

### III. METODOLOGI PENELITIAN

#### A. Waktu dan Tempat Penelitian

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

#### B. Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah alat-alat gelas laboratorium, neraca analitik, pemanas bunsen, kasa, kapas, spatula, rak tabung reaksi, jarum ose, autoklaf (model S-90N), *laminar air flow* (CURMA model 9005-FL), *shaker*, sentrifuga, tabung sentrifuga, mikropipet, *waterbath*, spektrofotometer UV-VIS, pH indikator, pH meter dan inkubator. Sedangkan bahan yang digunakan adalah pati singkong, pati jagung, pati sagu, pati ubi jalar, *soluble starch*, maltosa, urea,  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , pepton, *yeast extract*,  $\text{CuSO}_4$ ,  $\text{ZnSO}_4$ ,  $\text{FeSO}_4$ ,  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , fenolftalein (PP), metil jingga, agar,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ,  $\text{NaCl}$ , isolat LTi-3-A2.4, Na(K)-tartarat,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , reagen *folin ciocelteau*, buffer asetat 0.1 M pH 5.5, fenolftalein 1 mM, pereaksi C, pereaksi D, spirtus, alkohol, akuades.

#### C. Prosedur Penelitian

##### 1. Peremajaan Bakteri Isolat Lokal LTi-3-A2.4

Bakteri isolat lokal LTi-3-A2.4 diremajakan dalam medium agar miring Horikoshi's II (Park *et al.*, 1989) termodifikasi dengan komposisi 1% (w/v) pati singkong, 0.5% (w/v) pepton, 0.5% (w/v) *yeast extract*, 0.1% (w/v)  $K_2HPO_4$ , 0.02% (w/v)  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 0.03% (w/v) fenolftalein, 0.01% (w/v) metil jingga dan 1.5% (w/v) agar. Dalam penelitian ini volume medium yang digunakan untuk meremajakan dan untuk fermentasi yaitu 100 mL. Untuk meremajakan bakteri, dari komposisi yang telah disebutkan di atas kemudian dimasukkan ke dalam erlenmeyer dan dilarutkan dengan akuades sebanyak 80 mL disebut larutan I. Selanjutnya membuat larutan  $Na_2CO_3$  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. Setelah semua larutan steril selanjutnya sebanyak 80 mL larutan (1), 17 mL larutan (2) dan 3 mL larutan (3) dicampurkan dalam satu erlenmeyer di dalam *Laminar Air Flow*. Setelah itu dimasukkan ke dalam tabung reaksi sebanyak  $\pm 5$  mL, dimiringkan dan didiamkan pada suhu kamar. Setelah medium memadat dilakukan inokulasi bakteri isolat lokal LTi-3-A2.4 ke dalam medium agar miring. Kemudian diinkubasi selama 3 hari dalam inkubator.

## **2. Pembuatan Medium**

### **a. Pembuatan Medium Inokulum Nutrient Broth (NB)**

Medium NB digunakan untuk adaptasi awal pertumbuhan bakteri pada medium cair. Medium NB ini mengandung 0,3% (w/v) ekstrak ragi, 0,5% (w/v) pepton dan 0,5% (w/v) NaCl yang dilarutkan dalam akuades kemudian disterilkan dalam autoklaf.

## **b. Pembuatan Medium Kultur**

Medium kultur menggunakan medium cair Horikoshi's II termodifikasi tanpa fenolftalein, metil jingga dan agar yang disiapkan dengan cara menimbang pati singkong sebanyak 1 gram, pepton 0.5 gram, *yeast extract* 0.5 gram,  $K_2HPO_4$  0.1 gram,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.02 gram, kemudian semua bahan tersebut dimasukkan ke dalam erlenmeyer, dilarutkan dengan akuades sebanyak 80 mL dan dipanaskan disebut sebagai larutan (1). Selanjutnya, sebanyak 0.25 gram  $Na_2CO_3$  dimasukkan ke dalam erlenmeyer dan dilarutkan dengan akuades sebanyak 25 mL disebut sebagai larutan (2) , disiapkan juga akuades sebanyak 5 mL dalam erlenmeyer dan disebut sebagai larutan (3) dan kemudian disterilkan dalam autoklaf. Setelah semua larutan steril selanjutnya sebanyak 80 mL larutan (1), 17 mL larutan (2) dan 3 mL larutan (3) dicampurkan di dalam *laminar air flow* sampai menunjukkan pH 10.

## **3. Pembuatan Pereaksi**

Pereaksi yang akan digunakan pada penelitian ini yaitu: pereaksi CGT-ase (Kaneko *et al.*, 1987; Alves-Prado *et al.*, 2008), dan pereaksi Lowry (Lowry *et al.*, 1951). Pereaksi CGT-ase digunakan untuk menguji aktivitas ekstrak kasar enzim CGT-ase, sedangkan pereaksi Lowry digunakan untuk menguji kadar protein ekstrak kasar enzim CGT-ase.

