

II. TINJAUAN PUSTAKA

A. Bakteri

Bakteri merupakan mikroba uniseluler yang pada umumnya tidak mempunyai klorofil. Bakteri tersebar luas di alam, di dalam tanah, di dalam air, pada sumber air panas, dalam tubuh hewan, manusia dan tumbuhan. Bakteri umumnya berukuran kecil dengan karakteristik dimensi 1 μm . Beberapa kelompok memiliki *flagella* dan dapat bergerak aktif. Bakteri memiliki berat jenis 1.05 - 1.1 g cm^{-3} dan berat sekitar 10^{-12} g. Ukuran aktual tergantung dari laju pertumbuhan, media tumbuh dan sebagainya. Ada tiga bentuk dasar bakteri, yaitu bentuk bulat atau kokus, bentuk batang silindris, bentuk lengkung atau vibri. Bentuk bakteri dipengaruhi oleh umur dan syarat pertumbuhan tertentu (Hidayat dkk., 2006).

Untuk mendapatkan bakteri yang potensial dilakukan dengan penapisan mikroorganisme dari lingkungan. Umumnya isolat bakteri yang diperoleh sesuai dengan lingkungan tempat hidupnya. Hal ini dikarenakan kondisi lingkungan tersebut biasanya digunakan bakteri sebagai substrat utamanya. Misalnya, bakteri amilolitik dapat diisolasi dari sampel yang berasal dari limbah pengolahan singkong, limbah sayur (Chakrabarty *and* Sen, 1984),

rumen (Freer, 1993), serta hasil fermentasi ikan dan bahan makanan dari beras (Olympia *et al.*, 1995).

Bakteri LTi-A2.4 Isolat amilolitik dipilih dan diseleksi berdasarkan kemampuan membentuk zona bening (diameter *halozone* 2.6 cm) pada sekitar koloni bakteri dan aktivitas enzim CGT-ase yang dihasilkan. Dari serangkaian kegiatan isolasi dan penapisan pada medium padat didapat 5 isolat, dan seleksi lebih lanjut pada medium cair diperoleh 2 isolat amilolitik potensial yaitu LTi-A2.4 dan LTi-21.3. Pada medium cair yang mengandung berbagai jenis pati, pati singkong merupakan medium cair yang paling baik bagi isolat LTi-A2.4 untuk menghasilkan enzim CGT-ase dengan aktivitas yang cukup tinggi. Pewarnaan Gram isolat bakteri menunjukkan bahwa isolat LTi-A2.4 merupakan bakteri Gram positif dan berbentuk basil (Sastrawiyana, 2011).

Fase pertumbuhan bakteri dapat dibagi menjadi 4 fase, yaitu fase lag, fase logaritma (eksponensial), fase stasioner dan fase kematian. Fase lag merupakan fase penyesuaian bakteri dengan lingkungan yang baru. Lama fase lag pada bakteri sangat bervariasi, tergantung pada komposisi media, pH, suhu, aerasi, jumlah sel pada inokulum awal dan sifat fisiologis mikroorganisme pada media sebelumnya. Fase eksponensial ditandai dengan terjadinya periode pertumbuhan yang cepat. Variasi derajat pertumbuhan bakteri pada fase eksponensial ini sangat dipengaruhi oleh sifat genetik yang diturunkannya. Selain itu, derajat pertumbuhan juga dipengaruhi oleh kadar nutrisi dalam media, suhu inkubasi, kondisi pH dan

aerasi. Ketika derajat pertumbuhan bakteri telah menghasilkan populasi yang maksimum, maka akan terjadi keseimbangan antara jumlah sel yang mati dan jumlah sel yang hidup.

Fase stasioner merupakan saat laju pertumbuhan bakteri sama dengan laju kematiannya, sehingga jumlah bakteri keseluruhan akan tetap.

Keseimbangan jumlah keseluruhan bakteri ini terjadi karena adanya pengurangan derajat pembelahan sel. Hal ini disebabkan oleh kadar nutrisi yang berkurang dan terjadi akumulasi produk toksik sehingga mengganggu pembelahan sel. Fase stasioner ini dilanjutkan dengan fase kematian yang ditandai dengan peningkatan laju kematian yang melampaui laju pertumbuhan (Volk dan Wheeler, 1993).

