

### **BAB III. METODE PENELITIAN**

#### **A. Tempat dan Waktu Penelitian**

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Jurusan Biologi FMIPA Universitas Lampung dari bulan Januari sampai dengan April 2014.

#### **B. Alat dan Bahan**

##### **1. Alat**

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah laminar *air flow cabinet*, *autoclave*, neraca analitik, inkubator, oven, jarum ose, erlenmeyer, kompor listrik, *vortex mixer*, *micropipette*, pipet tips, spektrofotometer, cawan petri, kapas, tabung reaksi, *aluminium foil*, batang pengaduk, botol, bunsen, *water bath shaker*, gelas ukur, pinset dan mikroskop.

##### **2. Bahan**

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah 5 isolat bakteri selulolitik koleksi Sutrisna, Liman dan Ekowati (2012), MRS Agar (*De Man Rogosa and Sharpe Agar*), MRS Broth (*De Man Rogosa and Sharpe Broth*), Agar Bacteriological, Nutrien Agar, gelatin, CMC (*Carboxy Methyl Cellulose*), aquades, garam fisiologis, laktosa, sukrosa, galaktosa, glukosa, buffer sitrat pH 6, DNS (*3,5-dinitrosaliclic acid*),

indikator *congo red* 0,1%, indikator *phenol red*, alkohol 70% dan spirtus.

### C. Metode Penelitian

Pada penelitian ini digunakan 5 isolat bakteri dari usus itik koleksi Sutrisna, Liman dan Ekowati (2012) yang telah diremajakan. Koloni bakteri diberi kode huruf dan angka. Huruf O dan K menunjukkan asal bakteri dari usus itik yang diberi perlakuan bahan pakan dalam ransum berupa onggok (O) dan kakao (K). Huruf i dan c menunjukkan asal bakteri dari usus itik yang diambil dari bagian *ileum* (i) dan *colon* (c), sedangkan angka untuk membedakan antara bakteri satu dengan bakteri yang lainnya. Isolat bakteri di uji indeks selulolitik secara kualitatif berdasarkan zona jernih yang terbentuk dengan metode titik. Hasil dari uji indeks selulolitik dilakukan analisis ragam dan dilanjutkan dengan uji BNT (Beda Nyata Terkecil) dengan taraf 5% untuk menentukan isolat bakteri yang memiliki aktivitas enzim selulase terbaik. Tiga isolat bakteri yang memiliki indeks selulolitik tertinggi di uji aktivitas enzimnya. Uji aktivitas enzim selulolitik isolat bakteri disusun dengan Rancangan Acak Kelompok Lengkap (RAKL) dengan 3 ulangan sebagai kelompok. Untuk menentukan perbedaan aktifitas enzim selulase, dilakukan dengan Rancangan Perlakuan Faktorial 3 x 4, yaitu jenis isolat bakteri (Oc14, Oc15 dan Oi30) dan suhu inkubasi (suhu 35°C, 40°C, 45°C dan 50°C). Aktivitas selulase ditentukan berdasarkan kadar glukosa yang terbentuk dengan CMC (*Carboxy Methyl Cellulose*) sebagai substrat. Kadar glukosa diukur berdasarkan metode DNS (Miller, 1995),

absorbansinya dibaca dengan menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 540 nm (Hafnirsa, 2007).

#### **D. Analisis Data**

Data aktivitas enzim selulase yang diperoleh diolah menggunakan Analisis Ragam (Anara) dan dilanjutkan dengan menggunakan BNT (Beda Nyata Terkecil) dan Polinomial Ortogonal.

#### **E. Cara Kerja**

##### **1. Peremajaan**

Isolat (Oi27, Oi30, Ki2, Oc14, Oc15) bakteri dari usus itik koleksi Sutrisna, Liman dan Ekowati (2012), diremajakan pada tabung reaksi yang berisi media MRS *Agar* padat miring, kemudian di inkubasi selama 48 jam di dalam *anaerobic jar* pada suhu kamar.