### **a. Pembuatan Substrat untuk Uji Aktivitas Enzim CGT-ase**

Substrat yaitu larutan *soluble starch* 1% (w/v) disiapkan dengan cara melarutkan 1 gram *soluble starch* ke dalam 100 mL buffer asetat 0.1M pH 5.5 kemudian dipanaskan hingga larut.

## **b. Pembuatan Pereaksi Lowry**

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% (w/v) ditambahkan 5 mL larutan Na(K)-tartarat 1% (w/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.

## **4. Pengaruh Beberapa Faktor Terhadap Pertumbuhan Bakteri LTi-3-A2.4 dan Produksi Enzim CGT-ase**

### **a. Pengaruh Sumber C**

Sumber karbon yang digunakan dalam penelitian ini adalah *soluble starch*, pati singkong, pati jagung, pati sagu, pati ubi jalar, dan maltosa. Variasi sumber karbon pada medium kultur dengan mengganti pati singkong pada medium kultur Horikoshi's II termodifikasi dengan sumber karbon dari jenis pati lain yang telah disebutkan. Starter diinokulasikan ke dalam medium kultur dan dilakukan sampling setiap 12 jam selama 72 jam seperti pada prosedur 5, kemudian diukur nilai OD, aktivitas enzim CGT-ase, dan kadar protein seperti pada prosedur 6.

### **b. Pengaruh Sumber N**

Dari hasil variasi sumber C terbaik, dilakukan variasi sumber N pada medium kultur dengan cara mengganti pepton menjadi urea,  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , dan *yeast extract*. Selanjutnya dilakukan perlakuan yang sama dengan prosedur 5 dan 6.

### **c. Pengaruh Sumber Ion Logam**

Dari hasil variasi sumber N terbaik, dilakukan variasi sumber ion logam pada medium kultur dengan cara mengganti  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.02% (w/v) dengan  $\text{CuSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.02% (w/v) ,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.02% (w/v),  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.02% (w/v), dan  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  10 mM. Selanjutnya dilakukan perlakuan yang sama dengan prosedur 5 dan 6.

### **d. Pengaruh pH**

Medium kultur dengan komposisi sumber C, sumber N, dan sumber ion logam terbaik, dilakukan variasi pH dari pH 7 – 11. Selanjutnya dilakukan perlakuan yang sama dengan prosedur 5 dan prosedur 6.

## **5. Ekstrak Kasar Enzim CGT-ase**

Untuk mendapatkan ekstrak kasar enzim CGT-ase yaitu dengan menyiapkan medium inokulum dan medium kultur yang akan digunakan. Inokulum disiapkan dengan menginokulasikan 1 ose biakan isolat ke dalam Erlenmeyer 250 mL yang berisi larutan NB, kemudian diinkubasi pada *shaker* dengan kecepatan 105 rpm pada suhu  $37^\circ\text{C}$  selama 1 malam (*overnight*: 16-20 jam). Inokulum ini selanjutnya akan digunakan untuk diinokulasikan ke dalam medium kultur.

Medium kultur yang telah diinokulasikan sebanyak 1% inokulum : kultur kemudian diinkubasi pada *shaker* dengan kecepatan 105 rpm dengan suhu 37°C selama 3 hari dan di-*sampling* secara berkala setiap 12 jam selama 72 jam. Ekstrak kasar enzim CGT-ase diperoleh melalui proses sentrifugasi.

## **6. Penentuan Pertumbuhan Sel, Uji Aktivitas dan Uji Kadar Protein Enzim**

### **a. Penentuan Pertumbuhan Sel**

Penentuan pertumbuhan sel ini dilakukan 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.

### **b. Penentuan Aktivitas Enzim CGT-ase**

Aktivitas enzim CGT-ase dilakukan dengan menyiapkan ekstrak kasar enzim dari sampel kultur. Sampel kultur disentrifugasi dan supernatan yang diperoleh merupakan ekstrak kasar enzim CGT-ase. Ekstrak kasar ini kemudian diuji aktivitas dan ditentukan kadar proteinnya.

Aktivitas enzim CGT-ase diukur berdasarkan metode Kaneko *et al.* (1987) dan dimodifikasi oleh Alves-Prado *et al.* (2008). Sebanyak 100  $\mu$ L larutan enzim ditambahkan 800  $\mu$ L *soluble starch* 1% yang disiapkan dalam buffer asetat 0.1 M dan diinkubasi pada suhu 55°C selama 10 menit. Reaksi dihentikan dengan menambahkan 4 mL  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  0.25 M kemudian ditambahkan 0.1 mL larutan fenoltalein 1 mM. Absorbansi diukur 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.

### **c. Penentuan Kadar Protein Enzim**

Penentuan kadar protein dilakukan dengan cara sebanyak 0,1 mL larutan enzim ditambahkan 0,9 mL akuades lalu direaksikan 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. Kontrol diperlakukan sama dengan perlakuan pada sampel. Pengukuran serapan dilakukan pada  $\lambda_{\text{maks}}$  600 nm. Konsentrasi protein dihitung dengan mengekstrapolasi nilai absorban sampel terhadap kurva standar BSA.

## **7. Diagram Alir Prosedur Penelitian**





