

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

Tahapan dalam penelitian ini meliputi, isolasi bakteri, produksi enzim serta isolasi enzim protease termofilik. Isolasi bakteri dilakukan dengan metode skreening menggunakan medium gelatin 3%. Produksi enzim dilakukan dengan menggunakan medium skim milk broth. Sedangkan isolasi enzim dilakukan dengan metode ekstraksi, dilanjutkan fraksinasi bertingkat menggunakan amonium sulfat, kemudian proses dialisis dalam buffer fosfat.

3.1. Sampel, Alat dan Bahan

3.1.1. Sampel

Isolat bakteri termofilik yang digunakan dalam penelitian ini diisolasi dari sumber air panas Plantungan Kendal.

3.1.2. Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain:

- a. Spektrofotometer UV-Vis “Spektronik”
- b. Pengaduk Magnetik “Quart”
- c. Selofan
- d. Mikroskop “NIKON”
- e. pH Meter “Handy Lab”
- f. Timbangan “Sartorius Basic”

- g. Sentrifuge “Dynac”
- h. Alat-alat Gelas
- i. Botol Semprot
- j. Inkubator “Heraeus Instruments”
- k. Autoklaf “All American, mode No. 25”
- l. Shaker Inkubator “Precision, GCA Corp.”
- m. Lemari Pendingin “Goldstar GR-181 HGS”
- n. Jarum Ose

3.1.3. Bahan

Bahan-bahan yang digunakan antara lain:

- a. Pepton
- b. Nutrien Agar
- c. Gelatin
- d. Gram A
- e. Gram B
- f. Gram C
- g. Gram D
- h. Nutien Broth
- i. Susu Skim
- j. Amonium sulfat p.a
- k. Natrium karbonat p.a
- l. Natrium kalium tartrat p.a



- m. Tembaga sulfat pentahidrat p.a
- n. Folin ciocalteau fenol p.a
- o. Natrium dihidrofosfat p.a
- p. Dinatrium hidrofosfat p.a
- q. Natrium hidroksida p.a
- r. Barium klorida p.a
- s. Kasein p.a
- t. Bovine Serum Albumin (BSA) p.a
- u. Asam Trikloroasetat (TCA) p.a

3.2. Variabel Penelitian

3.2.1. Variabel yang diukur

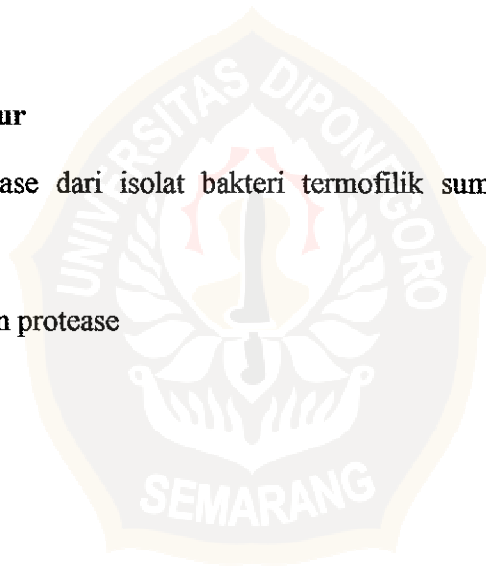
- a. Aktivitas enzim protease dari isolat bakteri termofilik sumber air panas
Plantungan Kendal
- b. Aktivitas spesifik enzim protease

3.2.2. Variabel bebas

- a. Suhu
- b. Waktu inkubasi
- c. Derajat keasaman (pH)

3.2.3. Variabel yang dikonstankan

- a. Konsentrasi substrat
- b. Volume substrat
- c. Volume enzim



3.3. Cara Kerja

3.3.1. Preparasi larutan

a. Pembuatan medium Pepton 5 %

Pepton sebanyak 5 g dilarutkan dalam 100 mL akuades, dan dipanaskan sampai larut. Lalu disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121 °C selama 15 menit.

b. Pembuatan medium Gelatin 3 %

Gelatin sebanyak 3 g dilarutkan dalam 100 mL akuades, dipanaskan sampai larut. Lalu disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121 °C selama 15 menit.

c. Pembuatan medium NA (Nutrien Agar)

NA sebanyak 23 g dilarutkan dalam 1000 mL akuades, dan dididihkan dalam penangas air sampai larut. Lalu disterilkan dengan *autoklaf* pada suhu 121 °C selama 15 menit.

d. Pembuatan medium Skim Milk Broth (NB + Susu skim 2 %)

NB (Nutrien Broth) sebanyak 8 g dilarutkan dalam 1000 mL akuades, dan dididihkan dalam penangas air sampai larut. Lalu disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121 °C selama 15 menit. Susu skim sebanyak 4 g dilarutkan dalam 200 mL akuades dan dipanaskan dalam penangas air sampai larut. Lalu disterilkan dengan teknik sterilisasi bertingkat. Dipanaskan dalam penangas air yang bersuhu 100 °C, lalu didinginkan dan diulangi lagi keesokan harinya selama 3 hari. Setelah itu dicampur dengan medium NB dalam kondisi steril.

