

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1. Objek Dan Lokasi Penelitian

Objek atau bahan penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah proteas *Bacillus subtilis* diperoleh dari laboratorium Mikrobiologi Jurusan Pendidikan Biologi FPMIPA UPI dan protease *Bacillus pumilus* yang diperoleh dari laboratorium ITB, kulit sapi didapat dari kampung Manoko, Lembang, Bandung.

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

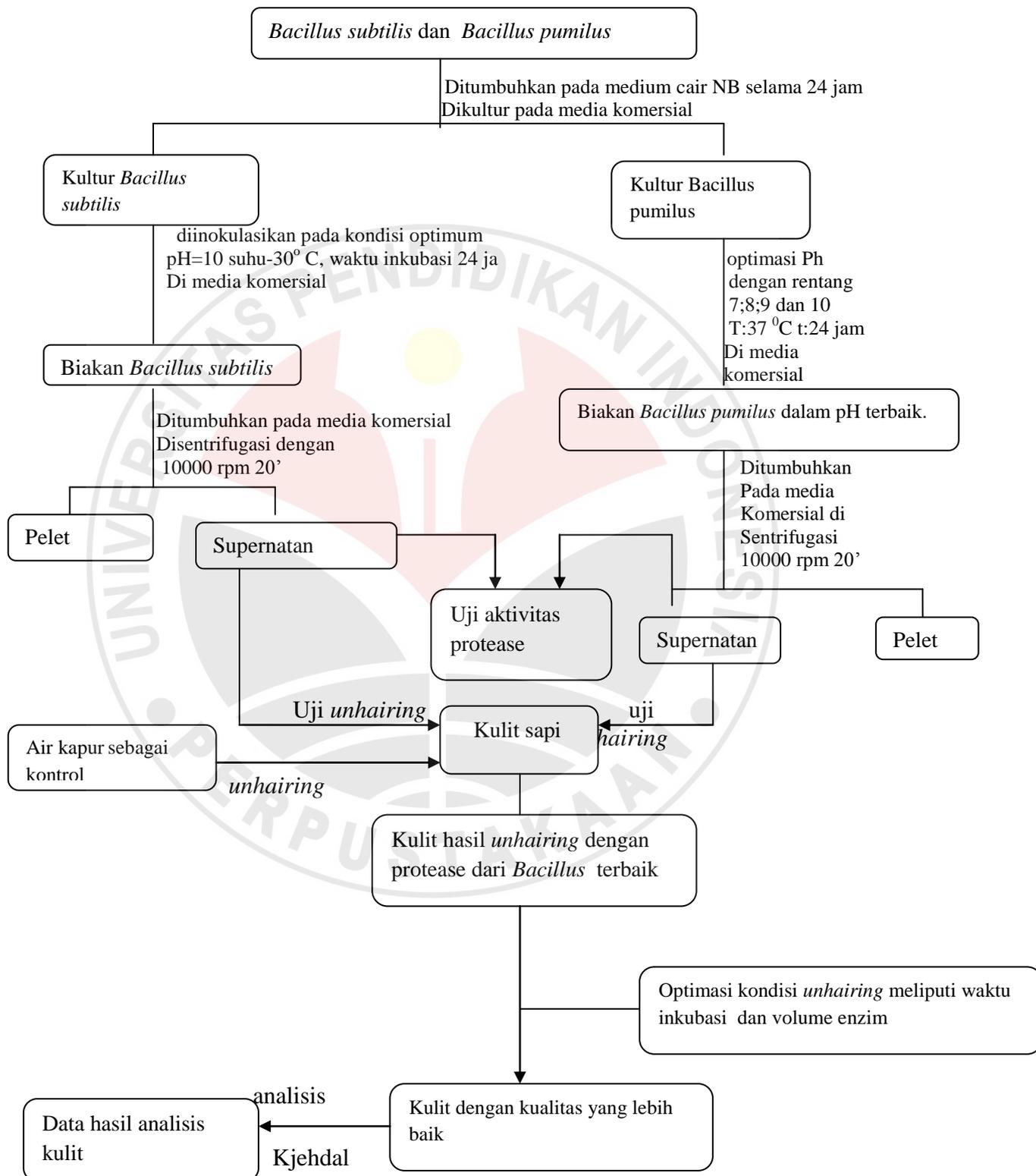
Alat yang digunakan dalam penelitian ini meliputi (1) peralatan untuk prakultur, media produksi enzim protease, uji aktivitas protease, serta uji penyerapan bahan penyamak yaitu *sterilizer (autoclaf)*, *waterbath shaker*, *shaker*, mikrosentrifuge, Genesis UV-mini, dan peralatan gelas laboratorium (2) peralatan untuk keperluan pengolahan kulit, yaitu gelas kimia dan *shaker* (3) alat untuk keperluan analisis kadar protein kulit hasil *unhairing*, yaitu seperangkat alat kjehdal.

3.2.2. Bahan

Bahan-bahan yang diperlukan untuk penelitian ini meliputi susu skim, pepton, agar, dan laktosa, K_2HPO_4 0-2%, KH_2PO_4 0-1%, 0-0,2% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, $(NH_4)_2CO_3$, NaCl 0-1% ekstrak ragi, susu kedelai, glukosa, *Beef Extract*, 0-5% kasein, buffer fosfat pH 7, TCA (trikloro asetat), Na_2CO_3 , reagen *Folin Ciocalteu* dan tirosin standar, Na_2S dan $(Ca(OH)_2)$, NaOH 10 %, H_2SO_4 pekat, H_3BO_3 3 %, HCl, protease dari *Bacillus subtilis* dan *Bacillus pumilus*.



