

### III. METODOLOGI PENELITIAN

#### A. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini telah dilakukan pada bulan April sampai dengan Juni 2012 di Laboratorium Biokimia Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lampung.

#### B. Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini antara lain adalah alat-alat gelas, Bunsen, kasa, kapas, spatula, rak tabung reaksi, jarum ose, autoklaf (model S-90N), *laminar air flow* (CURMA model 9005-FL), neraca analitik, inkubator, *shaker incubator* (Stuart SSL2), *waterbath*, sentrifuga, tabung sentrifuga, mikropipet, pH indikator, dan spektrofotometer *UV-Vis* (Cary Win UV 32).

Sedangkan bahan-bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah pati singkong, pati ubi jalar, pati jagung, pati sagu, maltosa, urea,  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ,  $\text{CuSO}_4$ ,  $\text{FeSO}_4$ ,  $\text{ZnSO}_4$ ,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , pepton, ekstrak ragi,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , fenolftalein (PP), metil jingga, agar, natrium karbonat ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ),  $\text{NaCl}$ ,  $\text{Na(K)-tartarat}$ ,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , reagen *folin ciocelteau*, pati *soluble*, natrium asetat, asam asetat, buffer asetat 0,1 M pH 5,5, fenolftalein 1 mM, spiritus,

pereaksi C, pereaksi D, alkohol, dan akuades. Sampel yang digunakan adalah bakteri isolat lokal LTi-21-3 yang telah diperoleh dari peneliti sebelumnya.

### C. Prosedur Penelitian

#### 1. Peremajaan Bakteri dan Produksi Enzim CGT-ase dari Isolat LTi-21-3

Kegiatan rutin yang dilakukan untuk peremajaan bakteri yang digunakan pada penelitian ini adalah :

##### a. Peremajaan Bakteri Isolat LTi-21-3

Bakteri isolat LTi-21-3 diremajakan dalam medium Horikoshi's II termodifikasi yang memiliki komposisi 1 g pati singkong, 0,5 g pepton, 0,5 g ekstrak ragi, 0,1 g  $K_2HPO_4$ , 0,02 g  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 0,03 g fenolftalein, 0,01 g metil jingga dan 1,5 g agar. Kemudian dimasukkan ke dalam Erlenmeyer dan dilarutkan dalam 80 mL akuades disebut larutan I. Larutan I dipanaskan sampai larutan jernih sambil diaduk. Selanjutnya membuat larutan natrium karbonat ( $Na_2CO_3$ ) 1% dengan cara menimbang 0,25 g  $Na_2CO_3$  dilarutkan dalam 25 ml akuades dan dimasukkan ke dalam Erlenmeyer disebut larutan II. Sejumlah akuades disiapkan dan dimasukkan ke dalam Erlenmeyer disebut larutan III. Larutan I, larutan II dan larutan III disterilisasi dengan menggunakan autoklaf pada suhu  $121^\circ C$  dengan tekanan 1 atm selama 30 menit. Medium Horikoshi's II termodifikasi disiapkan dengan mencampurkan larutan I sebanyak 80 mL, larutan II sebanyak 17 mL dan larutan III sebanyak 3 mL yang dilakukan di dalam *laminar air flow*. Setelah medium Horikoshi's II termodifikasi tercampur rata, kemudian

dimasukkan ke dalam tabung reaksi sebanyak  $\pm$  5 mL, dimiringkan dan didiamkan pada suhu kamar. Setelah media memadat dilakukan inokulasi bakteri isolat L<sub>Ti</sub>-21-3 tersebut pada media agar miring. Kemudian diinkubasi selama 3 hari dalam inkubator.

**b. Pembuatan Medium *Nutrien Broth* (NB)**

Medium NB dibuat dengan komposisi 0,3% (b/v) ekstrak ragi, 0,5% (b/v) pepton dan 0,5% (b/v) NaCl, kemudian disterilisasi. Medium NB digunakan sebagai penyiapan inokulum (*starter*) dengan cara menginokulasikan satu ose galur bakteri isolat L<sub>Ti</sub>-21-3 dari agar miring yang telah berusia 3 hari ke dalam masing-masing Erlenmeyer yang berisi 5 mL medium NB. Setelah diinokulasi, kemudian diinkubasi dalam *shaker incubator* dengan kecepatan 105 rpm pada suhu 37°C selama 1 malam (*overnight* : 16-20 jam).

