

### III. METODOLOGI PENELITIAN

#### 3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan antara Februari-Agustus 2007, di Laboratorium Mikrobiologi Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Riau, Pekanbaru.

#### 3.2 Bahan dan Alat

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah sampel tanah dari Tahura SSH, larutan garam fisiologis (0,85% NaCl), larutan Sudan Black B, xylene, gliserol 20%, medium Pati Agar (PA), medium Nutrien Agar (NA), ekstrak yeast, potasium klorida (KCl), magnesium sulfat heptahidrat ( $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ), agar, akuades, alkohol 95%, larutan Iodium, Hidrogen peroksida 3%, kristal violet, etanol 95%, safranin, dimetil-p-fenildiamina hidroklorida 1% dan minyak imersi.

Alat-alat yang digunakan adalah cawan Petri, tabung reaksi, vortex, batang penebar, pipit tetes, gelas objek, mikroskop, refrigator (Gallenkamp 202, USA), inkubator (Gallenkamp 202, USA), tabung efendorff, labu erlenmeyer, jarum ose, bunsen, corong, kertas Whatman no. 2, *laminar flow*, *autoclave* (Gallenkamp KY-23D, USA), *waterbath* (Juballo SW 22, USA), *hot plate* (Fisons, USA), kamera digital (Cannon), pH universal, *soil tester*, *shaker* (Gallenkamp 116, USA), timbangan (Dial O-gram Balance 310 g Ohaus, USA), *magnetic stirrer* dan oven.

#### 3.3 Metode Penelitian

##### 3.3.1 Pengukuran Parameter

Sebelum sampel diambil hal pertama yang dilakukan adalah mengukur parameter di lingkungan. Parameter yang diukur yaitu pH tanah. pH tanah diukur dengan menggunakan pH meter (*soil tester*). *Soil tester* dimasukkan ke dalam tanah pada tiap-tiap lokasi sehingga diperoleh data pH sampel tanah.

### 3.3.2 Pengambilan Sampel

Sampel diambil dari tanah secara acak pada kedalaman 0-15 cm untuk 3 titik sampel. Setiap titik dilakukan pengambilan sampel sebanyak 3 plot dengan ukuran 1x1 m dan masing-masing plot diambil sebanyak 500 g tanah. Kemudian sampel tanah dimasukkan ke dalam kantong plastik steril dan dibawa ke Laboratorium Mikrobiologi Jurusan Biologi FMIPA UNRI. Sampel disimpan pada refrigator sebelum isolasi dikerjakan.

### 3.3.3 Pembuatan Medium dan Larutan Pewarnaan

#### 3.3.3.1 Medium Nutrien Agar (NA)

Medium larutan nutrien agar (NA) dibuat dengan cara mencampurkan flashekstrak 3 g, pepton 5 g dan agar 18 g. Semua bahan dilarutkan ke dalam 1000 ml aquades hingga homogen dengan menggunakan *magnetic stirrer*. Kemudian disterilkan dengan *autoclave* selama 15 menit pada suhu 121°C dengan tekanan 15 psi dan dengan pH medium 7.

#### 3.3.3.2 Medium Pati Agar (PA)

Medium pati agar (PA) dibuat dengan cara mencampurkan pati 10 g, *yeast extract* 1 g, potasium klorida (KCl) 0,5 g, magnesium sulfat heptahidrat (MgSO<sub>4</sub>.7 H<sub>2</sub>O) 0,5 g dan agar 15 g. Semua bahan dilarutkan ke dalam 1000 ml aquades hingga homogen dengan menggunakan *magnetic stirrer*. Kemudian disterilkan dengan *autoclave* selama 15 menit pada suhu 121°C dengan tekanan 15 psi dan dengan pH medium 7 (Handayani, 2001).

#### 3.3.3.3 Reagen Sudan Black B

Reagen Sudan Black B dibuat dengan cara mencampurkan Sudan Black B ke dalam *propylene glycol* secara perlahan-lahan sambil diaduk. Kemudian dipanaskan pada waterbath dengan suhu 100°C, tetapi tidak boleh lebih dari 110°C selama beberapa menit, aduk secara terus menerus. Saring melalui kertas Whatman no.2 lalu disimpan dalam oven suhu 60°C. Larutan stabil selama satu tahun (Lay, 1992).

### 3.3.4 Isolasi Bakteri Penghasil PHA

Isolasi bakteri penghasil PHA dilakukan dengan metode sebar. Beberapa sampel tanah diambil masing-masing sebanyak 1 g tanah, diencerkan dengan larutan garam fisiologis (NaCl) sampai pengenceran  $10^{-2}$ . Setelah dihasilkan pengenceran  $10^{-2}$ , diambil sebanyak 0,1 ml suspensi tanah dan disebar di atas cawan petri yang berisi medium pati agar (PA) dan pH diset antara 6,8-7,0. Kemudian diinkubasi pada suhu  $27^{\circ}\text{C}$  selama 3 hari, diamati setiap hari. Bakteri yang tumbuh di medium pati agar dimurnikan kembali ke medium pati agar untuk mengetahui kemampuannya dalam mendegradasi pati (Handayani, 2001).