##### **2. Karakterisasi Bakteri Selulolitik Secara Mikroskopik**

Karakterisasi mikroskopik yang diamati meliputi bentuk sel, sifat bakteri Gram dan ada tidaknya spora (Salle, 1974).

##### **3. Uji Katalase**

Uji katalase, masing-masing isolat bakteri umur 48 jam di ambil satu ose dan diletakkan di atas *object glass* yang telah diberi dua ose akuades, kemudian diratakan, ditetesi H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3%. Adanya gelembung gas

menandakan bahwa bakteri bersifat katalase positif (Hastowo dan Lay, 1994).

#### **4. Uji Motilitas**

Uji motilitas, masing-masing isolat bakteri umur 48 jam di ambil satu ose dan di tusukkan secara lurus atau vertikal pada media NA (*Nutrien Agar*) padat yang telah disiapkan pada tabung reaksi, kemudian diinkubasi pada suhu kamar selama 48 jam dalam *anaerobic jar*. Dikatakan motil jika pertumbuhan koloni bakteri menyebar, sedangkan nonmotil jika pertumbuhan koloni bakteri tidak menyebar.

#### **5. Uji Gelatin**

Uji gelatin, masing-masing isolat bakteri umur 48 jam di ambil satu ose dan diinokulasikan pada medium nutrien gelatin yang telah disiapkan pada tabung reaksi, kemudian diinkubasi pada suhu kamar selama 48 jam dalam *anaerobic jar*. Kemudian kultur diletakkan pada pendingin dengan suhu 4°C selama 30 menit. Indikator pengamatan reaksi positif jika medium gelatin tetap menjadi cair, dan negatif jika medium gelatin menjadi padat (Lay, 1994).

#### **6 Uji Fermentasi Gula**

Uji fermentasi gula, masing-masing isolat bakteri umur 48 jam di ambil satu ose dan diinokulasikan pada media uji (glukosa, galaktosa, laktosa dan sukrosa) yang telah diberi indikator *phenol red*, kemudian

diinkubasi pada suhu kamar selama 48 jam dalam *anaerobic jar*. Setelah waktu inkubasi selesai, diamati perubahan warna pada media dan terbentuknya gelembung udara pada tabung durham. Perubahan warna media menjadi kuning menunjukkan adanya fermentasi sedangkan terbentuknya gelembung udara pada tabung Durham menunjukkan bahwa bakteri menghasilkan gas pada proses metabolismenya.

## **7. Uji Selulolitik Kualitatif**

Uji selulolitik kualitatif, masing-masing isolat bakteri umur 48 jam di ambil satu ose dan diinokulasikan pada media MRS *Agar* + CMC 1%. Kemudian isolat bakteri dititikkan pada permukaan media, lalu diinkubasi selama 48 jam pada suhu kamar. Koloni yang telah tumbuh kemudian ditetesi dengan indikator *congo red* 0,1 %, didiamkan selama 10 menit, kemudian dibilas dengan NaCl 1%. Zona bening yang terbentuk di sekitar bakteri mengindikasikan adanya aktivitas enzim selulase. Kemudian indeks selulolitik dapat diukur dengan cara membandingkan antara diameter zona bening dengan diameter koloni yang terbentuk (Nurkanto, 2007).

## **8. Pembuatan Suspensi Isolat Bakteri**

Isolat bakteri selulolitik yang sudah diremajakan pada media MRS *Agar* miring diambil 3 ose dan diinokulasikan ke dalam erlenmeyer 250 ml

yang berisi 50 ml media MRS *Broth* + CMC 1%, kemudian diinkubasi selama 48 jam di dalam *anaerobic jar* pada suhu kamar.

### **9. Produksi Enzim Selulase**

Stater bakteri selulolitik diinokulasikan sebanyak 10% ke dalam 50 ml media MRS *Broth* + CMC 1%. Lalu diinkubasi pada *anaerobic jar* selama 48 jam pada suhu kamar (Martien, 2000).

