

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

1. Populasi

Populasi terdiri dari semua hal yang akan dijadikan objek penelitian. Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah bakteri limbah cair industri kecap di Kecamatan Purwodadi Kabupaten Grobogan, Jawa Tengah.

2. Sampel

Sampel merupakan sebagian kecil dari populasi yang digunakan pada saat melakukan penelitian. Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah bakteri limbah cair industri kecap yang berwarna keruh yang telah diambil dan sudah di saring agar terbebas dari pengotor. Limbah cair kecap yang telah diambil diisolasi agar diperoleh bakteri limbah cair kecap.

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi variabel utama

Variabel utama adalah variabel yang membuat identifikasi dari semua variabel yang akan diteliti secara langsung. Variabel utama penelitian ini yaitu ekstrak kasar enzim bakteri dari limbah cair industri kecap

Variabel utama kedua pada penelitian ini adalah potensi fibrinolitik dari ekstrak kasar enzim bakteri limbah cair industri kecap menggunakan metode *clot lysis*.

2. Klasifikasi variabel utama

Variabel utama memuat identifikasi dari semua variabel yang akan diteliti langsung. Variabel utama yang telah diidentifikasi dapat diklasifikasikan menjadi beberapa macam, yaitu variabel bebas, variabel tergantung, dan variabel terkontrol.

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah variabel yang direncanakan untuk diteliti pengaruhnya terhadap variabel tergantung yaitu ekstrak kasar fibrinolitik limbah cair industri kecap dengan variasi 20; 40; 80 %.

Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah pusat persoalan yang merupakan pengaruh selain variabel bebas. Variabel tergantung pada penelitian ini adalah potensi fibrinolitik ekstrak kasar enzim

bakteri limbah cair industri kecap dengan menggunakan metode clot lysis.

Variabel terkendali dalam penelitian ini adalah variabel yang dapat mempengaruhi variabel tergantung sehingga perlu ditetapkannya kualifikasi agar hasil yang didapat tidak tersebar dan dapat diulang oleh peneliti secara tepat. Variabel kendali pada penelitian ini adalah ekstrak kasar enzim bakteri limbah cair industri kecap, laboratorium, metode penelitian yang digunakan, dan kondisi peneliti.

C. Alat dan Bahan

1. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah jarum ose, lampu Bunsen, kertas saring, laminar air flow, kuvet, freezer, autoclave, inkubator (Memmert), inkubator shaker, oven (Memmert), gelas objek, tabung reaksi (Pyrex), cawan petri (Pyrex), labu Erlenmeyer (Pyrex), gelas ukur (Pyrex), botol Schott, beaker glass (Pyrex), corong kaca (Pyrex), batang pengaduk (Pyrex), pipet volume (Pyrex), pipet tetes (Pyrex), mikropipet (Soccorex), tabung mikrosentrifuga, magnetic stirrer (Texcare), jangka sorong, vorteks, mikroskop, spektrofotometer (Indotech), timbangan analitik (Fujitsu), dan pH meter (Lutron), alat penangas air (WNB), dan alat sentrifugasi (Hettich).

2. Bahan

Bahan yang digunakan pada penelitian adalah sampel limbah cair industri kecap di Grobogan, Provinsi Jawa Tengah, pewarna Gram A (chrysal violet), Gram B (lugol iodine), Gram C (alcohol), Gram D (safranin), larutan buffer fosfat, *Bovine serum albumin* (BSA), *Water For Injection*, *aquadest*, *sodium dodecyl sulfate* (SDS), Nutrient Agar (NA), Luria Broth (LB), *Phospat Buffered Solution* (PBS), darah kelinci, *Nattokinasse*, dan garam fisiologis.

