

3. MATERI DAN METODE PENELITIAN

3.1. Materi Penelitian

3.1.1. Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan untuk membuat *crude* metabolit ekstraseluler bakteri adalah isolat bakteri murni *Acinetobacter* sp. yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang. Bahan pendukung lainnya adalah media cair TSB, aquades, NaCl untuk isolasi bakteri. Untuk presipitasi digunakan ammonium sulfat dan aquades. Untuk dialisis digunakan buffer fosfat 0,1 M pH 7, buffer fosfat 0,005 M pH 7, etanol dan aquades. Untuk pengujian *Bovine Serum Albumin* (BSA) digunakan *phosphate Buffer Saline* (PBS), *reagen biuret*, dan akuades. Untuk pengujian SDS-PAGE digunakan sampel berupa *crude* metabolit ekstraseluler bakteri *Acinetobacter* sp. dan Gel.

3.1.2. Alat Penelitian

Peralatan yang digunakan dalam proses penelitian ini antara lain *waterbath shaker*, kulkas, laminar *flow*, tabung reaksi, rak tabung reaksi bertutup, erlenmeyer, pipet volum, beaker glass, timbangan digital, gelas arloji, osse, laminaran, gelas ukur, spatula, bunsen, botol semprot, nampan, inkubator, autoklaf. Untuk Presipitasi digunakan *stirrer*, dan sentrifuse. Untuk dialisis digunakan kantong selofan, *ependorf*, dan sentrifuse. Untuk pengujian *Bovine Serum Albumin* (BSA) digunakan erlenmeyer, *ependorf*, vortek, tabung reaksi dan spektrofotometer UV-Vis. Sedangkan ntuk pengujian SDS-PAGE digunakan perangkat elektroforesis SDS-PAGE.

3.1.3. Lokasi Penelitian

Penelitian ini dilakukan di beberapa laboratorium diantaranya adalah untuk pengadaan bakteri, isolasi bakteri dan metabolit *Acinetobacter* sp. di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang, untuk presipitasi, dialisis, uji BSA, dan Uji SDS-PAGE di Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang, untuk aerasi dan preparasi uji histamin di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya Malang, sedangkan untuk uji histamin di Laboratorium Penelitian Pengujian Mutu Hasil Perikanan Surabaya.

3.2. Metode Penelitian

Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode eksploratif. Menurut Amirin (2009), metode eksploratif merupakan salah satu pendekatan dalam penelitian. Metode eksploratif berupaya menemukan informasi umum mengenai sesuatu topik/masalah yang belum dipahami sepenuhnya oleh seorang peneliti. Jadi, penelitian eksploratif merupakan salah satu pendekatan penelitian yang digunakan untuk meneliti sesuatu (yang menarik perhatian) yang belum diketahui, belum dipahami, belum dikenali, dengan baik. Metode ini mengarahkan studi ke suatu sasaran penelitian. Penelitian ini untuk mengetahui crude metabolit bakteri *Acinetobacter* sp menjadi lebih murni dan seberapa besar kandungan protein dan berat molekulnya.

Menurut Singarimbun dan Effendi (1989), metode eksploratif bertujuan untuk memperoleh pengetahuan tentang suatu gejala, sehingga setelah melalui tahap observasi, masalah serta hipotesisnya dapat dirumuskan. Dalam penelitian eksploratif pengetahuan tentang gejala yang hendak diteliti masih sangat terbatas dan merupakan langkah pertama bagi penelitian yang lebih mendalam.

Penelitian eksploratif bersifat menjelajah, artinya penelitian yang dilakukan apabila pengetahuan tentang gejala yang diteliti masih sangat kurang atau tidak ada sama sekali. Penelitian eksploratif seringkali berupa studi kasus dari suatu kelompok atau golongan tertentu, yang masih kurang diketahui orang. (Yumei dan Yulia, 2009).

3.3. Prosedur Penelitian

3.3.1. Pemiakan Bakteri

Sebelum melakukan penelitian terlebih dahulu dilakukan sterilisasi alat. Sterilisasi adalah suatu proses penguapan yang digunakan untuk beberapa produk dalam situasi dimana produk-produk tersebut terhindar dari infeksi (Dart, 2003). Karena stabilitas panas dari bakteri yang tidak bisa dihilangkan dengan cara direbus, sterilisasi menggunakan uap panas dilakukan pada suhu dan tekanan yang tinggi di dalam autoklaf. Mesin ini beroperasi pada suhu 121⁰C dan dapat membunuh mikroba (Nicklin *et al.*,1999). Selain itu alat yang harus disterilkan yaitu laminaran, dengan cara menyemprot bagian dalamnya dengan cairan aseptis (alkohol 70%), kemudian lap semua bagiannya menggunakan serbet makan bersih agar aseptis, ditutup kaca laminaran dan menekan tombol UV untuk menghidupkan sinar UV pada alat yang berfungsi sebagai pensteril laminaran selama 1 jam.

