

### **III. METODE PERCOBAAN**

#### **A. Waktu dan Tempat Penelitian**

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Februari sampai April 2014 di Laboratorium Mikrobiologi Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Lampung.

#### **B. Alat dan Bahan**

##### **1. Alat**

Adapun alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah *laminar air flow cabinet*, *autoclave*, tabung reaksi dan sumbat, cawan petri, neraca analitik, inkubator, *water bath*, kompor listrik, *vortex mixer*, pipet tetes, *centrifuge*, mikropipet, mikrotips, jarum ose, mikroskop, aluminium foil, erlenmeyer, batang pengaduk, botol aquadest, tabung durham, spektrofotometer, kuvet, *shaker incubator*, bunsen, gelas ukur, objek gelas, dan tabung durham.

## 2. Bahan

Adapun bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah aquadest, *Phenol Red*, *Skim Milk Agar* (SMA), *Sucrose Broth*, *Lactose Broth*, *Dextrose Broth*, bufer borat, TCA (*Trichloroacetic Acid*),  $\text{CaCl}_2$ , cat kristal protein (*Coomassie Brilliant Blue*), etanol, aseton, spirtus,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , *Nutrient Broth* (NB), *Natrium Agar* (NA), *folin Ciocalteau*, alkohol 70%, Hidrogen Peroksida ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), *Sulfit Indol Motility* (SIM), dan *Kasein Hammerstein*, *Brom Cresol Purple Milk* (BCPM), Gelatin Agar, .

## C. Metode Penelitian

Uji proteolitik dari isolat bakteri dilakukan secara kualitatif dan kuantitatif. Penelitian disusun menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan 3 ulangan. Uji kualitatif ditentukan dengan melihat adanya zona bening di sekitar koloni. Uji kuantitatif aktivitas protease ditentukan dengan menggunakan metode Bergmeyer dan Grassl (1983) yang diukur berdasarkan jumlah tirosin yang terbentuk. Banyaknya tirosin diukur dengan spektrofotometer berdasarkan absorbansinya pada panjang gelombang 578 nm. Uji fisiologi isolate bakteri proteolitik meliputi uji katalase, uji motilitas, uji gelatin, uji peptonisasi dan fermentasi gula disampaikan secara deskriptif.

## **D. Analisis Data**

Data aktivitas enzim protease yang diperoleh dilakukan analisis ragam dilanjutkan dengan menggunakan uji lanjut BNJ (Beda Nyata Jujur) 5%.

## **E. Prosedur Kerja**

### **1. Peremajaan Stok Kultur Koleksi Bakteri**

Isolat koleksi bakteri proteolitik( B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>3</sub>, dan B<sub>4</sub>) yang sudah murni, diremajakan pada NA miring dengan cara menggoreskan satu ose dari tiap isolat bakteri dan di inkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Bakteri ini harus diremajakan 1 kali dalam sebulan, agar tetap mendapat nutrisi dan tidak mati.

### **2. Uji Proteolitik Secara Kualitatif dan Kuantitatif**

#### **2.1. Aktivitas Protease Secara Kualitatif**

Uji proteolitik secara kualitatif isolat bakteri proteolitik dilakukan dengan menggunakan media *Skim Milk Agar* (SMA). Suspensi isolat Bakteri proteolitik yang telah diremajakan diambil sebanyak 1 ose dan di *point plate* ke dalam cawan petri yang berisi media *Skim Milk Agar* (SMA), lalu diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37 °C. Aktivitas proteolitik dari bakteri proteolitik yang ditumbuhkan pada media SMA ditunjukkan dengan terlihatnya zona bening yang muncul di sekitar koloni yang terbentuk (Putri, 2012). Indeks proteolitik dihitung dengan cara mengukur luas areal bening dan luas koloni bakteri. Perhitungan indeks

