

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi, Departemen Biologi dan Laboratorium Biokimia, Departemen Kimia Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Airlangga Surabaya pada bulan Desember 2010 sampai dengan Juli 2011.

3.2 Bahan dan Alat Penelitian

3.2.1 Bahan penelitian

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah:

1. Bahan penelitian

Media skim milk agar dengan campuran media cair Bussnell Hass (BH) merupakan media selektif yang digunakan sebagai media uji kualitatif dengan komposisi sebagai berikut: skim milk 2%; 0,1 gram KH_2PO_4 ; 0,1 gram K_2HPO_4 ; 0,1 gram NH_4NO_3 ; 0,02 gram $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,005 gram FeCl_3 ; 0,002 gram $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; dan agar powder 1,5 gram; media skim milk dengan campuran media cair Bussnell Hass tanpa penambahan agar merupakan media starter dan media produksi yang digunakan sebagai media uji kuantitatif; 2% kasein dalam larutan buffer fosfat pH 7 sebagai substrat; 0,4 M asam trikloroasetat (TCA) yang digunakan untuk menghentikan reaksi (menginaktifkan enzim); 0,5 M

natrium karbonat (Na_2CO_3) untuk mengikat air yang masih tersisa dan reagen *Folin Ciocalteu* untuk memberi warna pada larutan.

2. Isolat bakteri

Bakteri yang akan diskriminasi dan diuji aktivitasnya terdiri atas 5 isolat yang merupakan hasil isolasi dari limbah Rumah Pemotongan Hewan Pacar Keling, Surabaya. Pengambilan sampel limbah cair dilakukan pada 2 tempat yang berbeda. Sampel tersebut dimasukkan dalam botol sampel dan segera dibawa ke laboratorium untuk diisolasi serta dianalisis.

3.2.2 Alat Penelitian

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah *autoclave* Ogawa Seiki, spektrofotometer UV-VIS, spektrofotometer (spectronic 20 Bausch-Lomb), *laminar air flow*, neraca analitik (Shimadzu AEL-200), *shaker incubator*, oven, kompor listrik, *vortex*, pipet volume, pipet mikro, rak tabung reaksi, pembakar bunsen, spatula, tabung reaksi, cawan petri, gelas *Beaker*, labu Erlenmeyer, jarum ose, gelas ukur, labu ukur 25 ml dan 10 ml.

3.3 Prosedur Penelitian

3.3.1 Uji karakteristik bakteri secara makroskopis

Pengambilan sampel dilakukan di Rumah Pemotongan Hewan (RPH) pacar keling, Surabaya. Pengambilan sampel limbah cair dilakukan pada 2 tempat yang berbeda, yaitu pada bak pencucian hewan yang telah disembelih dan pada tempat pencucian ayam yang telah dipotong. Sampel tersebut dimasukkan dalam botol sampel yang berukuran 600 ml sebanyak 420 ml atau $\frac{3}{4}$ bagian dari botol

sampel tersebut, dan segera dibawa ke laboratorium untuk segera dianalisis. Bakteri hasil isolasi dari Rumah Pemotongan Hewan (RPH) dilakukan uji karakteristik secara makroskopis pada media *Nutrient Agar* (NA) *plate*. Uji karakteristik secara makroskopis dapat diketahui dari warna, bentuk, tepi dan elevasi dari koloni.

3.3.2 Pembuatan stok mikroba uji

Isolat bakteri yang diperoleh masing-masing diperbanyak dengan cara ditumbuhkan pada media NA miring dengan metode *streak* dan diinkubasi pada suhu ruang. Setelah 24 jam, semua stok bakteri disimpan dalam lemari es untuk persiapan perlakuan selanjutnya.

3.3.3 Uji kualitatif isolat bakteri

Untuk menguji isolat bakteri secara kualitatif digunakan beberapa tahapan, yaitu :

Pembuatan media selektif. Komposisi media selektif terdiri atas : 2 gram skim milk; 1,5 gram agar powder; dan media Bussnell Hass (0,1 gram KH_2PO_4 ; 0,1 gram K_2HPO_4 ; 0,1 gram NH_4NO_3 ; 0,02 gram $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,005 gram FeCl_3 ; 0,002 gram $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) dalam 100 ml aquades. Semua campuran media dipasteurisasi selama 15-16 detik pada suhu 71°C dengan menggunakan alat *Hot Plate* kemudian dibuat dalam bentuk media Agar plate dan digunakan untuk uji kemampuan aktivitas proteolitik.

