

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1. Bahan-bahan

3.1.1. Sampel

Air yang diperoleh dari sumber air panas Kawah Sikidang Dieng, Jawa Tengah.

3.1.2. Bahan-bahan yang dibutuhkan

Bahan-bahan yang diperlukan untuk penyiapan media pertumbuhan adalah *bacto* tripton (Conda), ekstrak ragi (Conda), *bacto* pepton (Conda) dan *trace element* yang terdiri atas $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, KH_2PO_4 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{NaB}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, dan CoSO_4 yang diperoleh dari Merck. Untuk pewarnaan gram dan uji mikroskopis memerlukan larutan Gram A (kristal ungu), B (iodin), C (etanol absolut), dan D (safranin). Identifikasi enzim ekstraseluler amilase memerlukan amilum terlarut (Merck), protease memerlukan gelatin dan ONPG (MD Bio) untuk enzim beta galaktosidase.

Isolasi dan pemurnian DNA memerlukan Tris-HCl, *Sodium dodecylsulphate* (SDS), proteinase-K (USB Corporation), EDTA (Gibco BRL), Natrium asetat, isoamil alkohol, kloroform, etanol absolut (Merck), dan aquabides (ddH_2O). Pada proses elektroforesis diperlukan gel agarosa, etidium bromida, bufer TAE (40 mM Tris-asetat dan 1 mM EDTA), dan *loading buffer* (6 mM EDTA, sukrosa 50 %, brom fenol biru, dan TAE 1X) (Pharmacia), marker DNA

(DNA λ /HindIII) untuk elektroforesis hasil ekstraksi DNA dan marker pUC/Hinfl untuk amplikon.

Amplifikasi secara *in vitro* dengan metode PCR memerlukan primer P1 (5'-ATGGCTGTCGTCAGCT-3') dan P3 (5'-ACGGGCGGTGTGTAC-3'), *deoxynucleosidetriphosphate* (dNTP) (Nucleic Plus TM), enzim *Taq* DNA polimerase (Amersham Pharmacia Biotech) dan bufer PCR (Tris-HCl pH 9, Magnesium klorida, dan Kalium klorida (MD Bio)). Selanjutnya untuk SSCP diperlukan akrilamida dan bis-akrilamida, tetrametiletilendiamin (TEMED), amonium persulfat (APS), formamida, bufer TAE (Tris HCl, Na-asetat, EDTA, asam asetat glasial) serta *silver staining* (Merck: asam asetat, formaldehid, larutan Perak nitrat, Natrium karbonat, Natrium tiosulfat dan gliserol). *A-dye terminator*, *G-dye terminator*, *T-dye terminator*, dan *C-dye terminator* (Amersham Pharmacia Biotech) diperlukan untuk sekuensing.

3.2. Alat-alat

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini meliputi labu erlenmeyer, tabung reaksi (Pyrex), tabung mikro volume 0,2 mL dan 1,5 mL (Eppendorf), *filter holder* (Duran), membran filter 0,2 μ m (Sartorius), membran filter 0,22 μ m (Millex[®]-GP), *Syringe* (Stera), pipet tetes, pipet mikro ukuran 10, 200, 1000 μ L (Eppendorf), jarum ose, neraca analitik (Kern 444-45), autoklaf (Clinical autoclave Prestige Medical series 2100), lemari pendingin (Sanyo SR-LV239N), inkubator (Memmert model 300), kaca preparat, lampu spiritus, *incase*, mikrosentrifus (Eppendorf Centrifuge 5417C), mesin *GeneAmp PCR System 2400*

(Perkin Elmer), Mini *sub*TM DNA Electrophoresis Cell (Biorad), pH meter (HACHEC 20), lampu UV seri 9814-312 nm (Cole Palmer), mikroskop (Nikon), kamera (Fuji), perlengkapan mini gel Protean (Biorad, Hercules, CA) dan perlengkapan D-Gene (Biorad, Hercules, CA).

3.3. Proses Kerja

3.3.1. Penyiapan Sampel

Sampel yang diperoleh dari sumber air panas Sikidang, Dieng, Jawa Tengah (dengan kode D3, lampiran A) difiltasi dengan membran berdiameter 47 mm dengan pori 0,2 μm . Residu yang terjebak dalam filter dilarutkan dalam 10 ml akuades steril.

3.3.2. Penyiapan Media Pertumbuhan

A. Media Sulfolobus

Media yang digunakan adalah media Sulfolobus, dengan komposisi per liter sebagai berikut 1,3 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 1,0 g ekstrak ragi; 0,28 g KH_2PO_4 ; 0,25 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,007 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 0,02 g $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; 4,5 mg $\text{NaB}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$; 1,8 mg $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$; 0,22 mg $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,05 mg $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 0,03 mg $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ dan 0,01 mg CoSO_4 . Semua bahan ditambah dengan akuades hingga volume 1 liter, dan dikondisikan pada pH 3 dengan 10 N H_2SO_4 . Media disterilisasi dengan menggunakan mikrofilter 0,22 μm (Atlas, 1993).