### **10. Penyiapan Enzim Selulase Kasar**

Kultur bakteri yang telah tumbuh selama 48 jam tersebut dikocok dengan *water bath shaker* yang didinginkan dengan es (suhu  $\pm 10^{\circ}\text{C}$ ) pada kecepatan 120 rpm selama 2 jam. Setelah itu disentrifugasi dengan kecepatan 4000 rpm selama 10 menit, selanjutnya supernatan (*filtrate* enzim) yang didapat dianalisis aktivitas enzim (Yani dan Djajasukma, 1991; Saskiawan dan Sastraatmadja, 1991).

### **11. Penentuan Aktivasi Enzim Selulase**

Penentuan aktivitas enzim selulase dilakukan berdasarkan kadar glukosa yang dihasilkan. Kadar glukosa diukur dengan menggunakan metode DNS (Miller, 1995). Supernatan diambil sebanyak 0,5 ml, lalu diencerkan dengan menggunakan buffer sitrat pH 6,0 sebanyak 2 ml. Kemudian dihomogenkan dan diambil larutannya sebanyak 0,75 ml, dicampurkan dengan CMC 0,5% dalam buffer sitrat sebanyak 0,75 ml dan diinkubasi selama 30 menit pada suhu  $35^{\circ}\text{C}$ ,  $40^{\circ}\text{C}$ ,  $45^{\circ}\text{C}$  dan  $50^{\circ}\text{C}$ ,

sedangkan campuran enzim dan larutan CMC 0,5% yang langsung dipanaskan tanpa diinkubasi selama 30 menit yang digunakan sebagai kontrol, ke dalam campuran tersebut ditambahkan 1,5 ml 3,5-*dinitrosaliclic acid*. Dihomogenkan dan dipanaskan dengan air mendidih selama 15 menit. Kemudian didinginkan dengan air dingin selama 20 menit selanjutnya diukur absorbansinya dengan menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 540 nm. Absorbansi yang diperoleh digunakan untuk menentukan kadar gula dengan rumus persamaan regresi linier  $Y = a + bx$ .  $a$  dan  $b$  diperoleh dari perhitungan gula standar,  $Y$  merupakan nilai absorbansi pada panjang gelombang 540 nm dan  $x$  adalah kadar glukosa yang dihasilkan. Satu unit dari aktivitas selulase diartikan sebagai jumlah dari enzim yang melepaskan  $\mu\text{mol}$  glukosa dalam satu menit pada kondisi pengujian.

Penentuan aktivitas enzim selulase per unit dapat ditentukan dengan rumus:

$$\text{Aktivitas enzim} = \frac{\text{kadar glukosa } (\mu\text{g}/\text{mL}) \times \text{faktor pengenceran}}{\text{berat molekul glukosa} \times \text{waktu inkubasi (menit)}}$$

Keterangan:

Faktor pengenceran : 5 kali

Berat molekul glukosa : 180 gr/mol

Waktu inkubasi : 30 menit

Aktivitas enzim pun dapat dikonversikan ke dalam satuan nkat. 1 unit =

1  $\mu\text{mol}/\text{menit}$  16,67 nkat (Dybker, 2001). nkat diartikan sebagai

