

## **BAB III**

### **METODA PENELITIAN**

#### **3.1. Waktu dan Tempat**

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Biokimia jurusan kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Riau Provinsi Riau selama lebih kurang 6 bulan.

#### **3.2. Alat dan Bahan**

##### **3.2.1. Alat**

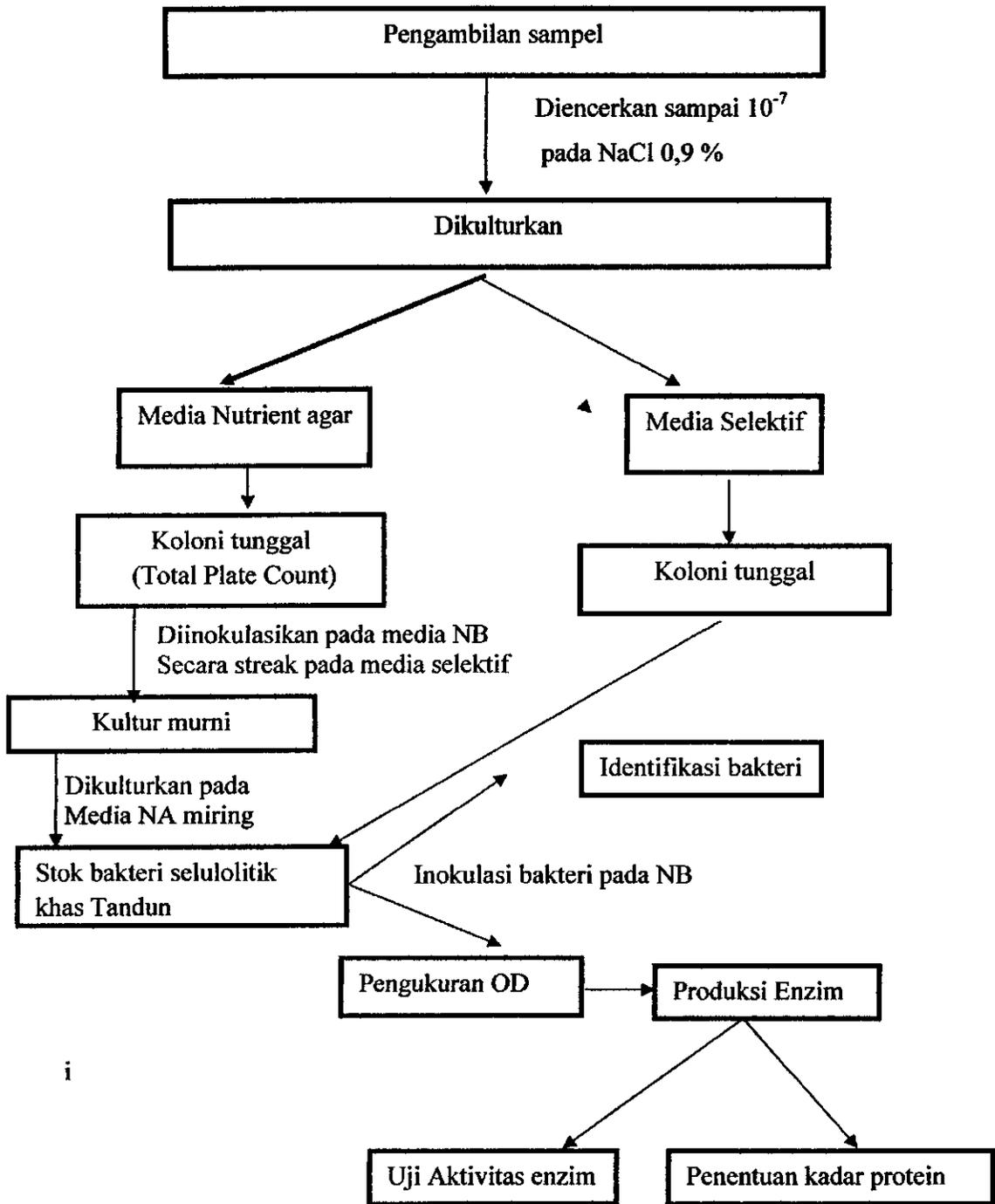
Spektrofotometer Genesis II keluaran Milton Roy Co., USA (No. Catalog 4001/4); Waterbath thermostat WK-24 (Sibata Scientific Technology Ltd); Kertas saring GF/C Whatman No. catalog 1822055; Corning Sterile Syringe filter 0,45 $\mu$ m No. catalog 431220, Autoklaf All American Model 1925 X/KY-23D Wisconsin Aluminium Foundry Co. Inc. Manitowoc dan peralatan laboratorium biokimia standar lainnya sesuai dengan prosedur.

