

### III. METODE PENELITIAN

#### A. Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilaksanakan dari bulan November 2009 sampai dengan bulan Mei 2010 di Laboratorium Biomassa dan Laboratorium Biokimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lampung.

#### B. Alat dan Bahan

Dalam penelitian ini alat-alat yang digunakan adalah *microplate reader* Hospitex Diagnostix, inkubator CO<sub>2</sub> Memmert-Germany/INC-02, *orbital shaker* Wiggen Hauser/OS150, *autoclave* Kleinfeld-Germany/HV-L25, *centrifuge* Hitachi/CF-46RX, laminar air flow ESCO/AVC4A1, *water Bath* Wiggen Hauser, jarum ose, pinset, lampu spiritus, mikropipet, *magnetic stirrer*, timbangan, penangas air, lemari pendingin, kertas saring, termometer, cawan petri, dan peralatan gelas lainnya seperti labu erlenmeyer, gelas beker, labu takar, tabung reaksi, spatula, pipet tetes dan lain-lain.

Adapun bahan-bahan yang digunakan adalah media ISP-2 (yeast ekstrak, malt ekstrak, dekstrose, dan agar), gelatin, susu skim, air laut steril, kasein, *mineral salt medium* (NaCl, CaCl<sub>2</sub>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O), kantung

selofan, buffer pospat pH 7. Sumber enzim adalah isolat *actinomycetes* yang diperoleh dari lumpur hutan bakau Pantai Ringgung, Perairan Teluk Lampung.

### **C. Prosedur Penelitian**

#### **1. Pembuatan Media dan Larutan Preaksi**

##### **a. Pembuatan Media Pertumbuhan dan Peremajaan *actinomycetes***

###### 1). Media ISP-2 untuk Peremajaan *actinomycetes*

Media ISP-2 terdiri dari 0,4% *yeast extract*; 1% *malt extract*; 0,4% *dextrose* dan 2,4% agar dilarutkan dalam air laut steril, lalu di sterilisasi selama 15 menit, pada 121°C, 1 atm (Margavey, N. A., *et al.*, 2004).

###### 2). Pembuatan Mineral Salt Medium untuk Produksi Enzim

*Mineral salt medium* dibuat dengan cara (0,6% NaCl; 0,01% CaCl<sub>2</sub>; 0,01% MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O; 0,1% FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O; 0,1% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), ditambahkan dengan 2% skim milk, lalu dilarutkan ke dalam air laut steril sampai pH 7,0. Kemudian di sterilisasi selama 15 menit pada 121°C, 1 atm.

##### **b. Pembuatan Media Uji Biokimia Protease**

Media uji biokimia enzim protease yang digunakan adalah *mineral salt medium* yang mengandung 10% gelatin, dilarutkan ke dalam aquades. Kemudian di sterilisasi selama 15 menit, 121°C, 1 atm.

**c. Pembuatan Pereaksi Untuk Pengukuran aktivitas Protease Metode Kunitz Termodifikasi**

- 1) 0,65% larutan kasein

Sebanyak 0,6 gram kasein dilarutkan dalam buffer Phosfat pH 7,5

- 2) 110mM Larutan Asam Trikloro Asetat (TCA)

Sebanyak 1,7985 gram TCA dilarutkan kedalam labu takar 100 mL dengan aquades lalu encerkan hingga garis batas.

- 3) Pereaksi Lowry

Pereaksi A ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ), reagen Folin – Ciocelteau 1 N.

- 4) Larutan Standar L-Tirosin

Larutan tirosin dengan konsentrasi 1,1 mM.

**d. Pembuatan Pereaksi Untuk Pengukuran Kadar Protein Dengan Metode Lowry**

- 1). Pereaksi A: 2 g  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  dilarutkan dalam 100 mL NaOH 0,1 N.

- 2). Pereaksi B: 2 mL larutan  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  1% ditambahkan ke dalam larutan NaK-tartarat 1%.

- 3). Pereaksi C: 2 mL pereaksi B ditambahkan 100 mL pereaksi A.

- 4). Pereaksi D: Reagen Folin-Ciocelteau 1 N.

