

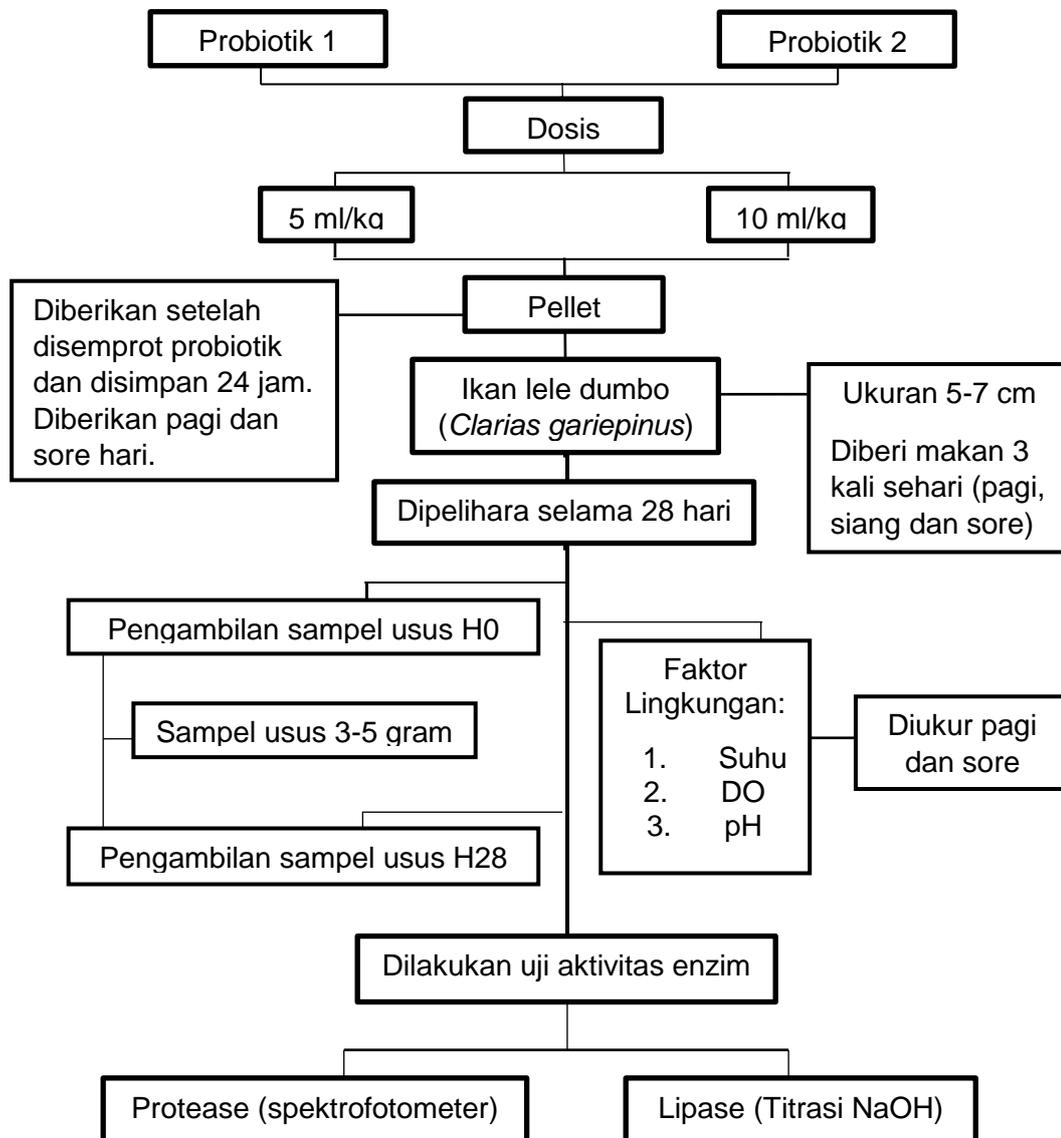
3. METODE PENELITIAN

3.1 Kerangka Operasional Penelitian

Penelitian ini dilakukan dengan pembuatan probiotik terlebih dahulu sesuai komposisi yang telah ditentukan. Probiotik yang digunakan ada 2 macam dengan komposisi dan dosis yang berbeda. Hal ini bertujuan untuk mengetahui jenis probiotik terbaik yang memberikan pengaruh terhadap aktivitas enzim lipase dan protease pada organ pencernaan ikan lele dumbo (*Clarias gariepinus*).

