

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

Tahapan dalam penelitian ini meliputi: isolasi bakteri, produksi enzim, serta isolasi enzim protease termofilik. Isolasi bakteri dilakukan dengan metode goresan menggunakan medium nutrisi agar. Produksi enzim dilakukan dengan menggunakan medium skim milk broth. Sedangkan isolasi enzim dilakukan dengan metode ekstraksi, dilanjutkan fraksinasi bertingkat menggunakan ammonium sulfat, kemudian proses dialisis dalam buffer fosfat.

3.1 Sampel, Alat Dan Bahan

3.1.1 Sampel

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah isolat murni bakteri yang merupakan hasil isolasi dari sumber air panas Gonoharjo, Boja.

3.1.2. Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain:

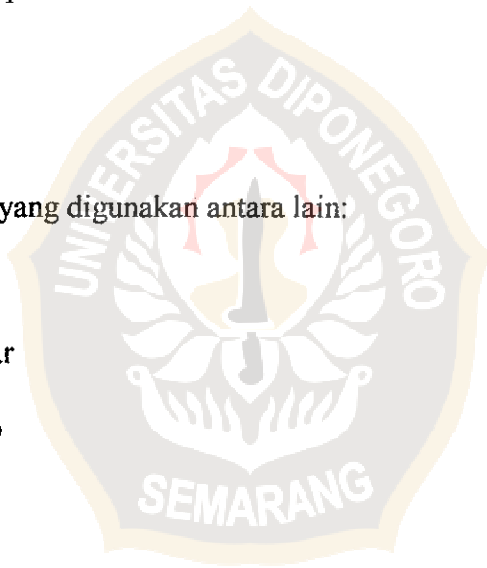
1. Sentifuge “Dynac”
2. Autoklave “All American, mode No. 25”
3. Inkubator “Heraeus Instruments”
4. Lemari pendingin “Goldstar GR-181 HGS”
5. Shaker Inkubator “Precesion, GCA Corp”
6. Spektrofotometer UV-Vis “Spektronik”

7. Timbangan “Sartorius Basic”
8. Kompor listrik (maspion s-300)
9. Peralatan gelas: gelas beker, erlenmeyer, gelas ukur, labu tukar, cawan petri, tabung reaksi, pengaduk.
10. Selofan
11. Mikroskop “NIKON”
12. pH Meter “Handy Lab”
13. Pengaduk magnetik “Quart”
14. Botol Semprot

3.1.3. Bahan

Bahan-bahan yang digunakan antara lain:

- a. Pepton 5 %
- b. Nutrien agar
- c. Gelatin 3 %
- d. Gram A
- e. Gram B
- f. Gram C
- g. Gram D
- h. Nutrien Broth
- i. Susu skim
- j. Ammonium sulfat p.a
- k. Natrium karbonat p.a



- l. Natrium kalium tartat 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 trikloro asetat p.a

3.2. Variabel Penelitian

3.2.1. Variabel Isolasi Bakteri

3.2.1.1. Variabel yang dikonstantkan

- * suhu inkubasi
- * waktu inkubasi

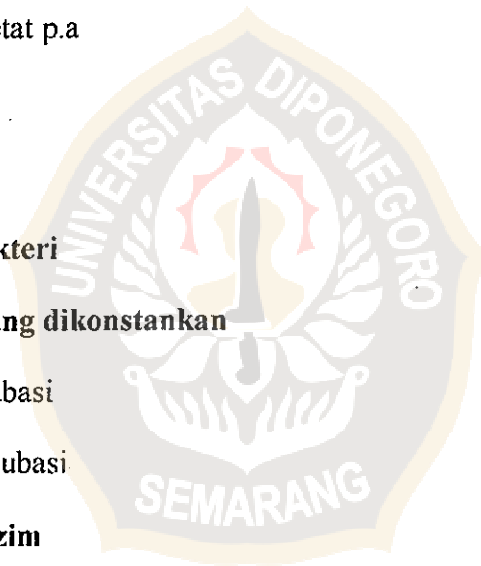
3.2.2. Variabel Isolasi Enzim

3.2.2.1. Variabel Yang Diukur

- Aktivitas enzim protease dari isolat bakteri termofilik sumber air panas
Gonoharjo Boja
- Aktivitas spesifik enzim protease

3.2.2.2. Variabel Bebas

- a. Suhu inkubasi



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

3.2.3. Variabel Yang Dikonstantakan untuk uji aktivitas enzim

- Konsentrasi substrat kasein
- Volume substrat kasein
- Volume enzim

3.3 Cara Kerja

3.3.1. Preparasi Larutan

- a. 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 aquades hingga volumenya menjadi 200 mL.

