

I. METODE PENELITIAN

3.1. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan April 2011 sampai dengan Desember 2011 di Laboratorium Biokimia, Laboratorium Organik, Laboratorium Instrumentasi Biokimia Jurusan Kimia dan Laboratorium Biologi Molekuler Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lampung.

3.2. Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah alat-alat gelas laboratorium, pemanas bunsen, jarum ose, pipa kapiler, lempeng KLT, *autoclave* (model S-90N), *laminar air flow* (CURMA model 9005-FL), shaker (*orbit enviro shaker*), sentrifuga, tabung sentrifuga, mikropipet, *waterbath*, spektrofotometer UV-VIS (*Pharmacia Biotech*), timbangan digital, oven, dan inkubator. Sedangkan bahan yang digunakan adalah onggok singkong yang merupakan limbah atau ampas hasil dari pengolahan singkong sebagai sumber mikroorganisme penghasil enzim CGT-ase, pati singkong segar, pepton, *yeast extract*, K_2HPO_4 , $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, *fenolftalein* (PP), *methyl orange*, agar, Na_2CO_3 , NaCl, pH indikator, *Bacillus firmus* ITBCC, Na(K)-tartarat, $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, reagen *folin ciocelteau*, *soluble starch*, buffer asetat 0,1 M pH 5,5, *fenolftalein* 1 mM, pereaksi C, pereaksi D, spiritus dan alkohol, serta akuades, alkohol, butanol, etanol dan H_2SO_4 5%.

3.3. Prosedur Penelitian

1. Pembuatan Medium

A. Pembuatan *Nutrient Broth* (NB)

Medium NB digunakan untuk adaptasi awal pertumbuhan bakteri pada medium cair. Medium NB ini mengandung 0,3% (w/v) *yeast extract*, 0,5% (w/v) pepton dan 0,5% (w/v) NaCl yang dilarutkan dalam 100 mL akuades kemudian disterilkan dalam *autoclave*.

B. Pembuatan Medium Horikoshi's II

Medium Horikoshi II ini merupakan medium spesifik yang digunakan untuk menginokulasikan mikroorganisme yang mampu menghasilkan enzim CGT-ase. Medium ini disiapkan dengan cara menimbang pati singkong segar 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, *fenolftalein* (PP) 0,03 gram, *methyl orange* 0,01 gram, agar 1,5 gram, kemudian semua bahan tersebut dimasukkan ke dalam Erlenmeyer, dilarutkan dengan akuades sebanyak 80 mL dan dipanaskan di atas bunsen 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 yang telah dimasukkan ke dalam Erlenmeyer dan disebut sebagai larutan (3) dan kemudian semua larutan (1), (2), dan (3) disterilkan dalam *autoclave* selama 30 menit dengan tekanan 2 atm dan suhu $121^\circ C$. Setelah semua larutan steril selanjutnya larutan (1), (2) dan (3) dicampurkan dalam satu Erlenmeyer, pH optimum untuk pertumbuhan bakteri pada medium Horikoshi II ini adalah 10 (yang diketahui dengan menggunakan indikator pH). Kemudian, campuran tersebut dimasukkan ke 7 cawan petri dan dibiarkan hingga memadat pada suhu kamar $25^\circ C$.

2. Pembuatan Larutan Pereaksi

Pereaksi yang digunakan pada penelitian ini yakni: pereaksi CGT-ase dan pereaksi Lowry. 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

Pereaksi CGT-ase disiapkan dengan cara melarutkan 1 gram *soluble starch* ke dalam 100 mL 0,1 M buffer asetat (pH 5,5) kemudian dipanaskan hingga larut.

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 Na_2CO_3 dilarutkan dalam 100 mL NaOH 0,1 N; 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 0-100 ppm.

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

Sebanyak 50 mL Na-asetat 0,1M dimasukan ke dalam Erlenmeyer kemudian ditambahkan 0,1 mL asam asetat 0,1M.

4. Pembuatan Larutan Salin

Larutan salin ini berfungsi sebagai larutan penyangga pH yang bertujuan agar sel bakteri tidak rusak akibat penurunan pH. Larutan ini dibuat dengan cara menimbang sebanyak 0,85 gram NaCl, dimasukan ke dalam Erlenmeyer dan dilarutkan dengan akuades sebanyak 100 mL, disumbat dengan rapat menggunakan kapas yang telah dibungkus kain kasa menyesuaikan bentuk Erlenmeyer, kemudian disterilkan dalam *autoclave*.

5. Skrining dan Isolasi Mikroorganisme Penghasil Enzim CGT-ase

Onggok singkong yang berasal dari limbah atau ampas hasil pengolahan singkong diambil sebanyak 1 gram kemudian dilarutkan dalam larutan salin dan dilakukan pengenceran secara bertingkat hingga 5 kali (10^{-5}). Dari pengenceran 10^{-5} diambil 200 μL kemudian ditumbuhkan

pada medium Horikoshi's II padat dengan metode *streak plate*. Medium tersebut kemudian diinkubasi selama 3 hari pada suhu 37 °C (waktu dan suhu yang digunakan tersebut merupakan kondisi optimum untuk pertumbuhan bakteri yang mampu menghasilkan enzim CGT-ase). Koloni yang tumbuh pada medium kemudian diambil 1 ose lalu dipindahkan ke medium yang baru. Setelah itu, diinkubasi selama 3 hari pada suhu 37 °C (Higuti *et al.*, 2003). Setelah 3 hari diamati terbentuknya enzim CGT-ase yang ditandai dengan adanya koloni yang ber-*halozone* (Mahat *et al.*, 2004).