Ikan lele yang digunakan untuk penelitian memiliki ukuran 5-7 cm. Pakan yang diberikan pada ikan sebelumnya ditambahkan probiotik dosis 5 ml/kg dan 10 ml/kg dengan cara disemprotkan kemudian dihomogenkan, lalu disimpan selama 24 jam agar bakteri dalam probiotik dapat tumbuh dan tercampur secara merata. Ikan lele diberikan pakan sebanyak 3 kali sehari pada pagi, siang dan sore hari selama 28 hari. Penelitian pada hari ke-0 dan hari ke-28 dilakukan pengambilan usus ikan lele dumbo sebanyak 3-5 gram, untuk dilakukan uji aktivitas enzim lipase dan protease di laboratorium. Alat yang digunakan untuk uji aktivitas enzim lipase yaitu titrasi dengan NaOH sedangkan untuk protease menggunakan spektrofotometer uV-Vis. Hasil uji dari laboratorium, dapat memberikan gambaran terhadap jenis probiotik dan dosis terbaik yang mempengaruhi aktivitas enzim lipase dan protease pada ikan lele. Selain itu, ada faktor penunjang dalam penelitian ini yaitu pH, DO dan suhu yang dilakukan 2 kali sehari pada pagi dan sore hari sebelum dilakukan pemberian pakan pada ikan.

Berikut kerangka operasional penelitian uji aktivitas enzim pada Ikan Lele dumbo (Gambar 2):



Gambar 2. Kerangka Operasional Penelitian

3.2 Materi Penelitian

3.2.1 Alat Penelitian

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain adalah akuarium ukuran 80X40X40 cm³, kabel roll, aerator, seser, termometer, heater akuarium, pH meter, DO meter, bak besar, hot plate, nampan, *beaker glass Pyrex* 100 ml, statif, erlenmeyer 100 ml, timbangan digital, timbangan analitik, tabung reaksi, rak tabung, cuvet, kulkas pendingin, spektrofotometer, kalkulator, botol film, *sectio set*, refrigerator, sentrifuge, homogeniser listrik, tabung eppendorf, mortal dan alu, gelas ukur 25 ml, washing bottle, corong, blue tip, yellow tip, pipet tetes, sendok besi, mikropipet.

3.2.2 Bahan Penelitian

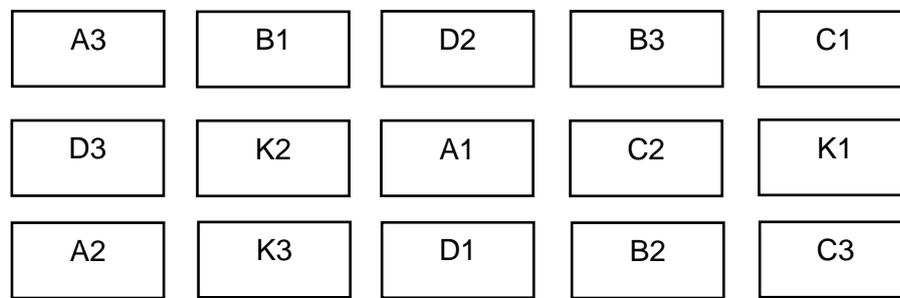
Bahan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain adalah ikan lele (*Clarias gariepinus*) dengan ukuran 5-7 cm, sampel usus ikan lele, bakteri (*Bacillus subtilis*, *Nitrosomonas* sp., *Nitrobacter* sp.), air tawar, molase, air kelapa tua, kunyit putih, lengkuas, temulawak, jahe merah kencur, temu ireng, bawang putih, ragi, yakult, aquadest, alkohol 70%, tissue, chlorine, Na Thiosulfat, kertas label, masker, pakan komersil, sarung tangan (latex), 2 ml larutan kasein 0,5%, 0,5 ml larutan buffer fosfat pH 7,1 ml larutan enzim protease, 2,5 ml larutan TCA 4%, air hangat, 2,5 ml minyak zaitun, 22,5 ml gum arabic 10%, 15 ml CaCl₂ 0,075 M, 10 ml NaCl 3 M, buffer fosfat 0,2 M pH 8, 0,5 ml ekstrak kasar (sampel), 3 tetes indikator PP 1%, NaOH 0,05 M.

