

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Jenis Penelitian

Penelitian ini merupakan jenis penelitian murni atau *pure research* yang dilakukan dengan metode deskriptif, yaitu suatu metode penelitian untuk membuat deskripsi, gambaran atau lukisan secara sistematis, faktual, dan akurat mengenai fakta - fakta, sifat - sifat, serta hubungan antar fenomena yang diselidiki (Nazir, 1988)

B. Polulasi dan Sampel

1. Populasi dalam penelitian ini adalah semua bakteri termofilik yang berada di setiap lokasi penelitian.
2. Sampel dalam penelitian ini adalah isolat bakteri termofilik penghasil amilase yang mampu tumbuh pada medium yang digunakan dalam penelitian.

C. Waktu dan Lokasi Penelitian

Penelitian ini dimulai pada bulan Maret 2011 sampai dengan Juni 2011 yang dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi Universitas Pendidikan Indonesia, Jalan Dr. Setiabudhi No. 229 Bandung.

D. Alat dan Bahan Penelitian

Peralatan yang digunakan pada penelitian ini terdapat di Laboratorium Mikrobiologi Universitas Pendidikan Indonesia. Alat dan bahan yang digunakan selama penelitian ini terdapat dalam **Tabel 3.1** dan **Tabel 3.2**

Tabel 3.1. Daftar Alat – alat Penelitian

No	Nama Alat	Spesifikasi	Jumlah
1.	Indikator pH universal	Merck	5 strips
2.	Termometer	-	2 buah
3.	Autoclave	Merk Hirayama HL36At	1 unit
4.	Termos air panas	Ukuran 250 ml	6 buah
5.	Cawan Petri	Pyrex; diameter = 9 cm	40 buah
6.	Tabung Reaksi	Pyrex	100 buah
7.	Pembakar spirtus	-	1 buah
8.	Lup inokulasi	-	2 buah
9.	Jarum inokulasi	-	2 buah
10.	Gelas Beaker (1 L)	Pyrex	4 buah
11.	Hotplate and magnetic stirrer	Eyela magnetic stirrer RCH- 3	1 unit
12.	Inkubator <i>shaker</i>	Boekel model 136400	1 buah
13.	Kamera digital	Canon	1 unit
14.	Objek gelas	Sail brand (25,4 x 76,2mm)	1 pak
15.	Penutup objek gelas	Focus (18 x 18 mm)	1 pak
16.	Bak pewarna	-	1 buah
17.	Rak kawat	-	1 buah
18.	Mikroskop	Novel XSZ-107BN	1 buah
19.	Rak tabung reaksi	-	1 buah
20.	High Performance UV Transilluminator	UVP Upland, CA.	1 buah
21.	Timbangan Digital	AND HF-300	1 buah
22.	Pipet tetes	-	5 buah
23.	Oven	Memmert	1 buah
24.	<i>Staining Jar</i>	-	1 buah
25.	Papan miring	-	2 buah
26.	Vorteks	Sibata TTM 1	1 buah
27.	<i>Warp plastic</i>		2 buah
28.	Gelas ukur (100 mL)	Pyrex	1 buah
29.	Sarung tangan karet steril	Latex- Master	1 pak

30.	Kertas label	No.111	1 pak
31.	Erlenmeyer (250 ml)	Pyrex	12 buah
32.	<i>Colony counter</i>	Sibata CL-560	1 buah
33.	Jangka sorong	Tricle Brand (0,05 mm)	1 buah
34.	Waterbath shaker	UNI Thermoshaker NTS-1300	1 buah
35.	Tripod	-	1 buah
36.	Batang pengaduk	P = 29,5 cm	1 buah
37.	<i>Sentrifuge</i>	Hettich EBA-12	1 buah
38.	Corong	-	1 buah
39.	Transfer Box	PT 25.221.03.019BM	1 buah
40.	Spatula	Bahan logam	1 buah
41.	Gelas ukur 10 ml	Pyrex	1 buah
42.	Gelas ukur 50 ml	Pyrex	1 buah
43.	Gelas ukur 500 ml	Pyrex	1 buah
44.	Mikropipet	Merk Gilson-PIPETMAN	3 buah
45.	Lemari Pendingin	PT25.221.03.021.BM	1 buah
46.	Alat Elektrofosis gel Mini	Bio-Rad Mini Sub Cell GT, CA USA	1 buah
47.	Mesin PCR	Perkin-Elmer 9700 Applied Biosystem, USA	1 buah
48.	Automated DNA sequencer 2720 thermal cycler	Applied Biosystem, USA	1 buah
49.	Tips 100 – 1000 μ l, 20 – 200 μ l	-	40 buah
50.	Spektrofotometer	The Bausch & Lomb Spectronic 20	1 buah

