

I. METODOLOGI PENELITIAN

A. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan April - Juli 2012 di Laboratorium Biokimia, Laboratorium Instrumentasi Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lampung.

B. Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain alat-alat gelas, jarum ose, pembakar spiritus, pipet Ependroff, pengaduk magnet, pH Universal, sentrifuga, autoklaf, lemari pendingin, *shaker incubator (orbit environ shaker)*, *cold plate*, *waterbath*, *laminar air flow*, dan spektrofotometer UV-Vis.

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain *malt extract*, pepton, *yeast extract*, larutan kasein, susu skim, air laut steril, akuades, alkohol, kantung selofan, glukosa, Na_2CO_3 , NaOH, TCA, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, reagen *folin ciocelteau*, Na/K tartarat, NaCl, NaH_2PO_4 , Na_2HPO_4 , BSA (*Bovine Serum Albumin*), gliserol dan sorbitol. Bakteri penghasil enzim protease yang digunakan yaitu *Actinomycetes ANL4 2b-3*.

C. Prosedur Penelitian

1. Pembuatan Media dan Larutan Pereaksi

a. Pembuatan Media Pertumbuhan dan Peremajaan *Actinomycetes*

1). Media ISP-2 (*International Streptomyces Project*) untuk Peremajaan

Actinomycetes ANL4 2b-3

Media ISP-2 terdiri dari 4 gram *yeast extract*, 10 gram *malt extract*, 4 gram *dextrose*, dan 24 gram agar dilarutkan dalam 1L air laut steril lalu disterilisasi selama 15 menit 121°C, 1 atm. Setelah media sedikit dingin ditambahkan sikloheksamida 25µg/mL dan *nalidixic acid* 25µg/mL (Margavey, *et al.*, 2004).

2). Pembuatan Media Inokulum dan Fermentasi untuk Produksi Enzim

Media cair dibuat dengan komposisi *yeast extract* 0,5%, glukosa 0,1%, susu skim 0,5%, 1% NaCl 0,5 M dilarutkan dalam 100 mL akuades, kemudian disterilisasi selama 15 menit pada suhu 121 °C dan tekanan 2 atm.

b. Pembuatan Pereaksi Untuk Pengukuran aktivitas Protease Metode Kunitz

1). Buffer Phospat pH 7

Stok A : 0,2 M NaH₂PO₄ (15,601 g NaH₂PO₄.2H₂O dilarutkan dalam labu ukur 1L dengan akuades.

Sok B : 0,2 M Na₂HPO₄ (17,799 g NaH₂PO₄.2H₂O dilarutkan dalam labu ukur 1L akuades.

Buffer phospat pH 7 dibuat dengan mencampurkan 38,9 mL stok A dan 61,1 mL stok B.

2). Larutan Kasein

1 gram larutan kasein dilarutkan dalam labu ukur 100 mL dengan buffer phospat pH 7 pada penangas air (80-90°C) pH akhir 7,2 .

3). Larutan Asam Trikloroasetat

5 gram TCA dilarutkan dalam labu ukur 100 mL lalu diencerkan dengan akuades hingga garis batas.

4). Larutan Standar Tirosin

Larutan standar tirosin dibuat dengan kadar 0, 20, 40, 60, 80, 100, 120 ppm.

c. Pembuatan Pereaksi Untuk Pengukuran kadar protein Metode Lowry

Pereaksi A : 2 gram Na_2CO_3 dilarutkan dalam 100 mL NaOH 0,1 N.

Pereaksi B : 5 mL larutan $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 1% ditambahkan ke dalam 5 mL larutan Na(K) tartarat 1%.

Pereaksi C : 2 mL pereaksi B ditambahkan 100 mL pereaksi A.

Pereaksi D : reagen *folin ciocelteau* diencerkan dengan akuades 1 : 1.

Larutan standar : larutan BSA (*Bovine Serum Albumin*) dengan kadar 0, 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140 ppm.

2. Penyiapan Inokulum

Isolat bakteri yang telah ditumbuhkan pada media ISP-2 diinokulasikan kedalam erlenmeyer yang berisi IL media yang mengandung *yeast extract* 0,5%, glukosa

0,1%, susu skim 0,5%, 1% NaCl 0,5 M, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C, pH 7.0 dan waktu inkubasi 120 jam. Biakan ini disebut starter atau inokulum.

