

IV. HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Pengaruh Beberapa Faktor Pada Medium Kultur Terhadap Pertumbuhan Sel dan Produksi Enzim CGT-ase Isolat LTi-21-3

Pertumbuhan mikroorganisme tertentu sangat dipengaruhi oleh sumber karbon, nitrogen, ion logam dan pH, dari sumber-sumber tersebut ada yang berfungsi mengkatalisis jumlah sel dan jumlah produksi enzim dan ada juga yang berfungsi menghambat pertumbuhan dan produksi enzim.

Pada penelitian ini, variasi komposisi medium sumber karbon, nitrogen, ion logam dan pH terbaik dipilih berdasarkan aktivitas spesifik tertinggi dari isolat LTi-21-3. Aktivitas spesifik merupakan hasil bagi antara aktivitas unit terhadap kadar protein. Dengan adanya aktivitas spesifik yang tinggi ini akan memudahkan dalam proses pemurnian enzim CGT-ase.

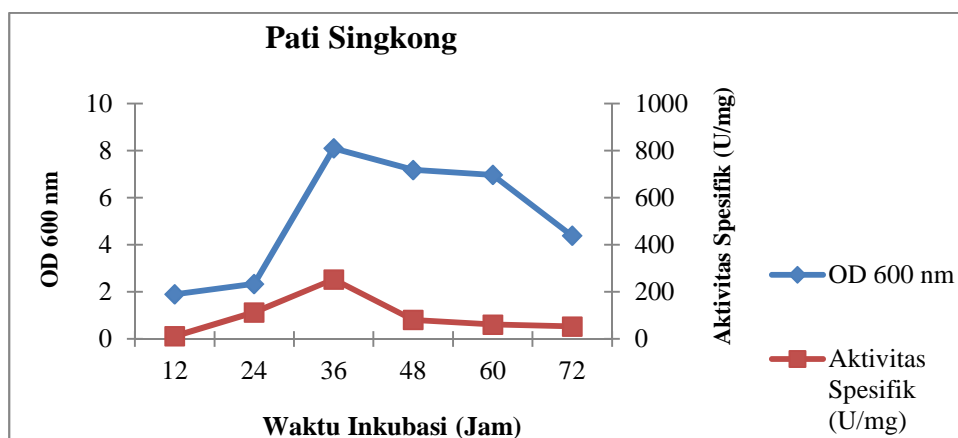
Hasil dari keseluruhan penelitian ini menunjukkan bahwa waktu optimum untuk menghasilkan enzim CGT-ase ekstraseluler untuk isolat LTi-21-3 ada pada 36 jam. Pada waktu optimum ini, enzim CGT-ase ekstraseluler banyak diproduksi oleh isolat bakteri. Hal ini ditunjukkan dengan aktivitas yang tinggi pada waktu inkubasi optimumnya.

1. Pengaruh Sumber Karbon

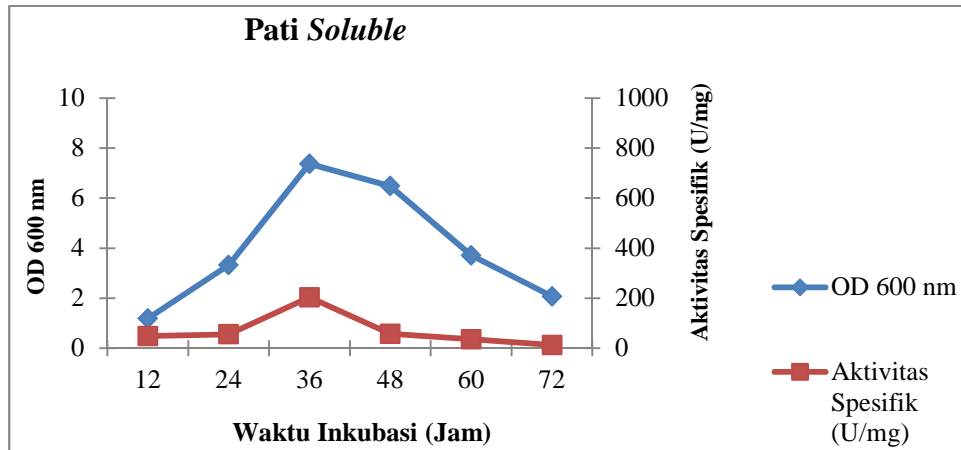
Menurut Posci *et al.* (1998), pati *soluble* adalah sumber karbon terbaik untuk *B. firmus* dan *B. macerans* dalam memproduksi enzim CGT-ase.

Pada *B. circulans* DF 9R sumber karbon terbaiknya yaitu 1,5% pati singkong (Rosso *et al.*, 2002) dan *Bacillus* sp. TS1-1 alkalofilik dan *Bacillus stearothermophilus* HR1 secara berurutan dengan 1,48% dan 1,5% pati sagu (Mahat *et al.*, 2004; Rahman *et al.*, 2004) dalam memproduksi enzim CGT-ase. Menurut Ibrahim *et al.* (2005), *Bacillus* G1 memiliki aktivitas CGT-ase tertinggi ketika digunakan pati singkong sebagai sumber karbonnya.

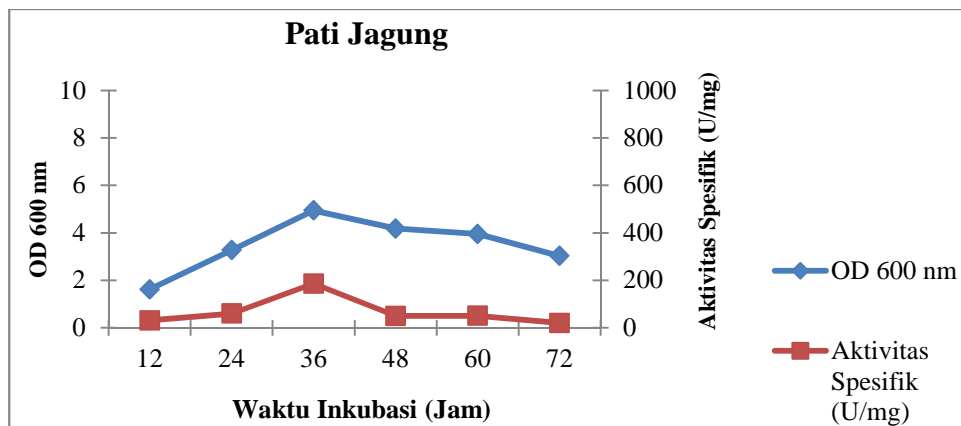
Pertumbuhan sel dan aktivitas spesifik isolat LTi-21-3 pada variasi komposisi medium sumber karbon dapat dilihat pada Gambar 6 – 11 berikut:



