

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian yang digunakan adalah rancangan penelitian deskriptif kualitatif. Data yang diperoleh disajikan secara deskriptif meliputi karakteristik makroskopis, mikroskopis, uji *Screening*, identifikasi dan uji aktivitas protease secara kuantitatif dari jenis bakteri termofilik penghasil protease yang diisolasi dari sumber air panas Pacet Mojokerto.

3.2 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini akan dilaksanakan pada bulan April sampai Agustus 2014 dan bertempat di Laboratorium Mikrobiologi Jurusan Biologi Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang dan Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.

3.3 Variabel Penelitian

3.3.1 Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini yaitu jenis bakteri proteolitik termofilik hasil isolasi dari sumber air panas Pacet Mojokerto

3.3.2 Variabel Terikat

Variabel terikat dalam penelitian ini yaitu besar diameter zona bening (*clear zone*) bakteri proteolitik termofilik pada media SMA (*Skim Milk Agar*) dan nilai aktivitas enzim protease pada substrat kasein.

3.4 Alat dan Bahan Penelitian

3.4.1 Alat Penelitian

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah termos panas, autoklaf, *laminar air flow*, cawan petri, kertas label, mikropipet, blue tip, jarum ose, tabung reaksi, bunsen, *magnetic stirrer*, termometer, mikroskop, inkubator, lemari es, pemanas (kompor), neraca analitik, pipet, dan penggaris. Pada penelitian ini juga digunakan berbagai macam peralatan gelas, seperti labu Erlenmeyer dan gelas ukur.

3.4.2 Bahan Penelitian

Bahan-bahan yang digunakan adalah sampel air yang diambil dari sumber air panas Pacet Mojokerto. Bahan lain yang digunakan adalah plastik tahan panas, kapas, tisu, kain kasa, karet tahan panas, aluminium foil, palstik wrap, alkohol 70%, alkohol 96 %, akuades, bakto agar, spirtus, *Skim Milk Agar* (SMA) (20 gr susu skim, 5 gr pepton, 2,5 gr ekstrak ragi, 1,0 gr dextrose, 20 mg/mL kasein dan 20 gr bakto agar), H₂O₂ 3%, reagen pewarna Gram, pewarna endospora, Kit *Microbact* (Oxoid), 0,5 tirosin, 25 ml buffer fosfat, 2,5 gr TCA 10%, 5,3 gr Na₂CO₃, 1 gr kasein, dan 25 ml reagen Folin *Ciocalteau*.

3.5 Prosedur Penelitian

3.5.1 Sterilisasi Alat dan Media

Semua alat dan bahan yang akan digunakan dalam penelitian disterilkan terlebih dahulu dengan cara mencucinya, dikeringkan kemudian dibungkus dan memasukkan kedalam autoklaf pada suhu 121°C dengan tekanan 15 psi (*per square inchi*) selama 15 menit. Untuk alat yang tidak tahan terhadap panas tinggi cukup disterilisasi dengan alkohol 70%. Setelah itu media yang digunakan dihomogenkan terlebih dahulu melalui pemanasan, kemudian disterilisasi dengan autoklaf pada suhu 121°C tekanan 15 psi selama 15 menit.

3.5.2 Pembuatan Media

3.5.2.1 Media *Skim Milk Agar* (SMA)

Media yang digunakan untuk pertumbuhan bakteri termofilik penghasil protease adalah media *Skim Milk Agar*. Sebanyak 20 gram susu skim dimasukkan ke dalam Erlenmeyer yang berisi 250 ml akuades. Kemudian susu dipasteurisasi pada suhu 80°C dan dipertahankan selama 30 menit dengan menggunakan termometer. Secara terpisah dilarutkan 5 gram pepton, 2,5 gram ekstrak ragi, 1,0 g dextrose, dan 20 gram bakto agar dalam 750 ml akuades, kemudian disterilisasi dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit. Susu skim yang telah di pasteurisasi dicampur dengan bahan-bahan yang telah di sterilisasi dalam keadaan steril. Media yang telah tercampur selanjutnya di tuang ke dalam cawan petri ± 5 ml, dibiarkan dingin kemudian disimpan selama 24 jam pada lemari es (Amelia, 2005).

