

III. METODOLOGI PENELITIAN

A. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini telah dilakukan pada bulan Juni-November 2013 di Laboratorium Biokimia dan Laboratorium Biomassa Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lampung.

B. Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini adalah *autoclave* (model S-90N), laminar air flow (CURMA model 9005-FL), timbangan digital, inkubator, shaker incubator, sentrifuga, lemari pendingin, kompor, tabung sentrifuga, mikropipet, waterbath, oven, spektrofotometer UV-Vis, amicon ultra-15, inkubator, kasa, rak tabung, jarum ose dan alat-alat gelas lain seperti tabung reaksi, cawan petri, erlenmeyer, beaker gelas, gelas ukur, labu ukur, pipet tetes, batang pengaduk, serta pemanas bunsen.

Bahan-bahan yang digunakan pada penelitian ini yaitu pati singkong, pepton, *yeast extract*, K_2HPO_4 , $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, fenolftalein (PP), methyl orange, agar, Na_2CO_3 , pH indikator, Na(K)-tartarat, $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, reagen folin ciocelteau, aquadest, *soluble starch*, pati ubi jalar, pati jagung, buffer sitrat 0,1M, buffer posfat 0,1 M, es batu, buffer asetat 0.1 M pH 5.5, fenolftalein 1 mM, pereaksi

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

C. Prosedur Penelitian

1. Tahapan Persiapan

a. Pembuatan Medium

Medium Pertumbuhan dibuat dengan komposisi medium Horikoshi's II termodifikasi (Park *et al*, 1989). Medium Horikoshi's II terdiri dari Larutan I (pati singkong 1%, pepton 0,5%, ekstrak ragi 0,5%, K_2HPO_4 0,1%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,02%, fenolftalein 0,03%, metil jingga 0,01%, dan agar 1,5%), Larutan II (Na_2CO_3 1%), dan Larutan III (Akuades). Medium starter dan kultur menggunakan medium Horikoshi's II tanpa fenolftalein, metil jingga, dan agar.

b. Peremajaan Bakteri Isolat LTi-21-3

Peremajaan Bakteri Isolat LTi-21-3 dilakukan dengan menginokulasikan bakteri LTi-21-3 pada medium padat Horikoshi's II agar miring.

2. Pembuatan Pereaksi

a. 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. Perekasi Enzim CGT-ase (Kaneko *et al.*, 1987; Alves-Prado *et al.*, 2008)

Perekasi ini digunakan untuk menguji aktivitas ekstrak kasar enzim CGT-ase. Perekasi enzim 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. Perekasi Lowry (Lowry *et al.*, 1951)

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

Perekasi A : 2 g Na₂CO₃ dilarutkan dalam 100 mL NaOH 0,1N;

Perekasi B : 5 mL larutan CuSO₄.5H₂O 1% (b/v) ditambahkan 5 mL

larutan Na(K)-tartarat 1% (b/v); Perekasi C : 2 mL perekasi B

ditambah 100 mL perekasi A; dan Perekasi D : reagen Folin-

Ciocalteu diencerkan dengan akuades 1:1. Larutan standar protein digunakan BSA (Bovine Serum Albumine) dengan konsentrasi 500-5000 ppm.

3. 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 (λ_{maks} 600 nm)

4. Produksi Enzim CGT-ase

Sebanyak 2 ose Bakteri Isolat LTi-21-3 dari media agar miring dipindahkan ke dalam media starter secara aseptis lalu dikocok dengan *shaker incubator*, dengan kecepatan 140 rpm pada suhu ruang selama *overnight* 17 jam. Selanjutnya 2ml media starter dipindahkan ke dalam medium kultur volume 100 mL dalam Erlenmeyer 500 mL. Kultur dikocok dengan shaker incubator dengan kecepatan 105 rpm, suhu ruang, selama waktu inkubasi yang diperlukan. Kemudian sentrifugasi kultur selama 30 menit untuk mendapatkan ekstrak kasar enzim CGT-ase.

5. Penentuan Aktivitas Enzim CGT-ase

Ekstrak kasar enzim CGT-ase yang diperoleh kemudian diuji aktivitas enzim CGT-ase nya. Sebanyak 100 μ L larutan enzim ditambahkan 800 μ 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_2CO_3 0,25M dan 0,1 mL larutan fenolftalein 1 mM. Absorbansi diukur menggunakan spektrofotometer *UV-Vis* pada λ_{maks} 550 nm. Kontrol dibuat dengan cara menginaktifkan larutan enzim pada suhu 100°C selama 30 menit, dan selanjutnya diperlakukan sama dengan sampel.

6. 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 λ_{maks} 600 nm.

7. Uji Kestabilan Enzim CGT-ase

Ekstrak Kasar Enzim CGT-ase disimpan pada suhu 4°C kemudian diukur aktivitas CGT-ase dan kadar proteinnya untuk menentukan aktifitas spesifik. Pengujian dilakukan berkala setiap 24 jam.

8. Pemurnian Enzim CGT-ase

Ekstrak kasar enzim yang diperoleh dimurnikan dengan pemekatan menggunakan Amicon Ultra-15 (Millipore) dengan kecepatan 5000rpm, temperatur 4°C selama 20 menit. Hasil pemurnian ini kemudian digunakan untuk karakterisasi.

9. Karakterisasi Enzim (Tonkova *et al.*, 2011).

Enzim CGT-ase isolat LTi-21-3 hasil pemurnian dikarakterisasi.

Karakterisasi enzim CGT-ase meliputi pengamatan terhadap pengaruh pH dan suhu terhadap aktivitas, penentuan konstanta kinetik dan spesifitas substrat dari beberapa jenis pati.

a. Pengaruh pH dan Temperatur terhadap Aktivitas CGTase

Efek pH terhadap aktivitas CGTase dilakukan dengan buffer sitrat 0.1 M pada interval pH 4.5 dan 5, dan menggunakan buffer fosfat pada interval 5.5-7.5. Efek temperatur dilakukan pada interval suhu dari 45 – 65°C.

b. Penentuan Konstanta Kinetik CGTase

Konstanta kinetika ditentukan dengan soluble starch sebagai substrat pada konsentrasi 2.5 – 20.0 mg/mL pada pH 5,5 dan dikalkulasi menggunakan transformasi Lineweaver-Burk.

c. Penentuan Substrat Spesifitas CGTase

Berbagai jenis pati (pati singkong, pati jagung, pati ubi jalar dan *soluble starch*) masing-masing 1% divariasikan pada proses reaksi enzim-substrat pada inkubasi dengan suhu 60°C selama 10 menit.

D . Diagram Alir Prosedur Penelitian

Prosedur penelitian dapat dilihat pada diagram alir berikut:

