

BAB III METODOLOGI PENELITIAN

3.1. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilaksanakan pada bulan Juni 2020. Persiapan kultur dan penghitungan biomasa sel basah maupun biomasa sel kering dilaksanakan di Laboratorium Budidaya Perairan Unisnu Jepara. Selanjutnya, dilakukan uji kinetika pertumbuhan sekaligus pengamatan aktivitas protease bertempat di Marine Sains Techno Park (MSTP) Undip Teluk Awur Jepara.

3.2. Materi Penelitian

Materi uji dalam penelitian ini adalah bakteri simbiosis spons yang didapatkan dari perairan Teluk Awur Jepara. Perairan Teluk Awur Jepara dipilih karena masih minimnya dieksplorasi keanekaragaman disana, serta berdasarkan letak geografisnya yang berupa teluk sehingga perairannya bersifat landai dan tenang.

3.3. Alat dan Bahan

3.3.1 Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian adalah sebagai berikut:

Tabel 3.1. Alat yang digunakan dalam penelitian

No	Alat	Spesifikasi	Fungsi
1	Erlemeyer	250 ml 500 ml	Wadah media kultur bakteri
2	Gelas ukur	50 ml	Mengukur volume air larutan
3	Mikropipet	Huawei 20-1000 μ l	Mengambil bahan volume microliter
4	Cawan petri	Diameter 15 cm	Tempat kultur dan uji difusi
5	Sentrifus	6 tabung ecataloge	Pemisah natan dan supernatan
6	Backer glass	500 ml 250 ml	Tempat mengukur volume larutan atau bahan
7	pH meter	0,01 auto calibrate	Mengukur pH dalam media kultur
8	Refraktometer	Atago masterP/TA	Mengukur salinitas pada media kultur

No	Alat	Spesifikasi	Fungsi
9	Spektrofotometer	Uv-Vis spektrofotometer agilent cary 60 UV-Vis	Menghitung OD
10	Kertas, plastik, karet gelang	-	Penutup wadah saat sterilisasi
11	Kuvet	4 ml	Menaruh sampel pada spektrokopi
12	Jarum ose		Memindahkan isolat bakteri
13	Paper disk	Advantec 8 ml	Pengujian difusi
14	Tabung reaksi	Iwaki pyrex 17ml	Tempat media miring
15	Rak tabung reaksi		Tempat tabung reaksi
16	Falcon	14 ml	Wadah sentrifus
17	Ependolf	1,5 ml	Wadah larutan
18	Timbangan elektrik	Ketelitian 0,01 gr	Menimbang bahan
19	Jangka sorong	StrewMac	Mengukur diameter bakteri
20	Laminar		Tempat melakukan isolasi
21	Bunsen		Sterilisasi jarum ose
22	Pipet tetes	10 ml	Alat untuk meneteskan atau mengambil larutan dengan jumlah kecil.
23	Autoklaf	1210C, 15 lbs	Alat untuk sterilisasi alat dan bahan
24	Show case	Politron Eberbach E6010	Tempat menyimpan media
25	Orbital shaker	Reciprocal shaker 115V	Kultur bakteri

3.3.2 Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini merupakan bahan untuk mengetahui aktivitas protease dari bakteri simbiosis spons.

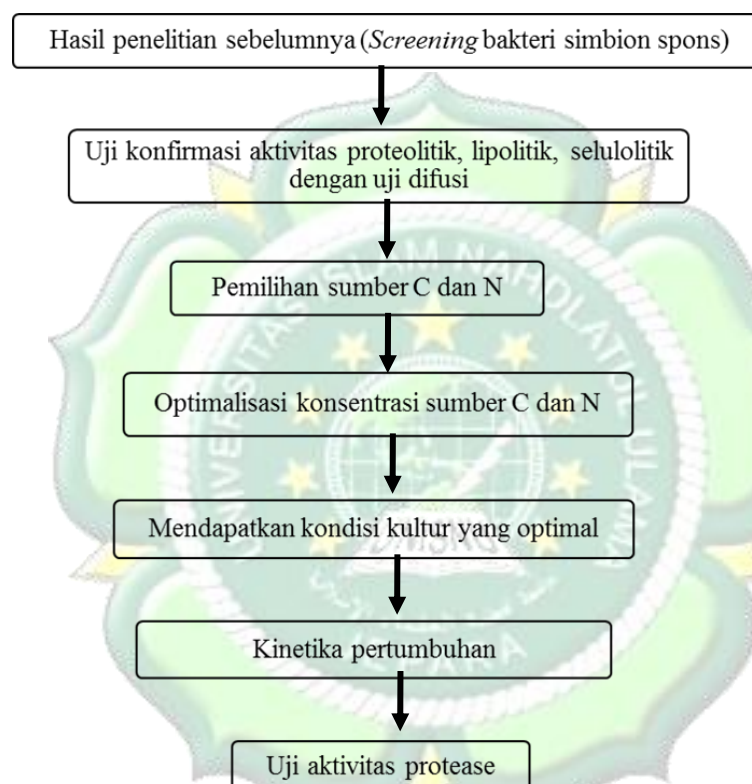
Tabel 3.2. Bahan yang digunakan dalam penelitian