- e. Buffer 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 akuades hingga volumenya menjadi 200 mL.

- f. Buffer fosfat 0,002 M pH 7,5

Larutan buffer fosfat 0,2 M pH 7,5 sebanyak 1 mL dilarutkan dalam akuades hingga volumenya menjadi 100 mL.

- g. Larutan NaH_2PO_4 0,2 M

Sebanyak 27,8 g NaH_2PO_4 kristal dilarutkan dengan akuades hingga volumenya menjadi 1000 mL.

- h. 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 akuades hingga volumenya menjadi 1L.

- i. Larutan BaCl_2 0,001 M

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

- j. Larutan TCA 30 %

Sebanyak 30 g TCA dilarutkan dalam akuades hingga 100 mL.

- k. Reagen Lowry

- a. Lowry A

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

- b. Lowry B

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

c. Lowry C

Lowry A sebanyak 50 bagian ditambah 1 bagian Lowry B

d. Lowry D

Folin ciocalteu phenol 1 bagian ditambah akuades 1 bagian.

l. Pembuatan substrat kasein

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

m. Pembuatan standar kasein

Kasein 0,03 g dilarutkan dalam akuades hingga volumenya menjadi 100 mL (konsentrasi 300 $\mu\text{g/mL}$). Untuk membuat variasi konsentrasi dilakukan pengenceran (300, 240, 180, 120, 60 $\mu\text{g/mL}$).

n. Pembuatan standar BSA (Bovine Serum Albumin)

BSA 0,03 g dilarutkan dalam akuades hingga volumenya menjadi 100 mL (konsentrasi 300 $\mu\text{g/mL}$). Untuk membuat variasi konsentrasi dilakukan pengenceran (300, 240, 180, 120, 60 $\mu\text{g/mL}$).

3.3.2. Isolasi Bakteri

3.3.2.1. Isolasi Bakteri Termofilik

Sampel air panas diambil sebanyak 1 mL dan dituang ke dalam tabung reaksi yang berisi medium pepton 5 %, setelah itu diinkubasikan pada suhu 40 °C selama 24 jam. Dari medium pepton diambil satu ose kemudian diinokulasikan ke dalam cawan petri yang berisi medium Nutrien Agar dengan metode goresan dan diinkubasikan pada suhu 40 °C selama 24 jam. Setelah diperoleh isolat murni,

dibuat goresan isolat pada medium agar miring dan diinokulasikan pada suhu dan waktu yang sama.

3.3.2.2. Pengecatan Gram

Dibuat olesan (smear) tipis isolat pada gelas benda, kemudian difiksasi dengan melewatkannya pada nyala api beberapa kali. Cat gram A ditetaskan pada olesan bakteri dan dibiarkan selama satu menit kemudian dicuci dengan air mengalir, setelah itu dikering anginkan. Cat gram B ditetaskan pada olesan bakteri dan dibiarkan selama satu menit kemudian dicuci dengan air mengalir, setelah itu dikering anginkan. Cat gram C ditetaskan pada olesan bakteri dan dibiarkan selama setengah menit kemudian dicuci dengan air mengalir, setelah itu dikering anginkan. Cat gram D ditetaskan pada olesan bakteri dan dibiarkan selama dua menit kemudian dicuci dengan air mengalir, dan dikering anginkan. kemudian diamati dengan mikroskop dari pembesaran lemah menuju pembesaran kuat, dan sebelumnya ditetesi minyak emersi.

3.3.2.3. Pengujian Aktivitas Protease

Isolat bakteri murni diambil dengan ujung jarum ose kemudian diinokulasikan ke dalam medium gelatin 3 %, diinkubasikan pada suhu 40 °C selama 24 jam. Kemudian diuji dengan menyimpannya dalam freezer selama 15 menit. Apabila medium tetap cair maka isolat bakteri tersebut menghasilkan protease. tetapi jika memadat berarti reaksi negatif (tidak terjadi hidrolisis protein).

3.3.3. Produksi Enzim

Isolat bakteri diinokulasikan pada medium NA miring dan diinkubasikan selama 24 jam pada suhu 40 °C. Kemudian isolat bakteri diinokulasikan pada medium stater. Sebagai stater adalah medium NB (Nutrien Broth) 50 mL dan diinkubasikan pada suhu 40 °C selama 8 jam. Setelah itu diukur absorbansinya pada panjang gelombang 600 nm. Absorbansi stater diusahakan 0,155. Medium stater diambil 2,5 mL dan diinokulasikan ke dalam 250 mL medium Skim Milk Broth (Nutrien Broth + Susu skim 2 %) dan difermentasikan dengan shaker inkubator pada suhu 40 °C selama 8 jam.

3.3.4. Isolasi Enzim

3.3.4.1. Ekstraksi

Cairan kultur yang diperoleh kemudian disentrifuge dengan kecepatan 2500 rpm selama 15 menit, filtrat yang didapat merupakan enzim ekstrak kasar.