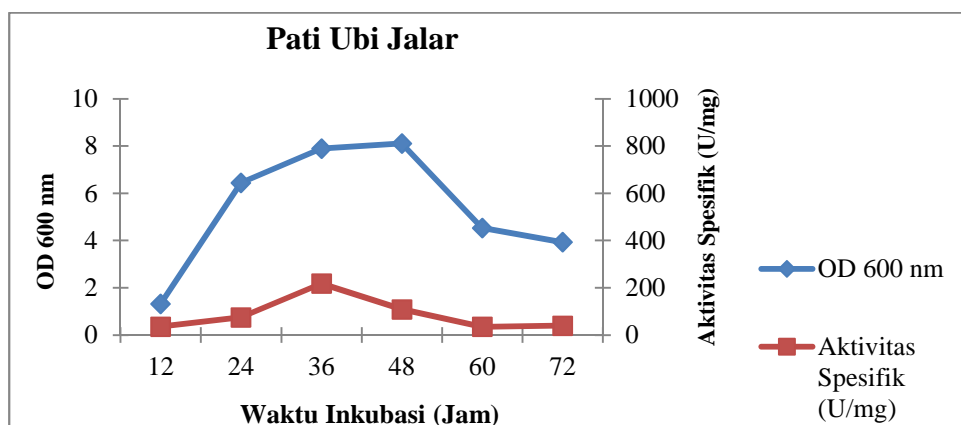
Gambar 6. Profil pertumbuhan sel dan aktivitas spesifik isolat LTi-21-3 pada medium Horikoshi's II dengan sumber karbon pati singkong



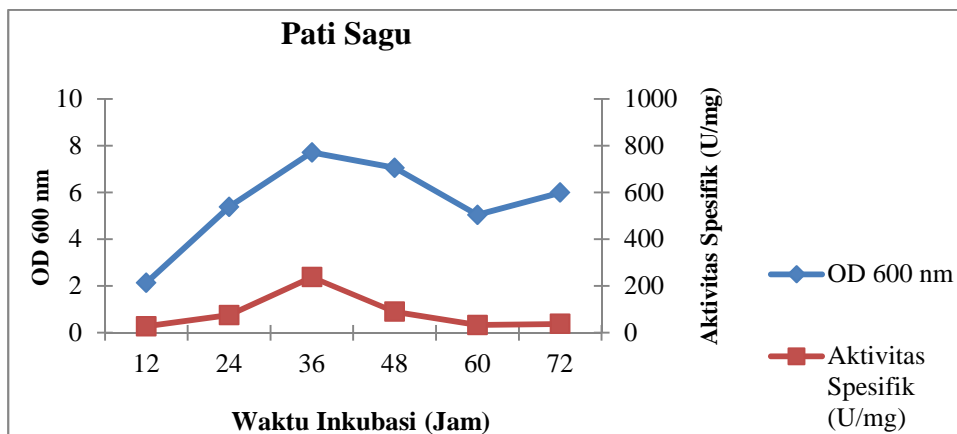
Gambar 7. Profil pertumbuhan sel dan aktivitas spesifik isolat LTi-21-3 pada medium Horikoshi's II dengan sumber karbon pati *soluble*



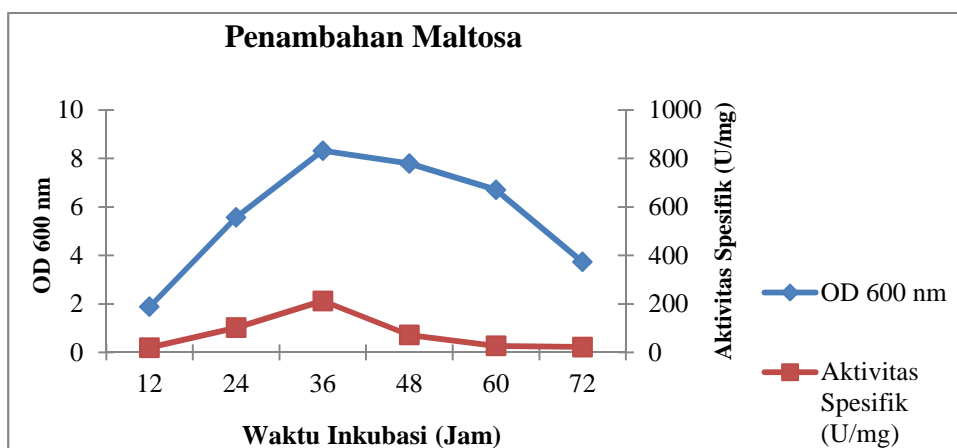
Gambar 8. Profil pertumbuhan sel dan aktivitas spesifik isolat LTi-21-3 pada medium Horikoshi's II dengan sumber karbon pati jagung



Gambar 9. Profil pertumbuhan sel dan aktivitas spesifik isolat LTi-21-3 pada medium Horikoshi's II dengan sumber karbon pati ubi jalar



Gambar 10. Profil pertumbuhan sel dan aktivitas spesifik isolat LTi-21-3 pada medium Horikoshi's II dengan sumber karbon pati sagu



Gambar 11. Profil pertumbuhan sel dan aktivitas spesifik isolat LTi-21-3 pada medium Horikoshi's II termodifikasi dengan sumber karbon penambahan maltosa

Pada Tabel 3. berikut dapat dilihat pertumbuhan sel, aktivitas unit, kadar protein dan aktivitas spesifik dari isolat LTi-21-3 pada variasi komposisi medium sumber karbon dengan waktu inkubasi optimum 36 jam. Data lengkap untuk pertumbuhan sel, aktivitas unit, kadar protein dan aktivitas spesifik dari isolat LTi-21-3 pada variasi komposisi medium sumber karbon dapat dilihat pada Lampiran 4.

Tabel 3. Pertumbuhan sel, aktivitas unit, kadar protein dan aktivitas spesifik isolat LTi-21-3 pada variasi komposisi medium sumber karbon dengan waktu inkubasi optimum 36 jam.