Tabel 3.2. Daftar Bahan - bahan Penelitian

No	Bahan	Jumlah
1.	Sampel air panas Gunung Darajat	750 ml
2.	Sampel air panas Ciengang	750 ml
3.	Medium ½ LB agar	2 L
4.	Medium Bcp laktosa <i>broth</i>	170 ml
5.	Medium Bcp dekstrosa <i>broth</i>	170 ml
6.	Medium Bcp sukrosa <i>broth</i>	170 ml
7.	Medium ½ LB <i>broth</i>	200 ml
8.	Medium triptic nitrat <i>broth</i>	100 ml
9.	Medium urea <i>broth</i>	100 ml
10.	Medium susu agar	170 ml
11.	Medium hidrolisis kasein	170 ml
12.	Medium selektif agar amilum	500 ml
13.	Medium agar lipid	170 ml

14.	Medium susu litmus	100 ml
15.	Medium SIM	100 ml
16.	Medium agar Simmon's Sitrat	100 ml
17.	Medium MR-VP <i>broth</i>	100 ml
18.	Reagen reduksi nitrat	100 ml
19.	Reagen Kovac's	10 ml
20.	Reagen Metil red	10 ml
21.	Reagen Barritt's	10 ml
22.	Reagen Malakit Hijau	50 ml
23.	Safranin O	50 ml
24.	Kristal Violet	50 ml
25.	Lugol	50 ml
26.	Alkohol 96 %	50 ml
27.	Aquadest	5 L
28.	H ₂ SO ₄ pekat	100 ml
29.	ddH ₂ O (Aqua bidestilata)	1 L
30.	Gel Agarose (FERMENTAS)	5 gram
31.	Taq Polymerase (NEB U.S.A)	8 reaksi
32.	PCR buffer 10x (NEB U.S.A)	8 reaksi
33.	dNTPs	8 reaksi
34.	Forward primer 63F	8 reaksi
35.	Reverse primer 1387R	8 reaksi
36.	FERMENTAS DNA Isolation Kit	1 set
37.	Kloroform	30 ml
38.	TAE Buffer 50x	10 ml
38.	1kb DNA <i>Ladder</i> (NEB U.S.A)	20 µl
39.	Plastik tahan panas (1L)	2 pak

E. Prosedur Penelitian

1. Tahap Persiapan

Persiapan penelitian meliputi pembuatan medium isolasi bakteri termofilik amilolitik, medium pengkayaan sampel, dan medium sub-kultur bakteri. Medium isolasi menggunakan medium selektif amilolitik, medium pengkayaan sampel menggunakan *half strength* Luria Bertani ($\frac{1}{2}$ LB) *broth*, sedangkan medium sub-kultur bakteri menggunakan $\frac{1}{2}$ LB

agar miring. Alat-alat kaca dan plastik yang digunakan dalam penelitian dicuci terlebih dahulu dan dikeringkan. Berbagai alat tersebut dibungkus dengan menggunakan kertas kemudian disterilisasi panas lembab menggunakan *autoclave* selama 15 menit pada suhu 121°C dan tekanan 15 lb.

2. Tahap Penelitian

a. Pengambilan Sampel

Sampel air panas diambil dari dua sumber mata air panas, masing-masing pada tiga titik yang berbeda. Pengukuran parameter faktor abiotik akuatik dilakukan sebelum pengambilan sampel air. Parameter yang diukur pertama kali adalah suhu air, yaitu dengan menggunakan termometer alkohol yang dicelupkan selama 3 menit ke dalam air di setiap titik tempat pengambilan sampel kemudian dicatat suhunya. Parameter kedua yang diukur adalah pH air, yaitu dengan menggunakan kertas indikator pH universal (Merck) yang dicelupkan ke permukaan air lalu dibandingkan dengan standar warna pH yang tertera. Sampel air diambil dari bagian permukaan air kolam, yaitu sebanyak 250 ml dari setiap tempat kemudian dimasukkan ke dalam botol termos steril dan diberi label. Sampel air selanjutnya di bawa ke Laboratorium Mikrobiologi Jurusan Pendidikan Biologi FPMIPA Universitas Pendidikan Indonesia, untuk dilakukan isolasi.