Uji kemampuan aktivitas proteolitik. Uji kemampuan bakteri terhadap aktivitas proteolitik secara kualitatif dilakukan dengan menumbuhkan satu

loopfull isolat bakteri pada permukaan media selektif, setelah ditumbuhkan pada media selektif lalu diinkubasikan pada suhu ruang selama 24 sampai 48 jam, aktivitas mikroba dalam mendegradasi protein ditunjukkan dengan adanya zona *halo* (lingkaran jernih) di sekitar koloni. Isolat dengan nilai indeks proteolitik tertinggi dilanjutkan dengan uji aktivitas enzim protease.

3.3.4 Produksi enzim dari bakteri terpilih

Untuk produksi enzim dari bakteri terpilih digunakan starter. Starter tersebut berasal dari bakteri yang diinokulasikan ke dalam media *Nutrient Broth* (NB) dan diinkubasi pada suhu ruang selama 24 jam. Setelah 24 jam starter tersebut diukur nilai *Optical density* (OD) dengan alat spektrofotometer pada $\lambda = 660$ nm, sampai didapatkan *Optical density* (OD) sebesar 0,5. Sebanyak 1% starter diinokulasikan ke dalam 20 ml media produksi (media susu skim dan media Bussnell Hass). Kultur diinkubasi pada *shaker incubator* dengan kecepatan 130 rpm pada suhu kamar selama 3 hari, dan dilakukan pengambilan sampel kultur setiap 4 jam sekali. Pada setiap pengambilan kultur setelah 4 jam sekali, kultur tersebut disentrifugasi pada kecepatan 9.000 rpm selama 15 menit yang digunakan untuk memisahkan filtrat atau supernatan dari biomassa sel. Supernatan yang diperoleh diukur aktivitas proteolitiknya.

3.3.5 Pembuatan kurva pertumbuhan bakteri

Kurva pertumbuhan mikroba di buat bersamaan dengan proses produksi. Sebagai starter digunakan biakan bakteri terpilih yang ditumbuhkan pada media Nutrien Broth lalu diinkubasi pada *shaker incubator* dengan kecepatan 100 rpm pada suhu kamar selama 1 hari. Sebanyak 4 ml suspensi sel dari starter diukur

nilai *Optical density* (OD) dengan alat spektrofotometer pada $\lambda = 660$ nm, sampai didapatkan *Optical density* (OD) sebesar 0,5. 0,2 ml starter diinokulasikan ke dalam 19,8 ml media produksi yaitu media susu skim yang ditambahkan dengan media cair Bussnell Hass. Kultur diinkubasi pada *shaker incubator* dengan kecepatan 130 rpm pada suhu kamar selama 3 hari, dan dilakukan pengambilan sampel kultur setiap 4 jam sekali. Dari kultur diambil 1 ml dan dilakukan pengenceran. Kemudian penghitungan jumlah selnya dilakukan dengan metode *Total Plate Count* (TPC). Data yang diperoleh digunakan untuk membuat kurva pertumbuhan mikroba antara hasil penghitungan TPC dengan *Optical density* (OD).

3.3.6 Pengukuran aktivitas proteolitik

Pengukuran aktivitas proteolitik dilakukan menurut metode yang dilakukan Enggel *et al.* (2004). Sebanyak 0,25 ml larutan enzim ditambahkan dengan 0,25 ml larutan buffer fosfat pH 7 dan dipreinkubasi pada suhu 37°C selama 5 menit. Setelah dipreinkubasi ditambahkan 0,25 ml substrat (2% kasein dalam buffer fosfat pH 7), campuran diinkubasi pada suhu 37°C selama 10 menit. Reaksi dihentikan dengan menambahkan 0,5 ml 0,4 M asam trikloroasetat (TCA), yang selanjutnya disentrifugasi untuk diambil supernatannya. Sebanyak 0,2 ml supernatan ditambah dengan 1 ml 0,5 M Natrium karbonat, dipreinkubasi selama 10 menit, kemudian ditambahkan dengan 0,2 ml reagen *Folin Ciocalteau* dan diinkubasi kembali selama 30 menit. Melakukan pembacaan *Optical density* (OD) pada panjang gelombang 660 nm. Untuk setiap kali pengujian, hasil sampel

