

BAB III METODOLOGI PENELITIAN

Isolasi bakteri dilakukan dengan metode goresan di medium Nutrient Agar selanjutnya enzim protease diproduksi di medium *Skim Milk Broth*. Isolasi enzim protease ekstraseluler dilakukan dengan metode sentrifuge dan difraksinasi bertingkat menggunakan amonium sulfat dengan tingkat kejenuhan yaitu F1 (0 - 20 %), F2 (20 - 40 %), F3 (40 - 60 %), F4 (60 - 80 %), F5 (80 - 100 %) dan dilanjutkan dialisis dalam buffer fosfat. Parameter yang diamati adalah aktivitas enzim, aktivitas spesifik enzim dan kadar protein.

3.1 Sampel, Alat, dan Bahan

3.1.1 Sampel

Sampel berupa air yang diperoleh dari sumber air panas Gedong Songo, Bawen.

3.1.2 Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah Nutrient Agar (NA), *Nutrient Broth* (NB), susu tanpa lemak (*Skim Milk*), buffer fosfat, pepton, gelatin, *Gram A*, *Gram B*, *Gram C*, *Gram D*, akuadest, natrium dihidrofosfat p.a, dinatrium hidrofosfat p.a, amonium sulfat kristal p.a, natrium hidroksida p.a, barium klorida p.a, natrium karbonat p.a, natrium kalium tartat p.a, tembaga

sulfat p.a, Follin Ciocalteau p.a, selofan, kasein p.a, *Bovine Serum Albumine* (BSA) p.a, asam klorida p.a, asam trikloroasetat (TCA) p.a.

3.1.2 Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah spektrofotometer UV-Vis, shaker “Precesion GCA Corp”, timbangan “Sartorius Basic”, peralatan gelas, selofan, autoklafe “ All American mode no.25”, jarum ose, pHmeter “Handy Lab”, inkubator “Heraeus Instruments”, sentrifuge “Dynac”, botol semprot, lemari pendingin “Goldstrar GR-181 HGS”, pemanas, mikroskop “NIKON”.

3.2 Variabel Penelitian

3.2.1 Variabel Isolasi Bakteri

Variabel yang dikonstankan

- a. Suhu inkubasi
- b. Waktu inkubasi

3.2.2 Variabel Isolasi Enzim

1. Variabel yang diukur

- a. Aktivitas enzim protease dari isolat bakteri termofilik sumber air panas Gedong Songo
- b. Aktivitas spesifik enzim protease
- c. Kadar protein

2. Variabel Bebas

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

3.2.3 Variabel yang Dikonstankan untuk Uji Aktivitas Enzim

- a. Konsentrasi substrat kasein
- b. Volume substrat kasein
- 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, dipanaskan sampai larut, kemudian disterilkan dengan autoklafe.

b. Pembuatan medium gelatin 3 %

Gelatin sebanyak 3 g dilarutkan dalam 100 mL akuades, dipanaskan sampai larut, kemudian disterilkan dengan autoklafe.

c. Pembuatan medium Nutrient Agar

Nutrient Agar sebanyak 23 g dilarutkan dalam 1 L akuades, dipanaskan sampai larut, kemudian disterilkan dengan autoklafe.

d.Pembuatan medium *Skim Milk Broth*

Nutrient Broth sebanyak 8 g dilarutkan dalam 1 L akuades, dipanaskan sampai larut, kemudian disterilkan dengan autoklafe. *Skim Milk* sebanyak 4 g dilarutkan dalam 200 mL akuades, dipanaskan sampai larut. Kemudian disterilkan dengan tehnik sterilisasi bertingkat yaitu dipanaskan dalam penangas air yang bertemperatur 100 °C, lalu didinginkan dan diulangi keesokan harinya selama 3 hari. Setelah itu dicampur dengan medium *Nutrient Broth* dalam kondisi steril.

e.Larutan NaH_2PO_4 0,2 M

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

g.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.

h.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.

i.Larutan BaCl_2 0,01 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***Lowry A***

Sebanyak 10 g Na_2CO_3 ditambah 2 g NaOH dan 0,2 g Natrium Kalium Tartat 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

Larutan *Lowry A* sebanyak 50 bagian ditambah 1 bagian larutan *Lowry B*

Lowry D

Larutan Follin ciocalteu phenol 1 bagian ditambah akuades 1 bagian

l. Pembuatan substrat kasein

Kasein sebanyak 0,12 g dilarutkan dalam akuades hingga volumenya menjadi 100 mL.

m. Pembuatan larutan standar kasein

Kasein sebanyak 0,03 g dilarutkan dalam akuades 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).

n. Pembuatan larutan standar BSA

BSA sebanyak 0,03 g dilarutkan dalam akuades 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

3.3.2.1 Isolasi Bakteri Termofilik

Sampel air panas sebanyak 0,5 mL diinokulasikan ke medium pepton diinkubasi pada temperatur 50 °C selama 24 jam, kemudian diinokulasikan dengan jarum ose ke medium gelatin diinkubasi 50 °C selama 24 jam. Kultur diisolasi dengan cara goresan pada medium Nutrient Agar, diinkubasikan pada 50 °C selama 24 – 48 jam. Koloni yang muncul diisolasi ke dalam medium miring Nutrient Agar.