b. Isolasi Bakteri Termofilik Amilolitik

Sampel dari setiap titik diberi perlakuan pengkayaan (Rahayu *et al.*, 1999). Sampel air panas diambil sebanyak 17 ml dan dimasukkan ke dalam labu erlenmeyer yang telah berisi 50 ml medium $\frac{1}{2}$ LB *Broth*. Sampel tersebut diinkubasi pada suhu 52°C di dalam inkubator selama 24 jam.

Medium yang digunakan untuk mengisolasi bakteri termofilik adalah medium selektif agar amilum dan $\frac{1}{2}$ LB agar. Hasil pengkayaan dimasukkan ke dalam cawan Petri sebanyak 1 ml dan ditambahkan 9 ml medium, kemudian dihomogenkan dan dibiarkan memadat. Setiap titik sampel air panas untuk setiap jenis medium dibuat ulangnya sebanyak tiga kali. Pinggiran cawan Petri dibungkus dengan menggunakan *warp plastic*, kemudian diinkubasi pada suhu 52°C selama 48 jam.

c. Pengamatan Morfologi Koloni Bakteri

Pengamatan jumlah dan karakteristik koloni dilakukan setelah sampel diinkubasi selama 48 jam. Karakteristik morfologi yang diamati meliputi bentuk, warna, elevasi, tepian, dan kepekatan koloni (Cappucino dan Sherman, 1986). Pengamatan jumlah koloni dilakukan dengan menggunakan *colony counter*.

d. Pembuatan Stok Isolat Bakteri

Stok kultur disiapkan dengan cara menggores satu ose dari tiap isolat bakteri yang tumbuh di medium isolasi sebelumnya, ke dalam bentuk medium miring $\frac{1}{2}$ LB agar. Kultur diinkubasi selama 24 jam pada suhu 52°C, selanjutnya disimpan di lemari pendingin untuk stok isolat. Stok kultur ini diremajakan setiap 3 minggu sekali.

e. Karakterisasi Bakteri Secara Mikroskopis

Karakterisasi bakteri secara mikroskopis dilakukan melalui pewarnaan Gram dan endospora. Pewarnaan Gram dilakukan dengan cara membuat sediaan mikroskopik isolat bakteri, kemudian difiksasi panas. Sediaan mikroskopik tersebut ditetaskan dengan karbol kristal violet dan dibiarkan selama tiga menit. Kelebihan warna pada sediaan tersebut dibuang. Sediaan diberi larutan lugol selama 45 - 60 detik, kemudian dimasukan ke dalam alkohol 96% dalam *staining jar* sambil digoyang perlahan selama satu menit. Tahap selanjutnya adalah membilas sediaan dengan aquades dan dikeringkan dengan kertas hisap. Larutan safranin O ditetaskan di atas sediaan, dibiarkan satu menit, lalu dibilas dengan aquadest, dan dikeringkan perlahan dengan kertas hisap. Sediaan yang telah kering diberi minyak imersi terlebih dahulu kemudian diamati di bawah mikroskop dengan menggunakan lensa objektif perbesaran 1000x. Bakteri Gram negatif akan terlihat

berwarna merah, sedangkan bakteri Gram positif berwarna ungu (Cappucino dan Sherman, 1986).

Pewarnaan endospora dilakukan dengan cara membuat sediaan mikroskopik isolat bakteri, kemudian difiksasi panas. Sediaan mikroskopik ditetaskan malakit hijau melalui kertas hisap pada penangas air selama lima menit, lalu kelebihan warna dibilas dengan aquadest. Tahap selanjutnya adalah sediaan mikroskopik ditetaskan safranin dan dibiarkan selama 30 detik. Kelebihan warna yang terjadi dicuci dengan aquadest lalu dikeringkan dengan kertas hisap. Sediaan yang telah kering diberi minyak imersi terlebih dahulu kemudian diamati di bawah mikroskop dengan menggunakan lensa objektif perbesaran 1000X. Endospora bakteri akan berwarna hijau sedangkan bagian sel lainnya berwarna merah (Cappucino dan Sherman, 1986).

