

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

Tahapan dalam penelitian ini meliputi, isolasi serta pembiakan bakteri dari sumber air panas Plantungan, Kendal dan isolasi protease dari bakteri tersebut serta karakterisasi enzim yang didapatkan. Isolasi dan pembiakan bakteri dilakukan dengan metode cawan gores menggunakan media nutrisi agar (NA). Isolasi protease diawali dengan mengisolasi protease dari media, dilanjutkan fraksinasi bertingkat menggunakan amonium sulfat, kemudian proses dialisis dalam bufer fosfat.

3.1. Sampel, Alat dan Bahan

3.1.1. Sampel

Biakan murni bakteri yang digunakan dalam penelitian ini dibiakkan dari isolat murni yang diperoleh dari sumber air panas Plantungan, Kendal di Laboratorium Mikrobiologi, Jurusan Biologi, FMIPA, Universitas Diponegoro.

3.1.2. Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini, antara lain :

1. Sentrifus "Dynac"
2. Otoklaf "All American, model No. 25X"
3. Spektrofotometer UV-Vis "Shimadzu-1201"
4. Inkubator "Blue M"
5. Lemari pendingin "Goldstar GR-181HGS"
6. Pengguncang berpenangas air "Precision, GCA Corp."

7. Timbangan "Sartorius Basic"
8. pH meter "Orion - 420A"
9. Pemanas
10. Pengaduk magnetik "Quart"
11. Peralatan gelas

3.1.3. Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini, antara lain :

1. Biakan murni bakteri dari sumber air panas Plantungan, Kendal
2. Nutrien agar p.a
3. Nutrien broth p.a.
4. Pepton p.a.
5. Gelatin p.a.
6. Aquades steril
7. Natrium dihidrofosfat p.a.
8. Dinatrium hidrofosfat p.a.
9. Amonium sulfat kristal p.a.
10. Natrium hidroksida p.a.
11. Barium klorida p.a.
12. Selofan
13. Kasein p.a.
14. Albumin Serum Darah Sapi (BSA) p.a.
15. Asam klorida p.a.
16. Asam Trikloroasetat (TCA) p.a.

3.2. Variabel Penelitian

3.2.1. Variabel yang Diukur

- Aktivitas protease
- Kadar protein protease
- Aktivitas spesifik protease

3.2.2. Variabel Bebas

- Derajat keasaman (pH)
- Suhu
- Waktu inkubasi

3.2.3. Variabel yang Dikonstankan

- Konsentrasi substrat
- Volume substrat
- Volume enzim

3.3. Cara Kerja

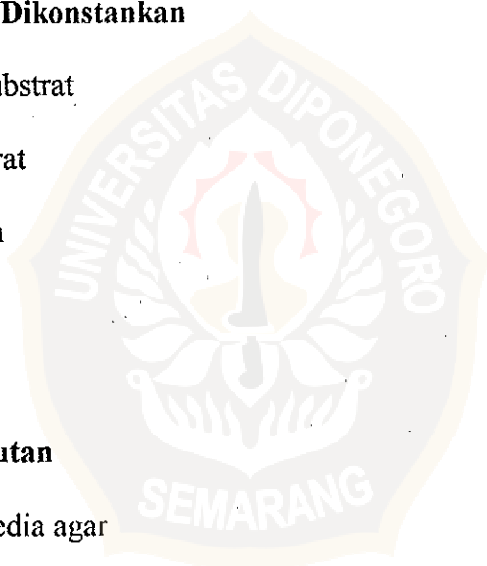
3.3.1. Preparasi Larutan

a. Pembuatan media agar

Sebanyak 2,3 g NA (nutrien agar) dilarutkan dalam aquades hingga volumenya menjadi 100 mL.

b. Pembuatan media cair

Sebanyak 0,8 g NB (nutrien broth) dilarutkan dalam aquades hingga volumenya menjadi 100 mL.



c. Bufer fosfat 0,2 M pH = 7,5

Larutan NaH_2PO_4 0,2 M sebanyak 16 mL ditambah 84 mL larutan Na_2HPO_4 0,2 M, dilarutkan dalam aquades hingga volumenya menjadi 200 mL.

d. Bufer fosfat 0,002 M pH = 7,5

Larutan bufer fosfat 0,2 M pH = 7,5 sebanyak 1 mL dilarutkan dalam aquades hingga volumenya menjadi 100 mL.

e. Larutan NaH_2PO_4 0,2 M

Sebanyak 27,8 g NaH_2PO_4 kristal dilarutkan dalam aquades hingga volumenya menjadi 1 L.