**2. Peremajaan dan Pengamatan Actynomicetes**

Media yang digunakan untuk peremajaan dan pengamatan isolat *Actinomyces* adalah media ISP-2. Isolat diremajakan pada media ISP-2 selama 1 minggu, setelah itu dilihat pertumbuhannya.

### 3. Uji Proteolitik

Media yang digunakan untuk uji biokimia biakan *actinomyces* dalam mendegradasi protein adalah *Mineral Salt Medium* yang mengandung 10% gelatin. Sebanyak 10 mL media dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian dimasukkan biakan *actinomyces* dan diinkubasi selama 4 hari. Setelah 4 hari lalu dipindahkan ke dalam lemari es dan di simpan selama 6 jam pada suhu 4°C. Selanjutnya, biakan *actinomyces* dikeluarkan dari dalam lemari es dan didiamkan selama 10 menit pada suhu ruang, lalu diamati tabung reaksi mana yang mencair.

### 4. Penentuan Kondisi Optimum Pertumbuhan Isolat Actinomyces

Media yang digunakan untuk menentukan kondisi optimum *actinomyces* untuk menghasilkan enzim protease adalah *Mineral Salt Medium* yang mengandung (0,6% NaCl; 0,01% CaCl<sub>2</sub>; 0,01% MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O; 0,1% FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O; 0,1% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>). Pada masing-masing media diberikan kondisi lingkungan yang bervariasi yaitu variasi pH dan waktu inkubasi. Variasi pH yg dilakukan adalah 6, 6.5, 7, 7.5 dan pH 8. Variasi waktu inkubasi yang dilakukan adalah 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168, 192, 216, 240 jam.

Setelah waktu pengamatan selesai, dilakukan pengukuran jumlah sel dengan melakukan pembacaan *optical density* (OD) pada panjang gelombang 600 nm menggunakan mikroplate rider. Dari data hasil pengukuran OD<sub>600</sub> dapat diketahui kondisi lingkungan yang tepat untuk produksi enzim.

## **5. Penyiapan Inokulum**

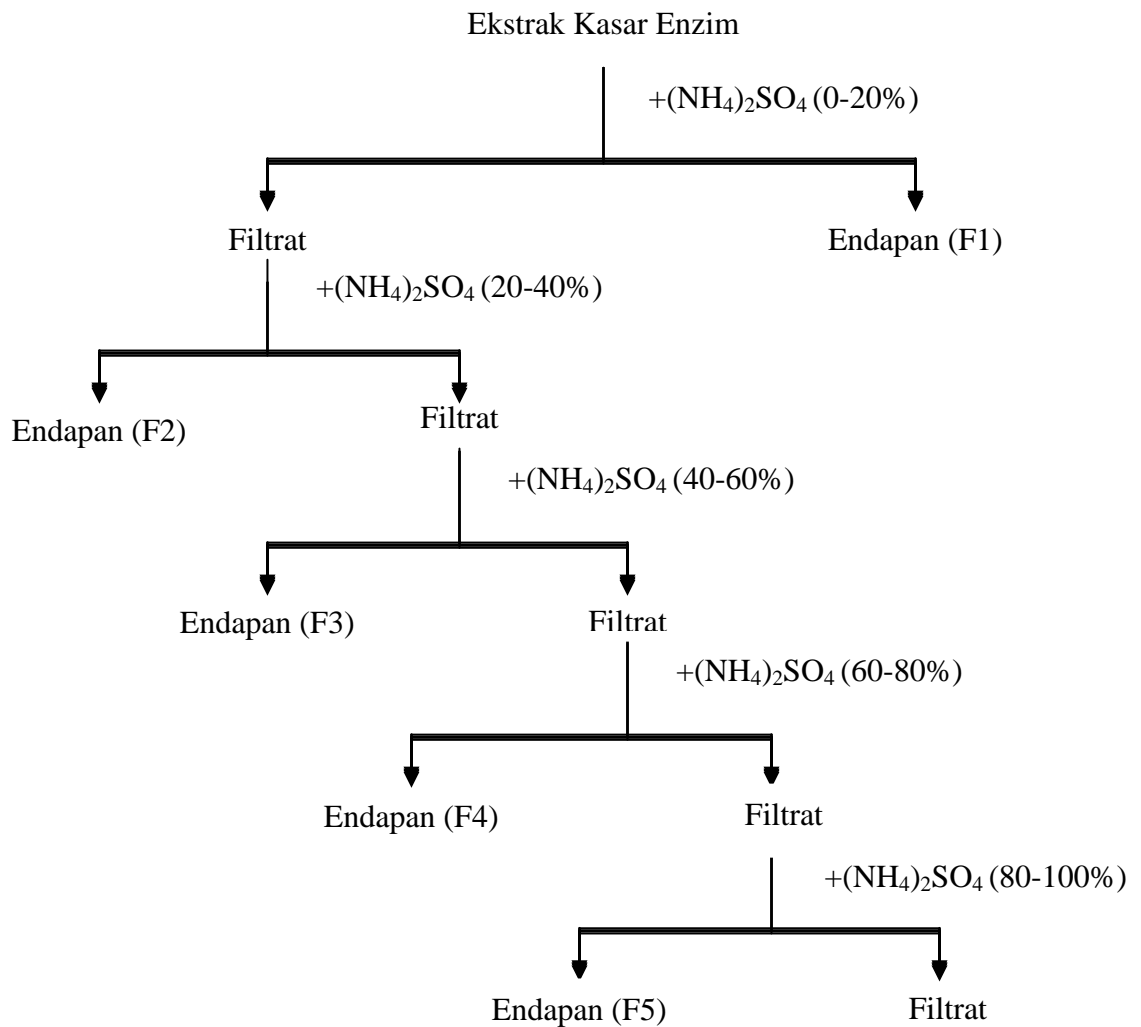
Isolat bakteri yang telah ditumbuhkan pada media ISP-2 selama 7 hari diinokulasikan ke dalam Erlenmeyer 500 mL yang berisi 100 mL media produksi dengan pH optimum dan kemudian diinkubasi pada temperatur optimum dan waktu inkubasi optimum. Biakan ini disebut starter atau inokulum.

