

BAB III METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi dan Genetika Jurusan Biologi Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang dari bulan Mei - Juli 2013.

3.2 Alat dan Bahan

Peralatan yang digunakan dalam pengujian aktivitas bakteri protease ini antara lain adalah : tabung reaksi, rak tabung, pipet, erlenmeyer, gelas ukur, beaker glas, spatula, tabung sentrifuse, autoklaf, timbangan digital, vortex mixer, shaker inkubator, jarum ose, hot plate, mikropipet, bunsen, inkubator, sentrifuse *crushable tang*, pH meter, spektrofotometri, LAF.

Bahan yang digunakan dalam pengujian aktivitas bakteri protease secara kuantitatif antara lain adalah : bakteri *Bacillus mycoides* yang di dapatkan dari koleksi laboratorium mikrobiologi UIN Maulana Malik Ibrahi Malang. Media alternatif : Dedak halus dan Limbah Cair Tahu (LCT), Aquades, NA (Nutrient Agar), kasein hammersten (2% kasein dalam 0,05 M larutan buffer burat pH 8,0), boric, larutan TCA 0,1 mol/L, Tyrosin standart 5mmol/L, Na₂CO₃ 0,4 mol/L, pereaksi folin ciocalteau, buffer fosphat 0,01M pH 6, tris HCl pH 7, 8, HCL 0,05M, CaCl₂ 12 mmol/L, aluminium foil, alkohol 70%, NaOH, HCl 1M dan 0,05 mol/L, asam borak dan ekstrak enzim protease.

3.3 Rancangan Penelitian

Rancangan yang digunakan dalam penelitian ini adalah rancangan acak lengkap (RAL) dengan perlakuan variasi pH memiliki 3 level yaitu 6, 7, 8 yang dikelompokkan dalam variasi suhu yang memiliki 4 level, yaitu 30, 40, 50, 60°C. Masing masing dilakukan pengulangan sebanyak 3 kali. Tabel yang digunakan bisa dilihat pada tabel 2 di bawah ini.

Tabel 3: Rancangan Pengamatan

Suhu	pH	Ulangan I	Ulangan II	Ulangan III
30°C	6			
	7			
	8			
40°C	6			
	7			
	8			
50°C	6			
	7			
	8			
60°C	6			
	7			
	8			

Metode analisa yang digunakan adalah sidik ragam yang mengikuti model

$$Y_{ijk} = \mu + A_i + B_j + p_k + (AB)_{ij} + \epsilon_{ijk}$$

Dimana:

Y_{ijk} = Nilai pengamatan pada perlakuan

μ = Nilai tengah umum

A_i = Pengaruh taraf ke-i dari faktor A

P_k = Ulangan ke-k

B_j = Pengaruh taraf ke-j dari faktor B

$(AB)_{ij}$ = Pengaruh taraf interaksi ke-i dari faktor A dan taraf ke-j dari faktor B

ϵ_{ijk} = Pengaruh sisa (*galat percobaan*) dari taraf ke-i dari faktor A dan taraf ke j dari faktor B pada ulangan yang ke-k.

3.4 Prosedur Penelitian

3.4.1 Pembuatan Media

3.4.1.1 Pembuatan Media Agar Nutrien (Cappucino & Sherman 1983) untuk Peremajaan

1. Dicampur sebanyak 10 g NA bubuk dengan 500 ml aquades di dalam labu erlenmeyer lalu dipanaskan sambil diaduk sampai media mendidih.
2. 15 ml larutan NA dituangkan ke dalam masing-masing 2 tabung reaksi untuk di buat media miring dan sebagian lagi tetap berada dalam labu erlenmeyer.
3. Disterilkan media NA pada suhu 121°C selama 15 menit.

3.4.1.2 Pembuatan Media Produksi (Naiola dan Widhyastuti, 2002)

1. Disaring limbah cair tahu untuk memisahkan kotoran.
2. Dilarutkan sebanyak 12,5 g dedak halus dalam 250 ml limbah cair tahu.
3. Disterilisasi pada suhu 121°C selama 15 menit.

3.4.2 Peremajaan *Bacillus mycoides*

1. Peremajaan *Bacillus mycoides* dilakukan dengan menginokulasikan isolat tersebut pada *Nutrient Agar* miring.

2. Diinkubasi pada suhu 37 °C selama 24 jam.

3.4.3 Kurva Perumbuhan Bakteri *Bacillus mycooides* (Ferdian, 2006)

1. Disiapkan labu erlenmeyer 250 ml yang berisi media campuran limbah cair tahu dan dedak.
2. Kemudian media campuran limbah cair tahu dan dedak disterilisasi pada suhu 121°C selama 15 menit.
3. Setelah media berada pada suhu ruang, diinokulasikan sebanyak 8 Ose *Bacillus mycooides* pada media campuran limbah cair tahu dan dedak.
4. Diletakkan labu erlenmeyer yang telah berisi *Bacillus mycooides* dalam waterbath shaker dengan kecepatan 200 rpm suhu 37°C.
5. Setiap 2 jam jumlah bakteri dalam labu diukur OD nya menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 660 nm.