3.3 Rancangan Penelitian

Penelitian ini dilakukan dengan menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL). Desain rancangan acak lengkap ini digunakan karena percobaan dilakukan di laboratorium dengan kondisi lingkungan yang dapat dikontrol. Menurut Novianti *et al.* (2014), rancangan acak lengkap sering digunakan dalam penelitian dikarenakan mudah dipahami dalam penggunaannya. Rancangan Acak Lengkap

(RAL) ini diberikan pada perlakuan yang berbeda secara acak dalam satu kelompok. Rancangan acak lengkap digunakan untuk percobaan yang memiliki media atau tempat percobaan yang seragam, sehingga rancangan acak lengkap banyak digunakan untuk percobaan laboratorium, rumah kaca dan peternakan (Sastrosupadi, 2000).

Perlakuan yang digunakan untuk uji enzim pada usus ikan lele (*C. gariepinus*) dengan penambahan variasi probiotik pada pakan yaitu terdiri dari empat perlakuan dengan tiga kali ulangan yang ditempatkan secara acak seperti pada denah penelitian (Gambar 3):



Gambar 3. Denah Penelitian

Keterangan:

A: Perlakuan pakan dengan penambahan probiotik A (5 ml/kg)

B: Perlakuan pakan dengan penambahan probiotik B (5 ml/kg)

C: Perlakuan pakan dengan penambahan probiotik A (10 ml/kg)

D: Perlakuan pakan dengan penambahan probiotik B (10 ml/kg)

K: Perlakuan kontrol

1-3: Ulangan

3.4 Prosedur Penelitian

3.4.1 Sterilisasi alat dan bahan

Persiapan alat dan bahan dilakukan sebelum kegiatan penelitian. Semua alat dan bahan yang akan digunakan supaya terbebas dari mikroorganisme hidup maka harus disterilisasi terlebih dulu. Peralatan yang akan digunakan dalam proses isolasi maupun uji sampel bakteri, harus dicuci terlebih dahulu dengan menggunakan sabun, kemudian dibilas air tawar dan ditunggu sampai kering. Selanjutnya peralatan seperti cawan petri, pipet tetes, tabung reaksi, erlenmeyer, beaker glass dan pipet volume dibungkus dengan menggunakan kertas koran, lalu

diikat dengan benang kasur. Selanjutnya peralatan ditata dalam autoklaf untuk disterilisasi dengan tekanan 1 atm pada suhu 121°C selama 30 menit. Wadah untuk fermentasi berupa tong dengan ukuran 30 liter disterilisasi dengan cara kimia seperti direndam air tawar dan ditambahkan larutan klorin 30 ppm kemudian didiamkan selama 24 jam dan dinetralkan dengan larutan Na-Thiosulfat 15 ppm. Menurut Sari dan Manan (2012), wadah untuk fermentasi yang berisi air tawar ditambahkan larutan klorin 20-30 ppm, direndam selama 24 jam. Selanjutnya dinetralkan dengan Na Thiosulfat 10 ppm.

Media pemeliharaan tidak disterilisasi, namun diaerasi selama 24 jam sebelum digunakan, sedangkan media pembuatan dan bahan-bahan probiotik sebelum diisolasikan bakteri dimasak di atas kompor pada suhu 100°C. Media tanam isolat disterilisasi dengan autoklaf dalam erlenmeyer steril.

