

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Objek dan Lokasi Penelitian

Objek atau bahan penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Bacillus subtilis* dan *Bacillus cereus* yang diperoleh di Laboratorium Mikrobiologi Jurusan Pendidikan Biologi FPMIPA UPI, limbah cair tahu yang diperoleh di pabrik tahu Cibuntu, Bandung dan kulit domba yang diperoleh dari Lembang-Bandung.

Adapun lokasi penelitian dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Jurusan Pendidikan Biologi, Laboratorium Riset dan Laboratorium Kimia Analitik Instrumen Jurusan Pendidikan Kimia FPMIPA UPI.

3.2 Alat dan Bahan

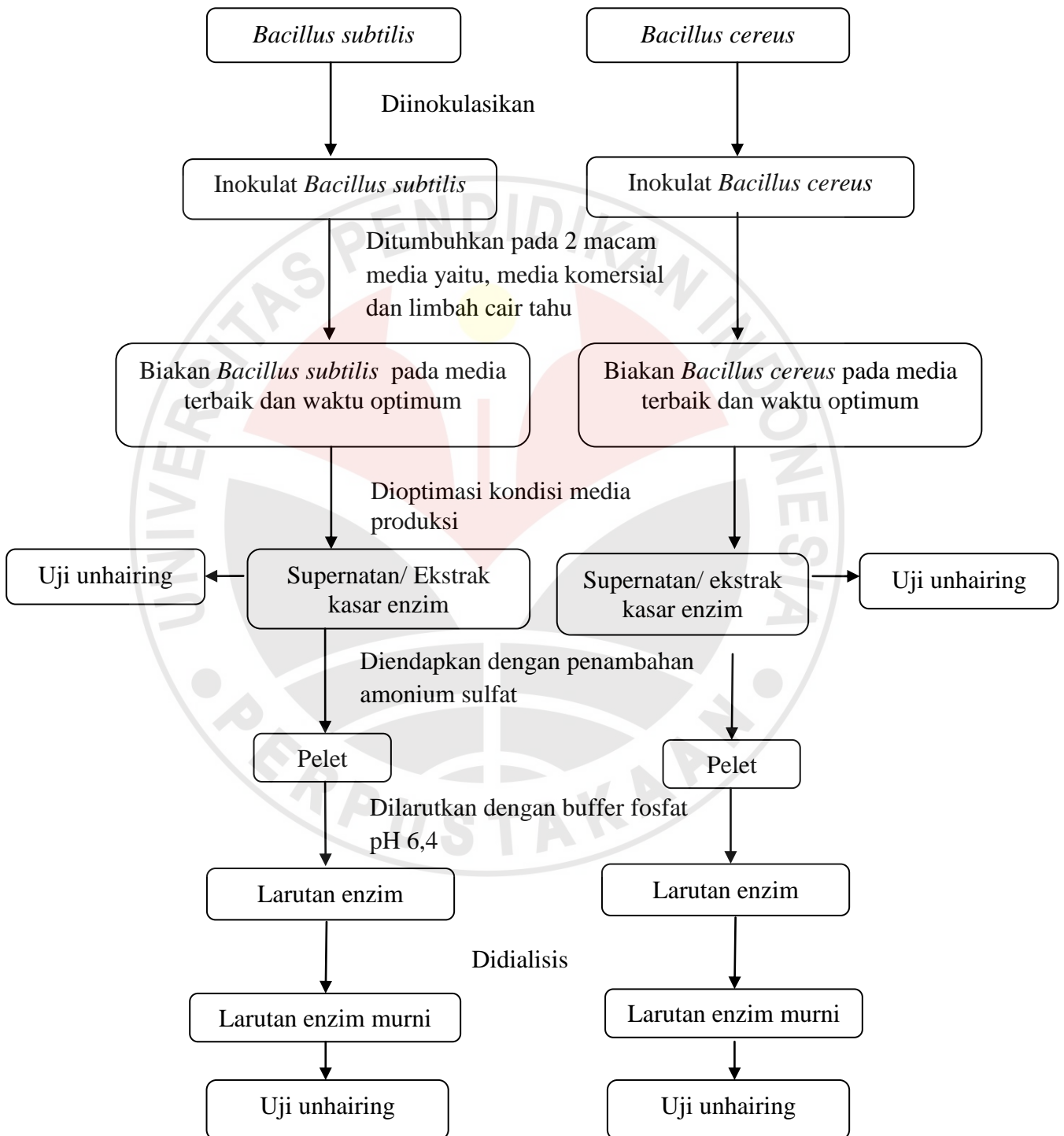
3.2.1 Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini meliputi (1) peralatan untuk prakultur, media produksi enzim protease serta uji aktivitas enzim dari *Bacillus subtilis* dan *Bacillus cereus* yaitu autoklaf, *waterbath shaker*, mikrosentrifuge, spektrofotometer UV-Vis dan peralatan gelas laboratorium lainnya; (2) peralatan untuk keperluan pemurnian enzim yaitu kantong selofan.

