

III. METODOLOGI PENELITIAN

A. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan Agustus 2010 sampai dengan bulan April 2011 di Laboratorium Biokimia dan Laboratorium Instrumentasi Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lampung.

B. Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain spektrofotometer UV-VIS, sentrifuga, mikropipet, shaker (*orbit environ shaker*), laminar *air flow*, pH universal, autoklaf, jarum ose, pembakar spiritus, neraca analitik dan alat-alat gelas laboratorium lainnya.

Bahan-bahan yang digunakan adalah pati singkong, pepton, NaNO_3 , NH_4NO_3 , $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$, glukosa, fruktosa, maltosa, ekstrak ragi, NaCl , CaCl_2 , K_2HPO_4 , KH_2PO_4 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, FeSO_4 , CaCl_2 , $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, NaOH , pereaksi iodin, BSA (*Bovine Serum Albumin*), Na_2CO_3 , Na-K- tartarat, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, reagen *folin ciocelteau*, alkohol, spiritus, akuades serta isolat LTE-6.

C. Prosedur Penelitian

1. Penyiapan Medium dan Perekasi

a. Pembuatan Perekasi untuk Pengukuran Aktivitas Enzim Amilase Metode *Fuwa* (Fuwa, 1954)

Pembuatan perekasi iodin yaitu dengan cara melarutkan 2 g KI dengan sedikit akuades di dalam labu takar 100 mL, lalu ditambahkan 0,2 g I₂ dan ditambahkan dengan akuades hingga tanda batas.

Pembuatan larutan pati yaitu dengan cara memasukkan 0,5 gram pati ke dalam labu takar 100 mL kemudian ditambahkan 0,1 M buffer asetat hingga tanda batas, lalu dipanaskan.

b. Pembuatan Perekasi *Lowry* untuk Pengukuran Kadar Protein (Lowry *et al.*, 1951).

Perekasi A dapat dibuat dengan cara melarutkan 2 g Na₂CO₃ dengan 100 mL NaOH 0,1N. Perekasi B dapat dibuat dengan cara menambahkan 5 ml CuSO₄.5H₂O 1% (w/v) ke dalam 5 mL larutan Na-K-tartarat 1% (w/v). Perekasi C dapat dibuat dengan cara menambahkan 2 mL perekasi B dengan 100 mL perekasi A. Perekasi D dapat dibuat dengan cara mengencerkan reagen Folin-Ciocalteu dengan akuades 1:1.

2. Penumbuhan Mikroba

Diinokulasi 1 ose mikroba dari isolat terpilih yaitu isolat LTE-6 masing-masing ke dalam erlenmeyer yang telah berisi medium NB cair steril. Tiap 100 mL medium NB mengandung (w/v) 0,3% *beef extract* dan 0,5% pepton. Biakan

diinkubasi pada *shaker* dengan kecepatan 180 rpm pada suhu 37°C selama 1 malam (*overnight*: 16-20 jam). Sebanyak 1% inokulum ini selanjutnya digunakan untuk menginokulasi media kultur dengan volume yang lebih besar.

3. Penentuan Profil Pertumbuhan

Profil pertumbuhan mikroorganisme meliputi fase lag, fase eksponensial, fase stasioner dan fase kematian. Untuk mengetahui profil pertumbuhan tersebut dilakukan pengukuran *optical density* (OD) pada selang waktu (8, 31, 48, dan 55 jam). Pengukuran OD dilakukan pada panjang gelombang 600 nm.

4 Penentuan Profil Kadar Protein dan Aktivitas Enzim Amilase

Isolat LTE-6 dikultur selama 55 jam dan dilakukan sampling dengan kisaran waktu 8, 24,31,48, dan 55 jam. Sampel kultur disentrifugasi dengan kecepatan 5000 rpm dan supernatan yang diperoleh diuji kadar proteinnya dengan metode *Lowry* dan aktivitasnya menggunakan metode *Fuwa*, seperti yang dijelaskan pada prosedur 5 dan 6.

5 Penentuan Kadar protein Metode *Lowry*

Metode *Lowry* digunakan untuk mengetahui kadar protein (Lowry *et al.*, 1951). Sebanyak 0,1 mL 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. Untuk kontrol sama dengan perlakuan pada sampel. Pengukuran serapan

dilakukan pada 600 nm. Konsentrasi protein enzim ditentukan dengan menggunakan kurva standar BSA.