## **6. Isolasi dan Pemurnian Enzim**

Isolasi protein enzim dilakukan dengan menumbuhkan starter pada media produksi dengan pH optimum dan waktu inkubasi maksimum, agar diperoleh jumlah maksimal enzim yang diproduksi *actinomyces* tersebut. Untuk memisahkan larutan enzim dari konstituen seluler lainnya dilakukan sentrifugasi pada 3500 rpm selama 30 menit. Filtrat yang diperoleh disebut ekstrak kasar enzim, terhadap ekstrak kasar enzim tersebut dilakukan penentuan kadar protein dengan metode *Lowry* dan uji aktifitas enzim menggunakan metode *Kunitz* termodifikasi.

### **a. Fraksinasi dengan Amonium Sulfat**

Ekstrak kasar enzim yang diperoleh diendapkan dengan menggunakan garam amonium sulfat dan pengendapan dilakukan secara bertahap. Skema proses pengendapan dengan penambahan amonium sulfat dapat dilihat pada Gambar 5



Gambar 5. Skema proses fraksinasi enzim dengan penambahan amonium sulfat

Setelah itu endapan protein enzim dipisahkan dari filtratnya dengan sentrifugasi pada kecepatan 6000 rpm selama 15 menit. Kemudian endapan yang diperoleh dilarutkan dalam buffer pospat pH 7 .

#### b. Dialisis

Endapan enzim dari tiap fraksi dilarutkan dalam buffer pospat pH 7, kemudian dimasukkan ke dalam kantong selofan dan didialisis dengan buffer pospat pH 7 selama  $\pm 30$  jam pada suhu dingin. Pada hasil dialisis dilakukan pengujian

aktifitas enzim metode Kunitz termodifikasi pada panjang gelombang 660 nm dan ditentukan kadar protein menggunakan metode Lowry pada panjang gelombang 600 nm.

## **7. Karakterisasi Enzim**

### **a. Penentuan Temperatur Optimum**

Untuk mengetahui suhu optimum dari enzim hasil isolasi, dilakukan pengukuran aktifitas enzim dengan metode *Kunitz* termodifikasi, dengan variasi temperatur yang digunakan adalah 30, 40, 50, 60, 70 dan 80°C.