3.2.2 Bahan

Bahan-bahan yang diperlukan untuk penelitian ini meliputi: *Bacillus subtilis* dan *Bacillus cereus*, medium cair *Nutrient Borth*, buffer fosfat pH 7, buffer karbonat pH 8; 9; 10; 11, NaOH, media komersial (K_2HPO_4 , $MgSO_4$, ekstrak ragi, dan susu kedelai (Priya Pillai, 2008)), media limbah cair tahu (limbah cair tahu dan 5% susu skim), kasein, TCA (asam trikloro asetat), Na_2CO_3 , reagen *Folin-Ciocalteu*, tirosin, reagent lowry, amonium sulfat, aquades dan buffer fosfat pH 6,4.

3.3 Bagan Alir Penelitian



Gambar 3.1 Bagan Alir keseluruhan Penelitian

3.4. Prosedur Kerja

3.4.1 Pertumbuhan *B. Subtilis* dan *B. Cereus*

Media pertumbuhan prakultur yang digunakan adalah medium cair *Nutrient Broth (NB)* yang mengandung 1% pepton, 0.5% NaCl, dan 0.3% ekstrak daging dalam 100 mL aquades. Bakteri diinokulasikan kedalam media cair *NB*, kemudian diinkubasi pada suhu kamar diatas alat pengocok pada kecepatan 120 rpm selama 24 jam. Untuk memperbanyak inokulat bakteri yang dihasilkan, inokulat tadi dimasukkan kedalam media komersial pada pH 10 suhu 37°C didalam *waterbath shaker*.

3.4.2 Pemilihan Media Terbaik dan Waktu Optimum

Media komersial yang digunakan untuk *Bacillus subtilis* dan *B. cereus* mengandung 0.7% K_2HPO_4 , 0.3% KH_2PO_4 , 0.01% $MgSO_4$, 0.5% ekstrak ragi, dan 1% susu kedelai sebanyak 100 mL pada pH 10 dimasukkan kedalam labu erlenmeyer 250 mL, disterilkan lalu kedalam media tersebut ditambahkan 1 ml larutan inokulum dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam .

Media limbah cair tahu yang digunakan sebagai media produksi protease adalah limbah cair tahu yang ditambah dengan 5% susu skim pada pH 10. Setelah media dimasukkan kedalam erlenmeyer sebanyak 100 ml kemudian disterilisasi. Setelah dingin dimasukkan 1 mL larutan inokulum. Inkubasi dilakukan pada suhu 37°C selama 24 jam.

Kemudian dibuat kurva pertumbuhan dari kedua media tersebut. Diukur absorbansinya pada panjang gelombang 540 nm setiap 2 jam sekali selama 24 jam.