3.3.4.2. Fraksinasi dengan Amonium Sulfat

Amonium sulfat ditimbang sesuai dengan yang dibutuhkan untuk tiap tingkat fraksinasi (Tabel 17). Ammonium sulfat yang sudah ditimbang dimasukkan ke dalam supernatan sedikit demi sedikit sambil diaduk. Pengadukan dilakukan dengan *magnetic stirrer* secara perlahan dan dilakukan dalam tempat yang direndam dalam es yang diberi garam. Campuran dibiarkan dalam keadaan dingin selama 2 jam lalu disentrifuge hingga diperoleh endapan (0-20 % jenuh) dan filtrat. Filtrat difraksinasi 20-40 % jenuh, lalu diperlakukan sama untuk 40-60 %, dan seterusnya.

60-80 % jenuh. Endapan yang diperoleh tiap fraksi dilarutkan dengan buffer fosfat 0,2 M; pH 7,5.

3.3.4.3. Proses Dialisis

Untuk membebaskan enzim dari ammonium 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 dengan pH 7,5. Bufer diaduk dengan *magnetic stirrer* dan diganti tiap 2 jam sekali. Bufer yang diganti diuji kandungan amonium sulfatnya dengan menggunakan larutan BaCl_2 0,001M.

3.3.4.4. Uji Aktivitas Enzim

3.3.4.4.1. Penentuan λ Optimum Kasein

Kasein 180 $\mu\text{g/mL}$ dibaca serapannya pada berbagai panjang gelombang

3.3.4.4.2. Penentuan Kurva Standar Kasein

Kasein dalam berbagai konsentrasi (300, 240, 180, 120, 60 $\mu\text{g/mL}$) dibaca serapannya pada panjang gelombang optimum kasein dengan alat spektrofotometer.

3.3.4.4.3. Penentuan λ Optimum BSA

BSA 180 $\mu\text{g/mL}$ dibaca serapannya pada berbagai panjang gelombang.

3.3.4.4.4. Penentuan Kurva Standar BSA

BSA dalam berbagai konsentrasi (300, 240, 180, 120, 60 $\mu\text{g/mL}$) dibaca serapannya pada panjang gelombang optimum BSA dengan alat spektrofotometer.

3.3.4.4.5. Penentuan Aktivitas Enzim Protease

Sebanyak 1,2 g kasein dilarutkan dalam 100 mL aquades. Kemudian mengambil larutan kasein sebanyak 1,0 mL dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi, lalu tambahkan larutan enzim sebanyak 0,3 mL dan 0,7 mL bufer fosfat 0,002 M, diinkubasi pada suhu 40 °C selama 15 menit.

Selanjutnya tambah dengan 3 mL larutan TCA 30 % kemudian dikocok. Dibiarkan selama 30 menit dalam inkubator pada suhu 40 °C. Setelah itu disentrifuge dengan kecepatan 2500 rpm selama 15 menit, kemudian endapan dipisahkan. Supernatan diambil, dibaca serapannya dengan spektrofotometer UV-Vis pada λ optimum kasein.

Sebagai kontrol adalah kasein, TCA dan enzim yang telah dimatikan (tidak memiliki aktivitas). Kemudian dihitung aktivitas enzim terhadap standar kasein.

3.3.4.4.6. Penentuan Kadar Protein dengan Metode Lowry

Sebanyak 1 mL larutan enzim ditambah 5 mL reagen Lowry C dikocok-kocok, lalu dibiarkan 20 menit. Reagen Lowry D 0,5 mL ditambahkan dengan cepat dan didiamkan selama 45 menit pada suhu kamar dengan sesekali digojog. Serapannya dibaca pada panjang gelombang optimum BSA dengan spektrofotometer UV-Vis.

3.3.4.5. Karakterisasi Enzim

3.3.4.5.1. Penentuan Temperatur Optimum

Larutan enzim pada berbagai variasi temperatur (34, 36, 38, 40, 42, 44, 46 °C) ditentukan aktivitasnya dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang optimum kasein.

3.3.4.5.2. Penentuan pH Optimum

Larutan enzim pada berbagai variasi pH (7,0; 7,3; 7,5; 7,8; 8,0) ditentukan aktivitasnya dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang optimum kasein.

3.3.4.5.3. Penentuan Waktu Inkubasi Optimum

Larutan enzim pada berbagai variasi waktu inkubasi (5, 10, 15, 20, 25 menit) ditentukan aktivitasnya dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang optimum kasein.

3.3.5. Penentuan Aktivitas Unit dan Aktivitas Spesifik Enzim Protease

a. Satuan unit aktivitas enzim (Unit) didefinisikan sebagai:

Jumlah mikromol substrat yang berkurang tiap satuan waktu inkubasi

$$1 \text{ Unit aktivitas enzim protease} = - \frac{1 \mu\text{mol kasein}}{\text{satuan waktu inkubasi}}$$

b. Aktivitas spesifik enzim didefinisikan sebagai:

Jumlah unit aktivitas enzim tiap miligram protein yang dikandung

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