Medium Kultur	Pertumbuhan Sel OD ₆₀₀	Aktivitas Unit (U/mL)	Kadar Protein (mg/mL)	Aktivitas Spesifik (U/mg)
Pati Singkong	8,10	664,37	2,62	253,31
Pati <i>Soluble</i>	7,37	630,19	3,09	203,68
Pati Jagung	4,94	569,78	3,06	186,32
Pati Ubi Jalar	7,89	606,95	2,78	218,12
Pati Sagu	7,71	684,00	2,88	237,39
Penambahan Maltosa	8,32	632,39	2,97	212,76

Tabel 4. Perbandingan pertumbuhan sel, aktivitas unit dan aktivitas spesifik antara medium tanpa dan dengan perlakuan variasi komposisi medium sumber karbon

Jenis Perlakuan	Medium Kultur	Pertumbuhan Sel OD ₆₀₀	Aktivitas Unit (U/mL)	Aktivitas Spesifik (U/mg)	Nilai/Persentase (%)		
					OD	AU	AS
Tanpa Perlakuan Variasi	Pati Singkong	8,10	664,37	253,31	100	100	100
	Pati <i>Soluble</i>	7,37	630,19	203,68	91	95	80
	Pati Jagung	4,94	569,78	186,32	61	86	74
	Pati Ubi Jalar	7,89	606,95	218,12	97	91	86
	Pati Sagu	7,71	684,00	237,39	95	103	94
	Penambahan Maltosa	8,32	632,39	212,76	103	95	84

Keterangan: OD = pertumbuhan sel, AU = aktivitas unit dan AS = aktivitas spesifik

Dari kedua data yang disajikan di atas, diketahui bahwa isolat LTi-21-3 menghasilkan aktivitas unit tertinggi pada sumber karbon pati sagu yaitu 684 U/mL. Untuk penambahan maltosa pada medium Horikoshi's II

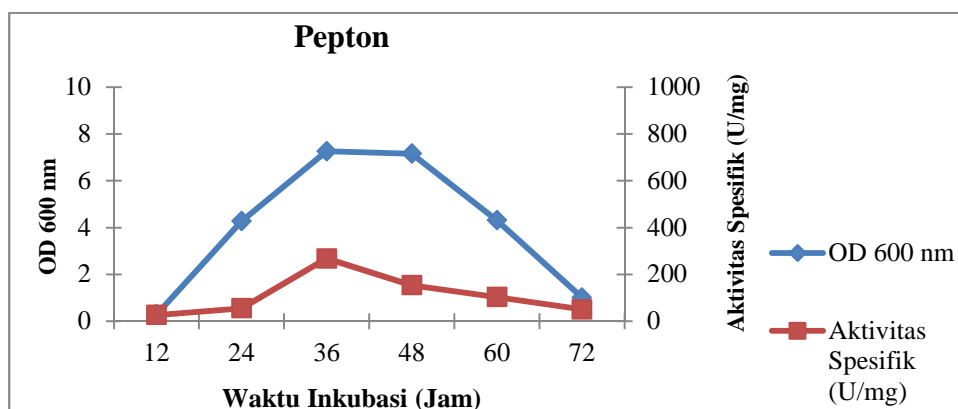
termodifikasi hanya meningkatkan pertumbuhan sel tanpa diikuti dengan meningkatnya aktivitas unit dan aktivitas spesifiknya. Terdapatnya gula sederhana dalam substrat hidrolisat seperti glukosa, maltosa dan maltotriosa, menyebabkan aktivitas CGT-ase tidak dapat mengkonversi substrat menjadi siklodekstrin secara optimal. Hal tersebut disebabkan gula sederhana menghambat reaksi siklisasi akibat terjadinya reaksi *coupling* yaitu pemecahan cincin siklodekstrin sehingga terbentuk maltooligosakarida yang menghasilkan maltooligosakarida lain dan gula pereduksi (Charoenlap *et al.*, 2004; Burhan *et al.*, 2005). Namun, pada medium kultur Horikoshi's II termodifikasi yang mengandung sumber karbon pati singkong menghasilkan aktivitas unit dan aktivitas spesifik secara berurutan yaitu 664,37 U/mL dan 253,31 U/mg. Nilai aktivitas spesifik ini merupakan nilai tertinggi dari sumber karbon yang lainnya. Untuk itu, pada variasi komposisi medium sumber karbon dengan pati singkong dipilih sebagai sumber karbon terbaik.

2. Pengaruh Sumber Nitrogen

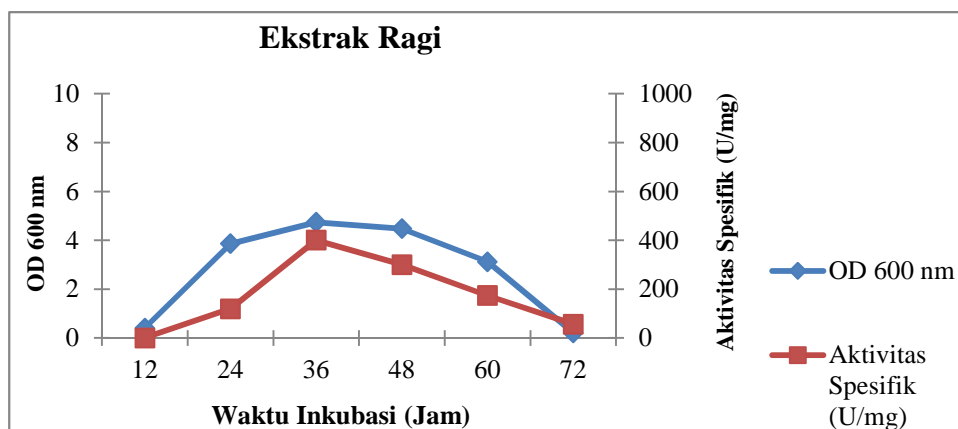
Ibrahim *et al.* (2005) mengamati adanya pengaruh sumber nitrogen organik dan anorganik pada produksi CGT-ase dari *Bacillus* G1. Mereka menemukan bahwa produksi CGT-ase tertinggi ketika sumber nitrogen organik ada di dalam medium. Menurut Illias *et al.* (2003) sumber nitrogen terbaik untuk produksi CGT-ase adalah pepton. Tetapi Mahat *et al.* (2004) mengamati bahwa pati sagu dan ekstrak ragi mempunyai efek yang signifikan untuk produksi CGT-ase. Gawande and Patkar (1999), mengamati produksi CGT-ase maksimum ketika digunakan pepton sebagai

sumber nitrogen untuk *Klebsiella pneumoniae* AS-22. Urea dan NH_4NO_3 diketahui menghambat pertumbuhan bakteri dan selanjutnya tidak ada enzim yang dihasilkan.