##### **3.2.2. Bahan**

Air hasil sampling DAS Siak di daerah Tandun, Media Nutrient Agar (NA). CMC (*Carboxymethylcellulose*) dan bahan-bahan lain yang digunakan adalah bahan tingkat analisis sesuai dengan metoda kerja.

#### **3.3. Metode Penelitian**

Penelitian ini dimulai dari pengambilan sampel secara acak, pada permukaan sungai, dan kedalaman 10 cm pada daerah Tandun. Pengambilan sampel dilakukan dua kali, sampel yang pertama diambil dari daerah CPO yang berjarak kurang lebih 4 meter dari saluran pembuangan limbah, sedangkan sampel yang kedua diambil dari air sungai disekitar perkebunan kelapa sawit. Selanjutnya dilakukan isolasi mikroba penghasil enzim selulase dengan menggunakan media selektif. Setelah didapatkan mikrobanya, dilakukan identifikasi mikroba dengan pewarnaan Gram, uji aktivitas selulase dengan metode Nelson Somogyi, dan penentuan kadar protein dengan metode Lowrey.



i

**Gambar 2.**

### **3.4. Prosedur Penelitian**

#### **3.4.1. Persiapan Sampel**

Pada penelitian ini diambil sampel air Daerah Aliran Sungai Siak di daerah Tandun. Sampel diambil dari 2 titik dengan menggunakan botol steril, kemudian sampel dimasukkan ke dalam termos berisi es.

#### **3.4.2. Pembuatan media Nutrient agar**

Nutrien agar sebanyak 4 gram ditimbang, kemudian dilarutkan dalam 200 ml aquades sampai homogen. Selanjutnya larutan disterilkan dalam autoklaf dengan suhu 120°C selama 20 menit. Kemudian media steril ini dituang ke cawan petri secara aseptis dan dibiarkan selama 1 malam di kotak kaca sebagai pengganti LAF (*Laminar Air Flow*).

#### **3.4.3. Isolasi dan Penghitungan Bakteri**

Sampel air sungai yang telah diambil dari dua titik dibawa ke laboratorium. Sampel dihomogenkan, sebanyak 1 ml sampel dilarutkan dalam 9 ml air salin steril (NaCl 0.9%), kemudian dilakukan pengenceran bertingkat dari  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$  sampai  $10^{-7}$ . Sebanyak 250  $\mu$ L dari setiap pengenceran disebarkan ke media Nutrien agar dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24-48 jam. Koloni yang tumbuh dihitung untuk menentukan jumlah pertumbuhan bakteri per ml sampel air (*Total Plate Count*).

#### **3.4.4. Uji Kualitatif Pada Media Selektif**

Isolasi bakteri selulolitik dilakukan dengan metode *streak plate* pada media CMC. Masing-masing koloni diinokulasi ke media CMC. Koloni yang ditumbuhkan selama 24-48 jam pada suhu 37°C dimurnikan dan dihitung kemampuan pembentukan zona bening.

