

III. METODE PENELITIAN

A. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Biokimia dan Laboratorium Instrumentasi Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lampung, pada bulan September 2009 sampai dengan April 2010.

B. Alat dan Bahan

Alat- alat yang digunakan pada penelitian ini antara lain inkubator, laminar air flow, autoklaf (*speed clave*) model S-90N, shaker (*orbit environ shaker*), jarum ose, sentrifuse dingin (*cold plate*), tabung sentrifuga, pH meter, penangas air, lemari pendingin, termometer, neraca analitik, kolom kromatografi, spektrofotometer UV-Vis, dan peralatan umum laboratorium lainnya.

Bahan-bahan yang digunakan adalah medium NA (*Nutrient Agar*), *yeast* ekstrak, pati, pereaksi DNS (*dinitrosalisilic acid*), pereaksi Iodin, amonium sulfat, buffer pospat, BSA(*Bovine Serum Albumin*), Na_2CO_3 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, CaCl_2 , KH_2PO_4 , $\text{Ba}(\text{OH})_2$, kapas, kasa, Na(K) tartarat, reagen *Folin-Ciocalteu*, kantung selofan, CMC (karboksil metil selulose), akuades, gliserol dan sorbitol.

Mikroorganisme yang digunakan pada penelitian ini adalah jenis bakteri, yaitu *Bacillus subtilis* ITBCCB148 yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi dan Teknologi Fermentasi ITB.

C. Prosedur Penelitian

1. Pembuatan Pereaksi

a. Pembuatan Peraksi Untuk Pengukuran Aktivitas α -amilase Metode *Fuwa*

(1.) Larutan KI : Kedalam labu takar 100 mL, sebanyak 2 gram KI dilarutkan dalam 10 mL aquades, ditambahkan 0,2 gram I_2 , lalu ditambahkan aquades hingga tanda batas.

(2.) Larutan pati : Kedalam labu takar 100 mL, sebanyak 0,1 gr pati dilarutkan dalam 100 mL aquades, dipanaskan hingga larut.

b. Pembuatan Pereaksi Untuk Pengukuran Aktivitas α -amilase Metode *Mandels*

Ke dalam labu takar 100 mL, dimasukkan 1% NaOH, 40% garam Na(k) tartarat, 1% DNS (*dinitrosalisilic acid*), 0,2% fenol dan 0,05% Na_2SO_3 kemudian dilarutkan dengan 100 mL aquades hingga tanda batas (Mandels *et al.*, 1976).

**c. Pembuatan Pereaksi Untuk Pengukuran Kadar Protein
Metode *Lowry***

- 1.) Pereaksi A : 2 gram Na_2CO_3 dilarutkan dalam 100 ml
NaOH 0,1 N
- (2.) Pereaksi B : 5 ml larutan $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0,1 %
ditambahkan ke dalam 5 ml larutan
Na(K)tartarat 1%
- (3.) Pereaksi C : 100 ml pereaksi A dan 2 ml pereaksi B
- (4.) Pereaksi D : reagen *Folin-Ciocalteu* diencerkan
dengan aquades dengan perbandingan 1:1
- (5.) Larutan standar : larutan BSA (*Bovine Serum Albumin*)
diencerkan hingga mengandung 0.100 –
0.250 mg/ml.

2. Produksi enzim α -amilase

Media inokulum dan media fermentasi yang digunakan adalah media yang mengandung *yeast ekstrak* 0,5%, pati 0,5%, KH_2PO_4 0,05%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,02%, dan $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,01% yang dilarutkan dalam akuades. Media disterilisasi pada suhu 121°C , tekanan 1 atm, selama ± 15 menit dalam autoklaf. *Bacillus subtilis* ITBCCB148 dari media agar miring dipindahkan ke dalam media inokulum secara aseptis, lalu dikocok dalam *shaker incubator* dengan kecepatan 150 rpm pada suhu 32°C selama 24 jam. Selanjutnya media inokulum

dipindahkan ke media fermentasi dengan kecepatan 150 rpm pada suhu 32⁰C selama 72 jam (Yandri *et al.*, 2000).

3. Isolasi dan Pemurnian Enzim α -amilase

A. Isolasi Enzim α -amilase

1. Sentrifugasi

Sentrifugasi merupakan tahap awal pemurnian enzim. Metode ini digunakan untuk memisahkan enzim ekstraseluler dari sisa-sisa sel. Sentrifugasi akan menghasilkan filtrat yang jernih dan endapan yang terikat kuat pada dasar tabung, yang kemudian dipisahkan secara manual.