**c. Pembuatan Medium Kultur dan Ekstraksi Enzim CGT-ase**

Medium kultur menggunakan medium Horikoshi's II termodifikasi (Park *et al.*, 1989) yang mengandung pati singkong, pepton, ekstrak ragi, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> tanpa fenolftalein dan metil jingga dengan pH medium 10. Produksi enzim CGT-ase dilakukan dengan menambahkan 1% inokulum dari *starter* isolat L<sub>Ti</sub>-21-3 diinokulasikan ke dalam media kultur volume 50 mL dalam Erlenmeyer 250 mL. Kultur kemudian diinkubasi pada *shaker incubator* dengan kecepatan 105 rpm, suhu 37°C selama 3 hari dan dilakukan pengambilan kultur secara

berkala setiap 12 jam dengan cara sentrifugasi, untuk mendapatkan ekstrak kasar enzim CGT-ase.

## 2. Penentuan Pertumbuhan Sel

Penentuan pertumbuhan sel ini digunakan untuk mengetahui pertumbuhan dari sel bakteri. Sebanyak 0,3 mL kultur dimasukkan ke dalam tabung reaksi kemudian ditambahkan 2,7 mL akuades lalu diukur serapannya menggunakan spektrofotometer *UV-Vis* pada panjang gelombang 600 nm.

## 3. Uji Aktivitas Enzim CGT-ase

### a. Pembuatan Larutan Buffer Asetat 0,1 M (pH 5,5)

Sebanyak 100 mL Na-asetat 0,1M dimasukkan ke dalam Erlenmeyer kemudian ditambahkan 0,2 mL asam asetat 0,1M.

### b. Pereaksi CGT-ase (Kaneko *et al.*, 1987; Alves-Prado *et al.*, 2008)

Pereaksi CGT-ase digunakan untuk menguji aktivitas ekstrak kasar enzim CGT-ase. Pereaksi CGT-ase yaitu larutan pati *soluble* 1% (b/v). Larutan pati *soluble* disiapkan dengan melarutkan 1 g pati *soluble* ke dalam 100 mL 0,1M buffer asetat pH 5,5 kemudian dipanaskan hingga larut.

### c. Penentuan Aktivitas Enzim CGT-ase

Ekstrak kasar enzim CGT-ase yang diperoleh kemudian diuji aktivitas enzim CGT-ase nya. Sebanyak 100  $\mu$ L larutan enzim ditambahkan 800  $\mu$ L pati *soluble* 1% yang disiapkan dalam buffer asetat 0,1M pH 5,5 dan diinkubasi pada suhu 55°C selama 10 menit. Reaksi dihentikan dengan menambahkan 4 mL Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0,25M dan 0,1 mL

larutan fenolftalein 1 mM. Absorbansi diukur menggunakan spektrofotometer *UV-Vis* pada  $\lambda_{\text{maks}}$  550 nm. Kontrol dibuat dengan cara menginaktifkan larutan enzim pada suhu 100°C selama 30 menit, dan selanjutnya diperlakukan sama dengan sampel.

#### **4. Uji Kadar Protein Enzim CGT-ase**

##### **a. Pereaksi Lowry (Lowry *et al.*, 1951)**

Pereaksi Lowry terdiri atas 4 macam, yang meliputi Pereaksi A, B, C, dan D. Masing-masing pereaksi tersebut disiapkan sebagai berikut :

Pereaksi A : 2 g  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  dilarutkan dalam 100 mL NaOH 0,1N; Pereaksi B : 5 mL larutan  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  1% (b/v) ditambahkan 5 mL larutan Na(K)-tartarat 1% (b/v); Pereaksi C : 2 mL pereaksi B ditambah 100 mL pereaksi A; dan Pereaksi D : reagen *Folin-Ciocalteu* diencerkan dengan akuades 1:1. Larutan standar protein digunakan BSA (*Bovine Serum Albumine*) dengan konsentrasi 500-5000 ppm.