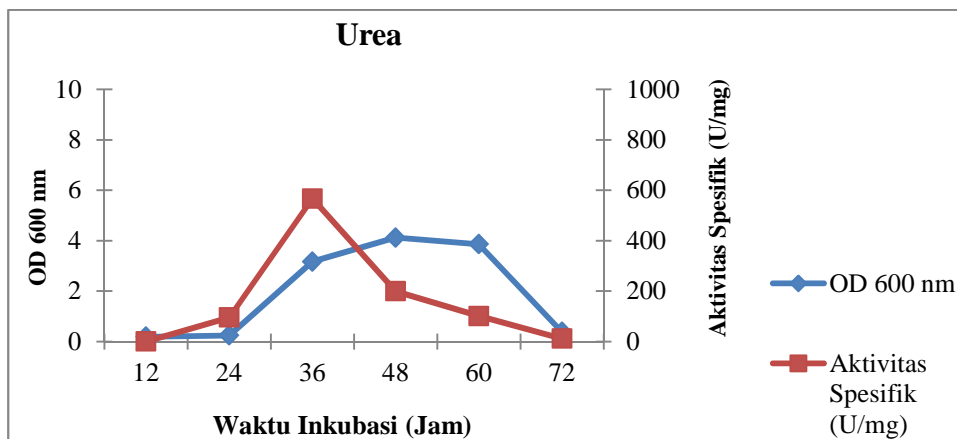
Pertumbuhan sel dan aktivitas spesifik isolat LTi-21-3 pada variasi sumber nitrogen dapat dilihat pada Gambar 12 – 15 berikut:



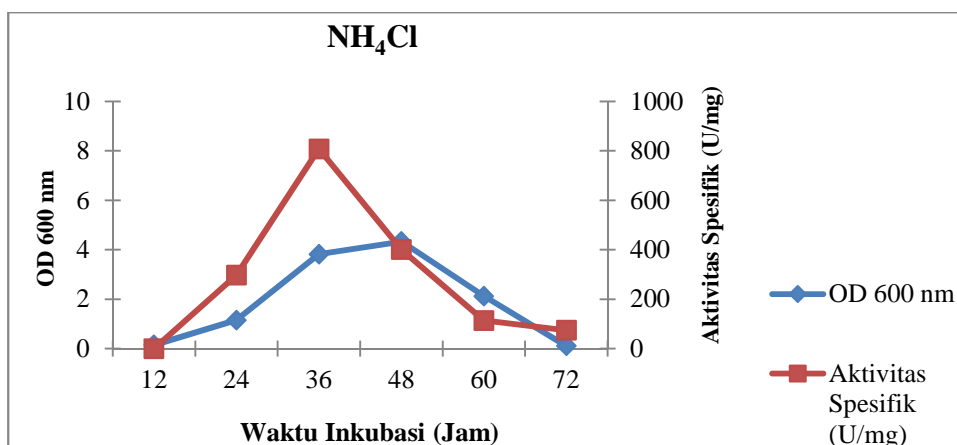
Gambar 12. Profil pertumbuhan sel dan aktivitas spesifik isolat LTi-21-3 pada medium Horikoshi's II termodifikasi dengan sumber nitrogen pepton



Gambar 13. Profil pertumbuhan sel dan aktivitas spesifik isolat LTi-21-3 pada medium Horikoshi's II termodifikasi dengan sumber nitrogen ekstrak ragi



Gambar 14. Profil pertumbuhan sel dan aktivitas spesifik isolat LTi-21-3 pada medium Horikoshi's II termodifikasi dengan sumber nitrogen urea



Gambar 15. Profil pertumbuhan sel dan aktivitas spesifik isolat LTi-21-3 pada medium Horikoshi's II termodifikasi dengan sumber nitrogen NH₄Cl

Berikut data pertumbuhan sel, aktivitas unit, kadar protein dan aktivitas spesifik dari isolat LTi-21-3 pada variasi komposisi medium sumber nitrogen dengan waktu inkubasi optimum 36 jam dapat dilihat pada Tabel 5. Data lengkap untuk pertumbuhan sel, aktivitas unit, kadar protein dan aktivitas spesifik dari isolat LTi-21-3 pada variasi komposisi medium sumber nitrogen dapat dilihat pada Lampiran 5.

Tabel 5. Pertumbuhan sel, aktivitas unit, kadar protein dan aktivitas spesifik isolat LTi-21-3 pada variasi komposisi medium sumber nitrogen dengan waktu inkubasi optimum 36 jam

Medium Kultur	Pertumbuhan Sel OD ₆₀₀	Aktivitas Unit (U/mL)	Kadar Protein (mg/mL)	Aktivitas Spesifik (U/mg)
Pepton	7,26	642,48	2,40	267,68
Ekstrak Ragi	4,74	673,02	1,68	400,30
Urea	3,17	664,92	1,17	567,14
NH₄Cl	3,82	611,55	0,76	808,36

Tabel 6. Perbandingan pertumbuhan sel, aktivitas unit dan aktivitas spesifik antara medium tanpa dan dengan perlakuan variasi komposisi medium sumber nitrogen

Jenis Perlakuan	Medium Kultur	Pertumbuhan Sel OD ₆₀₀	Aktivitas Unit (U/mL)	Aktivitas Spesifik (U/mg)	Nilai/Persentase (%)		
					OD	AU	AS
Tanpa Perlakuan Variasi	Pepton	7,26	642,48	267,68	100	100	100
Dengan Perlakuan Variasi	Ekstrak Ragi	4,74	673,02	400,30	65	105	150
	Urea	3,17	664,92	567,14	44	103	212
	NH₄Cl	3,82	611,55	808,36	53	95	302

Keterangan: OD = pertumbuhan sel, AU = aktivitas unit dan AS = aktivitas spesifik

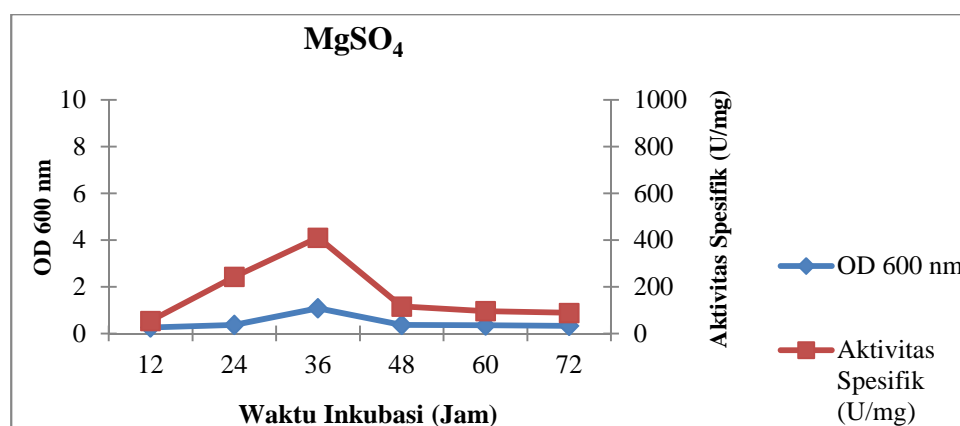
Dari kedua data di atas, diketahui bahwa aktivitas unit pada waktu inkubasi optimum 36 jam dengan sumber nitrogen pepton dan ekstrak ragi secara berurutan yaitu 642,48 U/mL dan 673,02 U/mL. Nilai aktivitas unit kedua sumber nitrogen tersebut lebih tinggi jika dibandingkan dengan sumber nitrogen NH₄Cl (611,55 U/mL). Walaupun pepton dan ekstrak ragi merupakan sumber nitrogen organik sedangkan urea dan NH₄Cl adalah sumber nitrogen anorganik. Namun, sumber nitrogen NH₄Cl memiliki aktivitas spesifik yang lebih tinggi jika dibandingkan dengan pepton dan ekstrak ragi yaitu 808,36 U/mL. Pertumbuhan sel