Media fermentasi yang berisi *Bacillus subtilis* ITBCCB148 yang telah dikocok menggunakan *shaker* inkubator selama 72 jam disentrifugasi pada 5000 rpm, suhu 4⁰C selama 20 menit. Filtrat yang diperoleh merupakan ekstrak kasar enzim yang selanjutnya dilakukan uji aktivitas amilase dengan metode *Fuwa* dan pengukuran kadar protein metode *Lowry*.

2. Pengujian aktivitas α -amilase dan kadar protein

Uji aktivitas dengan metode *Fuwa* dan penentuan kadar protein dengan metode *Lowry* dilakukan pada tahap isolasi, pemurnian dengan amonium sulfat, dialisis, kromatografi kolom, dan karakterisasi enzim baik sebelum maupun sesudah penambahan sorbitol dan gliserol.

a. Pengujian aktivitas α -amilase metode *Fuwa*

Aktivitas enzim α -amilase ditentukan oleh metode *Fuwa* (Fuwa, 1954). Sebanyak 250 μ L enzim ditambahkan 250 μ L larutan pati 0,1%, dan diinkubasi pada suhu 60⁰C selama 10 menit. Reaksi dihentikan dengan menambahkan 250 μ L HCl 1 N dan kemudian ditambahkan 250 μ L larutan KI dan 4 mL aquades kedalam tabung reaksi. Uji ini positif bila menghasilkan larutan kompleks berwarna kuning, kemudian absorbansi diukur dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 600 nm. Kontrol dibuat dengan cara yang sama tetapi menggunakan enzim yang sudah diinaktifkan.

b. Pengujian aktivitas α -amilase Metode *Mandels*

Pengujian aktivitas enzim α -amilase dengan metode *Mandels* dilakukan berdasarkan glukosa yang terbentuk. Uji ini dilakukan pada tahap karakterisasi enzim hasil isolasi dan penentuan K_M dan V_{Maks} , yaitu dengan cara sebanyak 0,5 mL enzim ditambah 0,5 mL larutan pati 0,1%, lalu diinkubasi selama 30 menit pada suhu 60 °C. Setelah itu ditambahkan 2 mL pereaksi DNS, dididihkan selama 10 menit pada penangas air kemudian didinginkan. Setelah dingin serapan diukur pada panjang gelombang 550 nm. Kadar glukosa yang terbentuk ditentukan dengan menggunakan kurva standar glukosa.

c. Penentuan kadar protein metode *Lowry*

Kadar protein enzim ditentukan dengan metode *Lowry et al* (1951). Sebanyak 0,1 mL enzim ditambahkan 0,9 mL akuades lalu direaksikan dengan 5 mL pereaksi C, lalu campuran diaduk secara merata dan dibiarkan selama 10 menit pada suhu kamar. Setelah itu ditambahkan dengan cepat 0,5 mL pereaksi D dan diaduk dengan sempurna, didiamkan selama 30 menit pada suhu kamar. Untuk kontrol, enzim diganti dengan 1 mL akuades, selanjutnya perlakuannya sama seperti sampel. Serapan diukur menggunakan spektrofotometer UV-VIS pada λ 750 nm. Untuk menentukan konsentrasi protein enzim digunakan kurva standar BSA (*Bovine Serum Albumin*)