dikurangi dengan blanko. Setelah terpilih isolat bakteri yang memiliki nilai aktivitas tertinggi, maka dilakukan tahap identifikasi bakteri.

3.3.7 Tahap identifikasi bakteri

Uji morfologi pewarnaan Gram. Isolat bakteri dengan indeks proteolitik tertinggi dikarakterisasi lanjut secara mikroskopis dengan cara pewarnaan Gram. Pewarnaan Gram mengklasifikasikan bakteri menjadi dua kelompok, yaitu Gram negatif (berwarna merah) dan Gram positif (berwarna ungu). Untuk memulai pengujian dengan cara pewarnaan Gram dilakukan pembuatan apusan pada kaca obyek dengan fiksasi panas. Apusan tersebut ditetesi atau direndam dengan kristal violet selama 1 menit, setelah 1 menit dicuci dengan air mengalir. Setelah itu merendam apusan tersebut dengan lugol selama 1 menit dan dicuci dengan air mengalir. Kemudian ditetesi dengan alkohol 95% selama 30 detik dan dicuci dengan air mengalir seperti cara sebelumnya. Untuk reagen terakhir yaitu direndam dengan safranin selama 30 detik, lalu dicuci dengan air mengalir dan dikeringkan dengan kertas penyerap. Selanjutnya mengamati hasil pewarnaan di atas mikroskop dengan perbesaran 1000x.

Uji pewarnaan endospora. Uji pewarnaan endospora ini merupakan uji lanjutan dari uji pewarnaan Gram untuk menetapkan genus bakteri yang diisolasi. Uji pewarnaan endospora ini menggunakan metode Schaeffer-Fulton, yang menggunakan 2 pewarna, yaitu malachite green dan safranin. Sebelum memulai pengujian, isolat bakteri diinkubasi selama 24 hingga 48 jam. Setelah inkubasi 24 jam, dibuat apusan pada kaca obyek dengan fiksasi panas. Apusan tersebut ditetesi atau direndam dengan malachite green dan diuapkan di atas gelas *Beaker* berisi air

yang dipanaskan selama 5 menit. Setelah 5 menit, apusan didinginkan dan dibilas dengan air selama 30 detik. Setelah 30 detik, ditetesi dengan safranin dan direndam selama 20 detik. Kemudian dibilas dengan air untuk menghilangkan sisa safranin. Apusan yang telah dibilas lalu dikeringkan dengan kertas penyerap. Selanjutnya diamati hasil pewarnaan dengan mikroskop pada perbesaran 1000x.

3.4 Analisis Data

Dari pengujian secara kualitatif diperoleh data nilai diameter zona bening dan nilai diameter koloni dengan hasil bagi antara keduanya yang menyatakan aktivitas protease secara relatif dengan nilai nisbi > 2 . Isolat bakteri yang telah menunjukkan adanya aktivitas proteolitik dengan nilai nisbi > 2 , akan dilanjutkan dengan pengujian karakteristik secara makroskopis, mikroskopis dan uji fisiologis dari isolat bakteri yang terpilih untuk menentukan genus dari bakteri tersebut. Pada pengujian aktivitas proteolitik secara kuantitatif terdapat pengukuran aktivitas proteolitik yang dinyatakan sebagai Internasional Unit (IU), dengan 1 unit (U) aktivitas enzim protease didefinisikan sebagai banyaknya enzim protease yang menghidrolisis kasein menjadi asam amino. Aktivitas enzim protease menurut Naiola dan Widhyastuti (2002), ditentukan dengan menggunakan persamaan berikut :