No	Bahan	Fungsi
1	Air laut	Bahan pembuatan media
2	Alkohol 70%	Bahan sterilisasi alat
3	NA	Bahan pembuatan media NA
4	Yeast	Bahan pembuatan media Zobell
5	Pepton	Bahan pembuatan media Zobell
6	Skim milk	Media protease
7	HCl	Penambah asam

No	Bahan	Fungsi
8	NaOH	Penambah basa
9	Glukosa	Sumber karbon
10	Fruktosa	Sumber karbon
11	Molase	Sumber karbon
12	Amonium klorida	Sumber nitrogen
13	Amonium nitrat	Sumber nitrogen
14	Urea	Sumber nitrogen

3.4. Diagram Alir

Prosedur penelitian dilaksanakan sebagaimana diagram alir berikut:



Gambar 3.1. Diagram alir

3.5. Metode Penelitian

Penelitian ini menggunakan metode eksperimental laboratoris. Metode eksperimental laboratoris yaitu sebuah penelitian untuk mengkaji variabel-variabel yang tidak relevan dengan permasalahan seminimal mungkin. Metode ini dilakukan dengan cermat dan teliti dalam situasi yang dispesifikasikan, dioperasionalkan, dikendalikan untuk memanipulasi satu atau lebih variabel

bebas. Sehingga, *output* dari metode yang telah dilakukan yaitu respon yang berupa diketahuinya penyebab maupun faktor-faktor yang mempengaruhi perubahan dalam eksperimen ini (Sudjana, 1994 dalam Alimin, 2018).

3.6. Prosedur Penelitian

Penelitian dilakukan dengan metode eksperimental laboratoris. Penelitian dilakukan dalam empat tahap kegiatan :

3.6.1. Pembuatan Media

Isolasi dan seleksi bakteri proteolitik dengan aktivitas protease, selulolitik, amilolitik dan lipolitik memiliki tahapan sebagai berikut:

1. Pembuatan Media Zobell Broth (ZB)

Pembuatan media Zobell Broth menggunakan 5,0 gr bakto-pepton, dan 1,0 gr yeast yang dilarutkan pada 1 liter air laut steril digunakan sebagai media cair isolasi bakteri general dengan pH netral (7).

2. Pembuatan Media Nutrien Agar (NA)

Pembuatan media Nutrien Agar menggunakan Nutrien agar sebanyak 20 gr yang dilarutkan pada 1 liter air laut steril digunakan sebagai media agar isolasi bakteri general dengan pH netral (7).

3.6.2. Uji Difusi Konfirmasi Aktivitas Ekstraseluler

Konfirmasi aktivitas proteolitik dilakukan menggunakan uji difusi yang diperkuat dengan uji aktivitas enzim selulase, dan lipase. Uji konfirmasi proteolitik, selulolitik, lipolitik mengacu pada prosedur yang digunakan oleh Bairagi *et.al.*, (2002).

3.6.2.1. Konfirmasi Aktivitas Proteolitik

Pemurnian isolat dilakukan dengan inokulasi 1 ose dari media miring NA ke dalam media Zobell Broth untuk diinkubasi selama 24 jam pada suhu ruang (30°C). Isolat bakteri yang telah berumur 24 jam kemudian diambil sebanyak 40 µl untuk ditetaskan di atas paper disk 0,8 cm pada media NA yang diperkaya

dengan skim-milk (1%) . Proses inkubasi dilakukan kembali selama 24 jam dan bersuhu 30°C. Aktivitas proteolitik dapat diidentifikasi melalui terbentuknya zona bening pada tepian paper disk. Selanjutnya, akan dilakukan pengukuran zona bening tersebut. Isolat bakteri proteolitik selanjutnya akan disimpan pada media NA miring.