D. Jalannya Penelitian

1. Pengambilan bahan

Sampel limbah cair diambil dari pembuangan air limbah di pabrik industri kecap Kecamatan Purwodadi Kabupaten Grobogan. Pengambilan sampel dilakukan menggunakan botol steril dengan volume pengambilan 500 mL. Limbah cair diambil dengan kedalaman ± 30 cm, kemudian di saring untuk mencegah adanya pengotor yang

ikut masuk kedalam botol (Hanifah *et al.*, 2020), kemudian tutup kembali mulut botol, dan sampel disimpan menggunakan sterofoam yang sudah diberi batu es (Trimulyo *et al.*, 2021) untuk menjaga suhu sampel bakteri dan mencegah bakteri agar tidak mati pada saat perjalanan menuju laboratorium. Setelah sampai laboratorium dilakukan pengenceran sampel.

2. Isolasi bakteri limbah cair

Dengan memvortex 10 ml sampel limbah cair industri kecap dalam 90 ml garam fisiologis (NaCl 0,85%), dihasilkan pengenceran 10^{-1} . Kemudian, 1 mL pengenceran 10^{-1} diencerkan ke dalam 9 ml garam fisiologis untuk membuat pengenceran 10^{-2} . Pengenceran serial dilakukan hingga pengenceran 10^{-5} (Murtiyaningsih dan Hazmi, 2017).

Sebanyak 100 μ L dari larutan pengenceran 10^{-1} sampai 10^{-5} diinokulasikan ke dalam media NA dengan metode sebaran, kemudian diinkubasi dalam inkubator pada suhu 37°C selama 24-48 jam. Koloni-koloni bakteri yang tumbuh kemudian dipilih 12 isolat yang mempunyai koloni dan morfologi yang berbeda yaitu bentuk, warna, ukuran, tepian dan elevasi kemudian dilakukan pemurnian dengan cara menginokulasikan isolat terpilih pada media NA padat dengan cara metode goresan 4 kuadran. Kemudian diinkubasi pada inkubator dengan suhu 37°C selama 24-48 jam. Setelah diperoleh koloni tunggal, kemudian isolat disimpan dalam lemari es dengan suhu 4°C (Madaniyah, 2013).

3. Uji aktivitas preteolitik isolat bakteri

Uji preteolitik menggunakan media SMA, Zona bening akan terbentuk bila bakteri proteolitik tumbuh pada media SMA, terbentuknya zona bening disekitar koloni karena terjadi hidrolisis kasein oleh protease yang dihasilkan dari bakteri proteolitik tersebut. Zona bening dan koloni diameternya diukur dengan jangka sorong satuan millimeter (mm). Penentuan aktivitas proteolitik isolate bakteri dihitung menggunakan Indeks Aktivitas Enzim (IAE) yaitu diameter zona bening (mm) dibagi dengan diameter koloni (mm) (Setiawan, 2013).

4. Perbanyakan bakteri

Perbanyakan bakteri dilakukan dengan cara satu ose biakan bakteri diinokulasikan pada media NA miring yang selanjutnya diinkubasi dalam inkubator selama 24 jam pada suhu 37°C (Wijayati, N *et al.*, 2014).

5. Identifikasi bakteri

5.1. Identifikasi mikroskopis dengan pewarnaan Gram.

Identifikasi dilakukan dengan pengecatan Gram. Dari 4 koloni isolat bakteri yang berbeda diambil 1 ose dari media NA kemudian dioleskan di atas gelas objek lalu difiksasi di atas lampu Bunsen. Kemudian tuang cat crystal violet (Gram A) 1-2 tetes pada preparat, biarkan selama 1 menit dan dicuci dengan air mengalir. Preparat ditetesi dengan cat iodine (Gram B) selama 1 menit, dibersihkan dengan air mengalir dan dikering anginkan. Ditetesi preparat dengan alkohol asam (Gram C) sebanyak 1-2 tetes sambil digoyang-goyang lalu dicuci dengan air mengalir. Cat safranin (Gram D) ditetaskan sebanyak 1-2 tetes selama 2 menit, lalu cuci cat dengan air mengalir sesudah itu dikering anginkan. Preparat diamati di bawah mikroskop. Bakteri Gram Positif (+) akan menunjukkan warna ungu dan bakteri Gram Negatif (-) akan menunjukkan warna merah.