3.3. Bagan Alir



3.4. Prosedur Kerja

3.4.1. Pertumbuhan *B. Pumilus* dan *B.subtiliis*

Media pertumbuhan yang digunakan untuk bakteri adalah medium cair NB yang mengandung 1% pepton, 0.5% NaCl, dan 0.3% ekstrak daging dalam 100 mL aquades. Bakteri diinokulasikan kedalam media cair, kemudian diinkubasi pada suhu kamar diatas alat pengocok dengan kecepatan 120 rpm selama 24 jam. (Elidar Naiola dan Nunuk Widyastuti, 2002).

3.4.2. Produksi Proteas dari *Bacillus Subtilis*

Enzim protease dari *Bacillus subtilis* diproduksi sebanyak 250 mL menggunakan medium yang mengandung 0,7% K_2HPO_4 , 0,3%, KH_2PO_4 0,01%, $MgSO_4$ ekstrak ragi, dan 1% susu skim. Kondisi media produksi dilakukan pada pH 10; suhu $30^{\circ}C$ dan waktu 24 jam dikocok pada 170 rpm (Nisa,2011). Inkubasi dilakukan pada pH 10 dengan suhu $30^{\circ}C$ selama 48 jam, setelah 48 jam dilakukan sentrifuge dengan kecepatan 12.000 rpm selama 10 menit untuk mendapatkan enzim ekstraselular yang akan digunakan pada tahap selanjutnya (Priya Pillai, 2008).

3.4.4. Produksi Protease dari *Bacillus pumilus*

Enzim protease dari *Bacillus pumilus* diproduksi 250 sebanyak mL menggunakan medium yang mengandung 0,7% K_2HPO_4 , 0,3%, KH_2PO_4 0,01%, $MgSO_4$ ekstrak ragi, dan 1% susu skim. (Priya Pillai, 2008). Optimasi kondisi media produksi dilakukan pada rentang pH 7;8;9 dan 10 suhu inkubasi pada suhu $37^{\circ}C$ selama 24 jam dilakukan sentrifuge dengan kecepatan 10.000 rpm selama 20 menit untuk mendapatkan enzim ekstraselular yang akan digunakan pada tahap selanjutnya (Wang,*et al*,2006)

3.4.3. Pengujian Aktivitas Protease secara Kuantitatif dari Bakteri *Bacillus pumilus* dan *Bacillus subtilis*

Substrat larutan kasein dipipet sebanyak 3 ml dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 5 menit kemudian ditambahkan 2 ml larutan enzim dan inkubasi selama 10 menit pada suhu 37°C sambil di kocok. Setelah 10 menit ditambahkan 3 ml larutan TCA untuk setiap tabung dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 30 menit sambil dishaker. (Nakanishi, 1974 dalam Mukhammad dan Surya, 2010) Setelah 30 menit disentrifugasi pada 8000 rpm selama 20 menit. Larutan tak berwarna (cairan jernih) didekantasi kemudian diambil 2 ml ditambahkan 5 ml Na₂CO₃ dan ditambahkan 0,5 ml larutan folin diinkubasi selama 30 menit pada suhu 37°C. Di ukur absorbansi sampel pada panjang gelombang 739 nm.

3.4.4. Optimasi Kondisi Proses *Unhairing*

Pertama pada proses *unhairing* sebagai kontrol, 6 g kulit sapi hasil pencucian dengan sabun direndam dengan larutan 1,5% Na₂S pada suhu ruangan selama 24 jam dan air kapur dengan konsentrasi 2⁰ Be, yaitu 0,4 kg kapur dalam 5 liter air untuk 1 kg kulit. Pengadukan menggunakan shaker dengan lama waktu pengadukan pada ± 24 jam (Amertaningtyas, 2009). Optimasi volume pada proses buang bulu (*unhairing*) dilakukan dengan cara inkubasi menggunakan protease yang dihasilkan dari *Bacillus* terpilih dengan rentang waktu 18, 19, 20 dan 21 jam pada suhu ruang dengan variasi konsentrasi 3 mL/g; 4 mL/g; dan 5 mL/g (v/w berat kulit), percobaan dilakukan secara triplo.

3.5. Analisis Kualitas Kulit

a. Pengujian Fisik

Sampel kulit hasil dari *unhairing* enzimatis dan konvensional dianalisis berdasarkan penampakan permukaan meliputi warna, tebal, dan rambut yang tersisa.

b. Analisis Kadar Protein (AOAC 1984)

Kadar protein yang terkandung dalam kulit hasil proses *unhairing* dan pembuangan bulu dengan menggunakan air kapur biasa diuji dengan metode kjehdal. Sampel dihitung sebanyak 0,5-3 g lalu dimasukkan ke dalam labu Kjeldahl dan didestruksi dengan menggunakan 20 ml asam sulfat pekat dipanaskan sampai terjadi larutan berwarna jernih. Larutan hasil destruksi diencerkan dan didestilasi dengan penambahan 10 ml NaOH 10 %. Destilat ditampung dalam 25 ml larutan H₃BO₃ 3 %. Larutan H₃BO₃ dititrasi dengan larutan HCl standar dengan menggunakan metal merah sebagai indikator. Dari hasil titrasi ini total nitrogen dapat diketahui. Kadar protein sampel dihitung berdasarkan rumus berikut:

$$\text{Total Nitrogen (\%)} = \frac{\text{miltitrax NHCl} \times \text{fk} \times 14}{\text{Bobot sampe}} \times 100$$

$$\text{Kadar Protein (\%)} = \text{Total Nitrogen} \times 6,25$$



Fiska Noor Adityani, 2012

Produksi Dan Pemanfaatan Protease Dari *Bacillus subtilis* Dan *Bacillus pumilus* untuk Unhairing Kulit Sapi Sebagai Bahan Baku Kerupuk Rambak

Universitas Pendidikan Indonesia | repository.upi.edu