menggunakan NH_4Cl mengalami penurunan sekitar 47% dari medium tanpa perlakuan. Dengan demikian, sumber nitrogen NH_4Cl dipilih sebagai variasi komposisi medium terbaik.

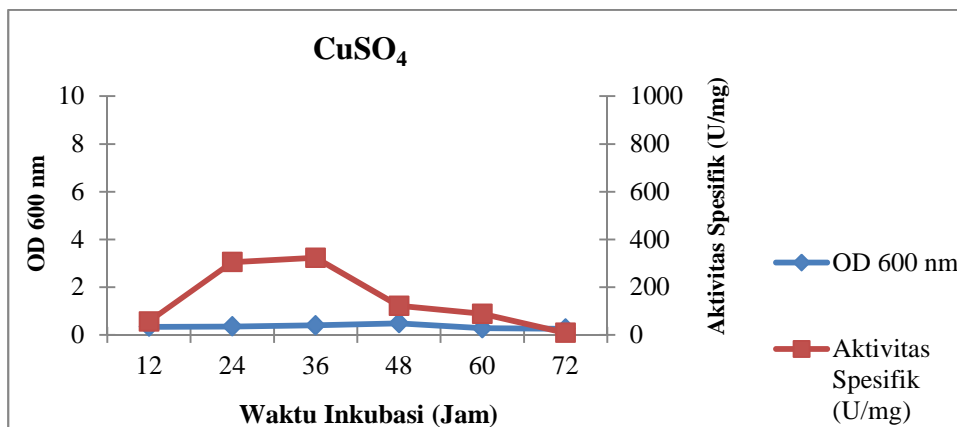
3. Pengaruh Sumber Ion Logam

Menurut Ibrahim *et al.* (2005), Gawande *et al.* (1998), Gawande and Patkar (1999) dan Jin-Bong *et al.* (1990) menemukan bahwa magnesium diperlukan untuk produksi CGT-ase. Cu^{2+} dan Zn^{2+} merupakan efek inhibitor yang signifikan dalam kestabilan CGT-ase untuk *Brevibacterium* sp. No. 9605 (Mori *et al.*, 1994), *B. agaradhaerens* (Martins and Hatti-Kaul, 2002) dan *Bacillus* sp. AL-6 (Fujita *et al.*, 1990). Sebagian besar CGT-ase diinhibisi kuat oleh Zn^{2+} , Cu^{2+} dan Fe^{2+} (Tonkova, 1998).

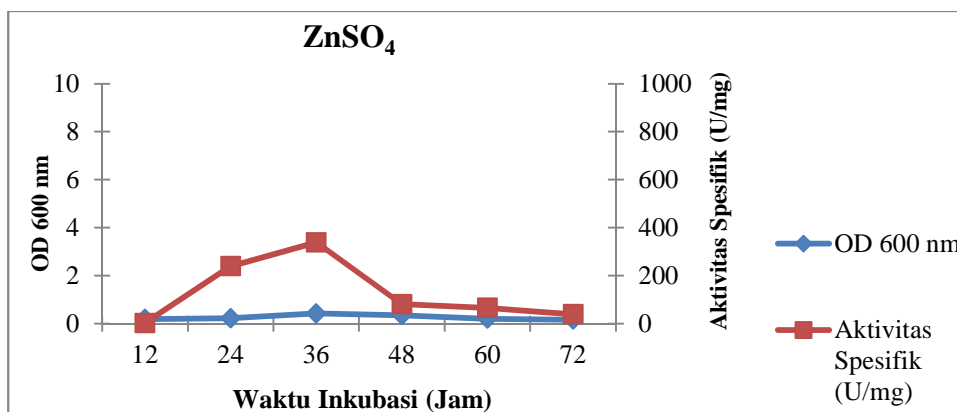
Pertumbuhan sel dan aktivitas spesifik isolat LTi-21-3 pada variasi komposisi medium sumber ion logam dapat dilihat pada Gambar 16 – 20 berikut:



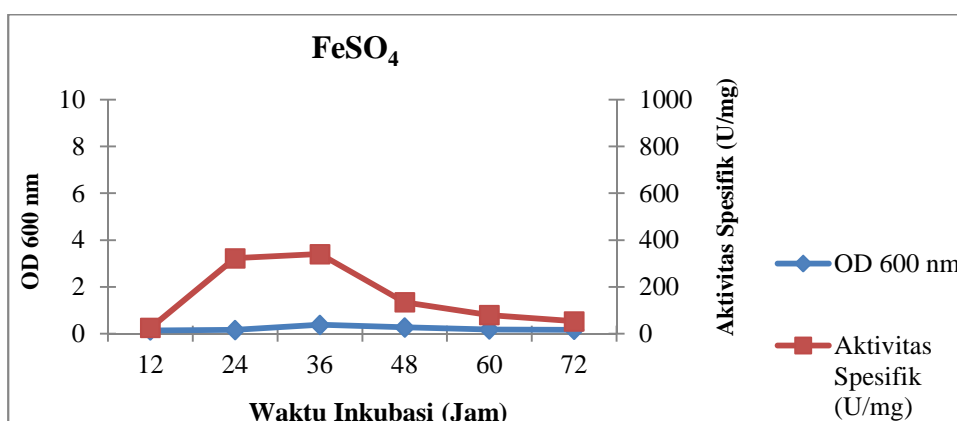
Gambar 16. Profil pertumbuhan sel dan aktivitas spesifik isolat LTi-21-3 pada medium Horikoshi's II termodifikasi dengan sumber ion logam MgSO_4