### **b. Penentuan pH Optimum**

Untuk mengetahui pH optimum dari enzim hasil isolasi, dilakukan pengukuran aktifitas enzim menggunakan metode *Kunitz* termodifikasi dengan variasi pH yang digunakan adalah 6; 6,5; 7; 7,5; dan 8.

### **c. Penentuan Waktu Inkubasi Maksimum**

Untuk mengetahui waktu inkubasi optimum dari enzim hasil isolasi, dilakukan pengukuran aktifitas enzim menggunakan metode *Kunitz* termodifikasi dengan variasi waktu inkubasi 30, 40, 50, 60, dan 70 menit.

### **d. Penentuan Nilai $K_m$ dan $V_m$**

Ke dalam tabung reaksi dimasukkan larutan substrat (kasein) dengan konsentrasi berturut-turut 5; 7,5; 10; 12,5; 15; 17,5; 20 dan 22,5 mg/ml. Pengerjaan selanjutnya sama dengan pengukuran aktifitas enzim metode *Kunitz* termodifikasi, dengan menggunakan data penentuan suhu, pH, dan waktu inkubasi maksimum

optimum. Nilai  $K_m$  dan  $V_m$  ditentukan dengan menggunakan kurva Lineweaver-Burk.

## 8. Uji Aktifitas Protease dan Penentuan Kadar Protein

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

### a. Pengujian Aktifitas Protease Metode *Kunitz* Termodifikasi

Analisis aktifitas dilakukan menurut metode *Kunitz* menggunakan substrat kasein (Soedigdo, 1988). Sedangkan pada penelitian ini digunakan metode *Kunitz* Termodifikasi (Anson, M.L., 1938). Pengukuran didasarkan pada satu unit enzim akan menghidrolisis kasein untuk menghasilkan warna dari tirosin per menit, dimana warna yang dihasilkan berasal dari reagen Folin-Ciocalteu. Prosedur pengujian adalah sebagai berikut: 5 ml kasein dimasukkan ke dalam tabung reaksi kemudian ditambahkan 1 ml larutan enzim. Kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 10 menit. Setelah itu masukkan 5 mL reagen TCA, lalu diinkubasi pada suhu 37°C selama 30 menit, tabung reaksi dikeluarkan lalu disaring dan didapatkan filtratnya. Kemudian Filtrat yang didapatkan, diambil sebanyak 2 mL dan ditambahkan 5 mL reagen  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  dan 1 mL reagen Folin Ciocalteu. Kemudian larutan diaduk dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 30 menit dan setelah itu didiamkan pada suhu kamar hingga dingin. Endapan yang terbentuk dipisahkan dengan penyaringan atau sentrifugasi. Absorbansi filtrat diukur pada panjang gelombang 660 nm. Kontrol dibuat dengan menambahkan enzim setelah di inkubasi selama 10 menit pada suhu 37°C. Aktifitas enzim dihitung