3.4.2 Media Pemeliharaan

Media pemeliharaan yang digunakan pada penelitian ialah air tawar. Media diperoleh dari kran air yang terdapat pada Laboratorium Reproduksi Ikan Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan. Air tawar didistribusikan ke dalam 15 buah akuarium berukuran 80X40X40 cm³ dengan menggunakan selang air. Akuarium diisi air setinggi 15,6 cm dengan volume air sebesar 50 liter. Media pemeliharaan selanjutnya di aerasi selama 24 jam untuk mensuplai kandungan oksigen terlarut.

3.4.3 Persiapan Hewan Uji

Hewan uji yang digunakan pada penelitian ini adalah ikan lele dumbo (*C. gariepinus*) yang diperoleh dari petani ikan di Gadang, Malang, dengan ukuran 5-7 cm dengan kepadatan 1 ekor/liter. Ikan lele diadaptasikan dahulu selama 1 minggu sebelum dilakukan penelitian. Ikan lele yang digunakan selama penelitian 28 hari, nantinya akan diambil sebanyak 12 ekor per akuarium dengan berat rata-rata 22±3,35 gram/ekor untuk diambil organ dalamnya berupa usus sebesar 3-5

gram. Hal ini dilakukan agar mempermudah perolehan data pada saat pelaksanaan uji enzim.

3.4.4 Persiapan dan Pembuatan Media Tumbuh Kandidat Probiotik

Media kultur mikroba adalah suatu bahan yang terdiri atas campuran nutrisi atau zat-zat hara. Nutrisi tersebut digunakan untuk pertumbuhan, sehingga faktor-faktor yang ada antara lain yaitu ketersediaan nutrisi (air, sumber karbon, sumber energi, sumber akseptor elektron, sumber mineral), faktor pertumbuhan dan sumber nitrogen yang dapat mempengaruhi pertumbuhan. Selain itu dipengaruhi juga oleh temperatur (suhu), pH dan kadar oksigen (Suriawiria, 2003).

Media tumbuh yaitu air tawar, air kelapa tua dan air tawar dimasak dengan kompor gas pada suhu 100°C. Bahan-bahan lain yang digunakan meliputi rempah-rempah, molase, dedak halus, susu, dan buah nanas juga ditambahkan dalam proses pemasakan. Kirna *et al.* (2013) telah menjelaskan bahwa probiotik dibuat dengan menggunakan bahan-bahan pokok, yaitu (1) rempah-rempah yang terdiri dari Jahe merah, kunyit putih, dan temulawak, (2) vitamin C yang diperoleh dari nanas, (3) gula yang berasal dari molase (tetes tebu) dan (4) dedak halus. Susu segar juga sangat baik ditambahkan dalam campuran bahan tersebut.

Langkah-langkah untuk pembuatan media tumbuh kandidat probiotik disiapkan berdasarkan variasi komposisi yaitu, sebagai berikut:

Tabel 1. Komposisi Variasi Probiotik

Probiotik 1	Probiotik 2
<ul style="list-style-type: none"> • Jahe merah 0,9 kg • Kunyit 1,5 kg • Temulawak 1,5 kg • Gula merah 1,5 kg • Dedak halus 600 gr • Molase 1,5 Liter • Markisa/nanas 900 gr • Susu segar 1,5 Liter • Air tawar 30 Liter • Inokulan bakteri <i>Bacillus subtilis</i>, <i>Nitrosomonas sp.</i>, <i>Nitrobacter sp.</i> 	<ul style="list-style-type: none"> • Kunyit putih 300 gr • Lengkuas 150 gr • Temulawak 300 gr • Jahe merah 300 gr • Kencur 150 gr • Temu ireng 150 gr • Bawang putih 300 gr • Molase 3 liter • Air kelapa tua 30 liter • Ragi 9 butir • Inokulan bakteri <i>Nitrosomonas sp.</i>, <i>B. subtilis</i>, <i>Lactobacillus casei</i>, <i>Nitrobacter sp.</i>