5.2. Identifikasi bakteri dengan uji biokimia.

5.2.1. Uji katalase. Satu ose bakteri dioleskan pada gelas objek yang telah disterilkan dengan alcohol dan ditetesi larutan H₂O₂ 3% 1-2 tetes. Hasil positif ditandai dengan terbentuknya gelembung gas.

5.2.2. Uji koagulase. Plasma darah kelinci sebanyak 200 µl dimasukkan secara aseptis kedalam tabung reaksi steril. Sebanyak 1 ose biakan bakteri ditambahkan kedalam tabung reaksi kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Hasil positif ditunjukkan dengan adanya *clot* atau gumpalan dan apabila tabung dimiringkan *clot* tetap di dasar tabung (Lay, 1994).

5.2.3. Uji Sulfit Indol Motility (SIM). Satu ose bakteri diinokulasikan dengan ditusukkan jarum ose secara tegak lurus hingga setengah tinggi media SIM dalam tabung reaksi. Media diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam, diamati hasil pergerakan bakteri.

5.2.4. Uji KIA. Satu ose bakteri diinokulasikan dengan ditusukkan jarum ose secara tegak dan digoreskan pada bagian miring media KIA. Media diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.

5.2.5. Uji Lysine Iron Agar (LIA). Satu ose bakteri diinokulasikan dengan tusukkan jarum ose secara tegak dan digoreskan pada bagian miring media LIA. Media diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.

5.2.6. Uji citrate. Satu ose isolate bakteri digores dan ditusukkan pada bagian tengah hingga dasar media pada tabung reaksi.

Media diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Hasil positif ditandai dengan perubahan warna media dari hijau menjadi warna biru.

6. Isolasi ekstrak kasar enzim bakteri yang diisolasi dari limbah cair industri kecap

Dalam inkubator shaker dengan kecepatan 5000 rpm selama 24 jam pada suhu 37°C, sebanyak 4% starter ditambahkan ke dalam 500 mL media BHI. Suspensi tersebut dicampurkan kedalam 500 mL, dilakukan shaker selama 45 menit dengan kecepatan 75 rpm, setelah itu dilakukan inkubasi kembali selama 24 jam dengan suhu 37°C. Suspensi setelah itu disentrifugasi pada kecepatan 5000 rpm pada suhu 40°C selama 15 menit bertujuan untuk memisahkan zat pengotor yang ada. Cara ini akan membuat sel mengendap disebabkan karena adanya gaya gravitasi, sedangkan enzim tetap berada pada supernatan. Supernatan merupakan ekstrak kasar (crude) dari enzim (Chaidir 1998).

7. Pemurnian ekstrak kasar enzim bakteri yang diisolasi dari limbah cair industri kecap

Ekstrak kasar enzim dimurnikan menggunakan teknik *salting out* yaitu *amonium sulfat* dengan saturasi 40%. Pencampuran pada suhu 4°C menggunakan *magnetic stirrer* dengan *amonium sulfat* ditambahkan secara bertahap sampai semua terlarut. Campuran kemudian didiamkan dalam refrigerator selama 1 hari pada suhu $\pm 4^{\circ}\text{C}$. Kombinasi enzim dan garam kemudian disentrifugasi selama 30 menit pada suhu 4°C dengan kecepatan 5.000 rpm. Endapan dipisahkan dan ditimbang menjadi endapan pemurnian enzim. Pelet ditimbang dan ditambahkan buffer PBS pH 7,4 menggunakan perbandingan volume pellet dan buffer 1:2 (Azizah, 2017).

8. Pembuatan sampel uji

Ekstrak kasar enzim bakteri dibuat menjadi tiga variasi konsentrasi yaitu 20, 40, dan 80% (Bimantara, R *et al.*, 2021). Pengujian ini dilakukan dengan melakukan replikasi sebanyak tiga kali, sehingga setiap sampel uji harus dikalikan dengan tiga dalam setiap perhitungannya. Nattokinase digunakan sebagai kontrol positif dalam penelitian ini. Untuk membuat suspensi nattokinase, 100 mg nattokinase ditimbang dan dihomogenkan dengan aquadest dalam labu ukur berukuran 10 mL hingga mencapai tanda batas (10 mL). Kontrol negatif dalam penelitian ini menggunakan aquadest (Zaman *et al.*, 2015).