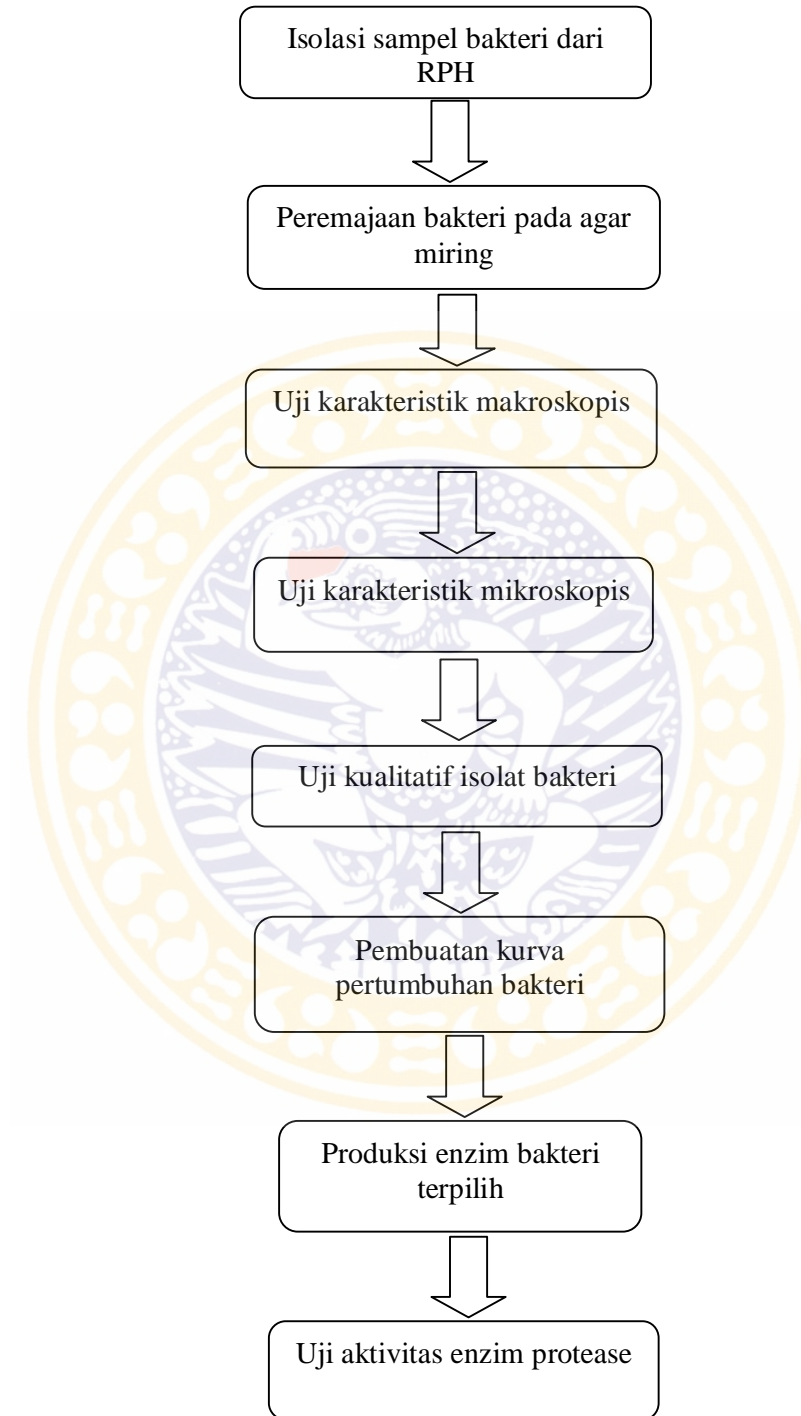
$$\text{Aktivitas Proteolitik (U/ml)} = \frac{(P)\text{Produk Hidrolisis}}{T}$$

dengan:

[P] = konsentrasi produk hidrolisis (μg)

T = waktu inkubasi (menit)

3.5 Skema Metode Pelaksanaan Penelitian



Gambar 3. Diagram alir pelaksanaan penelitian