Cara Pembuatan:**Probiotik 1**

1. Rempah-rempah (jahe merah, temulawak, kunyit putih) dan nanas dikupas, dicuci dan dipotong-potong, lalu diblender hingga halus,
2. Rempah-rempah, gula merah, dedak halus, tetes dan air tawar dimasak pada suhu 100°C,
3. Buah markisa/nanas dihaluskan dengan blender, lalu dipanaskan bersama dengan susu pada suhu 60°C,
4. Seluruh bahan dimasukkan kedalam wadah (tong) dalam kondisi masih panas,
5. Sirkulasi udara ditambahkan dengan memasang selang aerasi pada salah satu sisi wadah ke botol air mineral yang telah terisi air tawar,
6. Media didinginkan selama 48 jam (sampai dingin dengan kondisi wadah tertutup rapat),
7. Setelah 48 jam dimasukkan starter probiotik berupa bakteri *Bacillus subtilis*, *Nitrosomonas sp.*, *Nitrobacter sp.* (masing-masing sebanyak 4 ml/L),
8. Tong ditutup rapat dan difermentasi selama 1 bulan,
9. Setelah 1 bulan, probiotik siap digunakan dan dikemas.

Probiotik 2

1. Semua bahan dihaluskan dengan diselep,
2. Dimasak kecuali ragi dan yakult,
3. Dibiarkan agak dingin, tambahkan ragi dan yakult dan inokulan bakteri,
4. Homogenkan bahan dan simpan dalam tempat tertutup tanpa udara.

3.4.5 Persiapan Pakan

Pakan yang diberikan pada hewan uji yakni berupa pakan komersil dengan kandungan protein sebesar 31%. Kebutuhan pakan yang diberikan pada ikan dihitung sesuai dengan berat tubuhnya sebesar 5% dari bobot biomassa ikan. Pencampuran pakan komersil dengan probiotik dilakukan dengan cara penyemprotan. Penyemprotan dilakukan di *Laminatory Air Flow* (LAF) agar pakan maupun probiotik yang akan diberikan pada ikan tetap steril. Probiotik yang disemprotkan pada pakan diberikan sesuai dengan dosis yang telah ditentukan yaitu 5 ml/kg dan 10 ml/kg, lalu disimpan selama 24 jam, kemudian pakan yang telah disemprot diberikan pada ikan lele.

3.5 Pelaksanaan Penelitian

Akuarium yang telah diisi media pemeliharaan dan hewan uji kemudian ditata sesuai denah rancangan percobaan. Aerasi dan suhu diatur agar tetap stabil, untuk memastikan kestabilan suhu dapat menggunakan *heater*. Sebelum memulai perlakuan, ikan terlebih dahulu dipuasakan selama 24 jam. Akuarium yang digunakan berukuran 80X40X40 cm³ sebanyak 15 buah yang telah disterilisasi, kemudian diisi media pemeliharaan berupa air tawar. Setelah itu, hewan uji yang telah ditimbang berat tubuh dan diukur panjang tubuhnya dimasukkan kedalam akuarium. Padat tebar hewan uji yang digunakan yaitu 50 ekor/akuarium.

Frekuensi pemberian pakan dilakukan 3 kali sehari pada pagi hari, siang hari dan sore hari pada pukul 08.00 WIB, 12.00 WIB dan 16.00 WIB dengan jumlah 5% dari berat biomassa tubuh ikan tersebut. Setelah 28 hari masa pemeliharaan, ikan lele diambil sekitar 12 ekor dengan berat 15 gram/ekor yang selanjutnya akan dibedah dengan menggunakan *sectio set* untuk diambil organ tubuhnya berupa usus. Masing-masing sampel ikan lele diambil ususnya sebanyak 3-5 gram untuk dilakukan uji enzim lipase dan protease dilaboratorium sebagai parameter utama pada penelitian ini. Parameter penunjang yang diukur pada media pemeliharaan meliputi suhu, DO, dan pH. Pengukuran parameter tersebut dilakukan dua kali sehari yaitu pada pukul 07.00 WIB dan pukul 16.00 WIB.