f. Larutan Na_2HPO_4 0,2 M

Sebanyak 52,65 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ kristal atau 71,7 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ kristal dilarutkan dalam aquades hingga volumenya menjadi 1 L.

g. Larutan BaCl_2 0,01 M

Sebanyak 0,2083 g BaCl_2 dilarutkan dalam aquades hingga 100 mL.

h. Larutan TCA 30 %

Sebanyak 30 g TCA dilarutkan dalam aquades hingga 100 mL.

i. Reagen Lowry

- Lowry A

Sebanyak 10 g Na_2CO_3 ditambah 2 g NaOH dan 0,2 g Natrium Kalium Tartrat dilarutkan dalam aquades hingga volumenya menjadi 500 mL.

- Lowry B

Sebanyak 0,6 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ dilarutkan dalam aquades hingga volumenya menjadi 100 mL.

- Lowry C

Lowry A sebanyak 50 bagian ditambah 1 bagian Lowry B

- Lowry D

Folin ciocalteu fenol 1 bagian ditambah aquades 1 bagian.

- j. Pembuatan substrat kasein

Kasein sebanyak 1,2 g dilarutkan dalam aquades hingga volumenya menjadi 100 mL.

- k. Pembuatan standar kasein

Kasein sebanyak 0,03 g dilarutkan dalam aquades hingga volumenya menjadi 100 mL (konsentrasi 0,3 mg/mL). Untuk membuat variasi konsentrasi dilakukan pengenceran (0,3; 0,24; 0,18; 0,12; 0,06 mg/mL).

- l. Pembuatan standar BSA

BSA sebanyak 0,03 g dilarutkan dalam aquades hingga volumenya menjadi 100 mL (konsentrasi 0,3 mg/mL). Untuk membuat variasi konsentrasi dilakukan pengenceran (0,3; 0,24; 0,18; 0,12; 0,06 mg/mL).

3.3.2. Isolasi Bakteri

Sampel dari sumber air panas dipindahkan ke media pepton, diinkubasi pada temperatur 40 °C selama 24 jam. Sampel tersebut dipindah ke media nutrien agar (NA) dengan menggunakan jarum ose, diinkubasi 40 °C selama 24 jam. Proses selanjutnya adalah pemisahan koloni-koloni yang ada pada media NA. Masing-masing koloni dipindahkan ke media agar miring dengan menggunakan jarum ose, diinkubasi 40 °C selama 24 jam, sehingga didapatkan biakan murni bakteri.

3.3.3. Pembiakan Bakteri

Biakan murni bakteri yang telah didapatkan dari proses isolasi ditumbuhkan pada media NA steril dengan menggunakan jarum ose. Diinkubasi pada temperatur 40 °C selama 24 jam. Hasil biakan dipindahkan ke media fermentasi (NB), diinkubasi pada temperatur 40 °C dengan variasi waktu 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, dan 24 jam, untuk menentukan waktu fermentasi optimum enzim.⁽²⁾

3.3.4. Isolasi Protease

3.3.4.1. Fraksinasi Amonium Sulfat

Larutan hasil fermentasi disentrifus dengan kecepatan 3400 rpm selama 3,5 menit. Supernatannya merupakan ekstrak kasar enzim.

Pemisahan protein enzim dari hasil ekstraksi dilakukan dengan penambahan amonium sulfat dengan tingkat kejenuhan 0 – 20 %, 20 – 40 %, 40 – 60 %, 60 – 80 %, dan 80 – 100 %. Amonium sulfat yang telah ditimbang sesuai dengan fraksi yang dikehendaki 0 - 20 % dan seterusnya (sesuai tabel), dimasukkan ke dalam enzim kasar sedikit demi sedikit sambil diaduk dalam penangas es. Campuran didiamkan semalam dalam keadaan dingin, kemudian disentrifus dengan kecepatan 3500 rpm selama 42 menit. Endapan dipisahkan dan disuspensikan dengan bufer fosfat 0,2 M pH = 7,5. Endapan tersebut merupakan fraksi 0 - 20 %. Supernatan diperlakukan sama dengan di atas hingga didapatkan fraksi dengan tingkat kejenuhan 20 - 40 %, 40 - 60 %, 60 - 80 %, dan 80 - 100 %.⁽²⁰⁾