B. Pati

Pati atau amilum merupakan karbohidrat yang tersebar dalam tanaman terutama tanaman berklorofil. Bagi tanaman, pati merupakan cadangan makanan yang terdapat pada biji, batang dan pada bagian umbi tanaman.

Banyaknya kandungan pati pada tanaman tergantung dari asal pati tersebut, misalnya pati yang berasal dari biji beras mengandung pati 50-60% dan pati yang berasal dari umbi singkong mengandung pati 80% (Winarno, 1986).

Pati apabila diamati dengan mikroskop ternyata berbentuk granula-granula kecil yang bentuk dan ukurannya berbeda-beda tergantung dari tumbuhan apa pati tersebut diperoleh (Anna, 1994). Pati terdiri dari dua fraksi yang dapat dipisahkan dengan air panas. Fraksi terlarut disebut amilosa dan fraksi

tidak larut disebut amilopektin (Winarno, 1986). Amilosa (15-20%) merupakan rantai panjang tidak bercabang yang terdiri dari molekul-molekul α -D-glukopiranososa yang bersambungan dengan ikatan α -1,4. Amilosa terdiri atas 250-300 unit D-glukosa yang terikat dengan ikatan α -1,4-glikosidik, jadi molekulnya merupakan rantai terbuka. Sedangkan amilopektin (80-85%) merupakan rantai bercabang sebanyak 20-30 molekul α -D-glukopiranososa yang bersambungan dengan ikatan α -1,4 dan α 1,6. Adanya ikatan α -1,6-glikosidik ini menyebabkan terjadinya cabang, sehingga molekul amilopektin berbentuk rantai terbuka dan bercabang (Anna, 1994). Pati sagu memiliki kandungan amilosa 25-35% dan amilopektin 65-75%. Pati jagung normal mengandung 24-26% amilosa dan 74-76% amilopektin. Pati singkong dari tepung tapioka memiliki rasio 17% amilosa dan 83% amilopektin.

Amilum dalam kehidupan manusia dapat berperan sebagai sumber makanan penghasil energi utama dari golongan karbohidrat, di samping itu amilum juga dapat berperan sebagai bahan aditif pada proses pengolahan makanan, misalnya sebagai penstabil dalam proses pembuatan puding. Amilum juga berperan dalam pembuatan sirup dan pemanis buatan seperti sakarin. Dalam bidang non makanan, amilum digunakan untuk bahan baku dalam proses pembuatan kertas, pakaian dari katun, industri cat, maupun untuk produksi hidrogen (Liu,2005).

Amilum dapat dihidrolisis sempurna dengan menggunakan asam sehingga menghasilkan glukosa. Hidrolisis juga dapat dilakukan dengan bantuan enzim amilase. Pada reaksi hidrolisis parsial, amilum terpecah menjadi

molekul-molekul yang lebih kecil yang dikenal dengan nama dekstrin. Jadi dekstrin adalah hasil antara pada proses hidrolisis amilum sebelum terbentuk maltose (Anna, 1994). Untuk mengetahui adanya pati maka dilakukan pengujian dengan menggunakan larutan iodium (I_2 dalam KI). Bila terdapat amilosa, polimer-polimer glukosa yang lebih besar dari 20 maka akan menghasilkan warna biru. Bila polimer-polimer glukosa kurang dari 20 maka akan menghasilkan warna merah. Dekstrin dengan polimer enam, tujuh, dan delapan akan memberikan warna coklat. Polimer yang lebih kecil dari lima tidak memberikan warna dengan iodium (Winarno, 1986).

C. Enzim

Enzim adalah suatu atau beberapa gugus polipeptida (protein) yang berfungsi sebagai katalis yaitu senyawa yang mempercepat proses reaksi tanpa habis bereaksi dalam suatu reaksi kimia. Berdasarkan cara menghasilkannya, enzim dibagi menjadi dua, yaitu enzim ekstraseluler dan enzim intraseluler. Enzim ekstraseluler dapat diperoleh dalam keadaan murni pada biakan cair dengan cara pemisahan dan pemurnian yang tidak begitu rumit. Sedangkan enzim intraseluler memiliki peran dalam mensintesis bahan seluler dan menguraikan nutrisi untuk menyediakan energi yang dibutuhkan oleh sel (Wirahadikusumah, 1989).