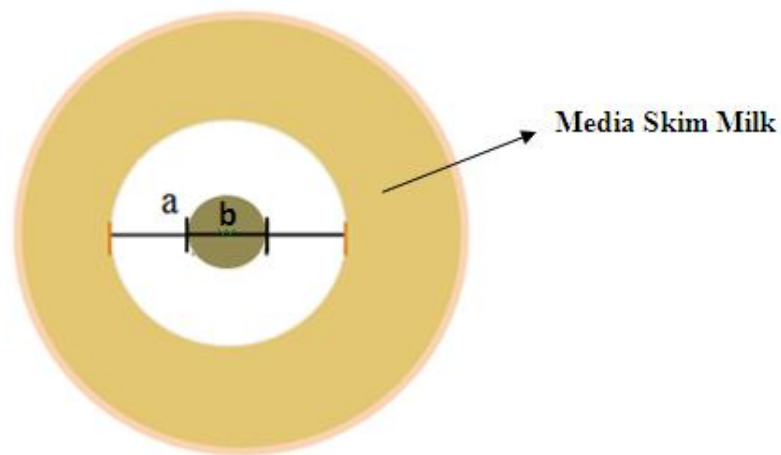
proteolitik adalah perbandingan luas areal bening dengan luas koloni bakteri (Baehaki, 2011).

Rumus indeks proteolitik:  $\frac{a}{b}$

Keterangan:

a = diameter zona bening

b = diameter koloni (Setyaningsih,2013)



Gambar 4. Penentuan indeks proteolitik.

## 2.2. Aktivitas Enzim Protease Secara Kuantitatif

### 2.2.1. Pembuatan Starter Isolat Bakteri Proteolitik

Isolat bakteri proteolitik yang sudah diremajakan pada media *Nutrient Agar* miring diambil 3 ose dan diinokulasikan ke dalam erlenmeyer 250 ml yang berisi 50 ml media *Nutrient Broth + Skim Milk*, kemudian diinkubasi selama 24 jam di atas *shaker incubator* dengan kecepatan 120 rpm.

### 2.2.2. Produksi Enzim Protease

Starter bakteri proteolitik sebanyak 10% diinokulasikan ke dalam 50 ml media *Nutrient Broth + Skim Milk*, kemudian diinkubasi selama 24 jam di atas *shaker incubator* dengan kecepatan 120 rpm. Setelah 24 jam, kultur dimasukkan ke dalam tabung dan dipanen dengan cara disentrifugasi pada kecepatan 4000 rpm selama 10 menit. Supernatan yang diperoleh digunakan untuk uji aktivitas protease (Baehaki, 2011).

### 2.2.3. Penentuan Aktivitas Enzim Protease

Aktivitas protease diukur dengan metode Bergmeyer dan Grassl (1983), dengan menggunakan substrat Kasein Hammerstein 2% (w/v). Prosedur pengujian aktivitas protease adalah mereaksikan 0,2 ml enzim dengan 1 ml substrat Kasein Hammerstein dan 1 ml bufer borat. Campuran reaksi diinkubasi pada suhu 37<sup>0</sup>C selama 10 menit, lalu ditambahkan 0,1 M TCA (*Trichloroacetic Acid*). Larutan diinkubasi kembali pada suhu 37<sup>0</sup>C selama 10 menit, dilanjutkan dengan sentrifugasi pada kecepatan 4000 rpm 10 menit. Dari campuran hasil sentrifugasi diambil 1,5 ml supernatan dan ditambahkan ke dalam tabung reaksi yang berisi 5 ml Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0,4 M, kemudian ditambahkan 1 ml pereaksi *Folin Ciocalteau* (1:2) dan diinkubasi pada suhu 37<sup>0</sup>C selama 20 menit. Hasil

inkubasi diukur absorbansinya dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 578 nm.