3.6.2.2. Konfirmasi Aktivitas Lipolitik

Isolat bakteri proteolitik pada kultur miring di inokulasikan ke dalam medium Zobell Broth cair dan dinkubasi selama 24 jam dengan suhu 30°C. Sebanyak empat puluh µl suspensi kultur bakteri proteolitik umur 24 jam tersebut di teteskan ke atas paper disk pada media NA yang telah ditambah 5 ml twin pada 1 liter pembuatan media. Selanjutnya, isolat diinkubasi pada suhu 30°C dengan waktu 24 jam. Terbentuknya endapan putih pada sekeliling paper disk membuktikan bahwa adanya aktivitas lipolitik.

3.6.2.3. Konfirmasi Aktivitas Selulolitik

Isolat bakteri yang akan dilakukan uji konfirmasi pada kultur miring di inokulasikan ke dalam medium Zobell broth kemudian diinkubasi dalam waktu 24 jam dengan suhu 30°C. Setelah 24 jam, suspensi kultur bakteri tersebut di ambil sebanyak 40uL untuk di teteskan ke atas paper disk pada media NA yang diperkaya dengan CMC (1%). Terbentuknya zona bening disekitar paper disk yang telah dituangkan larutan *congo red* menjadi deteksi bahwa bakteri tersebut mengkasilkan enzim selulose.

3.6.3. Uji Pemilihan Sumber C dan N

Pemilihan sumber karbon (C) dan nitrogen (N) dilakukan dengan metode eksperimental. Prosedur yang digunakan mengadaptasi dari Polak- Bereka *et.al.*, (2010) dan Sathyanarayanan *et al.*, (2011). Setiap perlakuan yang diberikan dilakukan pengulangan sebanyak 3 kali.

A. Seleksi sumber karbon (C)

Sumber karbon yang digunakan untuk seleksi ko-substrat berdasarkan produksi biomassa terdiri dari 3 jenis yaitu: glukosa, fruktosa dan molase. Pemberian sumber karbon sebanyak 1% dalam media Zobell Broth.

B. Seleksi sumber nitrogen (N)

Sumber nitrogen yang digunakan untuk seleksi ko-substrat berdasarkan produksi biomassa terdiri dari 3 jenis, yaitu: amonium klorida, amonium nitrat, dan urea. Pemberian sumber nitrogen sebanyak 0,2% dalam medium Zobell Broth.

3.6.4. Uji Konsentrasi Sumber C dan N

Uji konsentrasi sumber karbon (C) dan nitrogen (N) dilakukan dengan menggunakan metode yang digunakan oleh Mahdhi *et.al.*, (2012). Perlakuan yang diberikan dilakukan pengulangan sebanyak 3 kali.

A. Uji konsentrasi sumber karbon

Eksperimen seleksi sumber karbon yang telah dilakukan sebelumnya, selanjutnya akan dilakukan uji optimasi konsentrasi sumber karbon menggunakan media Zobell Broth. Tiga perbedaan konsentrasi sumber karbon yang digunakan yaitu 0,5%, 1,5%, dan 2,5%. Starter isolat yang diletakkan dalam erlemeyer bermedium Zobell Broth diinokulasi dengan starter isolat yang memberikan OD 0,01 pada A_{600} . Inkubasi pada suhu 30 °C. Setiap interval 6 jam dilakukan pengambilan sampel sebanyak 1,5 ml, kemudian dilakukan pengukuran OD pada A_{600} , dan dibuat plot OD vs berat kering.

B. Uji konsentrasi sumber nitrogen

Eksperimen seleksi sumber nitrogen yang telah dilakukan sebelumnya, selanjutnya akan dilakukan uji optimasi konsentrasi sumber nitrogen menggunakan media Zobell Broth. Ada tiga konsentrasi sumber nitrogen yaitu 0,05%, 0,15%, 0,25%. Medium Zobell Broth dengan berbagai konsentrasi sumber nitrogen dalam erlenmeyer diinokulasi dengan starter isolat yang memberikan OD 0,01 pada A_{600} . Inkubasi pada suhu 30°C. Setiap interval 6 jam sekali selama 48 jam dilakukan pengambilan sampel sebanyak 1,5 ml dan dilakukan pengukuran OD pada A_{600} .