f. Seleksi Bakteri Termofilik Amilolitik

Seleksi bakteri termofilik amilolitik dilakukan melalui pengukuran diameter zona bening hasil hidrolisis pati (Sianturi, 2008). Medium selektif agar amilum cair (dengan suhu 40 - 45 °C) dimasukkan ke dalam cawan Petri steril, dihomogenkan, lalu dibiarkan hingga memadat. Bagian tengah medium kemudian dilubangi dengan menggunakan pelubang gabus (10 mm). Isolat bakteri disuspensikan dalam larutan NaCl fisiologis sampai kekeruhannya sama dengan kekeruhan *Larutan Mac Farland 0,5* standart, yang setara dengan 10^8

CFU. Pengukuran kekeruhan dilakukan dengan menggunakan spektrofotometer (The Bausch & Lomb Spectronic 20). Setiap suspensi bakteri diambil sebanyak 5 µl dengan menggunakan mikropipet, lalu ditetaskan dengan tepat pada bagian tengah medium selektif agar amilum yang sebelumnya telah dilubangi. Kultur diinkubasi selama 24 jam pada suhu 52°C.

Setiap isolat bakteri yang tumbuh pada medium pati tersebut ditetesi dengan larutan iodin untuk melihat kemampuan daya amilolitiknya. Isolat yang menghasilkan enzim amilase akan membentuk zona bening pada agar di sekitar koloninya jika ditetesi dengan larutan iodin (Cappucino dan Sherman, 1986). Lebar zona bening yang terbentuk maupun ukuran koloni bakteri diukur dengan menggunakan jangka sorong, yaitu sebanyak enam kali pengukuran untuk setiap isolat. Indeks amilolitik untuk setiap isolat bakteri ditentukan dengan menggunakan rumus berikut ini (Juliadi, 2010) :

$$\text{Indeks Amilolitik} = \frac{\text{diameter hidrolisis} - \text{diameter koloni bakteri}}{\text{diameter koloni bakteri}}$$

Enam isolat dengan zona bening terbesar selanjutnya digunakan dalam penelitian ini untuk diidentifikasi berdasarkan karakter biokimiawi yang dimilikinya.

g. Uji Sifat Biokimia Bakteri Amilase Termofilik

Uji hidrolisis lipid dilakukan dengan cara menuangkan 9 ml medium agar lipid cair ke dalam cawan Petri steril, lalu dibiarkan memadat. Isolat bakteri kemudian diinokulasikan pada medium dengan cara inokulasi tusuk. Medium hasil inokulasi kemudian di inkubasi selama 24 jam pada suhu 52°C. Uji hidrolisis lipid positif ditandai dengan timbulnya zona bening di sekitar isolat bakteri atau warna medium yang terletak di bawah bakteri menjadi kemerahan. Hasil negatif ditandai dengan tidak adanya perubahan warna medium disekitar bakteri atau tidak adanya zona bening yang terbentuk. (Cappucino dan Sherman, 1986).

Uji hidrolisis kasein dilakukan dengan cara menuangkan 9 ml medium susu agar ke dalam cawan Petri steril, lalu dibiarkan memadat. Isolat bakteri kemudian diinokulasikan pada medium dengan cara inokulasi tusuk. Medium hasil inokulasi kemudian di inkubasi selama 24 jam pada suhu 52°C. Uji hidrolisis kasein positif ditandai dengan timbulnya zona bening disekitar isolat bakteri, sedangkan hasil negatif ditandai dengan tidak adanya zona bening yang terbentuk. (Cappucino dan Sherman, 1986).

Uji fermentasi karbohidrat dilakukan dengan cara menginokulasikan satu ose isolat bakteri pada medium (Bcp laktosa/dekstrosa/sukrosa) yang sebelumnya telah dimasukan tabung Durham. Medium kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu

52°C. Perubahan warna dan kemunculan gas pada tabung Durham merupakan indikator pengujian fermentasi karbohidrat ini. Perubahan warna medium menjadi kuning menunjukkan bahwa mikroorganisme yang diinokulasikan mampu memfermentasi karbohidrat dan umumnya diikuti dengan adanya gas CO₂ berupa gelembung udara pada tabung Durham. Hasil negatif ditunjukkan oleh tidak adanya perubahan warna pada medium serta tidak adanya gelembung udara yang terbentuk pada tabung Durham (Cappucino dan Sherman, 1986).