3. Isolasi dan Pemurnian Enzim

Media yang digunakan untuk isolasi enzim sama dengan media pada penyiapan inokulum, media tersebut disterilisasi selama 15 menit 121°C, 1 atm. Selanjutnya biakan *actinomycetes* diinokulasikan dan diinkubasi pada suhu 37°C, pH 7.0 dan waktu inkubasi 120 jam. Untuk memisahkan larutan enzim dari konstituen seluler lainnya dilakukan sentrifugasi pada 3500 rpm selama 20 menit. Filtrat yang diperoleh disebut ekstrak kasar enzim, terhadap ekstrak kasar enzim tersebut dilakukan penentuan kadar protein dengan metode Lowry dan uji aktivitas enzim menggunakan metode Kunitz.

a. Pengendapan dengan amonium sulfat [(NH₄)₂SO₄]

Ekstrak kasar enzim yang diperoleh diendapkan dengan garam amonium sulfat pada berbagai derajat kejenuhan yaitu (0-15)%; (15-30)%; (30-45)%; (45-60); (60-75)% ; dan (75-90)%. Skema proses pengendapan protein enzim dengan penambahan amonium sulfat ditunjukkan pada Gambar 6.

Sejumlah ekstrak kasar enzim yang diperoleh ditambahkan garam amonium sulfat secara perlahan sambil diaduk dengan *magnetic stirrer*. Endapan protein enzim yang didapatkan pada tiap fraksi kejenuhan amonium sulfat dipisahkan dari filtratnya dengan sentrifugasi dingin pada kecepatan 3500 rpm selama 20 menit. Kemudian endapan yang diperoleh dilarutkan dengan buffer fosfat 0,1 M pH 7,0

dan diuji aktivitasnya dengan metode Kunitz, serta diukur kadar proteinnya dengan metode Lowry. Selanjutnya, filtrat yang didapat dari fraksi 0-15% digunakan untuk diendapkan kembali dengan fraksi kejenuhan 15-30% dengan prosedur yang sama (Kazan *et al.*, 1997).

Gambar 6. Skema pengendapan protein enzim dengan amonium sulfat

b. Dialisis

Endapan enzim yang telah dilarutkan dari tiap fraksi amonium sulfat dengan aktivitas spesifik yang tinggi dimasukkan ke dalam kantung selofan dan didialisis dengan buffer posphat 0,01 M pH 7 selama 24 jam pada suhu dingin (Pohl, 1990).

Selama dialisis, dilakukan pergantian buffer selama 4-6 jam agar konsentrasi ion-ion di dalam kantung dialisis dapat dikurangi. Proses ini dilakukan secara terus menerus sampai ion-ion di dalam kantung dialisis dapat diabaikan. Untuk mengetahui bahwa sudah tidak ada lagi ion-ion garam dalam kantung, maka diuji dengan menambahkan larutan $\text{Ba}(\text{OH})_2$ atau BaCl_2 , bila masih ada ion sulfat dalam kantung, maka akan terbentuk endapan putih BaSO_4 . Semakin banyak endapan yang terbentuk, maka semakin banyak ion sulfat yang ada dalam kantung. Selanjutnya dilakukan uji aktivitas dengan metode Kunitz, serta diukur kadar proteinnya dengan metode Lowry.

4. Pembuatan Campuran Enzim dan Senyawa Aditif

Campuran enzim dan senyawa aditif dibuat dengan menambahkan senyawa aditif (gliserol dan sorbitol) ke dalam larutan enzim dengan perbandingan 1:1. Konsentrasi senyawa aditif yang digunakan yaitu masing-masing 0,5M, 1M dan 1,5M baik untuk gliserol maupun sorbitol.

5. Karakterisasi Enzim Sebelum dan Setelah Penambahan Senyawa Aditif

a. Penentuan pH Optimum Enzim Protease

Untuk mengetahui pH optimum dari campuran masing-masing enzim dan senyawa aditif (gliserol dan sorbitol) dilakukan pengukuran aktivitas enzim menggunakan metode Kunitz dengan variasi pH yang digunakan yaitu 5, 5,5, 6, 6,5, 7, 7,5, 8, 8,5 dan 9.