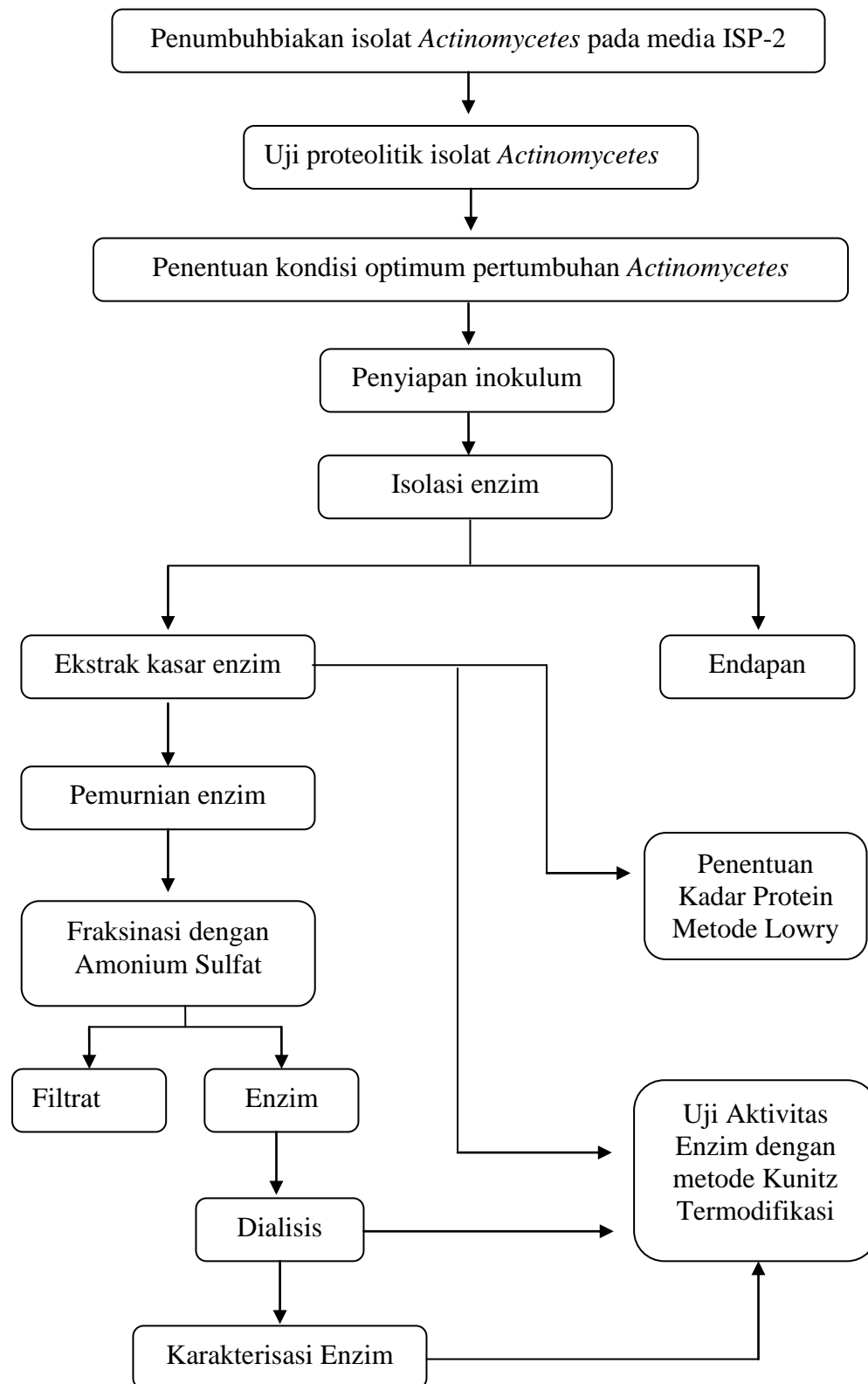


berdasarkan jumlah asam amino (peptida sederhana) yang terbentuk dengan menggunakan kurva standar tirosin. Aktivitas 1 unit enzim ditetapkan sebagai jumlah enzim yang dibutuhkan untuk menguraikan 1 $\mu$ g tirosin dari kasein di dalam 1 ml volume reaksi per menit .

b. Penentuan Kadar Protein ( Metode *Lowry*)

Analisis ini dilakukan untuk memperoleh data tentang jumlah protein dalam tiap ml cairan enzim, yang dilakukan dengan metode *Lowry* (*Lowry et al.*, 1951).

Sebanyak 0,1 ml larutan sampel yang akan diukur kandungannya ditambahkan dengan 0,9 ml aquades atau larutan standar dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Kemudian kedalam tabung reaksi tersebut dimasukkan 5 ml pereaksi C dan dicampurkan hingga homogen, lalu dibiarkan selama 10 menit pada suhu kamar. Kemudian ditambahkan pereaksi D dan dicampurkan hingga homogen, lalu didiamkan selama 10 menit pada suhu kamar, setelah itu absorbansinya dibaca dengan Spektrofotometer pada panjang gelombang 600 nm. Untuk menentukan konsentrasi protein enzim digunakan kurva standar Bovine Serum Albumin (BSA).



Gambar 6. Diagram alir penelitian