Uji Indol dilakukan dengan cara menginokulasikan isolat bakteri pada medium SIM agar, yaitu dengan menggunakan tehnik inokulasi tusuk. Medium kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 52°C. Reagen Kovac's diteteskan ke dalam medium yang telah diinkubasi, yaitu sebanyak 10 tetes. Hasil uji produksi indol positif ditunjukkan oleh perubahan warna medium menjadi merah, namun apabila warna medium menjadi kuning maka menunjukkan hasil negatif (Cappucino dan Sherman, 1986).

Uji *metil red* dilakukan dengan cara menginokulasikan satu ose isolat bakteri pada medium MR-VP *broth*. Medium kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 52°C. Reagen *metil red* diteteskan ke dalam medium yang telah diinkubasi, yaitu sebanyak 5 tetes lalu medium dihomogenkan secara perlahan. Hasil uji *metil red* positif ditunjukkan oleh perubahan warna medium menjadi merah,

namun apabila warna medium menjadi kuning maka menunjukkan hasil negatif (Cappucino dan Sherman, 1986).

Uji Voges Proskauer dilakukan dengan cara menginokulasikan satu ose isolat bakteri pada medium MR-VP *broth*. Medium kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 52°C. Reagen Barritt's A ditetaskan ke dalam medium sebanyak 10 tetes lalu dihomogenkan, dan ditambahkan kembali reagen Barritt's B sebanyak 10 tetes. Medium yang telah ditetesi reagen tersebut kemudian didiamkan selama 15 menit. Hasil uji Voges-Proskauer positif ditunjukkan oleh perubahan warna medium menjadi pink, namun apabila warna medium tidak menunjukkan perubahan warna maka hasilnya negatif (Cappucino dan Sherman, 1986).

Uji Sitrat dilakukan dengan menginokulasikan satu ose isolat bakteri, digores zig - zag pada permukaan medium agar miring Simmon's Sitrat. Medium tersebut diinkubasi pada suhu 52°C selama 24 jam. Hasil positif ditunjukkan bila medium berubah warna menjadi biru yang disertai dengan pertumbuhan isolat bakteri, namun apabila medium tetap berwarna hijau maka hasilnya negatif (Cappucino dan Sherman, 1986).

Uji H₂S dan motilitas dilakukan dengan cara menginokulasikan isolat bakteri dengan cara menusukkan jarum ose secara tegak lurus pada medium *Sulfide Indol Motility* agar. Tabung diinkubasi selama 48 jam pada suhu 52°C. Hasil positif ditunjukkan bila jejak inokulasi

di medium berubah warna menjadi hitam yang disertai dengan pertumbuhan isolat bakteri, namun apabila medium tidak mengalami perubahan warna serta tidak terlihat adanya motilitas maka hasilnya negatif (Cappucino dan Sherman, 1986).

Uji urease dilakukan dengan cara menginokulasikan satu ose isolat bakteri pada medium urea *broth*. Medium tersebut diinkubasi pada suhu 52°C selama 24 jam. Hasil positif ditunjukkan bila medium berubah warna menjadi pink, namun apabila warna medium tidak berubah warna maka hasilnya negatif (Cappucino dan Sherman, 1986).

Uji reaksi susu litmus dilakukan dengan cara menginokulasikan satu ose isolat bakteri pada medium susu litmus. Reaksi fermentasi laktosa yang bersifat asam ditunjukkan oleh warna medium yang berubah menjadi pink, reaksi reduksi litmus akan mengubah warna medium menjadi putih dengan cincin ungu dibagian atasnya, reaksi proteolisis ditunjukkan oleh warna medium yang menjadi kecoklatan dengan cincin ungu tua dibagian atasnya, sedangkan tidak adanya perubahan warna memperlihatkan reaksi yang terjadi bersifat basa (Cappucino dan Sherman, 1986).

Uji reduksi nitrat dilakukan dengan cara menginokulasikan satu ose isolat bakteri pada medium nitrat *broth*. Medium kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 52°C. Reagen *Solution A* diteteskan ke dalam medium sebanyak lima tetes lalu ditambahkan

kembali *Solution B* dengan jumlah yang sama, medium kemudian dihomogenkan secara perlahan. Hasil uji reduksi nitrat positif ditunjukkan oleh perubahan warna medium menjadi merah bata, namun apabila warna medium tidak menunjukkan perubahan warna maka hasilnya negatif (Cappucino dan Sherman, 1986).