6 Penentuan Aktivitas Enzim Metode Fuwa

Aktivitas α -amilase ditentukan oleh metode iodine (Fuwa, 1954). Pati *soluble* 0,5% di dalam buffer asetat 0,1 M sebanyak 300 μ L ditambahkan dengan enzim sebanyak 100 μ L dipanaskan pada suhu 55°C selama 10 menit lalu ditambahkan 0,2 M HCl sebanyak 40 μ L, ditambahkan larutan iodine 0,5 mL, dan ditambahkan H₂O hingga volumenya 10 mL, lalu diukur dengan spektrofotometer UV-VIS pada 700 nm. Kontrol dibuat dengan cara memanaskan enzim pada suhu 100°C selama 30 menit. Aktivitas unit dihitung dari jumlah enzim yang mereduksi warna biru 10% permenit.

7. Pengaruh Beberapa Faktor Terhadap Pertumbuhan Bakteri dan Produksi Enzim Amilase

a. Pengaruh Sumber N

Sumber N yang digunakan adalah pepton, NaNO₃, CO(NH₂)₂ dan NH₄NO₃. Masing-masing sumber N sebesar 0,5% (w/v) ditambahkan ke dalam medium standar. Medium kultur dengan komposisi tersebut kemudian diinokulasi dengan starter dan ditumbuhkan seperti yang dijelaskan pada prosedur 4. Sampling dilakukan pada rentang waktu 8, 24, 31, 48, dan 55 jam. Sampel kultur diukur nilai OD, kadar protein, dan aktivitas enzim seperti pada prosedur 3, 5 dan 6. Untuk sumber N terbaik kemudian dilakukan uji pengaruh variasi konsentrasi dari 0,5 – 2 % (w/v) dan diukur sebagaimana tersebut di atas.

b. Pengaruh Sumber C

Sumber C yang digunakan adalah glukosa, fruktosa, arabinosa, dan gula. Masing-masing sumber C sebanyak 0,5% (w/v) ditambahkan ke dalam medium tanpa perlakuan. Medium kultur dengan komposisi tersebut kemudian diinokulasi dengan starter dan ditumbuhkan seperti yang dijelaskan pada prosedur 4.

Sampling dilakukan pada setiap 24 jam selama 72 jam. Sampel kultur diukur nilai OD, kadar protein, dan aktivitas enzim seperti pada prosedur 3, 5 dan 6. Untuk sumber C terbaik kemudian dilakukan uji pengaruh variasi konsentrasi dari 0,5 – 2 % (w/v) dan diukur sebagaimana tersebut di atas.

c Pengaruh Ion Logam

Sumber ion logam yang digunakan adalah $MgSO_4$, $ZnSO_4$, $MnSO_4$, dan $FeSO_4$. Masing-masing sumber ion logam sebanyak 0,5% (w/v) ditambahkan ke dalam medium tanpa perlakuan. Medium kultur dengan komposisi tersebut kemudian diinokulasi dengan starter dan ditumbuhkan seperti yang dijelaskan pada prosedur 4. Sampling dilakukan pada rentang waktu 8, 24, 31, 48, dan 55 jam. Sampel kultur diukur nilai OD, kadar protein, dan aktivitas enzim seperti pada prosedur 3, 5 dan 6. Untuk sumber ion logam terbaik kemudian dilakukan uji pengaruh variasi konsentrasi dari 0,5 – 2% (w/v) dan diukur sebagaimana tersebut di atas.

d. Pengaruh pH

Medium yang digunakan untuk menginokulasi bakteri divariasikan pHnya dari pH 6 - 8. Medium kultur dengan komposisi tersebut kemudian diinokulasi dengan starter dan ditumbuhkan seperti yang dijelaskan pada prosedur 4. Sampling

dilakukan pada rentang waktu 8, 24, 31, 48, dan 55 jam. Sampel kultur diukur nilai OD, kadar protein dan aktivitas enzim seperti pada prosedur 3, 5 dan 6.

Untuk pH terbaik kemudian dilakukan uji pengaruh variasi dari 6 - 8 dan diukur sebagaimana tersebut di atas.