3.3.4.2. Dialisis

Untuk membebaskan enzim dari amonium sulfat yang masih terdapat dalam tiap fraksi, dilakukan dialisis dengan menggunakan selofan. Kantong selofan direbus selama 30 menit lalu dicuci dengan aquades. Salah satu ujung selofan diikat lalu diisi dengan larutan enzim. Kemudian ujung yang satu diikat dengan hati-hati untuk menghindari penggelembungan. Selofan diikat dengan benang lalu dimasukkan dalam beker gelas yang sudah berisi larutan bufer fosfat 0,002 M pH = 7,5. Bufer diaduk dengan pengaduk magnetik dan diganti tiap 2 jam sekali. Bufer yang diganti diuji kandungan amonium sulfatnya menggunakan larutan BaCl₂. Dialisis dihentikan jika hasil pengujian tidak lagi terdapat endapan putih.⁽²⁰⁾

3.3.5. Penentuan Panjang Gelombang Optimum Kasein

Kasein 0,18 mg/mL dibaca serapannya pada berbagai panjang gelombang dengan alat spektrofotometer UV-Vis.

3.3.6. Penentuan Kurva Standar Kasein

Kasein dalam berbagai konsentrasi dibaca serapannya pada panjang gelombang optimum kasein dengan alat spektrofotometer UV-Vis.

3.3.7. Penentuan Panjang Gelombang Optimum BSA

BSA 0,18 mg/mL dibaca serapannya pada berbagai panjang gelombang dengan alat spektrofotometer UV-Vis.

3.3.8. Penentuan Kurva Standar BSA

BSA dalam berbagai konsentrasi dibaca serapannya pada panjang gelombang optimum BSA dengan alat spektrofotometer UV-Vis.

3.3.9. Uji Aktivitas Enzim

Larutan kasein sebanyak 1 mL ditambah larutan enzim sebanyak 0,3 mL, disuspensikan dalam 0,7 mL bufer fosfat 0,2 M pH = 7,5, diinkubasi pada temperatur 40 °C selama 15 menit. Kemudian ditambah larutan TCA 30 % sebanyak 3 mL, dikocok dan dibiarkan 30 menit dalam inkubator pada temperatur 40 °C. Untuk memisahkan endapan, campuran disentrifus pada 5000 rpm selama 30 menit. Supernatan dibaca serapannya dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang optimum kasein. Sebagai kontrol adalah campuran substrat, TCA, dan enzim yang telah dimatikan (tidak memiliki aktivitas). Aktivitas enzim dicari secara regresi linear terhadap kurva standar kasein.

3.3.10. Penentuan Kadar Protein Enzim (Metode Lowry)

Larutan enzim sebanyak 0,6 mL ditambah 3 mL larutan Lowry C, dibiarkan selama 20 menit pada temperatur 40 °C. Tambahkan 0,3 mL larutan Folin dengan cepat dan dibiarkan kembali selama 45 menit pada temperatur 40 °C sambil sesekali dikocok. Larutan dibaca pada panjang gelombang optimum dari BSA dengan spektrofotometer UV-Vis. Kadar protein enzim ditentukan secara regresi linear terhadap kurva standar BSA.⁽¹³⁾

3.3.11. Penentuan Aktivitas Spesifik Optimum Protease pada pH 7,0 – 7,8

Protease diuji aktivitasnya pada temperatur 40 °C dengan pH yang bervariasi (7,0; 7,2; 7,4; 7,6; 7,8).

3.3.12. Penentuan Aktivitas Spesifik Optimum Protease pada Temperatur 38 – 46 °C

Hasil penentuan pH pada 3.3.11, digunakan untuk menentukan aktivitas spesifik optimum protease pada berbagai temperatur (38, 40, 42, 44, 46 °C).

3.3.13. Penentuan Aktivitas Spesifik Optimum Protease pada Waktu Inkubasi 5 – 25 menit

Hasil penentuan pH dan temperatur pada 3.3.11 dan 3.3.12, digunakan untuk menentukan aktivitas spesifik optimum protease pada berbagai waktu inkubasi (5, 10, 15, 20, dan 25 menit).

3.3.14. Penentuan Unit Aktivitas dan Aktivitas Spesifik Protease

- Satuan unit aktivitas enzim (U) didefinisikan sebagai :

Aktivitas enzim yang menyebabkan berkurangnya 1 mikrogram substrat yang diubah menjadi produk tiap satuan waktu

$$1 \text{ U aktivitas protease} = \frac{1 \mu\text{g substrat kasein}}{\text{menit}}$$

- Aktivitas spesifik enzim didefinisikan sebagai :

Satuan unit aktivitas enzim tiap miligram protein yang dikandung

$$\text{Aktivitas spesifik protease} = \frac{\text{Unit aktivitas protease}}{\text{mg protein}}$$