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

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

- c. Larutan NaH_2PO_4 0,2 M

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

- d. 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

e. Larutan TCA 30 %

Sebanyak 30 g TCA dilarutkan dalam aquades hingga 100 mL

f. Reagen Lowry

▪ 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

▪ Lowry B

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

▪ Lowry C

Lowry A sebanyak 50 bagian ditambah 1 bagian Lowry B

▪ Lowry D

Folin ciocalteu phenol 1 bagian ditambah akuades 1 bagian

g. Pembuatan substrat kasein

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

h. Pembuatan standar kasein

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

i. Pembuatan standar BSA (Bovine Serum Albumin)

BSA sebanyak 0,03 g dilarutkan dalam akuades hingga volumenya menjadi 100 mL. (konsentrasi 300 μ g/mL). Untuk membuat variasi konsentrasi dilakukan pengenceran (300, 240, 180, 120, 60 μ g/mL)

k. Pembuatan medium Pepton 5 %

Pepton sebanyak 5 g dilarutkan dalam 100 mL akuades, dan dipanaskan sampai larut. Kemudian disterilkan dengan autoklaf pada temperatur 121 $^{\circ}$ C selama 15 menit.

l. Pembuatan medium Gelatin 3 %

Gelatin sebanyak 3 g dilarutkan dalam 100 mL akuades, dipanaskan sampai larut. Lalu disterilkan dengan autoklaf pada temperatur 121 $^{\circ}$ C selama 15 menit.

m. Pembuatan medium NA (Nutrien Agar)

NA sebanyak 23 g dilarutkan dalam 1 L akuades, dan dididihkan dalam penangas air sampai larut. Lalu sterilkan dengan autoklaf pada temperatur 121 $^{\circ}$ C selama 15 menit.

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

NB (Nutrien Broth) sebanyak 8 g dilarutkan dalam 1L akuades, dan dididihkan dengan penangas air sampai larut. Lalu sterilkan dengan autoklaf pada temperatur 121 $^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ C, lalu

didinginkan dan diulangi lagi keesokan harinya selama 3 hari. Setelah itu dicampur dengan medium NB dalam kondisi steril.

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 diinkubasi pada suhu 40 °C selama 24 jam. Diamati pertumbuhan bakteri pada media pepton tersebut, setelah itu dari media pepton diambil satu ose kemudian diinokulasi ke dalam cawan petri yang berisi medium nutrisi agar dengan metode goresan dan diinkubasi pada suhu 40 °C selama 24 jam. Dilihat adanya pertumbuhan, kemudian pada masing-masing koloni yang tumbuh dan memisah, dilakukan inokulasi ke dalam medium miring nutrisi agar dengan suhu dan waktu inkubasi yang sama, begitu seterusnya sampai diperoleh isolat murni. Setelah diperoleh isolat murni, dibuat goresan isolat pada medium miring nutrisi agar dan disimpan sebagai stok isolat.

3.3.2.2 Pengecatan Gram

Dibuat olesan (smear) tipis isolat pada gelas benda, kemudian difiksasi dengan melewatkannya beberapa kali pada nyala api. 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, setelah itu dikering anginkan. Diamati di bawah mikroskop dengan pembesaran lemah kemudian dengan pembesaran kuat, dan sebelumnya ditetesi dengan minyak emersi.

3.3.2.3 Pengujian Aktivitas Protease

Isolat bakteri murni diambil dengan menggunakan ujung jarum ose bulat kemudian diinokulasikan ke dalam medium gelatin cair 3 %, setelah itu diinkubasi pada suhu 40⁰ C selama 24 jam kemudian disimpan dalam almari es bersuhu di bawah 10⁰ C selama ±15 menit untuk mengetahui apakah terjadi hidrolisis atau tidak. Bila setelah ±15 menit dalam almari es medium tetap cair, maka reaksi positif (terjadi hidrolisis protein gelatin) tetapi bila memadat kembali berarti reaksi negatif (tidak terjadi hidrolisis protein gelatin).