Pembuatan larutan untuk perkembangbiakan bakteri *Acinetobacter* sp. yaitu media TSB. Pertama yaitu menimbang media TSB sebanyak 18 gram menggunakan timbangan digital. Kemudian media TSB dimasukkan kedalam erlenmeyer 1000 ml dan diberi aquades sebanyak 600 ml, lalu diaduk dengan spatula sampai homogen. Kemudian didapatkan media cair, lalu dimasukkan kedalam masing-masing erlenmeyer sebanyak 100 ml. Setelah itu disterilkan menggunakan autoklaf dengan suhu 121⁰C tekanan 1 atm selama 15 menit

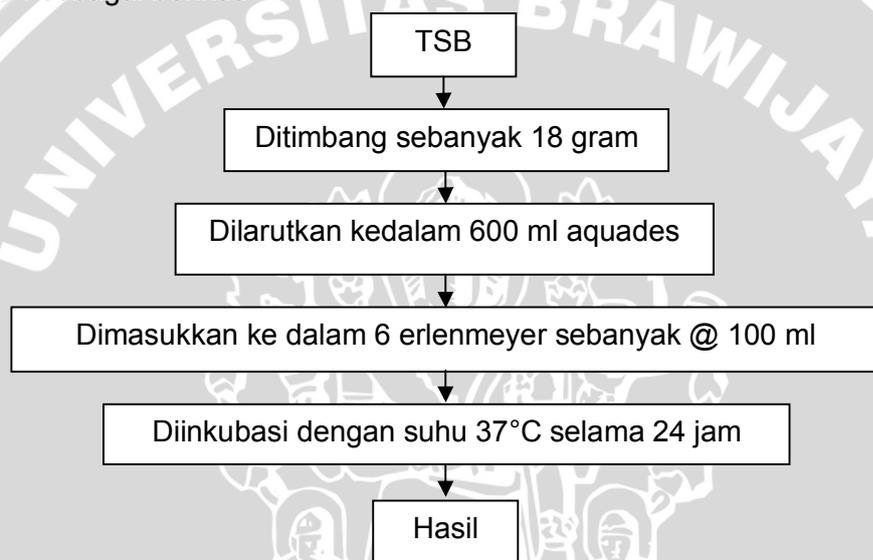
dengan tujuan menghilangkan kontaminan yang ada pada media. Setelah disterilisasi, media cair didiamkan sampai dingin agar botol tidak pecah ketika diberi perlakuan lebih lanjut. Adapun komposisi dari media TSB dapat dilihat pada Tabel 1 dibawah ini :

Tabel 1. Komposisi Medium Tryptone Soya Broth (TSB)

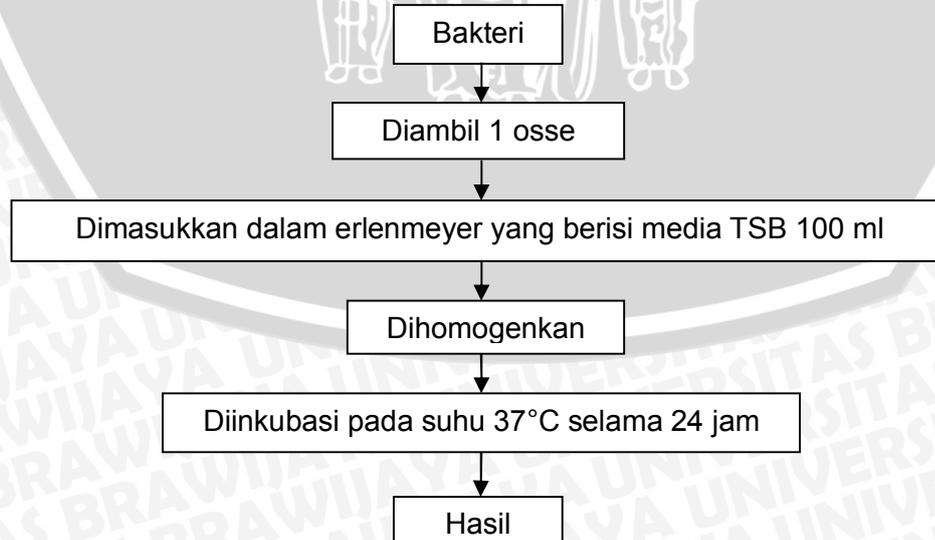
Formula	Gram per liter
Casein	17
Soybean Meal	3
Sodium Chloride	5
Dipotassium Phosphate	2,5
Dextrose	2,5