Uji katalase dilakukan dengan menginokulasikan satu ose isolat bakteri, digores zig - zag pada permukaan medium ½ LB agar miring. Medium tersebut diinkubasi pada suhu 52°C selama 24 jam. Hidrogen peroksida (H₂O₂) 3% diteteskan sebanyak 4 - 5 tetes di atas permukaan medium. Hasil positif ditunjukkan bila adanya gelembung udara, namun apabila tidak terdapat gelembung udara maka hasilnya negatif (Cappucino dan Sherman, 1986).

Setiap uji biokimiawi dilakukan dengan tiga kali pengulangan untuk setiap isolat bakteri yang diuji. Pengerjaan uji biokimiawi dilakukan secara aseptik di dalam *transfer box*. Hasil uji biokimiawi digunakan sebagai kriteria pembeda untuk mengidentifikasi bakteri termofilik, yaitu dengan menggunakan buku *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* sebagai acuannya.

h. Isolasi DNA Total (Genom)

DNA total isolat bakteri termofilik amilolitik diisolasi menggunakan KIT (FERMENTAS, Lithuania) dengan beberapa modifikasi pada beberapa langkah proses isolasi. Isolat bakteri yang

akan digunakan untuk proses isolasi terlebih dahulu di kultur dengan menggunakan medium LB *broth* selama 16 jam, pada *waterbath shaker* dengan suhu 52°C sambil di *shaker* dengan kecepatan 125 rpm. 1,5 ml kultur cair setiap bakteri dipindahkan ke dalam tabung sentrifuga (1,5 ml) yang steril. Sampel kemudian disentrifugasi pada kecepatan 6000 rpm selama empat menit. Supernatan yang terbentuk kemudian dibuang dan jangan sampai ada sisa medium dalam tabung sentrifugasi. Endapan sel bakteri kemudian ditambahkan dengan 200 µL larutan NaCL 0,8%, dan diresuspensi dengan cara membolak-balikan tabung sebanyak 30 - 50 kali. Tahap selanjutnya adalah penambahan 400 µL larutan lisis (*lysis solution*) ke dalam tabung sentrifuga. Tabung tersebut kemudian diinkubasi dalam *waterbath shaker* pada suhu 65°C selama 15 menit. Kloroform sebanyak 600 µL ditambahkan ke dalam tabung, lalu disentrifugasi pada kecepatan 13.000 rpm selama lima menit. Larutan mix presipitasi disiapkan selama proses sentrifugasi, yaitu sebanyak 80 µL *precipitation solution* dilarutkan dengan menggunakan 720 µL ddH₂O steril. Hasil sentrifugasi akan membentuk tiga fase pada tabung, yaitu fase atas, fase tengah, dan fase bawah. Fase atas diambil dan dipindahkan ke tabung sentrifuga yang baru, kemudian ditambahkan 800 µL larutan mix presipitasi, diresuspensi dengan cara membolak-balikan tabung selama dua menit. Tabung disentrifugasi kembali pada kecepatan 13.000 rpm selama lima menit. Supernatan yang terbentuk dibuang

secara hati-hati, jangan sampai pelet DNA bakteri yang sudah diisolasi ikut terambil. Tahap selanjutnya adalah penambahan 100 μ l NaCl *solution* (pastikan pelet DNA bakteri larut), 300 μ l etanol absolut (100%) dingin, dan penyimpanan sampel pada suhu -20°C selama minimal 24 jam. Sampel yang telah disimpan pada -20°C kemudian disentrifugasi pada kecepatan 12.000 rpm selama lima menit. Supernatan yang terbentuk dibuang secara hati - hati sampai terlihat pelet DNA. Alkohol 70% dingin ditambahkan pada pelet DNA di dalam tabung sentrifuga, kemudian kembali disentrifugasi pada kecepatan 12.000 rpm selama lima menit. Supernatan alkohol pada lapisan atas yang terbentuk dibuang secara hati - hati sampai habis. Tutup tabung sentrifuga dibiarkan terbuka sampai alkohol menguap dan pelet mengering. Pelet DNA kemudian dilarutkan dalam 20 μ L ddH₂O steril dan disimpan pada suhu -20°C untuk digunakan pada proses amplifikasi.

i. Amplifikasi DNA (PCR)