9. Pengujian potensi fibrinolitik dengan metode *clot lysis*

Uji potensi fibrinolitik pada ekstrak kasar enzim bakteri yang diisolasi dari limbah cair industri kecap. Metode *clot lysis* dilakukan dengan cara 200 µl darah kelinci segar dimasukkan kedalam 60 tabung eppendorf yang sudah ditimbang dan disterilkan, kemudian dilakukan inkubasi pada suhu 37°C selama 45 menit hingga darah menggumpal. Darah yang sudah menggumpal pada tabung dilakukan penimbangan (berat gumpalan darah = berat eppendorf berisi gumpalan darah–berat eppendorf kosong). Pelet pemurnian dengan konsentrasi 20%, 40% dan 80% dimasukkan kedalam masing-masing tabung sebanyak 50 µl, untuk 12 tabung eppendorf dimasukkan kontrol positif yaitu nattokinase dan 12 tabung dimasukkan control negatif yaitu aquadest, selanjutnya dilakukan inkubasi pada suhu 37°C selama 90 menit. Aktivitas fibrinolitik diamati melalui terjadinya peleburan gumpalan darah pada tabung eppendorf yang berisi gumpalan darah. Cairan yang diperoleh setelah inkubasi dikeluarkan dari tabung selanjutnya dilakukan penimbangan untuk mengamati perbedaan berat setelah lisis bekuan. Perhitungan persentase lisis dengan rumus (berat lisis gumpalan darah/berat gumpalan darah sebelum lisis) x 100 (Mohan *et al.*, 2014).

10. Ekstraksi DNA bakteri

Isolat bakteri yang dikultur ulang Media NA (Nutrient Agar), diregenerasi 1 ml pada media LB (Luria Bertani). Kemudian ditumbuhkan kembali pada medium LB 5 termasuk. Kultur isolat bakteri kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 3000 x.g, 2 menit, di suhu 4°C untuk mendapatkan pelet bakteri. Pelet Bakteri yang dihasilkan disuspensikan kembali Buffer TE hingga 573 µl. Pelisisan Dinding sel bakteri dibuat 15 µl SDS 20% dan proteinase-K 20 mg/ml untuk pemurnian awal. Inkubasi setelah homogen selama 1 jam, suhu 37°C. Ekstraksi DNA dilakukan dengan penambahan 100 µl 5 M NaCl dan 80 µl CTAB/NaCl, larutan homogenkan dan inkubasi selama 10 menit, suhu 65°C kemudian dimurnikan kembali menambahkan P:C:I (fenol: dengan kloroform:isoamil alkohol) (25:24:1). dalam volume yang sama dan disentrifugasi kecepatan 3600 x.g, suhu 4°C, 5 menit. Fase atas yang dihasilkan dimurnikan kembali menambahkan C:I (kloroform:isoamil alkohol) (24:1) dalam volume yang sama dan disentrifugasi pada 3600 x g, suhu 4°C, selama 5 menit. Fase atas yang diperoleh diendapkan dengan isopropanol dingin sebanyak 0,6 kali volume sampel yang diperoleh. Larutan lalu disentrifugasi pada suhu

3.600 x.g, selama 5 menit pada suhu 4°C untuk memperoleh pelet DNA. Pelet DNA yang dihasilkan dicuci menggunakan etanol 70% dan disentrifugasi pada 3600 x.g selama 5 menit, suhu 4°C. Pelet DNA kemudian dikeringkan, diresuspensi dalam buffer TE hingga 50 µL. Sampel kemudian disimpan pada -20°C sampai analisis lebih lanjut. Sampel DNA kemudian diuji semi Kualitatif dan kuantitatif. Sampel DNA yang memenuhi persyaratan dilanjut amplifikasi sekuens 16S rDNA dengan metode PCR (Wilson, 1997).