3.6.5. Kinetika Pertumbuhan Bakteri dan Aktivitas Protease

Bakteri yang telah lolos dalam tahap seleksi sebelumnya, akan dilanjutkan dengan kombinasi konsentrasi sumber C dan N terbaik untuk dilakukan perhitungan nilai *optical density* (OD) bakteri, biomassa bakteri, aktivitas protease, dan kadar protein. Pengamatan dilakukan pada inkubasi 0, 6, 12, 18, 24, 30, 36, 42, dan 48 jam (Annamalai *et.al.*,2011). Kinetika pertumbuhan bakteri dan aktivitas protease dilakukan sebagaimana berikut:

1. Preparasi Inokulum

Preparasi inokulum menurut Sreekumar *and* Krishnan (2010) dilakukan dengan pemindahan satu ose dari media miring yang diinokulasikan ke dalam 200 ml Zobell Broth, kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 30°C. Inokulum yang telah berumur 24 jam kemudian dipindahkan sebanyak 0,5% ke dalam erlemeyer 500 ml yang telah berisi 200 ml media eksperimen, selanjutnya diinkubasi menggunakan orbital shaker berkecepatan 160 rpm bersuhu 30°C.

2. Nilai Optical Density

Pengukuran OD dilakukan dengan cara sebanyak 10 ml sampel disentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm selama 10 menit. Supernatan di buang dan natan yang didapatkan dilarutkan dengan larutan PBS sebanyak 10 ml lalu di divortex. Setelah divortex diamati nilai OD-nya dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 600 nm (Setyati *et.al.*, 2014).

3. Biomassa Bakteri

Pengukuran kadar biomassa bakteri dilakukan dengan cara sebanyak 20 ml sampel disentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm selama 10 menit. Natan yang didapatkan dilarutkan dengan PBS sebanyak 10 ml untuk membersihkan sel dari media. Setelah dilarutkan dalam PBS disentrifugasi ulang pada kondisi yang sama dengan sebelumnya. Endapan sel kemudian dipindahkan ke cawan porselin dan dikeringkan dalam oven pada suhu 50 °C sampai beratnya konstan. Kemudian cawan porselin sel berisikan kering dimasukkan segera ke dalam desikator, setelah dingin cawan porselin berisi sel kering ditimbang (Yuliana, 2008).

4. Aktivitas Protease

Pengukuran aktivitas enzim dilakukan mengikuti metode yang digunakan Annamalai *et.al.*, (2011) termodifikasi. Kasein 1% yang dilarutkan dalam fosfat buffer salin (50 mM, pH 8) digunakan sebagai substrat. Substrat tersebut diambil sebanyak 1 ml untuk dieaksikan dengan 1 ml sampel dalam waktu inkubasi selama 10 menit bersuhu 37°C. Kemudian, trichloroacetic acid (TCA) 10 % ditambahkan sebanyak 1% untuk menghentikan reaksi lalu diinkubasi kembali selama 10 menit bersuhu 37°C. Kemudian disentrifugasi selama 20 menit dengan kecepatan 10.000 rpm. Kemudian, supernatan 1 ml diberi penambahan Na₂CO₃ sebanyak 0,5 ml serta pereaksi folin ciocalteus (1:2), setelah tercampur kemudian diinkubasi selama 20 menit bersuhu 37°C. Absorbansi dibaca pada panjang gelombang 578 nm (Oke *and* Onilude, 2014).

5. Kadar Protein

Metode Bradford (1976) digunakan untuk mengukur kadar protein dalam media kultur. Kultur bakteri proteolitik umur 24 jam disentrifugasi dengan kecepatan 2000 rpm. Supernatan yang diperoleh dilakukan pengujian aktivitas proteolitik menggunakan metode kaseinolitik (Annamalai *et.al.*, 2011). Sebanyak 200µl supernatan ditambahkan ke dalam campuran 100 µl buffer Tris-HCl (100 mM, pH 8) lalu ditambah dengan 1% larutan kasein sebanyak 100 µl dan diinkubasi selama 30 menit bersuhu suhu 30°C. setelah 30 menit, reaksi dihentikan dengan penambahan larutan TCA 10% sebanyak 400 µl. Kemudian, dilakukan sentrifugasi selama 15 menit berkecepatan 2000 rpm untuk mengendapkan kasein yang tidak terhidrolisis. Besar kecilnya protein yang terhidrolisis menunjukkan aktivitas proteolitik. Kadar protein yang tersisa diukur menggunakan metode Bradford (1976).