3.5.3 Pengambilan Sampel

Sampel yang digunakan berupa air panas yang berasal dari sumber air panas di Pacet Mojokerto. Sampel air diukur suhunya $\pm 40-50^{\circ}\text{C}$ sebelum dimasukkan ke dalam termos. Kemudian sampel air panas dibawa ke laboratorium dalam termos panas.

3.5.4 Isolasi dan Seleksi Bakteri Proteolitik Termofilik

Sebanyak 10 ml sampel dimasukkan ke dalam labu Erlenmeyer yang berisi 90 ml media skim milk cair (pengenceran 10^{-1}), kemudian diinkubasi selama 24 jam dalam inkubator dengan suhu 50°C . Selanjutnya dibuat seri pengenceran $10^{-2}-10^{-10}$ dengan mengambil 1 ml dari pengenceran sebelumnya lalu diencerkan dengan 9 ml aquadest steril. Sebanyak 1 ml dari tiap pengenceran dicawakan pada media *Skim Milk Agar* menggunakan metode *pour plate*. Media yang telah diinokulasi, diinkubasi pada suhu 50°C selama 48 jam dan diamati setiap 24 jam.

Koloni yang dihasilkan dari isolasi diamati morfologinya dan koloni yang terpisah dipindahkan pada agar miring untuk pemurnian. Pemurnian dilakukan dengan cara mengambil satu ose isolat bakteri dan menumbuhkan pada media *Skim Milk Agar* dengan metode *streak kuadran*. Isolat murni yang didapatkan disimpan pada media miring *Skim Milk Agar* untuk perlakuan selanjutnya.

3.5.5 Karakterisasi Bakteri Proteolitik Termofilik

Isolat bakteri termofilik penghasil protease dikarakterisasi dan diidentifikasi yang dilakukan secara biokimia yang mengacu pada buku *Bergey Manual of Determinative Bacteriology 9th*.

3.5.5.1 Pengamatan Makroskopik Koloni

Karakteristik koloni bakteri hasil inokulasi pada media *Skim Milk Agar* yaitu berdasarkan (Dwijoseputro, 1989):

- a. Bentuk koloni (dilihat dari atas): berupa titik-titik, bulat, berbenang, tidak teratur, serupa akar, serupa kumbaran.
- b. Permukaan koloni (dilihat dari samping): rata, timbul-datar, melengkung, membukit, serupa kawah.
- c. Tepi koloni (dilihat dari atas): utuh, berombak, berbelah, bergerigi, berbenang, keriting.
- d. Warna koloni: keputih-putihan, kelabu, kekuning-kuningan atau hampir bening.

3.5.5.2 Pengamatan Mikroskopik

Pengamatan mikroskopik dilakukan untuk melihat bentuk sel bakteri dan untuk melihat kemurnian dari isolat. Pengamatan mikroskopis meliputi bentuk sel bakteri dan pewarnaan Gram. Untuk penentuan jenis bakteri dilanjutkan dengan serangkaian uji biokimia terhadap isolat yang diperoleh dengan berpedoman pada buku *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (Holt dkk., 1994).

3.5.5.2.1 Pengamatan Bentuk Sel Bakteri

Bakteri proteolitik diambil sedikit dengan jarum ose secara aseptis dan disuspensikan dengan aquades yang ada di atas gelas objek kemudian di amati dibawah mikroskop.