Enzim mempunyai peranan sebagai katalis dalam menurunkan aktivitas dari reaksi energi. Aktivasi dapat diartikan sebagai sejumlah energi atau kalori

yang diturunkan oleh suatu mol zat pada temperatur tertentu untuk membawa molekul kedalam aktifnya atau keadaan aktifnya, menurunkan energi aktivasi, mempercepat reaksi pada suhu dan tekanan tetap tanpa mengubah besarnya tetapan seimbangannya, dan mengendalikan reaksi (Wirahadikusumah, 1989).

Pengaruh suhu sangat menentukan aktivitas enzim pada waktu mengkatalisis suatu reaksi. Seluruh enzim memerlukan jumlah panas tertentu untuk dapat aktif. Meningkatnya suhu akan semakin meningkatkan aktivitas enzim. Aktivitas enzim meningkat pada kecepatan ini hingga mencapai kondisi optimum. Peningkatan suhu yang melebihi suhu optimumnya menyebabkan lemahnya ikatan di dalam enzim secara struktural (Pratiwi, 2008). Pada suhu maksimum enzim akan terdenaturasi karena struktur protein terbuka dan gugus non polar yang berada di dalam molekul menjadi terbuka keluar, kelarutan protein di dalam air yang polar menjadi turun, sehingga aktivitas enzim juga akan turun (Lehninger, 1997).

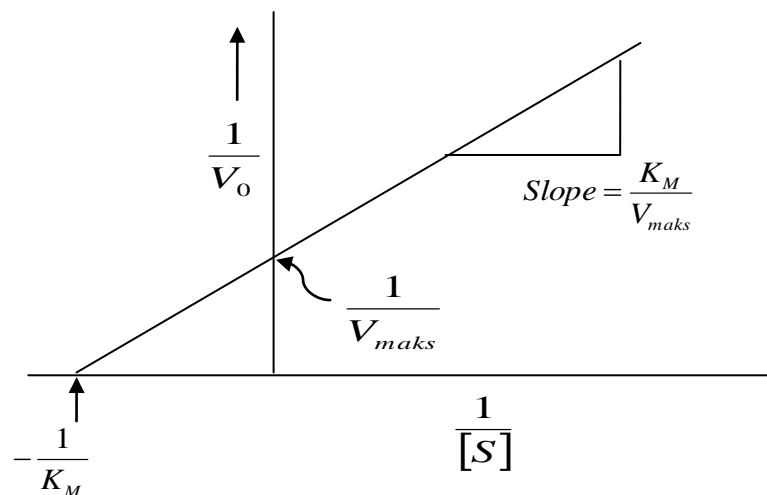
Aktivitas enzim juga dipengaruhi oleh konsentrasi substrat. Pada konsentrasi substrat rendah, enzim tidak mencapai konversi maksimum akibat sulitnya enzim menemukan substrat yang akan direaksikan. Seiring dengan meningkatnya konsentrasi substrat, kecepatan reaksi juga akan meningkat akibat makin cepatnya substrat terikat pada enzim. Peningkatan konsentrasi substrat pada titik jenuh tidak lagi dapat meningkatkan kecepatan laju reaksi (Pratiwi, 2008).

Konstanta Michaelis-Menten (K_M) dan laju reaksi maksimum (V_{maks}) merupakan parameter dalam kinetika reaksi enzim. Setiap enzim memiliki nilai K_M dan V_{maks} yang khas dengan substrat spesifik pada suhu dan pH tertentu (Kamelia et al., 2005). Penentuan harga K_M dan V_{maks} ini bertujuan untuk mengetahui konsentrasi substrat agar menghasilkan laju reaksi yang maksimal.

Nilai K_M suatu enzim dapat dihitung dengan persamaan *Lineweaver-Burk* yang diperoleh dari persamaan Michaelis-Menten yang kemudian dihasilkan suatu diagram *Lineweaver-Burk* (Page, 1997).

$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_M}{V_{maks}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{maks}} \longrightarrow \text{Persamaan } \textit{Lineweaver-Burk}$$

Diagram *Lineweaver-Burk* (Suhartono, 1989) :



pH lingkungan juga berpengaruh terhadap kecepatan aktivitas enzim dalam mengkatalisis suatu reaksi. Hal ini disebabkan konsentrasi ion hidrogen mempengaruhi struktur tiga dimensi enzim dan aktivitasnya. Setiap enzim

memiliki pH optimum di mana pada pH tersebut struktur tiga dimensinya paling kondusif untuk mengikat substrat. Bila konsentrasi ion hidrogen berubah dari konsentrasi optimal, aktivitas enzim secara progresif hilang sampai pada akhirnya enzim menjadi tidak fungsional (Lehninger, 1997).