### 3.3.5 Uji Hidrolisis Pati

Isolat bakteri ditumbuhkan dengan metode totolan yaitu dengan menggunakan tusuk gigi steril secara aseptik. Metode tersebut dilakukan pada media pati agar (PA). Isolat yang dapat tumbuh dengan cepat dan membentuk suatu zona bening (halo) disekitarnya, menunjukkan isolat tersebut mampu menghidrolisis pati, dan isolat yang lapar terhadap sumber karbon. Setelah itu dilakukan pengukuran zona bening dengan inkubasi selama 3 hari. Isolat unggul ini akan digunakan untuk uji Poli- $\beta$ -hidroksialkanoat (Lay, 1994).

### 3.3.6 Uji Poli- $\beta$ -hidroksialkanoat (PHA)

Isolat-isolat yang telah dimurnikan kemudian diuji kemampuannya dalam menghasilkan PHA. Uji ini dilakukan dengan pewarnaan PHA. Isolat bakteri dibuat siapan kering pada kaca objek dengan cara fiksasi kemudian ditetesi larutan Sudan Black B dan dibiarkan sekitar 10-15 menit. Siapan dibilas dan dikeringanginkan, kemudian dicelupkan ke dalam larutan xylene dan dikeringkan kemudian diberi pewarna safranin selama 5-10 detik. Siapan dibilas dengan akuades dan dikeringkan. Pengamatan dilakukan dengan menggunakan mikroskop cahaya perbesaran 1000x. Granula PHA akan terlihat berwarna biru kehitaman, sedangkan bagian sitoplasma berwarna merah muda (Lay, 1992).

### **3.3.7 Karakterisasi Bakteri Penghasil PHA**

#### **3.3.7.1 Pengamatan Morfologi**

Karakterisasi morfologi isolat bakteri penghasil PHA diamati di dalam medium NA setelah dilakukan inokulasi dengan metode tuang selama 24 jam. Pengamatan morfologi isolat bakteri hanya dilakukan secara penampakan terhadap bentuk koloni, diameter koloni, warna koloni, bentuk tepian dan elevasi. Sedangkan pengamatan morfologi sel dilakukan dengan menggunakan mikroskop untuk melihat bentuk sel (Hadioetomo, 1993).

#### **3.3.7.2 Pengamatan Fisiologi dan Biokimia**

##### **3.3.7.2.1 Uji Oksidase**

Reagent uji yang digunakan yaitu larutan dimetil-p-fenildiamina hidroklorida 1%. Isolat bakteri yang akan diuji diletakkan di atas kertas saring kemudian isolat tersebut ditetesi dengan larutan dimetil-p-fenildiamina hidroklorida 1%. Uji positif ditandai dengan berubahnya warna isolat bakteri menjadi hitam (Hadioetomo, 1993).

##### **3.3.7.2.2 Uji Katalase**

Reagent uji yang digunakan yaitu hidrogen peroksida 3%. Isolat bakteri yang akan diuji diambil sebanyak satu ose kemudian dioleskan di atas kaca objek. Sebanyak dua tetes hidrogen peroksida 3% diteteskan ke atas kaca objek. Uji positif ditandai dengan terbentuknya gelembung-gelembung udara yang menunjukkan bahwa isolat bakteri tersebut menghasilkan enzim katalase yang merubah hidrogen peroksida menjadi air dan oksigen (Hadioetomo, 1993).

##### **3.3.7.2.3 Pewarnaan Gram**

Isolat yang mampu menghidrolisis pati dan dapat mengakumulasi PHA dari medium PA serta isolat yang hanya mampu tumbuh pada medium PA, yang stoknya telah disimpan pada agar miring pada tahap sebelumnya ditumbuhkan kembali pada media agar nutrien agar (NA) supaya sel bakteri yang diuji untuk pewarnaan Gram masih segar. Setelah sel bakteri dalam media NA berumur 18-20 jam dibuat olesan isolat di atas gelas objek yaitu dengan cara mengambil satu ose isolat bakteri yang masih segar dan diletakkan pada gelas objek yang telah

ditetesi akuades steril, kemudian difiksasi di atas bunsen 2-3 kali dengan cepat supaya isolat melekat pada objek. Kemudian olesan isolat yang melekat pada gelas objek ditetesi kristal violet selama satu menit, lalu dicuci dengan akuades dan dikering anginkan. Setelah itu, olesan ditetesi dengan larutan Iodium selama dua menit, lalu dicuci lagi dengan akuades dan dikering anginkan. Selanjutnya, olesan ditetesi dengan alkohol 95% selama 30 detik. Terakhir, olesan ditetesi safranin selama 30 detik, lalu dicuci dengan akuades dan dikeringkan dengan kertas penghisap.

Hasil pewarnaan isolat diamati di bawah mikroskop dengan perbesaran 10 x100 kali. Bila isolat yang diamati berwarna biru gelap atau ungu, maka isolat bakteri tersebut tergolong bakteri Gram positif, dan bila isolat yang diamati berwarna merah muda (pink) maka tergolong bakteri Gram negatif (Hadioetomo, 1993).

### **3.3.8 Analisis Data**

Data hasil isolasi isolat bakteri penghasil PHA disajikan dalam bentuk tabel dan gambar, kemudian data analisis secara deskriptif berdasarkan pengamatan makroskopis dan mikroskopis. Data yang diperoleh dari pengukuran dianalisis berdasarkan zona bening yang terbentuk disekitar isolat penghasil PHA. Isolat tersebut diurutkan berdasarkan besar kecilnya zona bening yang terbentuk, kemudian dilakukan uji nilai tengah.