**Tabel 1. Metode Pengujian Aktivitas Enzim Protease**

	Blanko (ml)	Standars (ml)	Sampel (ml)
Bufer Borat (0,01 M, pH 8)	1,0	1,0	1,0
Substrat kasein (20 mmol, pH 8)	1,0	1,0	1,0
Enzim dalam CaCl <sub>2</sub> (2mM)	-	-	0,2
Tirosin standard	-	0,2	-
Aquadest	0,2	-	-
Inkubasi pada 37 <sup>0</sup> C selama 10 menit			
TCA (0,1 M)	2,0	2,0	2,0
CaCl <sub>2</sub> (2mM)	-	-	0,2
Enzim dalam CaCl <sub>2</sub> (2mM)	0,2	0,2	-
Inkubasi pada 37 <sup>0</sup> C selama 10 menit Sentrifugasi 4000 rpm selama 10 menit pada suhu 4 <sup>0</sup> C			
Filtrat	1,5	1,5	1,5
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (0,4 M)	5,0	5,0	5,0
Pereaksi Folin (1:2)	1,0	1,0	1,0
Diamkan selama 20 menit pada suhu 37 <sup>0</sup> C Baca absorbansinya pada panjang gelombang 578 nm			

Aktivitas ptotease dihitung dalam satuan PU (Protease Unit) per ml ekstrak enzim (Djajasukma, 1993).

$$PU = \frac{Asp - Abl}{Ast - Abl} \times \frac{1}{T}$$

Keterangan :

PU : Unit Aktivitas Protease (Unit/ml)  
 Asb : Nilai Absorbansi Sampel  
 Ast : Nilai Absorbansi Standard  
 Abl : Nilai Absorbansi Blanko  
 T : Waktu

### 3. Uji Fisiologi Isolat Bakteri Proteolitik

#### 3.1. Uji Peptonisasi

Isolat bakteri proteolitik diremajakan pada media NA miring dan di inkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Kemudian diambil 1 ose isolat dan dimasukkan ke dalam media skim milk yang telah diberi indikator *Bromocresol Purple*. Perubahan warna media menjadi ungu muda menunjukkan terjadi fermentasi dan adanya endapan pada media menunjukkan terjadi peptonisasi(Nurhayati,2011).

#### 3.2. Uji Fermentasi Gula

Uji fermentasi isolat bakteri proteolitik dilakukan dengan menambahkan 1 ml suspensi ke dalam 9 ml larutan *Glucose Broth*, *Lactose Broth*, dan *Dextrose Broth* + indikator *Phenol Red* yang dimasukkan ke dalam tabung reaksi berisi tabung durham. Masing-masing perlakuan dilakukan pengulangan sebanyak 3 ulangan. Kemudian isolat bakteri proteolitik tersebut diinkubasi selama 24-48 jam dan diamati ada atau tidaknya aktivitas fermentasi dari isolat bakteri proteolitik. Aktivitas fermentasi oleh bakteri proteolitik dapat dilihat dari adanya gelembung udara pada tabung durham dan terbentuknya asam yang ditandai dengan perubahan warna media menjadi kuning.

### **3.3. Uji Gelatin**

Sebanyak 1 ose isolat bakteri proteolitik diinokulasikan pada media gelatin dan diinkubasi selama 48 jam pada suhu 37°C. Kemudian kultur dimasukkan pada lemari pendingin dengan suhu 4°C selama 30 menit. Indikator pengamatan reaksi positif jika medium gelatin menjadi cair, dan negatif jika medium gelatin menjadi padat (Lay, 1994).

### **3.4. Uji Motilitas**

Uji Motilitas dilakukan dengan cara menginokulasikan isolat bakteri dengan cara menusukkan jarum ose secara tegak lurus hingga setengah tinggi media Sulfit Indol Motility pada tabung reaksi. Media diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C, setelah itu diperhatikan ada tidaknya motilitas koloni bakteri. Terbentuknya warna hitam pada media SIM dan kekeruhan yang menyebar sepanjang bekas tusukan menandakan hasil sulfur positif.

### **3.5. Karakterisasi Bakteri Penghasil Protease Secara Mikroskopis**

Karakteristik mikroskopik yang diamati dari bakteri stok kultur murni yaitu bentuk sel, sifat bakteri terhadap pengecatan gram, dan spora.



**F. Diagram Alir**