Setelah 1 jam, sinar UV pada laminaran dimatikan lalu lampu laminaran dinyalakan untuk memudahkan penglihatan pada saat penanaman bakteri. Laminaran bagian dalam disemprot dengan alkohol agar aseptis. Kemudian tangan yang telah dipasang dengan sarung tangan disemprot juga agar tidak ada kontaminasi saat penanaman bakteri. Kemudian bunsen dinyalakan dan diletakkan ke dalam laminaran beserta isolat murni bakteri *Acinetobacter* sp. dan media cair yang diletakkan di rak tabung reaksi. Lalu jarum osse pada bagian ujungnya disemprot dengan alkohol dan dipanaskan diatas bunsen. Hal tersebut dilakukan untuk menghindari kontaminasi alat pada saat penanaman bakteri. Kemudian diambil sampel bakteri yang akan dibiakkan, dibuka tutup tabung sambil dipanaskan diatas bunsen untuk menjaga kondisi tetap aseptis. Jarum osse disentuh di media isolat bakteri untuk mengurangi panas dari jarum osse, sehingga bakteri yang diambil tidak mati. Selanjutnya diambil sebanyak 1 osse bakteri dengan cara menggores isolat dan dimasukkan kedalam media cair baru yang telah disiapkan (jarum osse dimasukkan di permukaan saja agar tidak terjadi kontaminasi, karena hanya bagian ujung jarum osse yang disterilkan). Bakteri yang telah diinokulasi pada media baru, dipanaskan lagi diatas bunsen bagian permukaan erlenmeyernya dan segera ditutup. Jarum osse dipanaskan

diatas bunsen lagi bagian ujungnya agar kembali steril saat digunakan untuk membiakkan bakteri yang lain. Setelah itu, bakteri dan media dihomogenkan, lalu diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Setelah diinkubasi, dilihat ada atau tidak endapan pada media, dimana adanya endapan berarti pembiakan telah berhasil dilakukan. Erlenmeyer diberi label nama bakteri yang telah dibiakkan agar tidak terjadi kesalahan pada saat pengamatan perlakuan. Prosedur kerja pembuatan media cair dan peremajaan bakteri dapat dilihat pada Gambar 3 dan Gambar 4 sebagai berikut.



Gambar 3. Skema Kerja Pembuatan Media Cair (Metode: Novianti, et al.,2009)



Gambar 4. Skema Kerja Peremajaan Bakteri (Metode: Novianti, et al.,2009)

3.3.2 Pengamatan Fase-Fase Pertumbuhan Bakteri

Menurut Soeksmanto, *et al.*, (1998), pertumbuhan mikroba adalah meningkatnya jumlah kuantitas massa sel dengan cara terbentuknya sel-sel baru. Terjadinya proses pertumbuhan tergantung dari nutrient yang tersedia di lingkungannya. Pada setiap pertumbuhan bakteri dalam suatu medium terdapat fase-fase atau tahapan pertumbuhan mulai dari fase adaptasi hingga fase kematian.

Pengamatan fase dilakukan untuk mendapatkan sampel metabolit dari bakteri *Acinetobacter sp.* tersebut. Sebanyak 10 % dari hasil pengayaan, yang berarti sebanyak 10 ml bakteri dan 90 ml medium TSB + NaCl 2%, dicampur ke dalam erlenmeyer 250 ml. Selanjutnya di *shaker* dalam waterbath pada suhu 30°C. Setiap 1 jam sekali sampel bakteri diambil dan dihitung kepadatan bakteri dengan menggunakan hemositometer atau metode kamar hitung. Pengamatan dan perhitungan fase bakteri dilakukan selama 1x24 jam dan dihitung setiap satu jam sekali.