3.6 Parameter Uji

3.6.1 Parameter Utama

Menurut Juniarso (2008), aktivitas enzim merupakan banyaknya mol substrat yang diubah oleh enzim per satuan waktu. Aktivitas enzim dapat menggambarkan besarnya konsentrasi enzim dalam suatu medium. Terdapat istilah yang menjelaskan tentang aktivitas enzim, yaitu: unit aktivitas enzim, dimana satu unit aktivitas enzim adalah jumlah enzim yang menyebabkan perubahan 1 μmol (10^{-6} mol) substrat per menit pada suhu 25°C dalam kondisi optimum. Penentuan aktivitas enzim dapat dilakukan dengan menggunakan berbagai metode. Metode yang digunakan harus menyesuaikan dengan reaksi yang berlangsung dalam katalisis enzim bersangkutan. Parameter utama yang diamati dalam penelitian ini adalah sebagai berikut:

a. Uji Aktivitas Enzim Lipase

Aktivitas enzim lipase pada penelitian ini dilakukan dengan metode Al Gadri *et al.* (2014), pertama 2,5 ml minyak zaitun, 22,5 ml gum arabic 10% dicampur hingga homogen, kemudian ditambahkan 15 ml CaCl_2 , 10 ml NaCl dan buffer fosfat sampai pH 7. Campuran larutan sebelumnya diambil 5 ml dan dimasukkan

ke dalam erlenmeyer 100 ml, ditambahkan 0,5 ml ekstrak kasar (sampel) dan dihomogenkan selama 15 menit. Diinkubasi pada suhu 30°C selama 6 menit, lalu dicelupkan pada air mendidih dan didiamkan selama 1 menit. Larutan tersebut ditambahkan 3 tetes indikator PP 1% dan dititrasi dengan NaOH sampai larutan berwarna merah jambu.

Analisis aktivitas enzim lipase menggunakan metode Murni *et al.* (2014), sebanyak 2 gram minyak goreng sawit ditimbang dalam labu erlenmeyer 150 ml. Setelah itu, tambahkan 1 ml larutan enzim encer hasil fermentasi yang telah disaring dan 4 ml larutan *buffer* fosfat 0,05 M. Campuran diaduk dengan menggunakan *magnetic stirrer* selama 1 jam. Selanjutnya, tambahkan 10 ml aseton-alkohol (1:1) dan aduk hingga homogen. Tambahkan 2-3 tetes indikator pp (*phenolphthalein*) pada larutan yang telah diaduk. Titrasi dengan menggunakan KOH alkoholis 0,05 N. Hentikan titrasi pada saat warna larutan menjadi merah jambu dan tidak hilang, catat volume titrasinya. Larutan blanko dibuat dengan cara yang sama dengan sampel, tetapi larutan aseton–alkohol (1:1) ditambahkan pada jam ke-0, sebelum diaduk, untuk mematikan enzim.

Analisis lipase dilakukan dengan mencampur 2 gr minyak kelapa sawit dengan 4 ml buffer asetat pH 5,6 dan 1 ml CaCl₂ serta 1 ml enzim. Campuran tersebut diinkubasi pada plate stirer 30°C. Setelah 1 jam masa inkubasi, reaksi enzim diinaktifkan menggunakan aseton:etanol (1:1) sebanyak 10 ml dan ditambahkan 2–3 tetes indikator phenophtalin (pp) 1% dan dititrasi menggunakan KOH 0,05 N (Effendi *et al.*, 2006).

b. Uji Aktivitas Enzim Protease

Aktivitas enzim protease pada penelitian ini dilakukan dengan metode Al Gadri *et al.* (2014), pertama 2 ml larutan kasein 0,5%, 0,5 ml larutan buffer fosfat pH 7 dan 1 ml larutan enzim protease (sampel) dicampur hingga homogen dan didiamkan selama 10 menit pada suhu 37°C diatas pemanas air. Larutan

ditambahkan 2,5 ml larutan TCA 4% (b/v) lalu didiamkan selama 30 menit pada suhu 27°C (suhu kamar), kemudian di sentrifuge dengan kecepatan 3000 rpm \pm 5 menit dan diukur pemisahan filtrat serta endapan yang terbentuk. Filtran diambil 1 ml dan diencerkan sampai 6 ml lalu diukur absorbansinya pada panjang gelombang 578 nm (λ Tirosin). Blanko dibuat dengan prosedur yang sama.