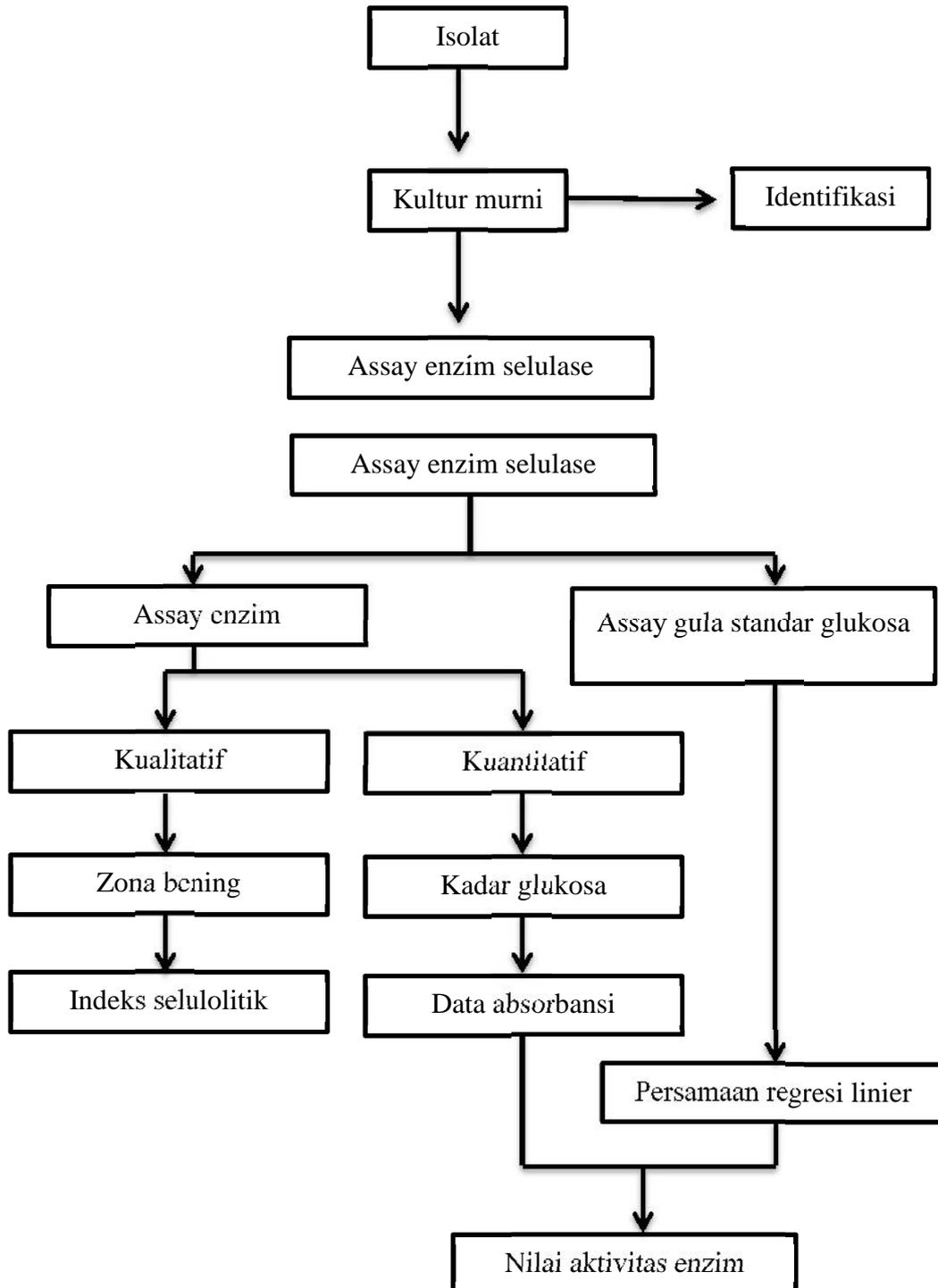
jumlah dari enzim yang melepaskan nmol glukosa dalam satu detik pada kondisi pengujian.

## **12. Pembuatan Kurva Standar Glukosa**

Larutan standar yang digunakan adalah glukosa dengan interval konsentrasi 0-200  $\mu\text{g}$  yaitu 0  $\mu\text{g}$ , 25  $\mu\text{g}$ , 50  $\mu\text{g}$ , 75  $\mu\text{g}$ , 100  $\mu\text{g}$ , 125  $\mu\text{g}$ , 150  $\mu\text{g}$ , 175  $\mu\text{g}$ , 200  $\mu\text{g}$  masing-masing larutan diambil sebanyak 0,75 ml, ditambahkan 0,75 ml larutan buffer sitrat CMC 0,5% sebagai substrat dan 1,5 ml larutan DNS sebagai pereaksi. Kemudian dihomogenkan, lalu dipanaskan dalam air mendidih selama 15 menit. Selanjutnya didinginkan dalam air dingin selama 20 menit. Pengukuran absorbansi dilakukan dengan menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 540 nm (Miller, 1959).

## F. Prosedur Kerja

Diagram alir penelitian adalah sebagai berikut.



Gambar 3. Diagram alir penelitian