3.5.5.2 Pewarnaan Gram

Bakteri proteolitik diambil sedikit dengan jarum ose secara aseptis dan disuspensikan dengan aquades yang ada di atas gelas objek. Preparat difiksasi diatas api bunsen sampai kering. Preparat ditetesi dengan larutan kristal ungu, didiamkan selama 1 menit dan dicuci dengan air mengalir dan dikeringkan. Preparat ditetsi dengan larutan iodin dan didiamkan selama 1 menit, dicuci dengan air mengalir dan dikeringkan. Preparat ditetesi dengan larutan alkohol 96 % sampai warna ungu hilang. Preparat ditetesi dengan larutan safranin dan didiamkan selama 30 detik, dicuci dengan air mengalir dan dikeringkan. Preparat ditetesi dengan minyak imersi, preparat diamati dengan mikroskop, uji Gram positif jika berwarna ungu dan negatif jika berwarna merah (Hadioetomo, 1985).

3.5.6 Uji Bakteri Termofilik Proteolitik Secara Kualitatif

Isolat bakteri hasil isolasi diseleksi kemampuan aktivitas proteolitiknya secara kualitatif pada media susu skim agar. Isolat bakteri termofilik dari media agar miring ditotolkan menggunakan jarum ose di pusat media SMA pada cawan petri. Media diinkubasi dalam inkubator pada suhu 50°C selama 48 jam. Adanya aktivitas protease secara kualitatif ditunjukkan dengan terbentuknya zona bening di sekitar koloni. Pengukuran diameter koloni dan diameter zona bening dilakukan menggunakan penggaris. Semakin besar zona bening yang terbentuk di sekitar koloni, maka semakin besar juga aktivitas protease yang dihasilkan.

3.5.7 Identifikasi Spesies Bakteri Menggunakan *Microbact*

Hasil karakterisasi dari masing-masing isolat diidentifikasi dengan menggunakan Kit *Microbact* 12A/12E atau 24E dan mengacu pada buku *Bergey Manual of Determinative Bacteriology 9th*. Sebelum ditentukan menggunakan 12A/12E atau 24E, koloni bakteri dilakukan uji oksidase, jika hasil oksidase negatif menggunakan *Micrbact* system 12A/12E saja, sedangkan jika hasil oksidasenya positif maka menggunakan 24E.

Isolat bakteri yang telah diinkubasi selama 18-24 jam diambil dengan menggunakan ose kemudian dilarutkan kedalam 5 ml garam fisiologis 0,9% pada tabung reaksi steril dan divortex hingga homogen. Suspense bakteri yang telah homogen diteteskan kedalam sumur *Microbact* sebanyak 100 µl, untuk sumur Lysin, Omitin, dan H₂S ditambah dengan tetesan *mineral oil* sebanyak 1-2 tetes. Setelah itu *Microbact* diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam. *Microbact* yang telah diinkubasi diambil kemudian diteteskan 2 tetes reagent Nitrat A dan B pada sumur 7, pada sumur nomor 8 dengan *Indol Kovact* sebanyak 2 tetes, sumur nomor 10 dengan VP I dan VP II masing-masing satu tetes, dan sumur 12 dengan TDA sebanyak satu tetes.

Uji fermentasi karbohidrat pada *Microbact* 12B, tanpa ada penambahan reagen yaitu hasil dari sumuran langsung bisa dibaca hasilnya, yaitu jika fermentasi positif menunjukkan warna kuning, sedangkan hasil negatif tidak ada perubahan warna tetap biru. Perubahan warna tes pada tiap sumur yang berbeda dicatat. Evaluasi hasil

dilihat melalui sumur-sumur *Microbact* apakah positif atau negatif dengan cara membandingkan dengan tabel warna dan hasilnya ditulis pada formulir *Patient Record*. (Oxoid, 2004).

3.5.8 Produksi Protease

Isolat bakteri proteolitik diinokulasikan sebanyak 2 ose dalam 50 ml media susu skim cair dan diinkubasi pada shaker inkubator dengan kecepatan 120 rpm pada suhu 50° C selama 18 jam. Inokulum kemudian diambil sebanyak 5 ml dan dipindahkan dalam 50 ml media susu skim cair dan diinkubasi pada shaker inkubator pada suhu 50° C selama 22 jam (Amelinda, 2010). Ekstrak kasar enzim diperoleh dengan mensentrifugasi kultur pada kecepatan 6000 rpm selama 20 menit pada suhu 4°C. Supernatan yang diperoleh adalah ekstrak kasar enzim protease dan digunakan untuk penentuan aktivitas enzim (Apriyantono dkk., 1989).