B. Media minimal pepton-ekstrak ragi

Media ini tersusun atas *bacto* pepton (0,1%) dan *bacto* ekstrak ragi (0,1%) yang dilarutkan dalam air sumber. Media disterilisasi dengan mikrofilter 0,22 μm .

3.3.3. Inokulasi Bakteri

Inokulasi bakteri dilakukan pada media A dan B yang sudah dipersiapkan sebelumnya dan inkubasi pada temperatur 75 °C selama 20-24 jam .

3.3.4. Penentuan Temperatur Optimum Pertumbuhan Bakteri

Bakteri sampel yang telah diinokulasikan ke dalam media pertumbuhan diinkubasi selama 20-24 jam dengan rentang variasi temperatur 45-85 °C. Selanjutnya masing-masing kultur ditentukan absorbansinya dengan spektrofotometer UV pada panjang gelombang 520 nm.

3.3.5. Pewarnaan Gram dan pengamatan secara mikroskopis

Uji morfologi pada penelitian ini mencakup pewarnaan gram dan mikroskopis. Pewarnaan gram dilakukan dengan menambahkan pewarna gram secara bertahap. Kaca preparat yang akan digunakan dibersihkan terlebih dahulu dengan alkohol kemudian ditetesi isolat kultur bakteri dengan menggunakan jarum ose, kemudian dipanaskan di dekat api sambil digoyang-goyangkan hingga isolat kering. Pada saat pemanasan diusahakan agar tidak terkena api langsung. Selanjutnya isolat bakteri ditetesi dengan Gram A, didiamkan selama satu menit, dicuci dengan akuades dan dikering anginkan. Hasil pewarnaan kristal ungu ditetesi dengan Gram B, didiamkan selama satu menit, dicuci dengan akuades dan dikeringkan. Hasil pewarnaan Gram B ditetesi dengan Gram C, didiamkan selama 30 detik, dicuci dengan akuades dan dikeringkan. Langkah yang terakhir, hasil yang diperoleh dari pewarnaan sebelumnya ditetesi dengan Gram D kemudian dicuci dengan akuades selanjutnya dikeringkan dan hasilnya diamati di bawah mikroskop dengan perbesaran 1000X (McClelland, 2001).

3.3.6. Identifikasi enzim ekstraseluler

3.3.6.1. Protease

Bakteri sampel dikulturkan pada media pertumbuhannya yang telah ditambahkan dengan 1,5 % gelatin, selanjutnya diinkubasi pada temperatur optimumnya selama 24 jam. Sebagai kontrol positif digunakan media yang telah ditambahkan dengan ekstrak nanas dan kontrol negatif berupa media tanpa kultur. Selanjutnya, tabung dimasukkan dalam lemari pendingin selama 2 jam, hasil uji positif bila media tetap cair (Seely dan van Demark, 1971).

3.3.6.2. Amilase

Bakteri sampel dikulturkan pada media pertumbuhannya yang telah ditambahkan dengan 0,5 % *soluble starch* (Ajayi *et al.*,2003). Pengujian enzim dilakukan dengan penambahan iodin, jika tidak terbentuk warna ungu menunjukkan hasil uji positif (Shaw, *et al.*, 1995). Untuk mengetahui adanya amilase, sebagai kontrol positif digunakan ekstrak ubi jalar yang ditambahkan pada media dan diinkubasi selama 1-2 jam.

3.3.6.3. Beta galaktosidase

Bakteri sampel dikulturkan pada media pertumbuhannya yang telah ditambahkan dengan 1% laktosa selanjutnya diinkubasi pada temperatur optimumnya selama 24 jam. Pengujian enzim dilakukan dengan menambahkan larutan ONPG ke dalam kultur dengan perbandingan 1: 5. Hasil uji positif jika terdapat perubahan warna menjadi kuning (Pestova dan Morisson, 1998). Sebagai kontrol positif digunakan bakteri *Escherichia coli* yang ditumbuhkan pada media

cair (tripton 0,5%, ekstrak ragi 0,25% dan NaCl 0,5%) yang telah diinduksi dengan laktosa.