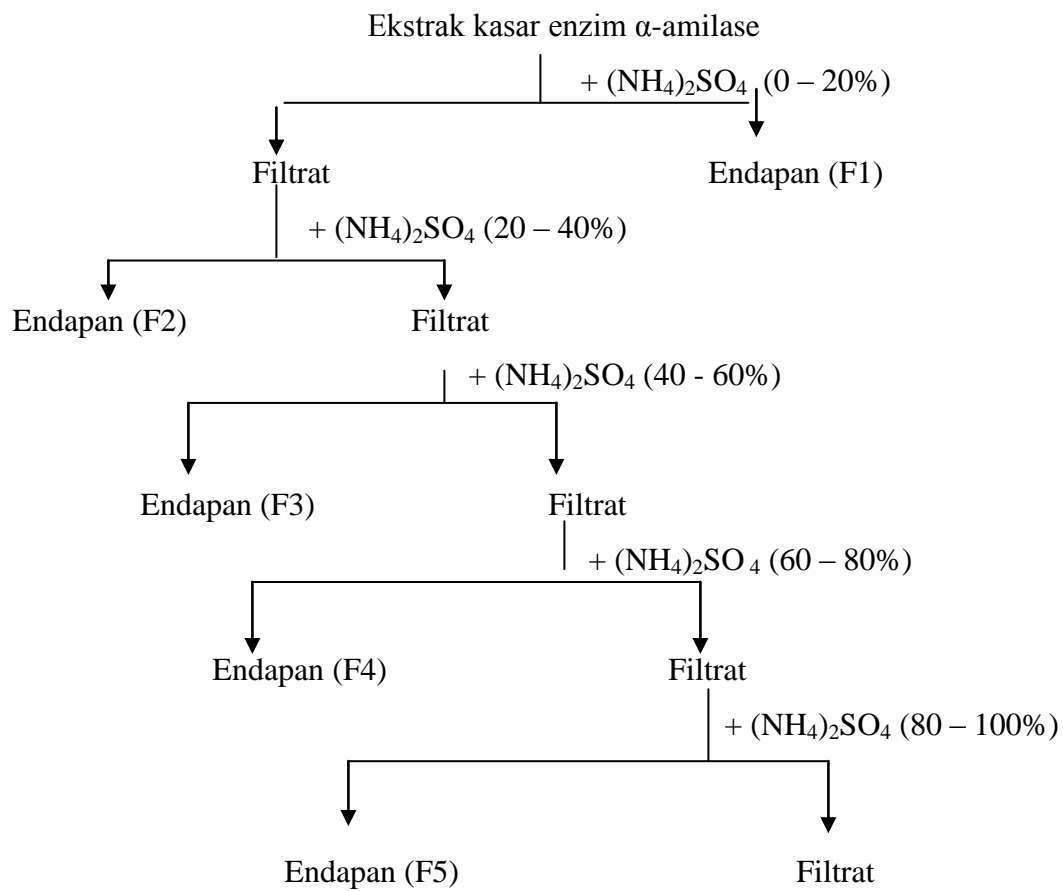
4. Pemurnian Enzim

a. Fraksinasi dengan Amonium Sulfat $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$

Ekstrak kasar enzim yang diperoleh, diendapkan dengan garam amonium sulfat. Skema proses pengendapan dengan penambahan amonium sulfat dapat dilihat pada Gambar 8. Secara terfraksi endapan protein enzim yang didapatkan, dipisahkan dari cairannya dengan cara sentrifugasi pada kecepatan 5000 rpm selama 20 menit dengan suhu 4°C. Kemudian endapan yang diperoleh dilarutkan dalam buffer pospat pH 6; 0,1 M. Hasil fraksinasi

dengan amonium sulfat ini, kemudian diuji aktivitasnya dengan metode *Fuwa* dan kadar proteinnya dengan metode *Lowry*.

Skema proses fraksinasi dengan penambahan garam amonium sulfat dijelaskan pada Gambar 4.



Gambar 4. Skema proses fraksinasi dengan amonium sulfat.

b. Dialisis

Endapan enzim yang telah dilarutkan dari tiap fraksi amonium sulfat yang mempunyai aktivitas yang tinggi, dimasukkan dalam kantung selofan dan didialisis dengan bufer pospat pH 6; 0,01 M selama \pm 40 jam dengan menggunakan *stirer* dalam suhu dingin. Kemudian hasil dialisis diuji aktivitas enzim dengan menggunakan metode *Fuwa* dan kadar proteinnya ditentukan dengan menggunakan metode *Lowry*.

c. Kromatografi Kolom

Proses kromatografi yang dilakukan adalah kromatografi penukar ion dengan menggunakan CMC. Proses pengerjaannya sebagai berikut :

a. Pengembangan gel

CMC disuspensikan dalam akuades dan dibiarkan mengembang pada suhu kamar. Partikel halus dibuang dengan cara dekantasi. Setelah itu ditambahkan NaOH 0,5 M dan HCl 0,5 M kemudian distabilkan dengan buffer awal.

b. Penentuan buffer awal

CMC yang sudah siap, distabilkan menggunakan buffer pospat 0,1 M dengan variasi pH yaitu 5,0; 5,5; 6,0; 6,5; 7,0; 7,5; dan 8,0. Kemudian ke dalam matriks ditambahkan 0,5 mL enzim hasil dialisis dan dielusi dengan

buffer yang sesuai, diaduk 5-10 menit. Campuran selanjutnya di dekantasi dan diuji aktivitas enzimnya.