Selain suhu, pH dan konsentrasi substrat, aktivitas enzim juga dipengaruhi oleh ada tidaknya inhibitor. Jika terdapat pengurangan laju reaksi oleh suatu senyawa, senyawa tersebut dinamakan inhibitor. Inhibitor dapat bersaing dengan substrat dalam berikatan dengan enzim, sehingga menghalangi substrat terikat pada tapak aktif enzim (Anna, 1994).

D. Enzim CGT-ase dan Siklodekstrin

Siklodekstrin Glukanotransferase (CGT-ase, alpha-1,4-glukan-4-glikosil transferase, EC.2.4.1.19) adalah enzim ekstraseluler multifungsional yang dapat mengkatalisis pati atau α -1,4 glukukan yang lain seperti maltodekstrin, amilosa dan lain-lain menjadi siklodekstrin (CD) (Tonkova, 1998). CGT-ase merupakan keluarga dari enzim α -amilase (Leemhuis *et al.*, 2003). CGT-ase memiliki berat molekul yang bervariasi dari 60-110 kDa dan terdiri dari 700 asam amino. Sebagian memerlukan kalsium sebagai agen pelindung terhadap denaturasi panas (Bovetto *et al.*, 1992). Suhu maksimal untuk bakteri yang menghasilkan enzim CGT-ase antara 40°C sampai 80°C. Sebagian besar CGT-ase diinhibisi kuat oleh Zn^{2+} , Cu^{2+} dan Fe^{2+} (Tonkova, 1998).

Bacillus menghasilkan berbagai enzim yang penting yang digunakan dalam bidang industri. Beberapa spesies bakteri terutama *Paenibacillus macerans* (Kitahata *et al.*, 1974), *Bacillus circulans* (Pongsawadi and Yagiswa, 1987), *Bacillus megaterium* (Kitahata and Okada, 1976), *Bacillus firmus* (Mori *et al.*, 1994), *Klebsiella sp.* (Bender, 1977; Lee *et al.*, 1992) dan *Bacillus* alkalofilik (Nakamura and Horikoshi, 1976) diketahui sebagai penghasil enzim CGT-ase yang potensial. Selain mikroorganisme alkalofilik, mikroorganisme psikrofilik, mesofilik dan termofilik juga menghasilkan enzim CGT-ase. *Bacillus macerans* (Takano *et al.*, 1986; Fujiwara *et al.*, 1992) dan *Bacillus stearothermophilus* (Fujiwara *et al.*, 1992) yang dikenal produsen α -CGT-ase. *Bacillus ohbensis* (Sin *et al.*, 1991), alkalofilik *Bacillus sp.* 38-2 (Horikoshi, 1999) dan *Bacillus sp.* 1011 (Kimura *et al.*, 1987) yang dikenal produsen β -CGT-ase. Produsen CGT-ase yang menghasilkan γ -CGT-ase adalah *Bacillus sp.* AL-6 (Fujita *et al.*, 1990).

Reaksi katalisis oleh enzim CGT-ase dapat terjadi secara intramolekul (siklisasi) dan antarmolekul (kopling, disproporsionasi), serta reaksi hidrolisis. Reaksi siklisasi yaitu transfer residu gula akhir ke residu gula yang lain pada rantai oligosakarida yang sama untuk membentuk suatu senyawa siklik. Ini merupakan reaksi intramolekul dimana pati dihubungkan dengan ikatan α -1,4-glukan yang dikonversi ke dalam siklodekstrin. Reaksi ini bersifat *reversible* dan cincin dapat dibuka oleh CGT-ase untuk reaksi lebih lanjut (Hedges, 1992).