3.3.7. Isolasi dan Pemurnian DNA

DNA dapat diperoleh dengan melisis sel bakteri, kemudian memisahkan DNA dari *debrisnya*. Tahap isolasinya adalah sebagai berikut: sebanyak 1,5 mL kultur bakteri dimasukkan ke dalam *microtube* 1,5 mL (Eppendorf) kemudian disentrifus dengan kecepatan 4000 x g selama 5 menit untuk memperoleh pelet sel. Supernatan dibuang dan pelet sel yang diperoleh ditambahkan dengan 300 μ L bufer ekstraksi (100 mM Tris HCl pH 8, 100 mM EDTA pH 8, 100 mM KH_2PO_4 dan 1,5 M NaCl) dan 0,5 μ L proteinase K (20 mg/ml), dikocok selama 15 menit dan ditambahkan dengan 30 μ L SDS 20% lalu diinkubasi pada 65 °C selama 2 jam (Stach, *et al.*,2001). Selanjutnya ditambahkan dengan kloroform-isoamil alkohol (24:1) dan disentrifus selama 5 menit, supernatan yang dihasilkan dipindahkan ke *microtube* baru, langkah tersebut diulang sebanyak tiga kali. Larutan bagian atas diambil dan dipindahkan ke *microtube* baru selanjutnya di campur dengan 805 μ L etanol absolut dan 45 μ L Natrium asetat 3 M. Kemudian disimpan dalam *freezer* -70 °C selama 2 jam, lalu disentrifus dengan kecepatan 13000 rpm selama 10 menit. Supernatannya dibuang, selanjutnya pada pelet DNA yang diperoleh dikeringkan (*over night*) kemudian ditambahkan 50 μ L ddH₂O untuk melarutkan DNA (Klijn *et al.*,1991). Untuk memastikan bahwa DNA kromosom yang diperoleh masih utuh maka dianalisis dengan elektroforesis gel agarosa dengan marker DNA λ HindIII.

3.3.8. Amplifikasi secara *invitro* fragmen gen 16S rRNA dengan PCR

Molekul DNA yang diperoleh selanjutnya diamplifikasi secara *in vitro* dengan metode PCR. Reaksi PCR dilakukan dalam tabung 0,2 mL dengan pereaksi yang terdiri atas 5 μ L templat DNA hasil lisis, primer P1 (5'-ATGGCTGTCGTCAGCT-3') dan P3 (5'-ACGGGCGGTGTGTAC-3') masing-masing 0,8 μ L, 5 μ L bufer PCR 10X (500 mM KCl, 15 mM MgCl₂, dan 100 mM Tris-HCl pH 9 pada suhu ruang), 0,1 μ L campuran dNTP, 0,5 μ L enzim *Taq* DNA polimerase, 3 μ L MgCl₂, dan ditambah dengan ddH₂O steril hingga volume 50 μ L (Sambrook dan Russel, 2001).

Proses PCR menggunakan mesin *GeneAmp PCR System 2400* (Perkin Elmer) sebanyak 30 siklus dengan tahapan sebagai berikut: denaturasi awal pada 94 °C (3 menit), kemudian siklus PCR masing-masing siklus terdiri atas tiga tahap yaitu tahap denaturasi pada 94 °C (1 menit), *annealing* 43 °C (1 menit), dan ekstensi pada 72 °C (1 menit). Pada akhir siklus proses ekstensi dilakukan pada 72 °C selama 10 menit.

3.3.9. Analisis dengan Elektroforesis Gel Agarosa

Elektroforesis dilakukan terhadap DNA hasil ekstraksi dan amplicon fragmen gen 16S rRNA. Marker DNA λ /*Hind*III digunakan dalam analisis hasil ekstraksi DNA, sedangkan untuk analisis amplicon digunakan marker pUC/*Hinf*I. Analisis dilakukan gel agarosa 1 % (b/v). Pembuatan gel agarosa dilakukan dengan melarutkan 0,3 g agarosa dalam 30 mL bufer TAE 1X. Larutan tersebut dipanaskan hingga semua agar larut, kemudian didiamkan pada suhu ruang. Ketika larutan hangat, ditambahkan 2 μ L larutan Ethidium bromida (10

$\mu\text{g/mL}$), kemudian dihomogenkan. Selanjutnya larutan dituangkan pada cetakan yang didalamnya telah diletakkan sisir sebagai pembentuk sumur gel.

Setelah gel agarosa membeku, sisir dan penyekat pada ujung cetakan diambil selanjutnya cetakan berisi agarosa diletakkan pada alat elektroforesis *Mini subTM DNA Electrophoresis* yang telah berisi larutan bufer TAE 1X sampai permukaan agarosa terendam. Elektroforesis diawali dengan memasukkan 10 μL hasil ekstraksi/ hasil PCR yang telah dicampurkan dengan *loading buffer* masing-masing ke dalam sumur gel dan dihubungkan dengan arus listrik. Sebagai pembanding ukuran dan ketebalan DNA digunakan marker yang konsentrasinya tertentu (Sambrook dan Russel, 2001).

3.3.9. SSCP

Produk PCR (amplikon) selanjutnya dianalisis dengan SSCP untuk memisahkan spesies spesifik bakteri. Amplikon sebanyak 1,25 μL dicampur dengan 2 μL bufer denaturasi 1X (0,1 M NaCl, 20 mM EDTA), selanjutnya diinkubasi pada 95 °C selama 3 menit kemudian diletakkan dalam es. Sebanyak 3 μL *loading buffer* (95 % formamida dan 0,25% xylene cyanol, 0,25% brom fenol biru) (Stach *et al.*, 2001).

Sampel dielektroforesis pada gel poliakrilamida (37,5 akrilamida:1 bis-akrilamida) 10 %. Gel dibuat dengan menambahkan 3,75 mL PAA 40 % dan 0,3 mL bufer TAE 50X dan 11,7 mL akuades. Sebagai katalis ditambahkan 150 μL APS dan 16 μL TEMED. Elektroforesis dilakukan dengan perlengkapan mini gel Protean (Biorad, Hercules, CA) pada tegangan 150 V selama 4 jam. Bufer elektroforesis (0,5X TAE) dijaga tetap pada temperatur 4 °C. Selanjutnya gel

diwarnai dengan *silver staining* menurut prosedur yang telah dikemukakan oleh Bassam *et al* (Stach *et al.*, 2001).

Tahap-tahap pada *silver staining* adalah sebagai berikut: 1). Fiksasi, gel difiksasi dengan 10 % asam asetat selama 2 X 10 menit. 2). Gel dicuci dengan akuabides dengan waktu 3 X 2 menit. 3). Pewarnaan, gel selanjutnya di rendam dalam larutan *staining* (0,5 mL Perak nitrat 20%, 150 mL formaldehid 37 % kemudian ditambahkan 100 mL akuabides) selama 1 X 30 menit. 4). Pencucian dengan akuabides selama 1 X 10 detik. 5). *Developing*, dengan merendam gel pada larutan *developing* (3 % larutan Natrium karbonat, 150 μ L formaldehid; 20 μ L Natrium tiosulfat (10 mg/ mL), kemudian ditambah dengan akuabides 100 mL). Perendaman dilakukan pada temperatur 4 °C selama 2-5 menit. 6). Fiksasi, gel difiksasi dengan 10 % asam asetat (tahap 1) dengan waktu 1 X 5 menit. 7). Pencucian, gel selanjutnya dicuci dengan akuabides selama 2 X 5 menit. 8). Pada tahap akhir, gel direndam dengan 1 % gliserol dalam air selama 1 X 5 menit (Bassam *et al.*, 1991).

3.3.10. Sekuensing

Gen 16S rRNA yang telah teramplifikasi selanjutnya ditentukan urutan nukleotidanya dengan metode sekuensing. Teknik sekuensing yang akan dilakukan dengan *direct sequencing* dengan metode Dideoksi Sanger.

Sebanyak 3 μ L templat DNA (gen 16S rRNA) hasil amplifikasi ditambahkan 1,2 μ L primer P1 (2,4 pmol). Selanjutnya ditambahkan ddH₂O steril hingga volume menjadi 9 μ L. Larutan dihomogenkan dan dimasukkan ke mesin PCR untuk didenaturasi pada 96 °C selama 30 detik. Reaksi dihentikan sesaat

untuk dilakukan penambahan 6 μL campuran reaksi yang mengandung *T-dye terminator*, *G-dye terminator*, *A-dye terminator*, *C-dye terminator*, dNTP, Tris-HCl (pH 9,0), MgCl_2 , pirofosfat termotabil dan *Amplitaq DNA Polymerase*. Semua pereaksi dihomogenkan, lalu proses PCR dilanjutkan sebanyak 25 siklus. Kondisi PCR untuk tiap siklus terdiri atas denaturasi pada suhu 96 °C selama 30 detik, *annealing* pada 48 °C selama 15 detik dan ekstensi pada 60 °C selama 4 menit.

Selanjutnya dilakukan elektroforesis pada gel poliakrilamida (40 mL poliakrilamida 6%, 200 μL APS, dan 23 μL TEMED). Sebelum digunakan, sumur gel poliakrilamida dicuci dengan bufer TAE 1X. Selanjutnya 4 μL sampel DNA dimasukkan dalam tiap sumur. Elektroforesis dilakukan pada arus 32 A dan tegangan listrik 1300-1400V selama 14 jam (Sambrook dan Russel, 2001).

3.3.11. Analisis Hasil Sequencing

Hasil sekuensing dapat dianalisis melalui pembacaan data elektroforegram yang menunjukkan tiap-tiap basa memiliki warna yang berbeda. Analisis hasil dilakukan dengan membandingkan urutan nukleotida dengan data elektroforegramnya.

3.3.12. Parameter yang diamati

Parameter yang diamati pada penelitian ini adalah hasil uji mikrobiologi dan urutan nukleotida hasil sekuensing gen 16S rRNA kemudian membandingkan urutannya dengan data yang representatif dari *GenBank*.