3.3.2.4. Produksi Enzim

Isolat bakteri diinokulasikan pada medium NA miring dan diinkubasikan selama 24 jam pada suhu 40⁰C. Kemudian isolat bakteri diinokulasikan pada medium stater. Sebagai medium stater adalah medium NB 50mL dan diinkubasikan pada suhu 40⁰C selama 10 jam. Setelah itu diukur transmitansinya pada panjang gelombang 600 nm. Absorbansi stater diusahakan 0,155. Medium stater diambil 2,5 mL dan dinokulasikan ke dalam 250 mL medium Skim Milk

Broth (Nutrien Broth + Susu skim 2 %) dan difermentasikan dengan shaker inkubator pada suhu 40 °C selama 10 jam. Kemudian diperoleh cairan kultur.

3.4 Isolasi Enzim

3.4.1. Ekstraksi

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

3.4.2. Fraksinasi dengan Garam Ammonium Sulfat^[15]

Ammonium sulfat ditimbang sesuai dengan yang dibutuhkan untuk tiap tingkat fraksinasi dengan kejenuhan 0 – 20 %; 20 – 40 %; 40 – 60 %; 60 – 80 % (Tabel 12). Ammonium sulfat yang sudah ditimbang untuk tingkat kejenuhan 0 – 20 % dimasukkan ke dalam supernatan sedikit demi sedikit sambil diaduk. Pengadukan dilakukan dengan magnetik stirer secara perlahan dan dilakukan dalam tempat direndam dalam es yang diberi garam. Campuran dibiarkan dalam keadaan dingin selama 2 jam lalu disentrifuge hingga diperoleh supernatan (0 – 20 % jenuh) dan endapan (0 - 20 %). Supernatan yang diperoleh dari tingkat kejenuhan 0 – 20 % difraksinasi untuk tingkat kejenuhan 20 - 40%, lalu diperlakukan sama untuk 40 – 60 %, 60 – 80 % jenuh. Endapan yang diperoleh tiap fraksi dilarutkan dengan buffer fosfat 0,2 M; pH 7,5.

3.4.3. Proses Dialisis^[15]

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 akuades. 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 beaker glass yang sudah diisi larutan buffer fosfat 0,002 M dengan pH 7,5. Buffer diaduk dengan magnetik stirer diganti tiap 2 jam sekali. Buffer yang diganti diuji kandungan ammonium sulfatnya dengan menggunakan larutan BaCl_2 . Proses dialisis dihentikan apabila tidak terdapat endapan putih dalam larutan buffer.

3.5 Uji Aktivitas Enzim

3.5.1. Penentuan λ Optimum Kasein

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

3.5.2. Penentuan Kurva Standar Kasein

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

3.5.3. Penentuan λ Optimum BSA

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

3.5.4. 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.

3.5.5 Penentuan Aktivitas Enzim Protease

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

Selanjutnya ditambah 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 pada λ optimum kasein.

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

3.6. Penentuan Kadar Protein dengan Metode Lowry

Sejumlah 1 mL larutan enzim ditambah dengan 5 mL reagen Lowry C dikocok – kocok lalu dibiarkan selama 20 menit. Ke dalam campuran ditambahkan 0,5 mL Lowry D dengan cepat dan didiamkan selama 45 menit pada

suhu kamar dengan sesekali digojong. Larutan dibaca serapannya pada panjang gelombang optimum BSA. Kadar protein enzim ditentukan secara regresi liner terhadap kurva standar BSA.

3.7. Karakterisasi Enzim

3.7.1. 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.

3.7.2. 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.

3.7.3. Penentuan Waktu Inkubasi

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

3.8. Penentuan Unit Aktivitas dan Aktivitas Spesifik Enzim Protease

- a. Satuan unit aktivitas enzim didefinisikan sebagai:

Jumlah milligram substrat kasein yang berkurang tiap satuan waktu inkubasi

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

- b. Aktivitas spesifik enzim didefinisikan sebagai:

Jumlah unit aktivitas enzim tiap milligram protein yang dikandung

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