Tabel 1. Susunan Nutrisi untuk media selektif

Nutrisi	Berat atau volum
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	0,02 gram
CMC	1 gram
KNO <sub>3</sub>	0,075 gram
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,05 gram
FeSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	0,002 gram
CaCl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O	0,004 gram
Ekstrak kamir	0,2 gram
Agar	1,5 gram
Glukosa	0,1 gram

### 3.4.5. Identifikasi Isolat

Sebanyak 200 µL inokulum ditanam dengan cara *spread plate* dan sebanyak 1 ose inokulum ditanam dengan cara *streak plate* ke media Nutrien agar. Kemudian diinkubasi dengan suhu 37°C selama 24-48 jam. Isolat yang tumbuh dipindahkan ke Nutrien agar miring sebagai stok bakteri khas Sungai Tandun.

#### 3.4.5.1. Pewarnaan Gram

Preparat ulas dibuat dengan mengambil 1 ulasan biakan bakteri dan Nutrien agar miring dengan menggunakan ose, selanjutnya diratakan diatas kaca preparat yang sudah ditetesi dengan aquades. Ulasan difiksasi dengan melewati diatas api lampu spritus hingga ulasan menjadi kering. Kemudian ulasan diberi beberapa tetes Kristal violet dan dibiarkan sekitar 1 menit, lalu dicuci dengan aquades mengalir.

Selanjutnya ulasan ditetesi dengan larutan lugol iodine dan dibiarkan 1 menit, lalu dicuci dengan aquades mengalir. Ulasan diberi larutan pemucat (etanol 96%) setetes demi setetes hingga tetesan etanol yang jatuh tidak berwarna, lalu dicuci dengan aquades mengalir. Safranin ditetaskan diatas ulasan dan dibiarkan

selama 45 detik, lalu dicuci dengan aquades mengalir. Preparat dikeringkan dengan menempelkan tissue disisi ulasan, lalu biarkan mengering diudara. Kemudian preparat diamati dibawah mikroskop.

#### 3.4.6. Pengukuran OD

Pengukuran OD dari tiap isolat dilakukan dengan cara yaitu solat dari setiap bakteri diinokulasikan pada *Nutrient Broth* kemudian diinkubasi selama 24 jam. Bakteri yang sudah diinkubasi selama 24 jam diukur OD dengan menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 600 nm.

#### 3.4.7. Produksi Enzim Selulase

Produksi enzim selulase dilakukan dengan cara yaitu, isolat dari setiap bakteri yang terdapat pada nutrient broh yang sudah dihitung ODnya dimasukkan pada Erlenmeyer 50 ml yang berisi media fermentasi yang mengandung nutrisi ( pada tabel 2) dalam buffer fosfat 25 ml kemudian diinkubasi selama 24 jam dengan pH 7 dan suhu 37°C.

Tabel 2. Susunan nutrisi dari medium cair produksi Selulase

Nama zat	Berat atau volume
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub>	0,005 gram
KNO <sub>3</sub>	0,01875 gram
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,0125 gram
FeSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	0,0005 gram
CaCl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O	0,0001 gram
Eksrak kamir	0,05 gram
CMC	0,25 gram

#### 3.4.8. Ekstraksi Enzim

Enzim kasar yang diperoleh disentrifugasi dengan kecepatan 5000 rpm selama 15 menit. Filtrat hasil sentrifugasi disebut ekstrak enzim kasar. Ekstrak

kasar tersebut kemudian dipisahkan dari endapannya kemudian ditentukan volume, kadar protein dengan Metode Lowry (*folin-ciocelteau*).

