dapat dilakukan dengan menghidrolisis gelatin. Bakteri yang diuji diinokulasikan kedalam media yang ditambah dengan gelatin kemudian disimpan dalam lemari es selama 10 menit. Apabila gelatin tetap cair menunjukkan adanya hidrolisis gelatin oleh bakteri sedangkan bila gelatin memadat maka tidak terjadi hidrolisis protein oleh bakteri (Agullo, 1955).

3.2.8 Identifikasi Enzim Amilase Ekstraseluler

Identifikasi enzim amilase dilakukan dengan menggunakan pati jagung sebagai substrat. Bakteri yang akan diuji diinokulasikan ke media agar yang mengandung (gram per liter): 2 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 0,5 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,01 g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,7 g K_2HPO_4 ; 0,3 g KH_2PO_4 ; 10 g pati jagung; dan 17 g agar. Setelah itu kultur diinkubasi pada temperatur 65 °C selama 24 jam. Kemudian plate ditetesi larutan iodin. Adanya daerah tak berwarna di sekitar koloni menunjukkan aktivitas enzim amilase (Shaw *et.al.*, 1995).

3.2.9 Identifikasi enzim β -galaktosidase Ekstraseluler

Identifikasi enzim β -Galaktosidase dilakukan dalam media yang telah diberi laktosa sebagai induser. Kultur diinkubasi selama 12-18 jam. Setelah itu ONPG ditambahkan pada kultur tersebut, kemudian sampel diinkubasi selama 5 jam. Aktivitas enzim β -Galaktosidase ditunjukkan dengan timbulnya warna kuning pada kultur (Pestova dan Morrison, 1998).