Amplifikasi gen 16S rRNA yang dilakukan dalam penelitian ini mengacu pada metode yang dipaparkan oleh Marchesi *et al.*, (1998) Komposisi *mix* PCR yang digunakan untuk mengamplifikasi gen 16S rRNA terdiri dari Taq *buffer* enzim (NEB U.S.A) 10x sebanyak 2,5 μ L hingga konsentrasi akhirnya 2,5 mM, dNTPs (*mix*) sebanyak 0,5 μ L dengan konsentrasi akhir 0,2 mM setiap dNTP, enzim Taq polimerase

(NEB U.S.A) dengan konsentrasi akhir 1-2,5 U/ μ l, primer 63F dan 1387R dengan konsentrasi akhir sebesar 0,4 μ M masing - masing ditambahkan sebanyak 1,0 μ l serta 1,0 μ L DNA bakteri (total genom). Keseluruhan mix PCR tersebut dicampurkan pada tabung PCR dan ditambahkan ddH₂O steril hingga volumenya menjadi 25 μ L.

Tabung PCR dimasukkan ke dalam mesin PCR (*Perkin Elmer Thermal Cycler*) yang telah diprogram untuk melaksanakan kondisi PCR, yaitu pre-denaturasi awal pada suhu 95°C selama lima menit, denaturasi pada suhu 95°C selama satu menit, *annealing* pada suhu 56°C selama satu menit, elongasi pada suhu 72°C selama satu menit, tahap post-PCR pada suhu 72°C selama lima menit, dan tahap inkubasi pada suhu 4°C tanpa batas waktu. Proses amplifikasi pada mesin PCR dilakukan selama 30 siklus. Amplikon yang terbentuk kemudian dielektroforesis pada gel agarose 0,8% dalam TAE buffer 1X untuk melihat kualitas hasil amplifikasi.

j. Elektroforesis DNA

Langkah pertama dalam proses elektroforesis adalah menyiapkan cetakan gel untuk membuat gel elektroforesis. Gel agarose (FERMENTAS) dibuat dengan konsentrasi 0,8% dalam *buffer* TAE 1X. Gel agarose dididihkan dengan menggunakan *microwave* sampai agar larut. Gel agarose yang sudah hangat - hangat kuku dituangkan ke dalam cetakan yang dilengkapi dengan sisir (*comb*) dan

dibiarkan mengeras pada suhu ruang. Gel dan cetakannya direndam pada *buffer* TAE 1X di kolom elektroforesis. Sampel amplikon DNA hasil PCR dimasukkan ke setiap sumur yang telah dibentuk oleh cetakan sisir. Sampel kemudian dielektroforesis pada tegangan 75 volt selama 45 menit. Gel berisi pita DNA hasil elektroforesis diwarnai dengan menggunakan larutan *Etidium Bromide* (EtBr) selama lima menit. Gel yang sudah diwarnai kemudian diamati dengan menggunakan sinar UV (UV *transluminator*). Fragmen atau pita DNA yang muncul didokumentasikan dengan menggunakan kamera digital (Canon).

k. ***Sikuensing* DNA**

Proses sikuensing dilakukan dengan mesin *sequencer*, namun karena keterbatasan fasilitas di laboratorium maka proses ini dilakukan di instansi lain. Sikuensing gen *16S rRNA* dilakukan dari satu arah, yaitu dari arah *forward* dengan menggunakan primer 63F.