3.4.4 Produksi Enzim Protease (Sutandi, 2003)

Media yang digunakan untuk produksi protease pada penelitian ini ialah campuran limbah cair tahu dengan dedak pH 7. Untuk menepatkan pH digunakan NaOH 1 M.

1. Dimasukkan sebanyak 250 ml media campuran limbah cair tahu dan dedak ke dalam erlenmeyer kemudian disterilisasi.
2. Dimasukkan inokulum segar sebanyak 10% (v/v) setelah media berada pada suhu ruang.
3. Diinkubasi pada mesin pengkocok/*Shaker* selama akhir fase logaritmik awal fase stasioner.

4. Ekstraksi enzim dilakukan dengan menggunakan sentrifuse dengan kecepatan 10000 rpm selama 15 menit.
5. Kemudian filtrat yang telah memisah dari pellet diambil. Filtrat ini merupakan enzim kasar.

3.4.5 Pengukuran Aktivitas Protease (Bergmeyer dan Grassal, 1983)

3.4.5.1 Penentuan Suhu dan pH

Aktivitas dari enzim protease yang dihasilkan diukur dengan Metode Bergmeyer dan Grassal (1983).

1. Dibuat pereaksi yang digunakan untuk pengukuran aktivitas enzim protease (Lampiran 1).
2. Disediakan tiga tabung: masing-masing untuk blanko, standar dan sampel.
3. Sebanyak 1 ml buffer fosfat (0.01M, pH 6) dan tris HCl (0,01M, pH 7,8) dimasukkan dalam masing- masing tabung.
4. Dilanjutkan dengan pemberian 1ml substrat kasein (20 mg/ml, pH 8) dan 0.2 ml HCl (0.05M) ke dalam masing- masing tabung.
5. Tabung blanko, standart dan sampel diisi dengan masing-masing 0.2 ml aquades. 0.2 ml tirosin standart (5mM), dan 0.2 ml enzim kasar dalam CaCl_2 (2mM).
6. Ketiga tabung diinkubasi dalam shaker inkubator dengan kecepatan 120 rpm selama 120 menit pada perbedaan suhu 30, 40, 50, 60°C.
7. Ketiga tabung ditambah 2 ml TCA (0.1M). Kemudian larutan CaCl_2 (2mM) sebanyak 0.2 ml dimasukkan ke dalam tabung sampel, Tabung

blanko dan standart masing- masing diberi 0.2 ml enzim kasar dalam CaCl₂ (2mM).

8. Ketiga tabung didiamkan pada suhu 37°C selama 10 menit.
9. Diputar dengan kecepatan 4000 rpm selama 10 menit.
10. Sebanyak 1.5 ml filtrat diambil dari ketiga tabung dan ditambahkan 5 ml Na₂CO₃ 0.4 M dan 1 ml reagen Folin Ciocalteau.
11. Reaksi didiamkan selama 20 menit pada suhu 37°C dan dibaca absorbansinya pada panjang gelombang 578 nm.
12. Setiap sampel yang akan dihitung aktivitasnya memiliki nilai absorbansi untuk blanko, standar dan sampel masing- masing. Dengan menggunakan rumus di bawah ini dapat dihitung unit aktivitas dari enzim. Perhitungan aktifitas enzim protease dapat dihitung dengan rumus (Bergmeyer, 1983):

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

- Keterangan;
- PU : Unit aktivitas protease (unit)
 - Asp : Nilai absorbansi sampel
 - Ast : Nilai absorbansi standart
 - Abl : Nilai absorbansi blanko
 - P : Faktor pengenceran
 - T : Waktu inkubasi enzim

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 (Nakanishi, 1974).

3.5 Analisa Data

Data yang diperoleh dari hasil penelitian, akan dianalisa secara statistik dengan menggunakan analisa keragaman (ANOVA) sesuai dengan rancangan yang digunakan rancangan acak lengkap (RAL). Langkah selanjutnya adalah membandingkan antara F hitung dengan F tabel:

- Jika $F_{hitung} < F_{tabel 5\%}$, maka perlakuan tidak berbeda nyata
- Jika $F_{hitung} > F_{tabel 5\%}$, maka perlakuan berbeda nyata dan di lanjutkan dengan Uji *Duncan Multiple Range Test* (DMRT).