3.3.3 Pemanenan Metabolit

Setelah dilakukan pengamatan fase-fase pertumbuhan bakteri, maka kita dapat mengetahui pada jam ke berapakah bakteri tersebut memasuki fase eksponensial. Sampel metabolit dipanen pada fase eksponensial. Fase eksponensial dipilih karena pada fase ini merupakan fase pertumbuhan tertinggi dari bakteri itu sendiri. Menurut Nurwantoro, *et al.*, (2003), populasi total bakteri cenderung meningkat seiring dengan pertambahan lama waktu penyimpanan. Hal ini dapat diakibatkan bakteri sedang berada dalam fase eksponensial. Semakin banyak bakteri yang dihasilkan maka akan semakin banyak pula senyawa bioaktif yang dapat dipanen dari bakteri tersebut.

Langkah pertama untuk pembuatan metabolit bakteri yaitu menginokulasi kultur cair isolat bakteri pada Erlenmeyer dengan menggunakan media TSB kemudian diinkubasi dengan suhu 37⁰C selama 24 jam. Setelah perlakuan tersebut media akan menjadi keruh hal ini dikarenakan bakteri tersebut mengalami pertumbuhan. Proses selanjutnya adalah disentrifugasi menggunakan alat sentrifuge dingin dengan kecepatan 12.000 rpm selama 15 menit dengan suhu alat 4⁰C, suhu ini digunakan pada alat tersebut dikarenakan dengan kecepatan 12.000 rpm sampel tersebut akan panas sehingga dapat merusak nutrisi-nutrisi yang ada di dalamnya, maka dari itu digunakan suhu ini untuk menghindari terjadinya kerusakan pada nutrisi yang ada di dalamnya. Proses sentrifugasi ini dilakukan dua kali, hal ini dikarenakan untuk mendapatkan metabolit yang lebih murni. Menurut Heruwati *et al.*, (2007) sentrifugasi harus menggunakan kecepatan 11.000 rpm sampai dengan 15.000 rpm selama 15 menit, supaya ekstrak enzim dapat dipisahkan dari sel bakteri.

3.3.4 Tahap-tahap Pemurnian

Menurut Dewi (2006), pemurnian enzim adalah salah satu cara untuk memisahkan protein enzim dari protein jenis lain dan kontaminan. Secara umum, pemurnian enzim dibagi dalam tiga tahap, yaitu ekstraksi, pemekatan, dan fraksinasi. Dalam prosedur penelitian ini dilakukan presipitasi yaitu pengendapan dengan ammonium sulfat dan dialisis.

3.3.4.1.Presipitasi

Presipitasi yaitu pengendapan dengan amonium sulfat. Memisahkan protein dari protein yang berbeda dan juga dengan non protein dari *crude* protein. Konsentrasi amonium sulfat yang tinggi akan meningkatkan muatan listrik disekitar protein yang akan menarik mantel air dari koloid protein (Aulanni, 2004).

Penambahan amonium sulfat berpengaruh terhadap protein yang terendapkan selama proses pemurnian. Ion-ion garam amonium sulfat akan berkompetisi dengan protein untuk menarik molekul air. Ion-ion garam memiliki kelarutan lebih besar dibandingkan dengan protein sehingga ion garam akan menarik molekul air dari protein enzim. Protein-protein enzim akan berinteraksi membentuk gumpalan dan mengendap (Davidson dan Sittman, 1999). Endapan enzim yang terbentuk dipisahkan dengan sentrifugasi (Deustcher, 1990).

Protein dari ekstrak kasar metabolit diendapkan menggunakan ammonium sulfat dengan modifikasi Putranto (2006) dan Nurhasanah (2008). Untuk menggumpalkan protein, supernatan hasil sentrifugasi ditambahkan ammonium sulfat sedikit demi sedikit sambil diaduk dengan *magnetic stirrer* dengan tingkat kejenuhan atau konsentrasi (40%, 50%, 60%, 70%, 80%) dan dibiarkan selama satu malam pada suhu 40°C. Selanjutnya disentrifugasi 10000 rpm, suhu 4°C, selama 15 menit. Pelet yang diperoleh diresuspensikan dengan buffer Tris-HCl 10 mM pH 7 untuk dilakukan penelitian selanjutnya dan untuk penentuan kadar proteinnya dengan metode Bradford (1976).

3.3.4.2. Dialisis

Prinsip dialisis adalah difusi garam amonium sulfat melalui membran semipermeabel. Pada proses dialisis terjadi pemisahan molekul yang lebih besar melalui membran semipermeabel dengan menggunakan kantong selofan yang memiliki pori-pori berukuran 10 kD. Membran ini dapat dilewati oleh molekul-molekul kecil saja tapi tidak untuk molekul-molekul besar. Pada proses ini terjadi perpindahan garam amonium sulfat yang mempunyai berat molekul lebih kecil dari satu sisi membran ke sisi yang lain terjadi karena adanya gradien konsentrasi. Perbedaan kecepatan difusi melalui membran timbul karena adanya perbedaan ukuran molekul yang menyebabkan garam terpisah dari protein

(Sorensen *et al.*, 1999). Langkah-langkah prosedur kerja dialisis dapat dilihat pada Lampiran 1.