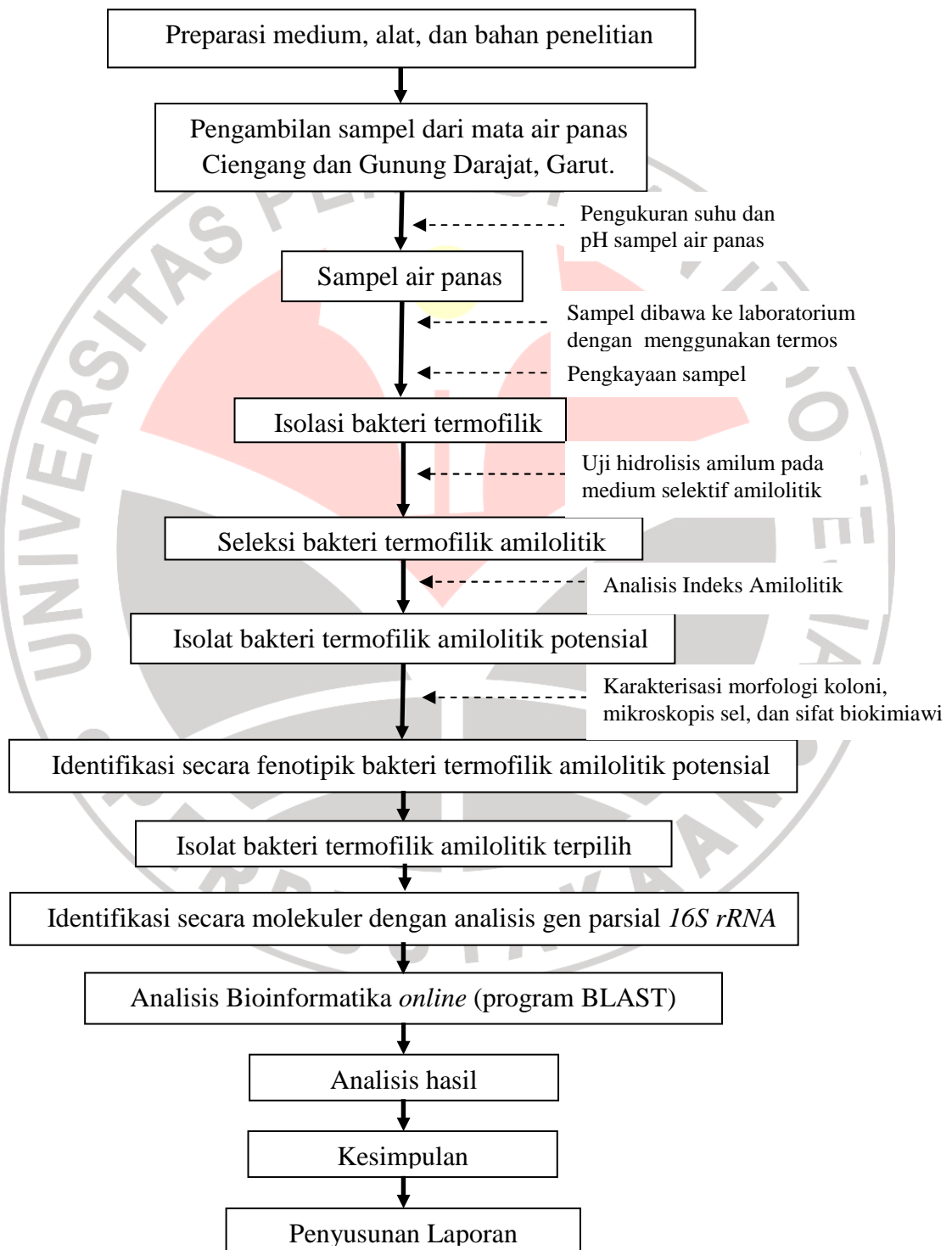
F. Analisis Data

Analisis data berupa karakterisasi dan identifikasi isolat bakteri termofilik amilolitik terpilih dilakukan dalam dua tahapan. Tahap awal adalah identifikasi hingga tingkat taksa genus, yang dilakukan melalui analisis karakteristik fenotip untuk setiap isolat terpilih, yaitu dengan menggunakan acuan buku *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. Hasil pengamatan makroskopis koloni, mikroskopis sel, dan hasil uji biokimia menjadi karakter fenotipik yang mendasari proses identifikasi secara konvensional.

Tahap kedua adalah identifikasi sampai tingkat taksa spesies. Hal ini dilakukan sebagai verifikasi identifikasi secara konvensional, yaitu melalui analisis sikuen gen *16S rRNA* dan menggunakan metode bioinformatika secara *online*. Hasil sikuensing kemudian dibandingkan dengan data gen *16S rRNA* yang ada pada *database* GenBank NCBI (*National Centre for Biotechnology Information*). Hal tersebut dilakukan untuk melihat homologi dan komparasi sikuen parsial gen *16S rRNA* isolat bakteri termofilik amilolitik (sikuen *query*) dengan *database* yang tersedia secara *online*, yaitu menggunakan program BLASTN *version* 2.2.25.

G. Alur Penelitian

Penjelasan mengenai prosedur penelitian dapat dilihat dalam bentuk diagram alir, yaitu:



Gambar 3.1. Diagram Alir Penelitian