b. Penentuan Suhu Optimum Enzim Protease

Untuk mengetahui suhu optimum dari campuran masing-masing enzim dan senyawa aditif (gliserol dan sorbitol) dilakukan pengukuran aktivitas enzim dengan metode Kunitz dengan variasi temperatur yang digunakan adalah 45, 50, 55, 60, 65, 70 dan 75 °C.

c. Penentuan Waktu Inkubasi Maksimum

Untuk mengetahui waktu inkubasi optimum dari campuran masing-masing enzim dan senyawa aditif (gliserol dan sorbitol), dilakukan pengukuran aktivitas enzim menggunakan metode Kunitz dengan variasi waktu inkubasi 50, 55, 60, 65, 70, 75 dan 80 menit.

d. Uji stabilitas enzim

Penentuan stabilitas enzim dilakukan dengan mengukur aktivitas sisa enzim setelah diinkubasi selama suhu dan pH tertentu (suhu dan pH optimum). Caranya yaitu dengan mengukur aktivitas enzim setelah proses pemanasan selama waktu tertentu sesuai dengan pengukuran aktivitas enzim. Aktivitas awal enzim (tanpa perlakuan) di beri nilai 100% (Virdianingsih *et al.*, 2002)

$$\text{Aktivitas sisa} = \frac{A_{\text{er s p}}}{A_{\text{a er (t: p)}}} \times 100\%$$

6. Uji Aktivitas Protease dan Penentuan Kadar Protein

Uji aktivitas protease dilakukan pada tiap tahap isolasi, tiap tahap pemurnian dan pada saat karakterisasi enzim hasil isolasi dan pemurnian. Penentuan kadar protein dilakukan pada tiap tahap isolasi dan pada tiap tahap pemurnian.

a. Pengujian Aktivitas Protease Metode Kunitz

Analisis aktivitas dilakukan menurut metode Kunitz menggunakan substrat kasein (Soedigdo, 1998). Pengukuran didasarkan pada jumlah peptida yang terlarut dalam TCA (asam trikloroasetat). Prosedur pengujian adalah sebagai berikut : 1 mL larutan kasein dimasukkan dalam tabung reaksi kemudian ditambah 1 mL larutan enzim. Kemudian diinkubasi pada 35°C selama 30 menit. Setelah 30 menit, tabung reaksi dikeluarkan lalu ditambah 3 mL larutan TCA , larutan diaduk dan didiamkan selama 30 menit pada suhu kamar agar pengendapan sempurna. Endapan yang terbentuk dipisahkan dengan sentrifugasi. Absorpsi filtrat diukur pada panjang gelombang 280 nm. Pada pengujian aktivitas untuk uji stabilitas termal, 1mL kasein dan 1mL larutan enzim diinkubasi pada suhu 50°C selama 60 menit yang merupakan suhu dan waktu inkubasi optimum yang diperoleh pada karakterisasi enzim protease. Kontrol dibuat dengan menambahkan larutan TCA sebelum enzim lalu diinkubasi. Aktivitas enzim dihitung berdasarkan jumlah asam amino (peptida sederhana) yang terbentuk dengan menggunakan kurva standar tirosin. Aktivitas 1 unit tirosin ditetapkan sebagai jumlah enzim yang dibutuhkan untuk menguraikan 1µmol tirosin dari kasein di dalam 1 mL volume reaksi per menit.

b. Penentuan kadar protein Metode Lowry

Kadar protein enzim ditentukan dengan metode Lowry (Lowry *et al.*, 1951). Penentuan kadar protein ini bertujuan untuk mengukur aktivitas spesifik dari protein enzim protease. Sebanyak 0,1 mL enzim protease ditambahkan 0,9 mL akuades lalu direaksikan dengan 5 mL pereaksi C dan diaduk rata kemudian dibiarkan selama 10 menit pada suhu ruang. Setelah itu ditambahkan dengan cepat 0,5 mL pereaksi D dan diaduk dengan sempurna, didiamkan selama 30 menit pada suhu kamar. Untuk kontrol, 0,1 mL enzim diganti dengan 0,1 mL akuades, selanjutnya perlakuannya sama seperti sampel. Serapannya diukur menggunakan spektrofotometer *UV-Vis* pada panjang gelombang 750 nm. Untuk menentukan konsentrasi protein enzim yang digunakan kurva standar BSA (*Bovine Serum Albumin*). Penentuan kadar protein enzim protease dengan menggunakan metode Lowry ini dilakukan pada tahap isolasi dan pada tiap tahap pemurnian.