11. Amplifikasi gen 16S rRNA

Larutan sampel isolasi DNA Tempatkan dalam 7 tabung PCR µL, 12,5 µL Reagen Campuran Utama PCR, BactF1 Primer (5'-AGA GTT TGA TC(G/C) TGG CTC AG-3') 1µL, Uni B1 primer mundur (5'- GGT TAC(G/C) TTG TTA CGA CTT-3') 1µL dan NFW 3,5 µL. Kemudian tambahkan campuran dimasukkan dalam PCR menggunakan pengaturan suhu denaturasi awal 95°C selama 5 menit, suhu denaturasi lanjut 95°C selama 30 detik, suhu annealing 60°C selama 30 detik, suhu polimerisasi 72 °C selama 1 menit dan Suhu polimerisasi akhir 72°C selama 4 menit. Proses PCR ini dilakukan selama 30 siklus. Reagen PCR multimix merupakan reagen Campuran mengandung enzim DNA i-Taq Polimerase 5U/µL, 4 jenis dNTP (dTTP, dCTP, dATP dan dGTP) masing-masing 2,5 mM; Buffer PCR dan buffer loading gel setelah analisis amplifikasi dilanjut elektroforesis gel.

12. Ekektroforesis

Tambahkan 0,2 g agarosa ke dalam 20 ml Tris Acetate EDTA (TAE) 1x steril dididihkan. Setelah agak dingin, larutan dituangkan ke dalam cetakan gel, diletakkan sisir dan dibiarkan mengeras. Lepaskan sisir dan pindahkan naman ke wadah elektroforesis. 1x buffer TAE ditambahkan ke dalam wadah untuk menutupi permukaan gel agarosa. Loading buffer 2,5 µL ditambahkan ke 3 µL ekstrak DNA disuspensikan dengan memipet. Campuran tersebut dimasukkan dengan hati-hati ke dalam sumur gel yang disediakan. Nyalakan elektroforesis dan atur tegangan m 50 Volt. Kemudian operasikan alat hingga xylene cyanol mencapai 1 cm dari tepi dasar gel. Prosedur pewarnaan dengan menambahkan 1 µL etidium bromida ke dalam campuran, dan menuangkan ke dalam cetakan gel. Pemucatan warna dilakukan dengan merendam gel agarosa dalam wadah berisi air selama 5 menit, sambil digoyang dan mengganti air beberapa kali. Hasilnya diamati pada transilluminator UV dengan panjang gelombang 590 nm.

13. Sekuensing

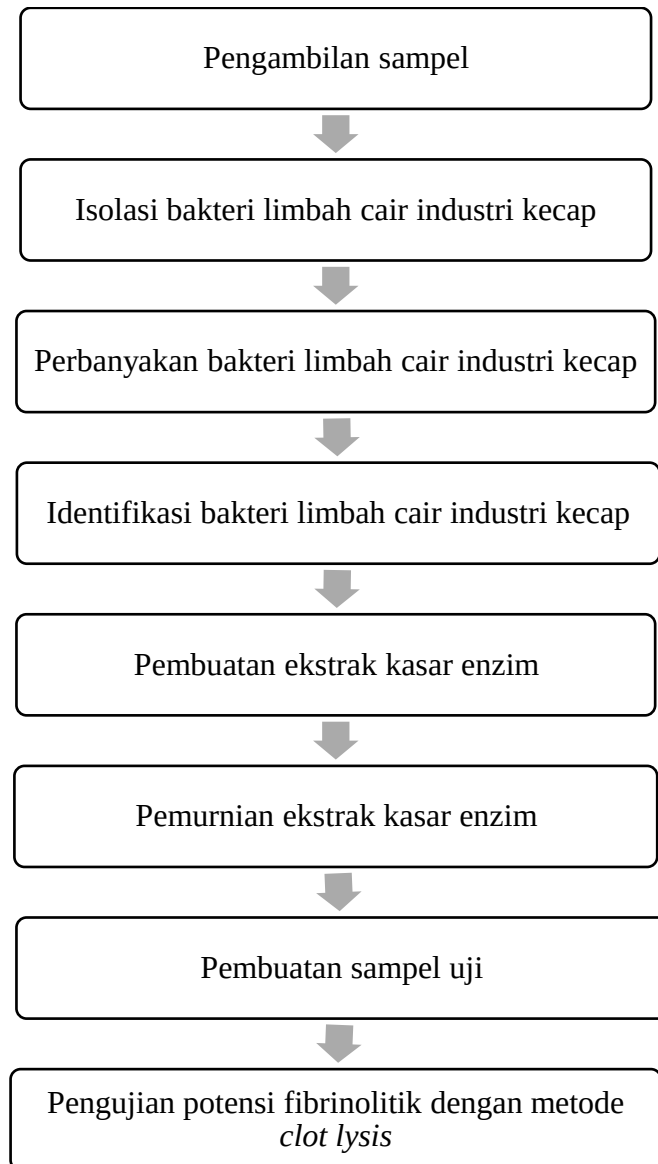
Sekuensing DNA dapat dilakukan dengan menggunakan metode Sanger atau sekuensing DNA modern. Ketersediaan peralatan masih terbatas sehingga untuk melakukan sequencing, peneliti mengirimkan sampel ke laboratorium terpilih di Indonesia melalui layanan sequencing. Analisis sekuens dilakukan dengan metode Sanger menggunakan prinsip chain termination dideoksiribonukleotida. Bahan yang digunakan untuk sequencing adalah: DNA template, primer forward menggunakan 63F (5'CAG GCC TAA CAC ATG CAA GTC 3') dan primer reverse menggunakan 1387R (5'GGG CGG WGT GTA CAA GGC 3'), DNA Polymerase dideoksiribonukleotida trifosfat (ddNTP) dan aquabides (ddH₂O). Alat yang digunakan untuk sekuensing adalah kit dan sequencer. Setelah panjang dari basaterminal dari setiap fragmen diketahui, maka urutan basa dapat ditentukan.