6. Profil Isolat Terbaik pada Medium Horikoshi's II

Isolat dengan diameter *halozone* yang besar sama dengan atau lebih besar dari kontrol positif (*Bacillus firmus*) dipilih sebagai isolat potensial. Isolat terbaik adalah isolat yang memiliki ukuran diameter *halozone* (zona bening bewarna kuning keunguan disekitar koloni) yang besar diantara isolat yang diperoleh secara keseluruhan.

7. Produksi Enzim CGT-ase

Produksi enzim CGT-ase dilakukan 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 150 rpm pada suhu 37°C selama 1 malam (*overnight*: 16-20 jam).

Inokulum ini selanjutnya akan digunakan untuk diinokulasikan ke dalam medium kultur.

Medium kultur menggunakan medium yang mengandung pati singkong, pepton, *yeast extract*, K₂HPO₄, dan MgSO₄.7H₂O. Medium kultur yang telah diinokulasikan sebanyak 0,01 mL inokulum kemudian diinkubasi pada *shaker incubator* dengan kecepatan 150 rpm, suhu 37 °C selama 3 hari dan di-*sampling* secara berkala 12 jam, 24 jam, 36 jam, 48 jam, 60 jam dan 72 jam. Kemudian disentrifugasi selama 15 menit untuk mendapatkan ekstrak kasar

enzim CGT-ase yang kemudian dapat ditentukan pertumbuhan selnya, diuji aktivitasnya dan kadar proteinnya.

8. Penentuan Pertumbuhan Sel

Penentuan pertumbuhan sel ini digunakan untuk mengetahui pertumbuhan dari sel bakteri.

Pertumbuhan sel ini ditentukan dengan mengencerkan sampel kultur 10 kali pengenceran.

Sebanyak 0,3 mL ekstrak kasar enzim CGT-ase dimasukkan ke dalam tabung reaksi kemudian ditambahkan 2,7 mL akuades lalu diukur serapannya menggunakan *spektrofotometer UV-VIS* pada panjang gelombang 600 nm.

9. Uji Aktivitas Enzim CGT-ase

Ekstrak kasar enzim CGT-ase yang telah diperoleh (pada prosedur 6) kemudian diuji aktivitas enzim CGT-ase nya. Sebanyak 100 μ L larutan enzim ditambahkan 800 μ L *soluble starch* 1% (w/v) yang disiapkan dalam buffer asetat 0,1 M pH 5,5 dan diinkubasi pada suhu 55 °C selama 10 menit (pH, suhu, dan waktu tersebut merupakan kondisi optimum enzim CGT-ase). Reaksi dihentikan dengan menambahkan 4 mL Na_2CO_3 0,25 M dan 0,1 mL larutan *fenolftalein* 1 mM. Absorbansi diukur pada panjang λ_{maks} 550 nm. Kontrol dibuat dengan cara menginaktifkan larutan enzim pada suhu 100 °C selama 30 menit, dan selanjutnya diperlakukan sama dengan sampel. Larutan standar yang digunakan adalah β -siklodekstrin dengan konsentrasi 0-10000 ppm. Satu unit enzim didefinisikan sebagai jumlah enzim yang mampu mereduksi warna merah muda keunguan antara kompleks siklodekstrin dan *fenolftalein* sebesar 10 % per menit.

10. Uji Kadar Protein Enzim CGT-ase

Ekstrak kasar enzim CGT-ase yang telah diperoleh (pada prosedur 6) kemudian diuji kadar proteinnya dengan cara 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. Perlakuan kontrol sama dengan perlakuan pada sampel. Pengukuran serapan dilakukan pada λ_{maks} 600 nm.

11. Analisis Produk Hasil Biokatalisis Enzim CGT-ase dengan Metode KLT

A. Analisis dengan Metode KLT

(1). Persiapan sampel/ standar

Sampel yang diuji pada KLT adalah hasil produk biokatalisis enzim CGT-ase dengan kondisi optimum (sesuai prosedur 6). Standar β -siklodekstrin dengan konsentrasi tertentu dan supernatan yang diperoleh dari hasil sentrifugasi diambil dengan pipa kapiler, lalu ditotolkan pada plat KLT dengan jarak dari pinggir bawah plat 0,5 cm.

(2). Persiapan bejana pengelusi

Bejana pengelusi yang kecil diisi dengan larutan pengelusi butanol-etanol-air dengan komposisi 5:3:2 dan untuk melihat perubahan yang terjadi pada nilai Rf selanjutnya komposisi eluen diturunkan menjadi 5:3:1, kemudian bejana ditutup, hingga jenuh dengan uap eluen sehingga bejana siap digunakan.

(3). Elusi

Plat yang telah ditotolkan larutan standar β -siklodekstrin dan sampel siklodekstrin hasil biokatalisis enzim CGT-ase (sesuai prosedur 6) dimasukkan ke dalam bejana yang telah diisi eluen (jaga agar noda senyawa tidak terendam dalam larutan pengelusi). Proses elusi akan berlangsung sampai pergerakan pelarut mencapai batas yang telah diberi tanda pada

bagian atas plat. Setelah itu, plat diangkat dari dalam bejana dan pelarut dibiarkan kering. Bercak noda divisualisasikan dengan menyemprot plat dengan H_2SO_4 5 % kemudian dipanaskan dalam oven dengan suhu $120\text{ }^\circ\text{C}$ selama 15 menit (Labes and Schonheit, 2007). Noda (spot) yang terbentuk berwarna gelap, selanjutnya noda diberi tanda sehingga nilai R_f standar dan sampel dapat diketahui dengan membandingkan jarak (dalam ukuran cm) antara migrasi sampel dan jarak migrasi eluen yang digunakan. Jika nilai R_f yang diperoleh sama dengan nilai standar β -siklodekstin berarti sampel tersebut adalah β -siklodekstrin.