3.7. Metode Perhitungan

Penelitian ini menggunakan berbagai metode pehitungan sebagai berikut:

3.7.1. Pertumbuhan Bakteri

Melalui sebuah kurva, pertumbuhan bakteri dapat dipahami. Pembuatan kurva tersebut dilakukan dengan pengambilan data pertumbuhan pada selang waktu

tertentu untuk selanjutnya akan mendapatkan hasil yang dimasukkan dalam sebuah grafik berisi hubungan antara waktu sebagai sumbu x dan biomasa sel sebagai sumbu y. Pertumbuhan bakteri dihitung dengan cara sebagaimana berikut:

1. Generasi Bakteri

Penghitungan generasi bakteri dilakukan dengan rumus berikut:

$$G = \frac{t \log 2}{\log b - \log B}$$

Keterangan:

G = generasi (sel)

b = jumlah sel pada akhir penghitungan (sel)

B = jumlah sel pada awal penghitungan (sel)

t = interval waktu antara B dan b (jam)

2. Waktu generasi

Waktu generasi adalah waktu yang dibutuhkan bakteri untuk memperbanyak jumlah masa sebanyak 2x lipat dari sebelumnya (Pelczar *et.al.*, 2013). Adapun perhitungan waktu generasi dapat menggunakan rumus sebagai berikut :

$$tg = \frac{t}{3,3 \log \frac{b}{B}}$$

Keterangan :

G = waktu generasi (jam)

t = total waktu mencapai puncak (jam)

B = populasi awal (cfu/ml)

b = populasi puncak (cfu/ml)

3,3 = faktor konversi log 2 menjadi log 10

3. Kecepatan Generasi

Kecepatan generasi bakteri dapat dihitung menggunakan rumus :

$$\mu = \frac{2,303(\log n - \log n_0)}{t - t_0}$$

Keterangan:

- μ = kecepatan generasi (generasi/jam)
- n_0 = jumlah awal sel (sel/ml)
- n = jumlah sel setelah waktu (sel / ml)
- t_0 = waktu awal (jam)
- t = waktu akhir (jam)

4. Biomasa Bakteri Kering/Basah

Biomasa bakteri basah maupun kering dapat dihitung menggunakan cara berikut:

$$X = Wd - W0$$

Keterangan:

- x = berat bakteri kering/basah (g)
- w_d = berat bakteri kering/basah dalam wadah (g)
- w_0 = berat wadah kosong (g)

3.7.2. Aktivitas Protease

Aktivitas protease dapat didukung dari hasil penghitungan kadar protein, total protein, dan aktivitas protease itu sendiri. Penghitungan tersebut menggunakan rumus sebagaimana berikut:

1. Kadar Protein Standar Biuret

Analisis kadar protein, dihitung menggunakan uji standar biuret. Pereaksi biuret dan larutan standar protein dimasukkan dalam tabung reaksi, sedangkan blanko dimasukkan dalam kuvet. Semua tabung dihomogenkan dan didiamkan selama 30 menit pada suhu kamar. Larutan sampel uji, standar, dan blanko dimasukkan dalam spektrofotometri dan dibaca pada panjang gelombang 540 nm. Nilai baca tersebut dianalisis dengan rumus berikut (Mardani, dkk. 2015):

$$\text{Kadar protein} = \frac{hg-sb}{Ab}$$

Keterangan:

- hg = hasil gelombang (ml)

Ab = absorbansi blanko (ml)
 sb = standart biuret (ml)

2. Total Protein

Total protein dihitung dengan rumus:

$$\text{Total protein} = \text{Kadar protein} \times v$$

Keterangan:

v = volume pelarut (ml)

3. Aktivitas Protease

Aktivitas protease dihitung menggunakan rumus:

$$UA = \frac{A \text{ sample} - A \text{ blanko}}{A \text{ standar} - A \text{ blanko}} \times P \frac{1}{t}$$

Keterangan:

UA = aktivitas protease (U/ml)
 A sampel = nilai absorbansi sampel
 P = faktor pengenceran
 A standar = nilai absorbansi standar
 1/T = waktu inkubasi (jam)
 A blanko = nilai absorbansi blanko

3.8 Analisis Data

Pertumbuhan isolat bakteri hasil penelitian diolah secara deskriptif kuantitatif melalui Microsoft Excel 2010. Selanjutnya data diuji normalitas, homogenitas, dan aditivitas melalui program SPSS versi 20. Menurut Andriyanto (2019), bila pada uji normalitas bersifat normal, maka selanjutnya akan diuji sidik ragam melalui analisis *oneway anova* (α : 0,05). Hasil analisis *oneway anova* menunjukkan perbedaan nilai respon pada pertumbuhan isolat bakteri, sehingga dilanjutkan dengan uji *Tukey*.