Menurut Ramli (2015), aktivitas protease diukur dengan menggunakan pereaksi kasein-TCA dengan metode spektrofotometri. Penentuan aktivitas protease dilakukan dengan cara ekstrak protease dari sampel (supernatant) dipipet 1 ml kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan 2,5 ml larutan kasein 1% pH 6,5 dan diinkubasi dalam waterbath suhu 37°C selama 10 menit. Reaksi dihentikan dengan menambahkan 2,5 ml larutan TCA 5% dan didiamkan selama 30 menit pada suhu kamar (27°C). Kemudian disentrifugasi pada kecepatan 3.000 rpm selama 5 menit. Supernatant yang diperoleh diukur absorbansinya dengan spektrofotometer UV-Vis pada λ maks tirosin (287 nm). Sebagai blanko digunakan larutan enzim dengan perlakuan yang sama, tetapi penambahan TCA dilakukan sebelum penambahan substrat.

Analisa protease dilakukan dengan membuat campuran yang terdiri dari 0,5 ml buffer borat (pH 8), 0,5 ml larutan substrat kasein 1% dan 0,1 ml larutan enzim dalam CaCl₂, selanjutnya campuran tersebut diinkubasi pada suhu 37°C selama 10 menit. Ditambahkan 1 ml larutan asam Trichloroacetic (TCA) untuk menghentikan reaksi yang sedang berlangsung dan diinkubasi lagi pada suhu 37°C selama 10 menit, kemudian disentrifuge selama 10 menit dengan kecepatan 3000 rpm. Filtrat yang dihasilkan, ditambahkan 2,5 ml Na₂CO₃ dan 0,75 ml reagen Folin (1:2), kemudian diinkubasi kembali pada suhu 37°C selama 20 menit lalu dilakukan pengukuran menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 578 nm (Effendi *et al.*, 2006).

3.6.2 Parameter Penunjang

Parameter penunjang yang diamati untuk mendukung penelitian ini adalah sebagai berikut:

a. Suhu

Pengukuran suhu dilakukan dengan menggunakan termometer. Cara penggunaannya yaitu termometer dicelupkan ke dalam media pemeliharaan ikan lele dumbo kemudian dicatat hasilnya. Pengukuran dilakukan dua kali sehari pada pukul 07.00 WIB dan 16.00 WIB.

b. pH

Pengukuran pH dilakukan menggunakan pH meter. Cara penggunaannya yaitu pH meter yang dicelupkan ke dalam media pemeliharaan ikan lele dumbo dan dicatat hasilnya. Pengukuran pH dilakukan dua kali sehari pada pukul 07.00 WIB dan 16.00 WIB.

c. DO

Pengukuran DO pada media pemeliharaan dilakukan dengan menggunakan DO meter yang dicelupkan ke dalam media pemeliharaan udang dan dicatat hasilnya. Pengukuran DO dilakukan dua kali sehari pada pukul 07.00 WIB dan 16.00 WIB.

3.7 Analisa Data

Semua analisis diulang sebanyak tiga kali dari masing-masing perlakuan diuji secara statistik dengan menggunakan analysis of variance (ANOVA) sesuai dengan rancangan yang digunakan yaitu Rancangan Acak Lengkap (RAL). Jika pada analisis sidik ragam menunjukkan bahwa perlakuan memberikan pengaruh yang berbeda nyata atau berbeda sangat nyata, maka dilakukan uji Duncan untuk mengetahui perbandingan antar perlakuan. Analisis uji keragaman (ANOVA) dan Uji Duncan dalam penelitian ini menggunakan program SPSS ver. 20 for windows.