3.5.9 Pembuatan Kurva Standart Tirosin (Dina, 2012)

Kurva standar tirosin dibuat dengan pengenceran dari larutan induk tirosin 1 mg/ml menjadi beberapa konsentrasi yaitu 60 ppm, 120 ppm, 180 ppm, 240 ppm, dan 300 ppm. Variasi konsentrasi tersebut dibuat dengan menggunakan larutan standar tirosin 1 mg/ml. Masing-masing konsentrasi diambil sebanyak 1 ml lalu dimasukkan kedalam tabung reaksi. Kemudian masing-masing konsentrasi tersebut ditambahkan 0,5 ml Na₂CO₃ 0,5 M dan dihomogenkan. Kemudian ditambahkan 1 ml reagen Folin *Ciocalteau* dan dihomogenkan. Selanjutnya diukur nilai absorbansinya pada panjang gelombang 578 nm dengan spektrofotometer. Hasil absorbansi yang diperoleh

kemudian diinterpolasikan dengan konsentrasi yang diukur dengan dibuat persamaan linearnya.

3.5.10 Pengujian Aktivitas Protease (Dina, 2012)

Aktivitas enzim protease diukur dengan metode Bergmeyer dan Ward (1984) yang dimodifikasi. Metode ini menggunakan kasein sebagai substrat. Substrat yang digunakan adalah kasein 1 % sebagai inducer dilarutkan kedalam buffer posfat (50 mM, pH 7). 1 ml substrat kemudian direaksikan dengan 1 ml enzim selama 10 menit pada suhu 50°C. Reaksi dihentikan dengan penambahan 1 ml asam tricloro asetat (TCA) 10 % inkubasi selama 10 menit pada suhu 50°C. Kemudian disentrifugasi pada kecepatan 10.000 rpm selama 20 menit. Pada 1 ml supernatan ditambahkan Na₂CO₃ 0,5 M dan pereaksi Folin *Ciocalteau* (1:2), campuran diinkubasi 20 menit pada suhu 50°C. Absorbansi dibaca pada panjang gelombang 578 nm. Aktivitas protease ditentukan dengan cara menginterpolasikan nilai absorbansi dengan persamaan regresi dari kurva standar tirosin yang didapatkan. Blanko dibuat dengan cara yang sama, namun enzim di inaktifkan dahulu dengan direaksikan dengan 1 ml TCA. Satu unit aktivitas enzim didefinisikan sebagai jumlah enzim yang membebaskan 1 μmol tirosin per menit pada suhu dan pH optimum (Sugiyono dkk., 2008). Perhitungan aktifitas enzim protease dapat dihitung dengan rumus Walter (1984):

$$\text{Aktivitas enzim} = \frac{[\text{Tirosin}]}{\text{Mr Tirosin}} \times \frac{v}{pxq} \times fp$$

Dimana:

- [tirosin] :konsentrasi tirosin yang terbentuk
v :volume total sampel pada tiap tabung (ml)
q :waktu inkubasi (menit)
p :jumlah enzim (ml)
fp :faktor pengenceran

Aktivitas protease dihitung dalam satuan U (unit) per mL ekstrak enzim. Satu unit protease (U) didefinisikan sebagai banyaknya mL enzim yang dibutuhkan untuk menghasilkan 1 μmol tirosin tiap menit dengan kasein sebagai substrat (Yusriah dan Nengah, 2013).

3.5.11 Analisis Data

Data yang diperoleh disajikan secara deskriptif meliputi karakteristik makroskopis dan mikroskopis, uji aktivitas enzim protease secara kualitatif maupun kuantitatif, serta hasil identifikasi sampai tingkat spesies dari uji *Microbact* dari masing-masing jenis bakteri proteolitik termofilik yang berhasil diisolasi dari sumber air panas Pacet Mojokerto.