E. Analisis Data

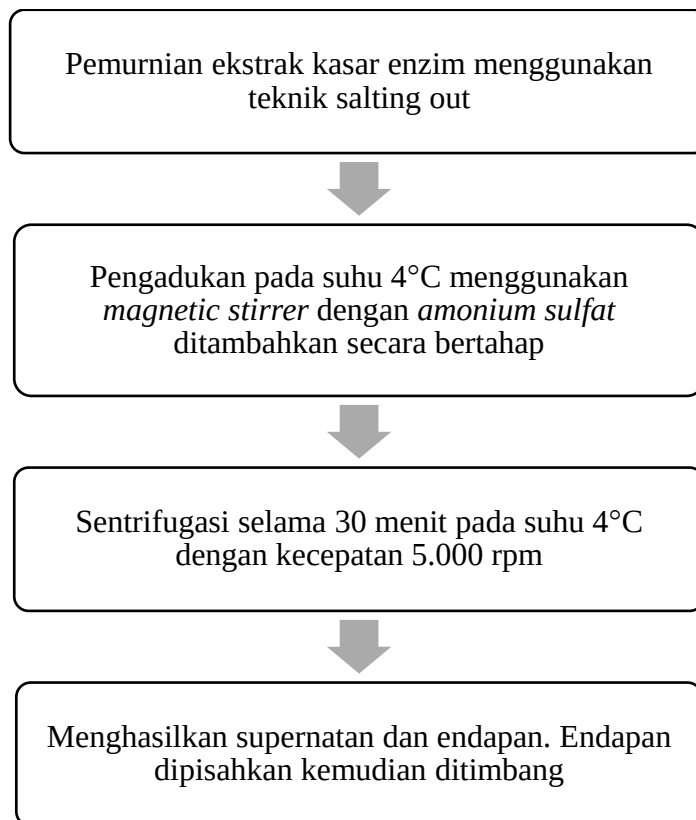
Data yang diperoleh dari penelitian dianalisis secara deskriptif dan ditampilkan dalam bentuk grafik, tabel, dan foto. Data awal disajikan dalam bentuk tabel dan mencakup temuan analisis data pada data isolasi dan identifikasi morfologi makroskopis dan mikroskopis.

Analisis terhadap isolat bakteri yang menghasilkan agen fibrinolitik dengan cara mengukur persentase (%) lisis bekuan darah. Hasil dari penelitian kemudian dianalisis menggunakan cara pendekatan statistik two way ANOVA. Data berbeda signifikan apabila nilai $P < 0,05$.