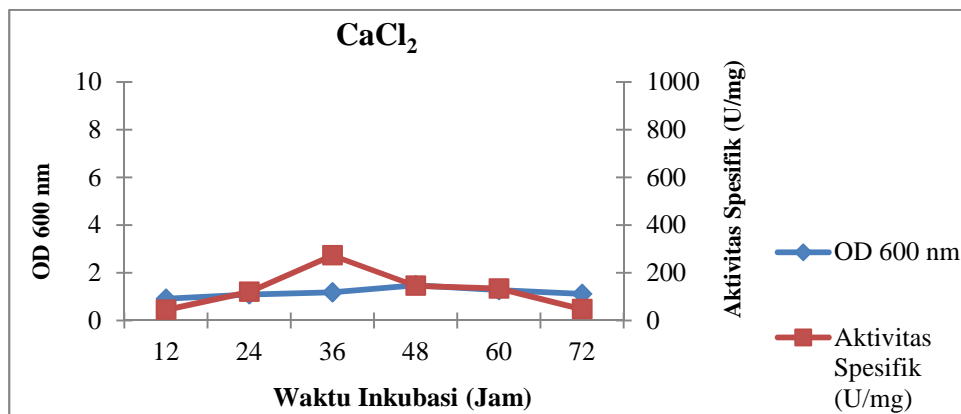
Gambar 17. Profil pertumbuhan sel dan aktivitas spesifik isolat LTi-21-3 pada medium Horikoshi's II termodifikasi dengan sumber ion logam CuSO₄



Gambar 18. Profil pertumbuhan sel dan aktivitas spesifik isolat LTi-21-3 pada medium Horikoshi's II termodifikasi dengan sumber ion logam ZnSO₄



Gambar 19. Profil pertumbuhan sel dan aktivitas spesifik isolat LTi-21-3 pada medium Horikoshi's II termodifikasi dengan sumber ion logam FeSO₄



Gambar 20. Profil pertumbuhan sel dan aktivitas spesifik isolat LTi-21-3 pada medium Horikoshi's II termodifikasi dengan sumber ion logam CaCl₂

Medium Horikoshi's II termodifikasi yang mengandung sumber ion logam MgSO₄ merupakan medium tanpa perlakuan. Selain logam yang berkombinasi dengan anion sulfat (SO₄²⁻), digunakan juga logam yang berkombinasi dengan anion klorida yaitu CaCl₂.

Berikut data pertumbuhan sel, aktivitas unit, kadar protein dan aktivitas spesifik dari isolat LTi-21-3 pada variasi komposisi medium sumber ion logam dengan waktu inkubasi optimum 36 jam dapat dilihat pada Tabel 7. Data lengkap untuk pertumbuhan sel, aktivitas unit, kadar protein dan aktivitas spesifik dari isolat LTi-21-3 pada variasi komposisi medium sumber ion logam dapat dilihat pada Lampiran 6.

Tabel 7. Pertumbuhan sel, aktivitas unit, kadar protein dan aktivitas spesifik isolat L*Ti*-21-3 pada variasi komposisi medium sumber ion logam dengan waktu inkubasi optimum 36 jam

Medium Kultur	Pertumbuhan Sel OD ₆₀₀	Aktivitas Unit (U/mL)	Kadar Protein (mg/mL)	Aktivitas Spesifik (U/mg)
MgSO ₄	1,08	529,19	1,29	410,23
CuSO ₄	0,40	504,63	1,56	322,71
ZnSO ₄	0,42	480,37	1,42	338,40
FeSO ₄	0,38	522,55	1,53	340,54
CaCl ₂	1,18	416,27	1,53	272,86

Tabel 8. Perbandingan pertumbuhan sel, aktivitas unit dan aktivitas spesifik antara medium tanpa dan dengan perlakuan variasi komposisi medium sumber ion logam

Jenis Perlakuan	Medium Kultur	Pertumbuhan Sel OD ₆₀₀	Aktivitas Unit (U/mL)	Aktivitas Spesifik (U/mg)	Nilai/Persentase (%)		
					OD	AU	AS
Tanpa Perlakuan Variasi	MgSO ₄	1,08	529,19	410,23	100	100	100
	CuSO ₄	0,40	504,63	322,71	37	95	79
Dengan Perlakuan Variasi	ZnSO ₄	0,42	480,37	338,40	39	91	82
	FeSO ₄	0,38	522,55	340,54	35	99	83
	CaCl ₂	1,18	416,27	272,86	109	84	80

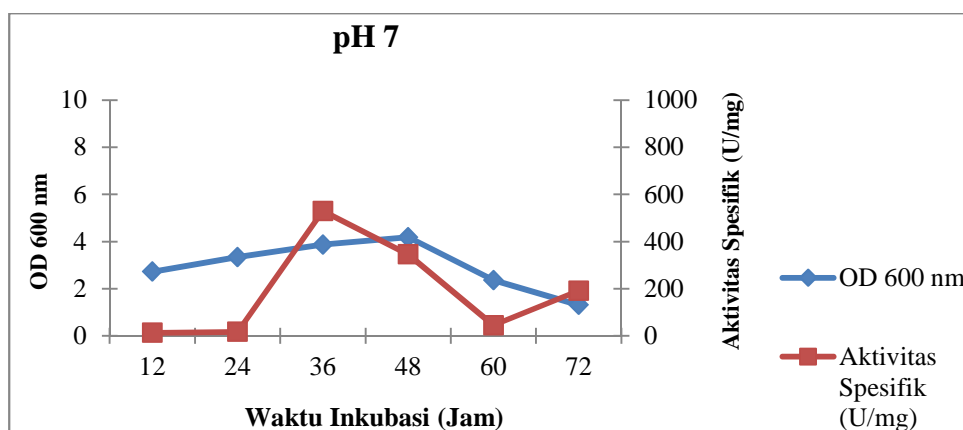
Keterangan: OD = pertumbuhan sel, AU = aktivitas unit dan AS = aktivitas spesifik

Dari data yang disajikan di atas, isolat L*Ti*-21-3 memiliki aktivitas unit dan aktivitas spesifik yang tinggi pada sumber ion logam MgSO₄ secara berurutan yaitu 529,19 U/mL dan 410,23 U/mg. Untuk sumber ion logam CaCl₂ menghasilkan aktivitas unit dan aktivitas spesifik yang terendah dan pertumbuhan selnya tertinggi dibandingkan dengan sumber ion logam yang lain. Pada pengaruh variasi sumber ion logam ini, aktivitas spesifik