##### **b. Penentuan Kadar Protein Enzim CGT-ase**

Ekstrak kasar enzim CGT-ase yang diperoleh kemudian diuji kadar proteinnya. Sebanyak 0,1 mL larutan enzim ditambahkan 0,9 mL akuades lalu ditambahkan dengan 5 mL pereaksi C. Campuran diaduk secara merata dan dibiarkan selama 10 menit pada suhu kamar. Kemudian ditambahkan dengan cepat 0,5 mL pereaksi D dan diaduk dengan sempurna. Setelah itu didiamkan selama 30 menit pada suhu kamar. Sebagai kontrol, larutan enzim diganti dengan akuades. Perlakuan kontrol sama dengan perlakuan pada sampel. Pengukuran

serapan dilakukan menggunakan spektrofotometer *UV-Vis* pada maks  
600 nm.

## **5. Pengaruh Beberapa Faktor Pada Medium Kultur Horikoshi's II Termodifikasi Terhadap Pertumbuhan Bakteri dan Produksi Enzim CGT-ase dari Isolat LTi-21-3**

### **a. Pengaruh Sumber Karbon**

Pada medium kultur Horikoshi's II termodifikasi dengan sumber karbon pati singkong dianggap sebagai medium kultur tanpa perlakuan variasi. Selanjutnya dilakukan variasi sumber karbon dengan cara mengganti pati singkong 1% (b/v) dengan pati *soluble*, pati jagung, pati ubi jalar, pati sagu masing-masing 1% (b/v) dan penambahan maltosa 0,5% (b/v). Kemudian dilakukan perlakuan yang sama dengan prosedur 2, 3 bagian c dan 4 bagian b lalu hasilnya dibandingkan antara tanpa dan dengan perlakuan variasi.

### **b. Pengaruh Sumber Nitrogen**

Sumber karbon terbaik kemudian dilakukan variasi terhadap sumber nitrogen. Medium kultur Horikoshi's II termodifikasi yang mengandung pepton sebagai sumber nitrogen dianggap sebagai tanpa perlakuan variasi. Selanjutnya dilakukan variasi sumber nitrogen dengan cara mengganti pepton 0,5% (b/v) dengan ekstrak ragi, urea dan  $\text{NH}_4\text{Cl}$  masing-masing 0,5% (b/v). Kemudian dilakukan perlakuan yang sama dengan prosedur 2, 3 bagian c dan 4 bagian b lalu hasilnya dibandingkan antara tanpa dan dengan perlakuan variasi.

**c. Pengaruh Sumber Ion Logam**

Sumber karbon dan nitrogen terbaik kemudian dilakukan variasi terhadap sumber ion logam. Medium kultur Horikoshi's II termodifikasi yang mengandung  $\text{MgSO}_4$  sebagai sumber ion logam dianggap sebagai tanpa perlakuan variasi. Selanjutnya dilakukan variasi sumber ion logam dengan cara mengganti  $\text{MgSO}_4$  0,02% (b/v) dengan  $\text{CuSO}_4$ ,  $\text{FeSO}_4$ ,  $\text{ZnSO}_4$  dan  $\text{CaCl}_2$  masing-masing 0,02% (b/v). Kemudian dilakukan perlakuan yang sama dengan prosedur 2, 3 bagian c dan 4 bagian b lalu hasilnya dibandingkan antara tanpa dan dengan perlakuan variasi.

**d. Pengaruh pH**

Sumber karbon, nitrogen dan ion logam terbaik kemudian dilakukan variasi pH-nya. Medium kultur Horikoshi's II termodifikasi dengan pH 10 dianggap sebagai tanpa perlakuan variasi. Selanjutnya dilakukan variasi pH-nya yaitu pada pH 7, 8, 9 dan 11 dengan cara perbedaan penambahan larutan  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ . Kemudian dilakukan perlakuan yang sama dengan prosedur 2, 3 bagian c dan 4 bagian b lalu hasilnya dibandingkan antara tanpa dan dengan perlakuan variasi.

## 6. Diagram Alir Prosedur Penelitian