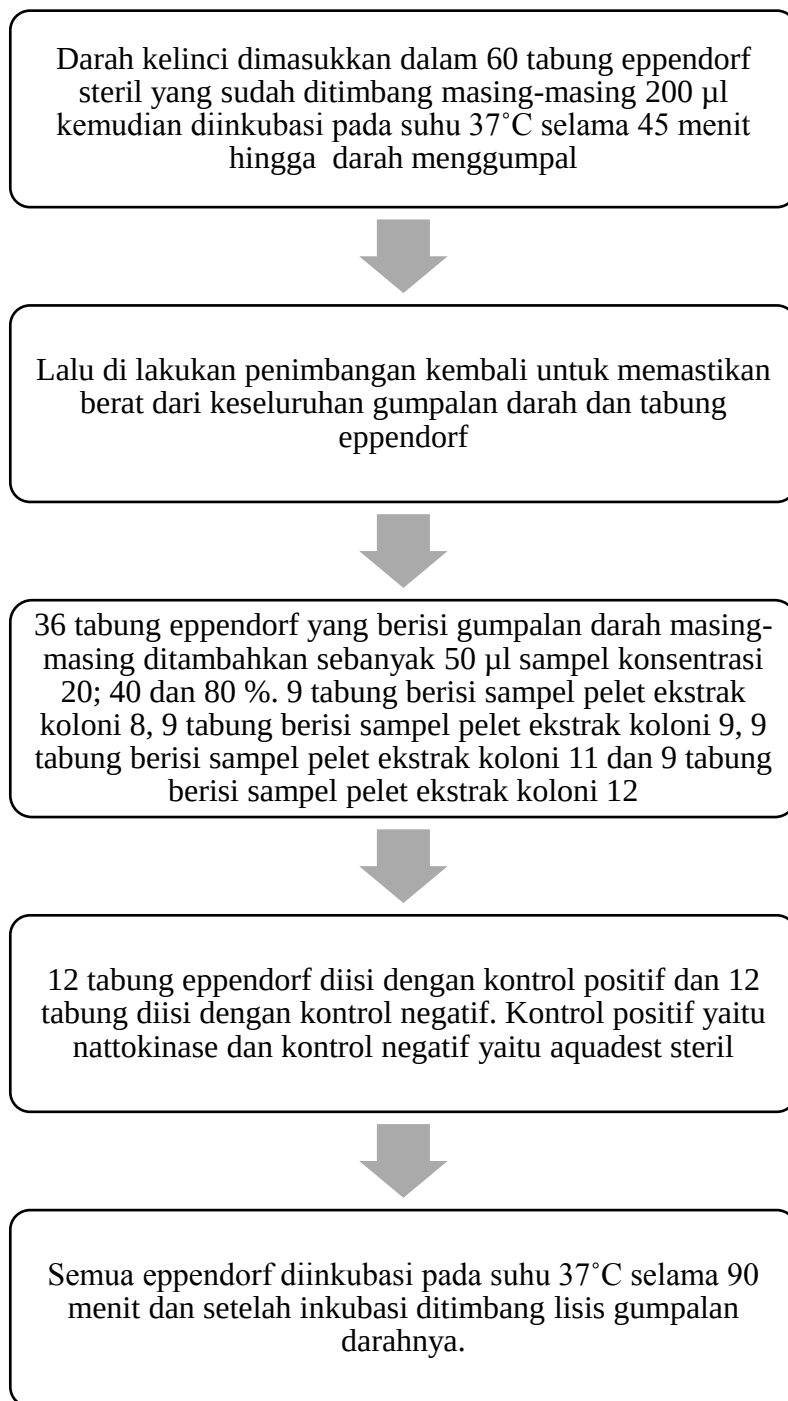
F. Skema Penelitian



Gambar 2. Skema alur penelitian.



Gambar 3. Skema pemurnian ekstrak kasar enzim.



Gambar 4. Skema uji potensi fibrinolitik