CGT-ase menghasilkan campuran dari tiga jenis siklodekstrin (CD) yaitu α -CD, β -CD dan γ -CD. Kebanyakan CGT-ase menghasilkan terutama α -CD dan β -CD dibandingkan γ -CD (Tonkova, 1998). Namun, untuk menghasilkan CD yang terutama adalah tergantung metode dan kondisi inkubasi yang digunakan, sedangkan untuk menghasilkan α -CD, β -CD dan γ -CD sangat tergantung pada asal enzim yang digunakan (Schmidt *et al.*, 1998). Hasil dan selektivitas tergantung pada jenis CGT-ase dan jenis substrat yang digunakan (Biwer *et al.*, 2002). Jenis siklodekstrin utama yang dihasilkan berdasarkan asal enzim CGT-ase yang digunakan, dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Jenis siklodekstrin utama yang dihasilkan berdasarkan asal enzim CGT-ase yang digunakan (Biwer *et al.*, 2002)

Organisme	Tipe CGT-ase	Referensi
<i>Bacillus macerans</i> strain IAM1234	α	Takano <i>et al.</i> , 1986
<i>Bacillus macerans</i> strain IFO 3490	α	Fujiwara <i>et al.</i> , 1992
<i>Thermococcus</i> sp. Strain B1001	α	Yamamoto <i>et al.</i> , 2000
<i>Thermococcus kodakaraensis</i> KOD1	β	Rashid <i>et al.</i> , 2002
<i>Bacillus</i> sp. E1	β	Yong <i>et al.</i> , 1996
<i>Bacillus circulans</i> 251	β	Lawson <i>et al.</i> , 1994
<i>Bacillus circulans</i> 8	β	Nitschke <i>et al.</i> , 1990
<i>Bacillus firmus</i> var. <i>alkalophilus</i>	β	Park <i>et al.</i> , 1999
<i>Bacillus licheniformis</i> strain CGT-A	α/β	Hill <i>et al.</i> , 1990
<i>Thermoanaerobacter</i> sp.	α/β	Patent Appl DK 96 001/79
<i>Thermoanaerobacter</i> sp. ATCC 53627	α/β	Jorgensen <i>et al.</i> , 1997
<i>Bacillus stearothermophilus</i> NO2	α/β	Fujiwara <i>et al.</i> , 1992
<i>T. thermosulfurigenes</i> strain EM1	α/β	Wind <i>et al.</i> , 1995
Alkalophilic <i>Bacillus</i> sp. 28-2	β	Horikhosi <i>et al.</i> , 1988
Alkalophilic <i>Bacillus</i> sp. 1011	β	Kimura <i>et al.</i> , 1987
<i>Bacillus</i> sp strain B1018	β	Itkor <i>et al.</i> , 1990
<i>Bacillus</i> sp strain KC201	β	Kitamoto <i>et al.</i> , 1992
<i>Bacillus</i> sp. A2-5a	β	Ohdan <i>et al.</i> , 2000
<i>Bacillus agaradhaerens</i> strain LS-3C	β	Martins <i>et al.</i> , 2003
<i>Bacillus ohbensis</i>	β/γ	Sin <i>et al.</i> , 1991
Alkalophilic <i>Bacillus clarkii</i> 7364	γ	Takada <i>et al.</i> , 2003
<i>Brevibacillus brevis</i> CD162	γ	Myung <i>et al.</i> , 1998
<i>Bacillus firmus/lentus</i> strain 290-3	γ	Schmid, 1992
<i>Nostoc</i> sp. PCC 9229	Not specified	Wouter <i>et al.</i> , 2003

Cincin luar struktur siklodekstrin bersifat tidak polar (hidrofobik) sedangkan bagian dalam rongga bersifat lebih polar (hidrofilik) (Szetjli, 1982). Produk siklik dapat terbentuk secara kompleks inklusi dengan senyawa anorganik maupun organik. Sifat ini menyebabkan siklodekstrin banyak digunakan dalam berbagai industri seperti pangan, kosmetika, farmasi, agrokimia serta untuk penanganan polusi (Bender, 1977; Kaneto and Fumithasi, 1996; Szetjli, 1982).

Pada bidang farmasi siklodekstrin berfungsi untuk mempermudah pembuatan obat-obatan dalam bentuk tablet dengan menghambat zat volatil, selain itu siklodekstrin juga meningkatkan stabilitas obat agar lebih tahan terhadap hidrolisis, oksidasi, panas, cahaya dan garam logam (Tonkova, 1998). Pada bidang pangan siklodekstrin berfungsi untuk menghaluskan tekstur kue dan daging, menstabilkan rasa bila makanan disimpan untuk waktu lama dan pembuatan susu yang rendah kolesterol (Szetjli, 1982).