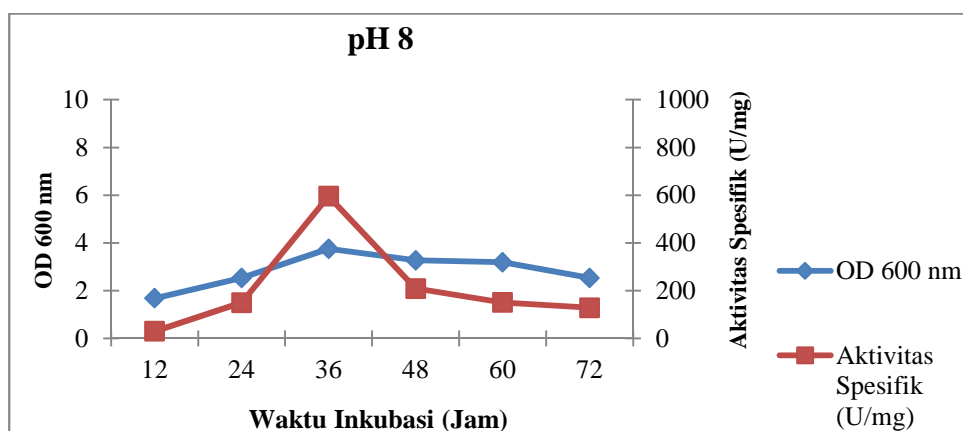
dengan sumber ion logam $MgSO_4$ mengalami penurunan begitu juga dengan pertumbuhan selnya dibandingkan dengan penelitian sebelumnya pada variasi komposisi medium sumber nitrogen. Sumber ion logam $MgSO_4$ dipilih sebagai sumber ion logam terbaik karena memiliki aktivitas spesifik tertinggi sesuai dengan beberapa literatur yang telah disebutkan di atas.

4. Pengaruh Variasi pH

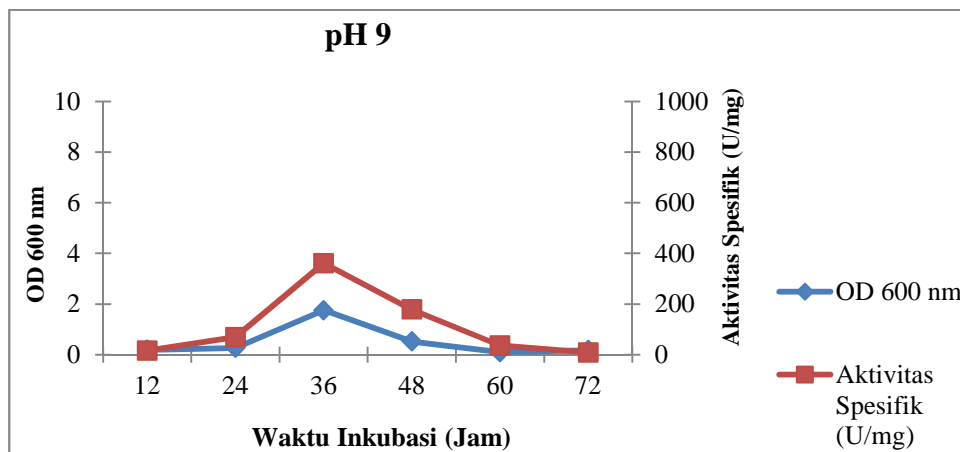
Pertumbuhan sel dan aktivitas spesifik isolat LTi-21-3 pada variasi komposisi pH medium dapat dilihat pada Gambar 21- 25 berikut:



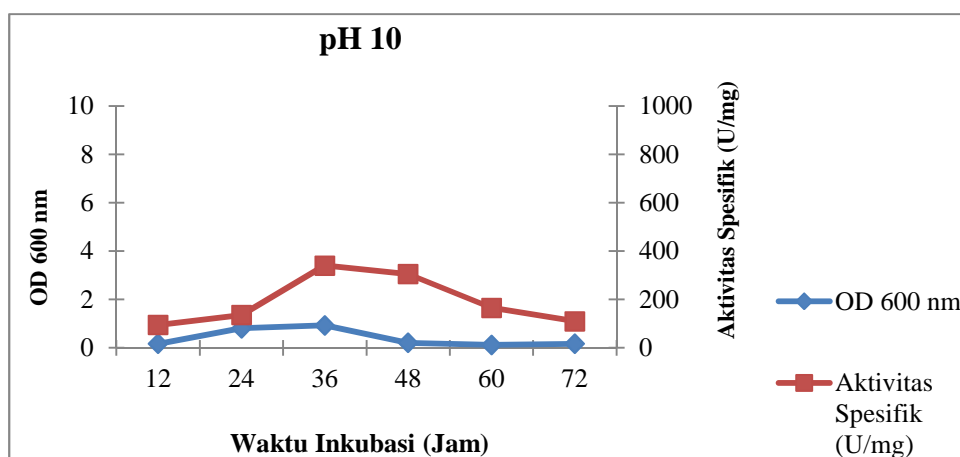
Gambar 21. Profil pertumbuhan sel dan aktivitas spesifik isolat LTi-21-3 pada medium Horikoshi's II termodifikasi pH 7



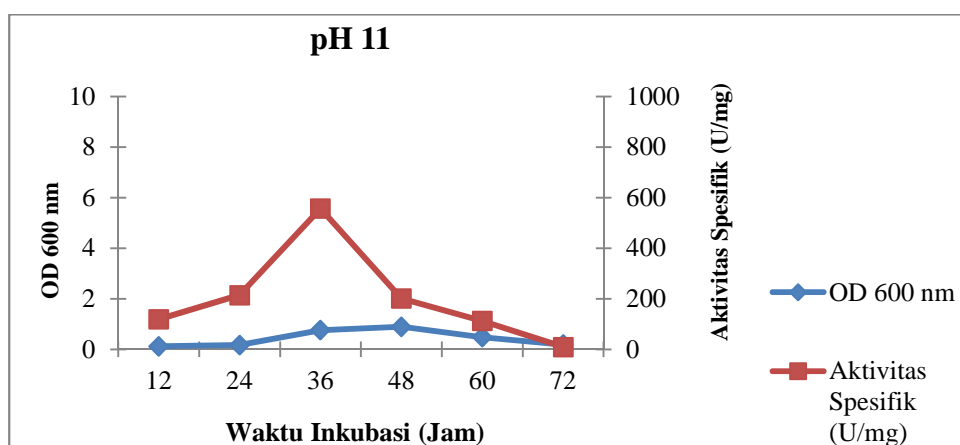
Gambar 22. Profil pertumbuhan sel dan aktivitas spesifik isolat LTi-21-3 pada medium Horikoshi's II termodifikasi pH 8



Gambar 23. Profil pertumbuhan sel dan aktivitas spesifik isolat LTi-21-3 pada medium Horikoshi's II termodifikasi pH 9



Gambar 24. Profil pertumbuhan sel dan aktivitas spesifik isolat LTi-21-3 pada medium Horikoshi's II termodifikasi pH 10



Gambar 25. Profil pertumbuhan sel dan aktivitas spesifik isolat LTi-21-3 pada medium Horikoshi's II termodifikasi pH 11

Pada Tabel 9 berikut dapat dilihat pertumbuhan sel, aktivitas unit, kadar protein dan aktivitas spesifik dari isolat LTi-21-3 pada variasi komposisi pH medium dengan waktu inkubasi optimum 36 jam. Data lengkap untuk pertumbuhan sel, aktivitas unit, kadar protein dan aktivitas spesifik dari isolat LTi-21-3 pada variasi komposisi pH medium dapat dilihat pada Lampiran 7.