3.3.5 Pengujian Kadar Histamin

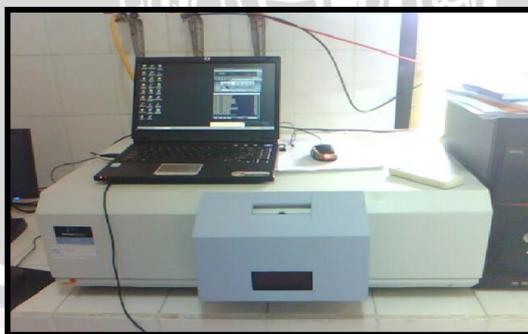
Hasil presipitasi dengan menggunakan ammonium sulfat bertingkat yaitu konsentrasi 40%, 50%, 60%, 70% dan 80% masing-masing diuji kadar histaminnya dengan cara mereaksikan dengan 50 ml larutan L-Histidin konsentrasi 500 ppm. Hasil kadar histamin tertinggi digunakan untuk acuan pemurnian selanjutnya yaitu proses dialisis. Diambil sampel yang menunjukkan kadar histamin tertinggi karena diduga dengan kadar histamin yang tertinggi pada sampel tersebut mengandung enzim histidin dekarboksilase dengan jumlah yang besar dibanding dengan presipitasi lainnya.

Prosedur pereaksian presipitat dengan L-Histidin adalah dimulai dengan pembuatan larutan histidin 500 ppm. Dalam pembuatan larutan histidin ini digunakan konsentrasi 500 ppm dengan cara menimbang serbuk histidin sebanyak 500 mg dengan menggunakan timbangan analitik. Serbuk histidin kemudian dilarutkan dalam 1000 ml aquabides. Dibutuhkan untuk masing-masing botol adalah 50 ml sebanyak 15 botol. Homogenkan larutan dengan menggunakan magnetik stirrer. Larutan histidin dimasukkan ke dalam botol masing-masing berisi 50 ml satu sampel diulang 3 kali sebagai perbandingan. Masing-masing larutan histidin 50 ml ditambahkan sampel presipitat sebesar 0,5 ml dan diaerasi selama 24 Jam. Metode aerasi sudah dilakukan oleh Nento, *et al.*, (2011) untuk mempercepat proses pendegradasian histidin menjadi histamin. Setelah 24 jam aerasi dihentikan, sampel dimasukkan ke dalam freezer supaya kadar histamin tidak meningkat oleh aktivitas enzim. Histamin yang disimpan pada suhu 0° C memiliki kemungkinan untuk meningkat, bukan dikarenakan oleh aktivitas bakteri melainkan enzim yang dihasilkan oleh bakteri itu sendiri (Mahendradatta *et al.*, 2003). Pada proses dialisis setelah didapat dialisat maka

juga perlu diuji kadar histamin untuk mengetahui perbandingan kadar histamin antara presipitat dan dialisat dengan prosedur yang sama seperti sebelumnya.

Sampel yang telah di aerasi selama 24 Jam diuji kadar histaminnya secara kuantitatif menggunakan metode spektrofotometri, dimana menurut Wanenoor (2010), metode spektrofotometri adalah suatu metode pengukuran berdasarkan sinar yang berfluoresensi. Fluoresensi adalah gejala dari suatu molekul setelah radiasi cahaya, melepas kembali radiasi tadi dengan panjang gelombang yang lebih panjang. Fluoresensi akan nampak jelas apabila penyerapan sinar pada daerah ultraviolet dan melepaskannya dalam daerah gelombang nampak.

Untuk uji histamin itu sendiri, terutama histamin menggunakan Spektrofotometri. Analisis pengujian histamin secara kuantitatif ini menggunakan metode Spektrofotometri sesuai SNI 2354. 10 tahun 2009. Besarnya *fluoresensi* histamin diukur secara fluorometri pada panjang gelombang excitasi 350 nm dan emisi 444 nm. Alat spektrofotometri dapat dilihat pada Gambar 5 dan langkah-langkah prosedur analisis histamin dapat dilihat pada Lampiran 2.