E. Pemurnian Enzim CGT-ase

Pemurnian merupakan tahap yang penting setelah enzim diisolasi. Pemurnian enzim dapat dilakukan dengan beberapa cara antara lain dengan cara pengendapan dalam garam organik (*salting out*) atau pelarut organik (aseton), dan melalui membran ultrafiltrasi. Pemurnian enzim lebih banyak dilakukan pada enzim ekstraseluler karena mudah didapat dari *raw material* dan bersifat lebih stabil. Pada penelitian ini dilakukan pemurnian dengan metode ultrafiltrasi.

Prinsip pemisahan dengan proses ultrafiltrasi ialah memisahkan komponen berdasarkan bobot molekul. Pada ultrafiltrasi, molekul-molekul dipaksa melewati suatu membran dengan ukuran pori sangat kecil dengan menggunakan tekanan hidarulik. Ultrafiltrasi menghasilkan enzim yang lebih pekat dengan aktivitas spesifik yang lebih tinggi, aktivitas enzim CGT-ase dari isolat Alkaliphile *Bacillus Pseudocaliphilus* 20RF meningkat dua kali lipat (Tonkova, 2011).

Meskipun retensi molekul merupakan fungsi dari ukuran molekul, namun terbukti bobot molekul dapat digunakan sebagai peubah yang lebih praktis, khususnya pada molekul dengan bobot molekul tinggi. Setelah proses isolasi enzim akan diperoleh supernatan. Supernatan yang diperoleh dimurnikan dengan membran ultrafiltrasi dan hanya protein yang berukuran lebih dari 30000 Dalton tertinggal di atas membran. Proses pemurnian menyebabkan hilangnya kofaktor yang penting sehingga menyebabkan hilangnya aktivitas enzim. Selain itu dapat pula terjadi denaturasi protein akibat pengaruh suhu dan pH selama pemurnian berlangsung.

III. METODOLOGI PENELITIAN

A. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan Juni-November 2013. Penelitian ini dilakukan 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, sentrifuga, *magnetic stirrer*, tabung sentrifuga, alat ultrafiltrasi (Hitachi CF 16 RX11 *Himac compact centrifuges RX11 series*), *tube* sentrifuga Centricon, *mikropipet*, *waterbath*, oven, spektrofotometer *UV-Vis*, inkubator, kasa, kapas, 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 dan kompor gas.

Bahan-bahan yang digunakan pada penelitian ini yaitu bakteri isolat LTI-A2.4, pati singkong, pati jagung, pati ubi jalar, pepton, *yeast extract*, K_2HPO_4 , $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$, *fenolftalein* (PP), *methyl orange*, agar, Na_2CO_3 , NaCl, PH indikator, Na(K)-tartarat, $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, *reagen folin ciocelteau*, *akuadest*, *aquabidest*, *soluble starch*, buffer asetat 0.1 M pH 5.5, *fenolftalein* 1 mM, pereaksi C, pereaksi D, spiritus, buffer fosfat 0,1 M, buffer sitrat 0,1 M, buffer asetat 0,1 M serta alkohol.

C. Prosedur Penelitian

1. Tahap Persiapan

a. Persiapan Alat

Semua peralatan gelas yang dipakai dicuci bersih, dikeringkan dan dilakukan sterilisasi agar alat-alat tersebut terhindar dari mikroba yang tidak diinginkan. Sterilisasi alat dilakukan dengan menggunakan *autoclave* pada suhu $121^\circ C$ dengan tekanan 1 atm selama 20 menit. Seluruh kegiatan dilakukan secara aseptik di dalam *laminar air flow* kecuali yang disebutkan secara khusus.

Seluruh alat-alat yang digunakan terlebih dahulu dikalibrasi, termasuk spektrofotometri UV-Vis dengan cara memasukkan aquades ke dalam kuvet lalu di set absorbansinya hingga menunjukkan zero, setelah itu kuvet di set lagi dengan

menggunakan sampel enzim, pada penelitian ini, kontrol enzim berupa kontrol negatif.