3.3.2.2 Pewarnaan *Gram*

Dibuat preparat apusan bakteri pada kaca obyek yang telah ditetesi akuades steril, kemudian dilewatkan beberapa kali pada nyala api. *Gram A* ditetaskan pada apusan bakteri dan dibiarkan selama satu menit. Dicuci dengan akuades, setelah itu dikeringanginkan. Ditetaskan *Gram B* dibiarkan selama satu menit, dicuci dengan akuades dan dikeringanginkan. Ditetaskan *Gram C* dibiarkan selama setengah menit dan dicuci dengan akuades, setelah itu dikeringanginkan. Tetaskan *Gram D* dibiarkan selama dua menit, dicuci dengan akuades, setelah itu dikeringanginkan. Isolat bakteri yang telah diwarnai diamati dengan mikroskop dengan perbesaran kuat menggunakan minyak inersi.

3.3.2.3 Pengujian Aktivitas Enzim Protease

Isolat bakteri murni diambil dengan menggunakan ujung jarum ose kemudian diinokulasikan ke dalam medium gelatin, diinkubasi pada suhu 50 °C selama

24 jam kemudian disimpan dalam lemari es selama \pm 15 menit untuk mengetahui apakah terjadi hidrolisis atau tidak. Bila setelah \pm 15 menit dalam lemari es medium tetap cair, maka reaksi positif (terjadi hidrolisis gelatin) tetapi bila memadat berarti reaksi negatif (tidak terjadi hidrolisis gelatin).

3.3.2.4 Penentuan Kurva Pertumbuhan Bakteri

Isolat bakteri diinokulasikan pada medium Nutrient Agar miring dan diinkubasi selama 24 jam pada temperatur 50 °C. Kemudian isolat bakteri diinokulasikan ke medium *Nutrient Broth* sebagai medium stater, diinkubasi pada temperatur 50 °C selama 24 jam. Medium stater diambil 2,5 mL dan dinokulasikan ke dalam 250 mL medium *Nutrient Broth*, diletakkan di shaker inkubator temperatur 50 °C selama 2 x 24 jam dan diukur transmitansinya tiap 2 jam sekali.

3.3.3. Produksi Enzim Protease

Isolat bakteri diinokulasikan pada medium Nutrient Agar miring dan diinkubasi selama 24 jam pada temperatur 50 °C, selanjutnya diinokulasikan ke medium *Nutrient Broth* dan diinkubasi pada temperatur 50 °C selama 24 jam. Kultur bakteri diambil 2,5 mL dan dinokulasikan ke medium *Nutrient Broth* yang telah ditambahkan 2 % *Skim Milk*, diletakkan di atas shaker inkubator pada temperatur 50 °C selama 6 jam.

3.3.4 Isolasi Enzim Protease

3.3.4.1 Ekstraksi

Cairan kultur yang diperoleh disentrifuge dengan kecepatan 3400 rpm selama 15 menit, hasil yang diperoleh endapan putih berupa organel-organel sel dan cairan ekstrak kasar yang merupakan supernatan.

3.3.4.2 Fraksinasi

Amonium sulfat ditimbang sesuai dengan yang dibutuhkan untuk tiap tingkat fraksinasi dengan kejenuhan 0 – 20 %, 20 – 40 %, 40 – 60 %, 60 – 80 %, 80 – 100 % (tabel hal 51). Amonium sulfat untuk tingkat kejenuhan 0 – 20 % dimasukkan ke dalam ekstrak kasar sedikit demi sedikit sambil diaduk. Pengadukan dilakukan dengan magnetik stirer dan dilakukan dalam keadaan dingin. Campuran dibiarkan selama 24 jam dalam keadaan dingin lalu disentrifuge hingga diperoleh supernatan dan endapan. Supernatan yang diperoleh dari tingkat kejenuhan 0 – 20 % difraksinasi untuk tingkat kejenuhan 20 – 40 %, lalu diperlakukan sama untuk 40 – 60 %, 60 – 80 %, dan 80 – 100 %. Endapan dipisahkan dan disuspensikan dengan 0,2 M buffer fosfat pH = 7,5.