Gambar 5. Alat Spektrofotometri

3.4 Karakterisasi Dialisat

3.4.1. Uji Konsentrasi Protein (Metode BSA)

Penentuan konsentrasi protein metabolit menggunakan metode biuret dengan BSA (Bovine Serum Albumin) sebagai standar dengan modifikasi dari Wiseman (1985) dengan Holme dan Peck (1993). Prinsip kerja metode biuret adalah senyawa dengan 2 atau lebih ikatan peptida apabila direaksikan dengan garam kupri dalam suasana basa akan membentuk warna violet. Reaksi biuret bergantung pada pembentukan suatu kompleks antara ion Cu^{++} dengan 4 atom N-peptida pada suasana basa, maka akan membentuk suatu kompleks warna ungu yang absorbansinya dapat dibaca pada panjang gelombang 540 nm. Pada metode menggunakan larutan BSA. Kelebihan BSA adalah larutan stabil pada pemanasan 70°C selama 30 menit, lebih spesifik karena 95% protein terdiri dari albumin. Adapun kelebihan biuret ini sendiri adalah lebih spesifik untuk peptida, polipeptida, dan protein, tidak bereaksi dengan ammonia, urea, dan senyawa nitrogen sederhana.

Konsentrasi protein ditentukan dengan menggunakan kurva standar *Bovine Serum Albumin* (BSA) dengan konsentrasi 0-800 ppm. Setelah didapat nilai absorbansi dari larutan BSA maka dapat dibuat kurva standar. Langkah-langkah pengujian kadar protein dapat dilihat pada Lampiran 3.

3.4.2. Uji SDS-PAGE

Elektroforesis adalah teknik pemisahan fraksi-fraksi zat berdasarkan migrasi partikel bermuatan di bawah pengaruh medan listrik karena adanya perbedaan ukuran, bentuk, muatan dan sifat kimia molekul (Boyer, 1986).

Penentuan berat molekul dialisat metabolit *Acinetobacter* sp. dapat dilakukan dengan menggunakan metode populer yang disebut Sodium Dodesil Sulfat Poliakrilamid Gel Elektroforesis (SDS-PAGE). Metode SDS-PAGE dilakukan dengan menggunakan 2 jenis gel yaitu "stacking" dan "separating".

Pada *stacking gel*, molekul bermuatan dapat bergerak bebas dalam pengaruh medan listrik. Molekul dengan muatan dan ukuran yang sama akan terakumulasi pada zona atau pita yang berdekatan. Protein dengan berat molekul tinggi dielektroforesis pada kondisi terdisosiasi menjadi monomer sehingga protein menjadi subunit yang lebih kecil sehingga elektroforetiknya bergantung pada berat molekulnya (Granner *et al.* 2003).

Prosedur kerja SDS-PAGE modifikasi dari Aulanni (2004), dalam pelaksanaannya dibutuhkan dua peralatan, yaitu *power supply* dan *buffer system*. Setelah buffer sistem dipasang maka *separating gel* dengan konsentrasi 12,5% dimasukkan dalam *plate* dan ditunggu sampai mengeras. Di atas *separating gel* dimasukkan *stacking gel* dengan konsentrasi 12,5% dan sisir dimasukkan di antara *plate* sehingga nantinya akan terbentuk sumuran sebagai tempat masukan enzim. Sampel 15 μL diberi 15 μL RSB (*Reducing Sample Buffer*) dan dipanaskan selama 5 menit. Marker (*prestained protein ladder*) 15 μL yang digunakan mempunyai BM dengan kisaran 17 – 250 kDa. Sampel dan marker dimasukkan dalam sumur gel. *Running buffer* dituang ke dalam *buffer system*. Anoda dan katoda dihubungkan dengan *power supply* dan dialiri arus listrik sebesar 120 Volt, 20 *Ampere* selama kurang lebih 75 menit. Proses elektroforesis dilakukan sampai pita mencapai batas akhir dari gel. Pewarnaan dilakukan dengan merendam gel dalam *staining solution* sambil di goyang dengan shaker selama 1-2 jam. Penghilangan warna dilakukan dengan merendam gel dalam *destaining solution*. Proses *destaining* dilakukan sampai pita protein pada gel terlihat dan warna gel tidak terlalu biru untuk menghilangkan warna latar belakang. Pita protein akan nampak dalam gel. Langkah-langkah pengujian elektroforesis dengan metode SDS-PAGE dapat dilihat pada Lampiran 4.