b. Pembuatan Medium Padat Horikoshi's II

Medium padat Horikoshi 's II disiapkan dengan cara menimbang 1g/l pati singkong, 0,5 g/l pepton, 0,5 g/l *yeast extract*, 0,1 g/l K_2HPO_4 , 0,02 g/l $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$, 0,03 g/l *fenolftalein*, 0,01 g/l *methyl orange*, 1,5 g/l agar. Kemudian semua bahan yang telah ditimbang tersebut dimasukkan ke dalam Erlenmeyer, dilarutkan dengan akuades sebanyak 80 mL dan dipanaskan di atas bunsen (larutan 1). Kemudian sebanyak 0,25 g/l Na_2CO_3 dimasukan ke dalam Erlenmeyer dan dilarutkan dengan akuades sebanyak 25 mL (larutan 2), disiapkan juga akuades sebanyak 5 mL yang telah dimasukkan ke dalam Erlenmeyer (larutan 3). Larutan (1), larutan (2) dan larutan (3) kemudian disterilisasi dengan menggunakan *autoclave* pada suhu $121^\circ C$ dengan tekanan 1 atm selama 15 menit. Medium Horikoshi's II disiapkan di dalam *laminar air flow* dengan mencampurkan larutan I sebanyak 80 mL, Larutan II sebanyak 17 mL dan larutan III sebanyak 3 mL. Setelah medium Horikoshi's II tercampur rata, medium di cek pH nya, yakni harus pH 10, kemudian medium Horikoshi's II dimasukkan ke dalam beberapa buah tabung reaksi dan dibiarkan dalam posisi tabung sengaja

dimiringkan atau dimasukkan ke dalam cawan *plate* hingga memadat pada suhu kamar.

c. Pembuatan Medium Cair Horikoshi's II

Medium cair *starter* digunakan untuk adaptasi awal pertumbuhan bakteri pada medium cair. Sedangkan untuk kultur digunakan medium cair Horikoshi's II dengan volume yang lebih besar. Medium cair yang digunakan yaitu medium Horikoshi's II yang mengandung pati singkong, pepton, *yeast extract*, K_2HPO_4 , $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ tanpa fenolftalein, metil jingga dan agar.

d. Penumbuhan Bakteri Amilolitik.

Medium padat Horikoshi's II diinokulasi dengan isolat bakteri amilolitik yaitu LTi-A2.4. Inokulasi dilakukan dengan metode zig-zag. Medium Horikoshi's II diinkubasi di dalam inkubator selama 24 jam. Bakteri yang menghasilkan zona bening atau *halozone* berwarna keunguan atau kuning disekitar koloni merupakan bakteri yang menghasilkan enzim CGT-ase Park *et al.*, 1989).

2. 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. 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. Untuk penentuan konstanta kinetik enzim CGT-ase, *soluble starch* yang digunakan diganti dengan konsentrasi 0,25%, 0,5%, 0,75%, 1,25% dan 1,50% dengan cara pembuatan yang sama.

b. 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 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.

b. Penentuan Pertumbuhan Sel

Penentuan pertumbuhan sel digunakan untuk mengetahui pertumbuhan dari sel bakteri dengan cara mengencerkan sampel kultur. Sebanyak 0,3 mL kultur dimasukkan ke tabung reaksi, lalu ditambahkan 2,7 mL akuades, dan diukur serapannya menggunakan *spektrofotometer UV-VIS* pada panjang gelombang 600 nm.

c. Produksi Enzim CGT-ase

Produksi enzim CGT-ase dilakukan dengan menyiapkan medium *starter* dan medium kultur yang akan digunakan. *Starter* disiapkan dengan menginokulasikan 2 ose isolat ke dalam 5 ml medium cair Horikoshi's II (tanpa fenolftalein, metil jingga dan agar), kemudian diinkubasi pada *shaker* dengan kecepatan 140 rpm selama 17 jam (*overnight*: 16-20 jam). *Starter* selanjutnya digunakan untuk diinokulasikan ke dalam medium kultur.

Medium kultur sebanyak 100 ml yang telah disiapkan, diinokulasikan sebanyak 1 mL *starter* kemudian diinkubasi pada *shaker incubator* dengan kecepatan 105 rpm selama 36 jam dan diproduksi setelah 36 jam. Proses produksi dilakukan pada sampel

kultur dengan cara sentrifugasi selama 30 menit dengan kecepatan 5000 rpm untuk mendapatkan ekstrak kasar enzim CGT-ase yang kemudian dapat diuji aktivitasnya.

d. Uji Aktivitas Ekstrak Kasar Enzim CGT-ase (Kaneko *et al.*, 1987 dan Alves-Prado *et al.*, 2008)