3.3.4.3 Proses 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 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 gelas yang sudah berisi larutan buffer fosfat 0,002 M dengan pH = 7,5. Buffer diaduk dengan magnetik stirer dan diganti tiap 2 jam sekali. Buffer yang diganti diuji amonium sulfatnya dengan menggunakan larutan BaCl_2 . Proses dialisis dihentikan jika hasil pengujian tidak lagi terdapat endapan putih.

3.3.5 Uji Aktivitas Enzim

3.3.5.1 Penentuan λ Optimum Larutan BSA

Larutan BSA 0,18 mg/mL ditambah 3 mL larutan *Lowry C* dan 0,3 mL larutan *Lowry D*, kemudian dibaca absorbansinya pada berbagai panjang gelombang dengan spektrofotometer UV - Vis.

3.3.5.2 Penentuan Kurva Larutan Standar BSA

Larutan BSA berbagai konsentrasi (0,06; 0,12; 0,18; 0,24; 0,3 mg/mL) ditambah 3 mL larutan *Lowry C*, dibiarkan selama 20 menit. Tambahkan 0,3 mL larutan *Lowry D* dan biarkan kembali selama 45 menit sambil sesekali dikocok. Larutan dibaca pada panjang gelombang optimum larutan BSA dengan spektrofotometer UV - Vis.

3.3.5.3 Penentuan λ Optimum Larutan Kasein

Larutan kasein 0,18 mg/mL ditambah 5 mL larutan Na_2CO_3 dan 2 mL larutan *Lowry D* kemudian dibaca serapannya pada berbagai panjang gelombang dengan spektrofotometer UV - Vis.

3.3.5.4 Penentuan Kurva Larutan Standar Kasein

Larutan kasein berbagai konsentrasi (0,06; 0,12; 0,18; 0,24; 0,3 mg/mL) ditambah 5 mL Larutan Na_2CO_3 dan 2 mL larutan *Lowry D* kemudian dibaca serapannya pada panjang gelombang optimum larutan kasein dengan spektrofotometer UV - Vis.

3.3.5.6 Penentuan Aktivitas Enzim Protease

Larutan kasein sebanyak 1 mL ditambah larutan enzim sebanyak 0,3 mL, akuades sebanyak 1 mL dan 0,2 M buffer fosfat pH = 7,5 sebanyak 0,7 mL, kemudian diinkubasi pada temperatur 50 °C selama 15 menit. Kemudian ditambah larutan TCA 30 % sebanyak 3 mL, dikocok dan dibiarkan 30 menit dalam inkubator pada temperatur 50 °C. Untuk memisahkan endapan campuran disentrifuge pada 3400 rpm selama 30 menit. Supernatan ditambah 5 mL larutan Na_2CO_3 dan 2 mL larutan *Lowry D* kemudian dibaca serapannya dengan spektrofotometer UV - Vis pada panjang gelombang optimum larutan kasein. Dengan cara yang sama dibuat kontrol, tetapi enzim yang digunakan adalah enzim yang telah dimatikan (tidak memiliki aktivitas). Absorbansi yang diperoleh

diplotkan terhadap kurva larutan standar kasein sehingga aktivitas enzim dapat dihitung.

3.3.5.7 Penentuan kadar protein dengan metode *Lowry*

Larutan enzim sebanyak 0,6 mL ditambah 3 mL larutan *Lowry C*, dibiarkan selama 20 menit. Tambahkan 0,3 mL larutan *Lowry D* dan biarkan kembali selama 45 menit sambil sesekali dikocok. Larutan dibaca pada panjang gelombang optimum larutan BSA dengan spektrofotometer UV - Vis. Absorbansi yang diperoleh diplotkan terhadap kurva standar larutan BSA sehingga kadar protein dapat dihitung.

3.3.6 Karakterisasi Enzim Protease

3.3.6.1 Penentuan Temperatur Optimum

Larutan enzim pada berbagai variasi temperatur (46, 48, 50, 52, 54 °C) diukur absorbansinya dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang optimum larutan kasein.

3.3.6.2 Penentuan pH Optimum

Larutan enzim pada berbagai variasi pH (7,1; 7,3; 7,5; 7,7; 7,9) diukur absorbansinya dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang optimum larutan kasein.

3.3.6.3 Penentuan Waktu Inkubasi Optimum

Larutan enzim berbagai variasi waktu inkubasi (5, 10, 15, 20, 25, 30 menit) diukur absorbansinya dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang optimum larutan kasein.