Tabel 9. Pertumbuhan sel, aktivitas unit, kadar protein dan aktivitas spesifik isolat LTi-21-3 pada variasi komposisi pH medium dengan waktu inkubasi optimum 36 jam

Medium Kultur	Pertumbuhan Sel OD ₆₀₀	Aktivitas Unit (U/mL)	Kadar Protein (mg/mL)	Aktivitas Spesifik (U/mg)
pH 7	3,87	520,44	0,98	529,58
pH 8	3,75	546,86	0,92	595,72
pH 9	1,75	467,39	1,29	361,15
pH 10	0,93	494,01	1,45	340,24
pH 11	0,76	520,55	0,93	556,93

Tabel 10. Perbandingan pertumbuhan sel, aktivitas unit dan aktivitas spesifik antara medium tanpa dan dengan perlakuan variasi komposisi pH medium

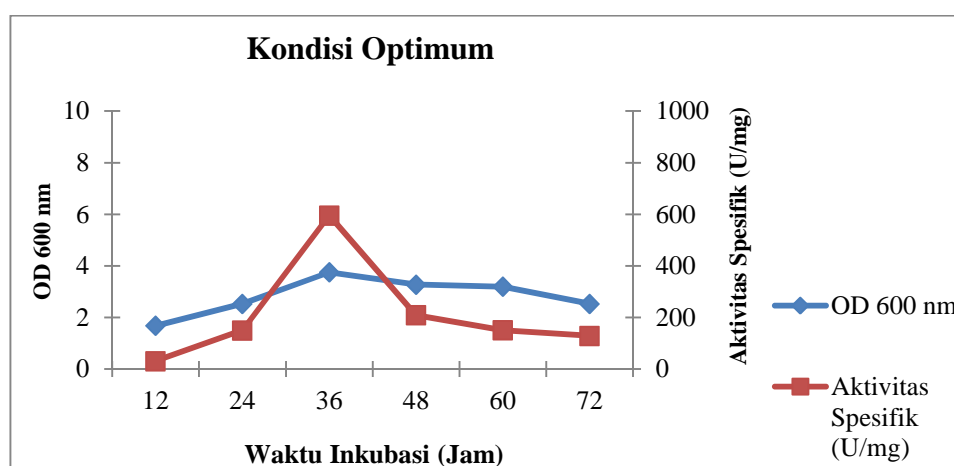
Jenis Perlakuan	Medium Kultur	Pertumbuhan Sel OD ₆₀₀	Aktivitas Unit (U/mL)	Aktivitas Spesifik (U/mg)	Nilai/Persentase (%)		
					OD	AU	AS
Tanpa Perlakuan Variasi	pH 10	0,93	494,01	340,24	100	100	100
	pH 7	3,87	520,44	529,58	416	105	156
Dengan Perlakuan Variasi	pH 8	3,75	546,86	595,72	403	111	175
	pH 9	1,75	467,39	361,15	188	95	106
	pH 11	0,76	520,55	556,93	82	105	164

Keterangan: OD = pertumbuhan sel, AU = aktivitas unit dan AS = aktivitas spesifik

Dari data yang disajikan di atas, pH 8 merupakan pH optimum untuk isolat LTi-21-3 dengan dihasilkan aktivitas unit dan aktivitas spesifik secara berurutan yaitu 546,86 U/mL dan 595,72 U/mg. Pertumbuhan sel dan aktivitas spesifik pada pH 8 lebih tinggi dibandingkan pada pH 10 dengan komposisi medium yang sama. Pada pH 8, pertumbuhan sel pada waktu inkubasi optimum 36 jam mencapai 3,75 sedangkan pada pH 10 hanya 0,93.

B. Profil Kondisi Optimum Isolat LTi-21-3

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan, kondisi optimum untuk isolat LTi-21-3 yaitu pada medium kultur Horikoshi's II yang mengandung 1% (b/v) pati singkong, 0,5% (b/v) NH_4Cl , 0,02% (b/v) MgSO_4 dengan pH medium 8. Berikut merupakan profil pertumbuhan sel dan aktivitas spesifik isolat LTi-21-3 pada kondisi optimum yang dapat dilihat pada Gambar 26.



Gambar 26. Profil pertumbuhan sel dan produksi enzim CGT-ase isolat LTi-21-3 pada medium Horikoshi's II termodifikasi dengan kondisi optimum

Tabel 11. berikut merupakan perbandingan antara medium Horikoshi's II termodifikasi dengan medium variasi terbaik.

Tabel 11. Perbandingan pertumbuhan sel, aktivitas unit, dan aktivitas spesifik isolat L_{Ti}-21-3 antara medium Horikoshi's II termodifikasi dengan medium variasi terbaik pada waktu inkubasi optimum 36 jam

Jenis Perlakuan	Pertumbuhan Sel OD ₆₀₀	Aktivitas Unit (U/mL)	Aktivitas Spesifik (U/mg)	Nilai/Persentase (%)		
				OD	AU	AS
Medium Horikoshi's II Termodifikasi	8,10	664,37	253,31	100	100	100
Medium Horikoshi's II termodifikasi dengan Variasi Terbaik	3,75	546,86	595,72	46	82	253

Keterangan: OD = pertumbuhan sel, AU = aktivitas unit dan AS = aktivitas spesifik

Dari data di atas, isolat L_{Ti}-21-3 dari variasi terbaik menghasilkan aktivitas spesifik 253% lebih tinggi jika dibandingkan dengan medium Horikoshi's II tanpa perlakuan variasi. Dengan aktivitas spesifik yang tinggi ini akan memudahkan dalam proses pemurnian enzim CGT-ase.