Sebanyak 100 μL larutan enzim ditambahkan 800 μL *soluble starch* 1% yang disiapkan dalam *buffer* asetat 0.1 M pH 5.5 diinkubasi selama 10 menit pada suhu 55°C di dalam *waterbath*. Kemudian ditambahkan 4 mL Na_2CO_3 0.25 M dan 0.1 mL larutan *fenoltalein* 1 mM. Absorbansi diukur pada λ_{maks} 550 nm. Untuk kontrol, enzim diinaktifkan terlebih dahulu pada suhu 100°C selama 30 menit. Selanjutnya diperlakukan sama seperti sampel.

e. Uji Kadar Protein Enzim CGT-ase

Sebanyak 100 μ L larutan enzim ditambahkan 0,9 ml akuades dan ditambah 0,5 ml pereaksi D, kemudian diaduk-aduk dan didiamkan selama 30 menit pada suhu kamar, lalu absorbansinya pada λ_{maks} 600 nm. Untuk kontrol, enzim diganti dengan akuades. Selanjutnya diperlakukan sama seperti sampel.

f. Studi Pendahuluan Produksi Enzim CGT-ase

Studi pendahuluan produksi enzim CGT-ase dilakukan dengan mengganti sumber nitrogen pada medium Horikoshi's II dengan variasi *yeast extract-urea*, *yeast extract- yeast extract*, *yeast extract-pepton*, pepton - pepton. Dari kultur pada medium tersebut, dilakukan pengukuran aktivitas dan pengukuran kadar protein enzim CGT-ase pada waktu 24 jam, 48 jam dan 72 jam sejak kultur.

g. Uji Kestabilan Aktivitas Ekstrak Kasar Enzim CGT-ase

Ekstrak kasar enzim CGT-ase disimpan di suhu 4°C, kemudian diukur aktivitas CGT-ase dan kadar proteinnya setiap 24 jam sejak kultur selama 5 hari berturut-turut.

h. Pemurnian Enzim CGT-ase

Ekstrak kasar enzim CGT-ase sebanyak 60 ml, dipekatkan menggunakan alat ultrafiltrasi dengan cara memasukkan 10 ml ekstrak kasar enzim ke dalam *tube* Centricon yang memiliki ukuran rotor 28, dengan kecepatan 5000 rpm, dan suhu 4°C, kemudian di ultrafiltrasi selama 20 menit dengan menggunakan alat ultrafiltrasi Hitachi CF 16 RX11 (*Himac compact centrifuges RX11 series*). Hanya enzim yang berukuran lebih dari 30000 Dalton yang tertinggal di atas membran ultrafiltrasi. Enzim hasil pemurnian yang telah dipekatkan kemudian dikarakterisasi.

i. Karakteristik Enzim (Tonkova *et al.*, 2011).

Enzim yang diperoleh dari fraksi ultrafiltrasi, dikarakteristik dengan beberapa pengamatan meliputi: Pengaruh pH terhadap aktivitas enzim, pengaruh suhu terhadap aktivitas enzim, penentuan konstanta kinetik dan substrat spesifitas dari beberapa jenis pati.

a. Pengaruh pH Terhadap Aktivitas CGT-ase

Pengaruh pH terhadap aktivitas CGT-ase diamati dengan *buffer* sitrat 0.1 M untuk pH 4.5, *buffer* asetat 0.1 M untuk pH 5.5 dan *buffer* fosfat untuk interval pH 6.0 – 6.5.

b. Pengaruh Temperatur terhadap Aktivitas CGT-ase

Setelah diperoleh dua pH yang menghasilkan aktivitas unit terbaik pada karakterisasi pengaruh pH terhadap aktivitas CGT-ase, selanjutnya dilakukan uji aktivitas enzim dengan variasi temperatur pada interval 45°C – 65°C saat inkubasi enzim CGT-ase.

c. Penentuan Konstanta Kinetik CGT-ase

Konstanta kinetika ditentukan dengan mengganti konsentrasi *soluble starch* sebagai substrat dengan konsentrasi 0,25%, 0.5%, 0.75%, 1,25 % dan 1.50% menggunakan pH dan temperatur terbaik yang diperoleh saat karakterisasi sebelumnya.

d. Penentuan Substrat Spesifitas CGT-ase

Penentuan substrat dari berbagai jenis pati menggunakan pati singkong, pati ubi jalar, *soluble starch* dan pati jagung pada pH dan temperatur terbaik yang diperoleh pada karakterisasi sebelumnya.

D. Diagram Alir Prosedur Penelitian