3.4.3 Penentuan Suhu dan pH Optimum

Setelah didapat media terbaik dan waktu optimum untuk produksi protease kemudian dilakukan optimasi media produksi dengan cara *Bacillus subtilis* dan *Bacillus cereus* ditumbuhkan pada media terbaik kemudian divariasikan kondisi inkubasi yaitu, pada pH 7, 8, 9, 10, 11; suhu 30°C, 35°C, 37°C, 40°C, 45°C selama 14 jam dishaker pada 120 rpm. Setelah itu disentrifugasi selama 10 menit dengan kecepatan 13000 rpm. Untuk mengetahui kondisi optimum produksi protease, setiap supernatan diuji aktivitas proteasenya (Zambare *et al.*, 2007)

3.4.4 Pengujian Aktivitas Protease

Aktivitas protease diukur dengan menggunakan kasein sebagai substrat (2% kasein dalam 0.05 M larutan buffer fosfat pH 7,0). Sebanyak 5 mL larutan kasein diinkubasi pada suhu 37°C selama 5 menit, ditambah 1 mL enzim kemudian diinkubasi kembali pada suhu 37°C selama 10 menit. Setelah inkubasi 5 mL asam trikloroasetat (TCA) ditambahkan untuk menghentikan reaksi dan diinkubasi selama 30 menit. Selanjutnya supernat dipisahkan dari endapan dengan disentrifuge dengan kecepatan 13.000 rpm selama 10 menit. Filtrat diambil sebanyak 2 mL, kemudian ditambahkan 5 mL Na₂CO₃ dan 1 mL reagen *Follin Ciocalteu* dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 30 menit. Setelah inkubasi, dilakukan

pengukuran absorbansi pada panjang gelombang 739 nm. Sebagai blanko digunakan larutan enzim dengan perlakuan yang sama, tetapi penambahan TCA dilakukan sebelum penambahan substrat (Nigam, 2007). Satu unit aktivitas enzim protease adalah banyaknya enzim yang diperlukan untuk menghasilkan 1 μg tirosin.

3.4.5 Pemurnian Enzim

3.4.5.1 Pengendapan dengan Amonium Sulfat

Pengendapan protein dengan amonium sulfat dilakukan dengan metode Scope (1982). Sebanyak 10 ml supernatan enzim ditambahkan amonium sulfat dengan berbagai kadar berdasarkan kejenuhan (65%, 67%, 70%, 75%, 80%.) untuk mendapatkan kadar amonium sulfat yang optimum. Penambahan amonium sulfat dilakukan sedikit demi sedikit dengan magnetic stirer pada suhu dingin. Setelah semua amonium sulfat larut, didiamkan semalam pada suhu 4°C. Endapan yang terbentuk dipisahkan dari supernatan dengan sentrifugasi 3000 rpm, 60 menit, suhu 4°C. Selanjutnya dilakukan pengujian aktivitas protease dan kadar proteinnya. Pengendapan amonium sulfat yang menghasilkan aktivitas tertinggi pada endapannya digunakan sebagai patokan untuk pengendapan selanjutnya.

3.4.5.2 Dialisis

Dialisis dilakukan untuk menghilangkan garam yang tersisa pada proses pengendapan. Endapan enzim yang diperoleh dari hasil pengendapan amonium sulfat yang optimum dilarutkan ke dalam 0,05 M

buffer fosfat pH 6,4. Campuran tersebut dimasukkan ke dalam kantong selofan yang telah dipreparasi sebelumnya, kemudian kantong selofan diikat dan direndam kedalam 0,025 M buffer pH 6,4, diaduk dengan menggunakan stirrer secara perlahan selama 24 jam pada suhu 4°C. Buffer diganti setiap 1 jam sekali selama 4 jam pertama setelah itu buffer diganti selama 4 jam sekali.

3.4.6 Uji *Unhairing* Kulit Domba

Uji aktivitas *unhairing* dilakukan dengan merendam kulit domba dengan larutan ekstrak kasar enzim dibandingkan dengan kulit domba yang direndam dengan enzim protease yang telah dimurnikan. 1 gram kulit domba direndam dengan 4 mL larutan enzim selama 20 jam.