#### 3.4.8. Uji aktivitas enzim selulase

Larutkan 0,5 gram CMC (*Carboxymethyl cellulose*) ke dalam 100 ml buffer fosfat 0,05 M (pH 7) sebagai substrat. 4 ml larutan substrat dimasukkan pada tabung reaksi, selanjutnya dimasukkan ke dalam *waterbath thermostat* (temperatur 45<sup>0</sup>C) selama 5 menit. Tanpa mengeluarkan tabung reaksi dari *waterbath* tambahkan 0,5 ml buffer asetat, selanjutnya masukkan 0,5 ml larutan enzim. Larutan diaduk ( tanpa mengeluarkan dari dalam *waterbath*) dengan hati-hati, jangan sampai larutan berbusa. Biarkan larutan selama 30 menit dalam *waterbath*. Setelah 30 menit campuran dipanaskan selama 10 menit dalam air mendidih dan mulut tutup tabung ditutup dengan kelereng. Selanjutnya larutan disentrifugasi selama 25 menit, dan diukur konsentrasi gula pereduksi dengan metode Nelson-Somogyi. Sebagai kontrol digunakan 0,5 ml larutan enzim (tanpa substrat) yang diinkubasi dealam *waterbath* (temperatur 45<sup>0</sup>C) selama 30 menit, selanjutnya diperlakukan sama dengan sampel namun setelah 30 menit, sebelum dipanaskan dalam air mendidih, larutan ditambahkan 0,5 ml larutan substrat CMC. Setelah pendidihan konsentrasi gula pereduksi yang terbentuk ditentukan dengan metode Nelson-Somogyi. Sebagai blanko adalah 1 ml larutan bufer fosfat 0,05 mM (pH 7) yang diperlukan sama dengan sampel.

Untuk mengkatalisis gula pereduksi yang terbentuk ditentukan dengan metoda Nelson-Somogyi sebagai berikut :sampel setelah didinginkan ( temperatur kamar ) 1 ml larutan sampel dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Kedalam tabung tersebut ditambahkan 1 ml reagen Nelson-Somogyi, tutup tabung tersebut dengan kelereng atau kertas aluminium. Letakkan tabung tersebut dalam penangas air mendidih selama 20 menit. Selama 20 menit, segera didinginkan dalam air es atau air dingin sampai temperatur tabung tersebut sama dengan temperatur kamar. Setelah tabung tersebut dingin ditambahkan 1 ml arsenomolibdat dan masukkan 7 ml aquades. Aduk larutan dalam tabung reaksi tersebut dengan batang pengaduk. Absorban masing-masing larutan tersebut diukur dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 540 nm. Pengukuran aktivitas enzim dilakukan masing-

masing 3 kali untuk setiap sampel. Lakukan hal yang sama pada blanko dan kontrol.

### 3.5. Penentuan kadar protein

Larutan enzim dipipet 1 ml dan dimasukkan ke dalam eppendorf, kemudian ditambahkan masing-masing 1 ml aseton dingin 80 % (-20°C), dihomogenkan dan disimpan dalam *freezer* dengan temperatur -20°C selama 30 menit. Selanjutnya disentrifugasi dengan mikro sentrifuga pada kecepatan 13000 rpm selama 10 menit, lalu eppendorf yang berisi endapan protein dilarutkan dengan 1 ml buffer fosfat pH 7 (0,05 M), kemudian larutan dihomogenasikan hingga endapan protein tersebut larut. Larutan dianalisis dengan metode Lowrey.

Larutan sampel protein dipindahkan ke dalam tabung reaksi dan ditambahkan ke dalam tabung tersebut 5 ml reagen C, lalu dihomogenkan dan dibiarkan pada suhu kamar selama 10 menit. Selanjutnya, pada larutan ditambahkan 0,5 ml reagen *Folin-Ciocalteu* ke dalam tabung tersebut, kemudian divortex. Tabung diinkubasi selama 30 menit pada suhu kamar. Serapan masing-masing larutan sampel diukur dengan spektrofotometer dengan panjang gelombang 750 nm. Perlakuan yang sama dilakukan terhadap blanko yaitu buffer fosfat (0,05 M) pada pH 7 serta larutan standar protein yang dibuat pada berbagai konsentrasi (antara 0,2 s/d 1 mg/mL).