

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 L_{Ti}-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