c. Penentuan buffer elusi

Penentuan buffer elusi dilakukan sama seperti di atas. Setelah CMC distabilkan menggunakan buffer pospat 0,1 M dan kemudian ke dalam masing – masing tabung ditambah 0,5 mL enzim, kemudian masing-masing tabung dielusi dengan buffer pospat dengan pH yang divariasikan, di aduk 5-10 menit. Campuran tersebut selanjutnya dibiarkan hingga CMC mengendap dan supernatan didekantasi dan diuji aktivitas enzimnya.

d. Pembuatan kolom gel

Pembuatan kolom gel dilakukan dengan membubuhi wool glass dibagian bawah. Kolom dipasang tegak lurus, kemudian gel yang telah ditimbang dimasukkan ke dalam kolom dengan bantuan batang pengaduk dan diusahakan jangan sampai ada gelembung udara di dalam kolom. Kran pengatur tetesan dibuka sedemikian rupa sehingga kecepatan tetes 15-20 mL/jam.

e. Penempatan cuplikan ke dalam kolom

Cuplikan (larutan enzim) diteteskan ke permukaan kolom secara perlahan-lahan.

f. Penampungan eluen

Eluen ditampung dengan volume 15- 20 ml.

g. Pengukuran eluen

Pengukuran eluen dilakukan dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 280 nm, selanjutnya absorbansi setiap fraksi diplotkan terhadap nomor fraksi.

h. Pengukuran aktivitas enzim

Setiap fraksi pada pola protein yang diperoleh dari pengukuran eluen di atas ditentukan aktivitasnya. Semua fraksi yang menunjukkan aktivitas enzim dikumpulkan menjadi satu, lalu ditentukan aktivitas unit dan aktivitas spesifiknya.

5. Karakterisasi Enzim

a. Penentuan Suhu Optimum Sebelum Penambahan Polioli

Untuk mengetahui temperatur optimum kerja enzim dilakukan dengan variasi suhu antara 55, 60, 65, 70, 75, dan 80°C, kemudian dilakukan pengukuran aktivitas enzim dengan metode *Fuwa*.

b. Penentuan pH Optimum Sebelum Penambahan Polioli

Untuk mengetahui pH optimum dari enzim hasil pemurnian digunakan buffer pospat 0,01 M dengan variasi pH yaitu 5; 5,5; 6; 6,5; 7; 7,5; 8,0; dan 8,5 . Kemudian dilakukan pengukuran aktivitas enzim dengan metode *Fuwa*.

c. Penentuan Nilai K_M dan V_{Maks} Enzim Sebelum penambahan Polioliol

Nilai K_M dan V_{Maks} enzim yang telah dimurnikan ditentukan dengan memvariasikan konsentrasi substrat yaitu 0,1; 0,2; dan 0,4, 0,6, 0,8 dan 1%. Dengan menggunakan data hasil penentuan pH dan suhu optimum, dilakukan pengukuran aktivitas enzim dengan metode *Mandels*. Kemudian data diplotkan kedalam kurva *Lineweaver-Burk* untuk penentuan nilai K_M dan V_{Maks} .

d. Penentuan pH optimum setelah penambahan polioliol

Larutan polioliol ditambahkan pada enzim hasil pemurnian dengan perbandingan (1 : 1), (enzim : polioliol) untuk konsentrasi polioliol masing-masing 0,5; 1,0; dan 1,5 M. Selanjutnya enzim dikondisikan pada variasi pH 5,0; 5,5; 6,0; 6,5; 7,0; 7,5; 8,0; dan 8,5. Kemudian dilakukan pengukuran aktivitas unit enzim dengan metode *Fuwa*. Kontrol dibuat dengan perlakuan yang sama, yaitu diinkubasi pada waktu dan pH yang sama tetapi menggunakan enzim yang telah diinaktifkan. Enzim kontrol ini digunakan untuk mengetahui ada tidaknya pengaruh penambahan polioliol terhadap aktivitas sisa enzim.

e. Penentuan Suhu Optimum Setelah Penambahan Polioliol

Larutan polioliol ditambahkan pada enzim hasil pemurnian dengan perbandingan 1 : 1, (enzim : polioliol) untuk konsentrasi polioliol masing–masing 0,5M; 1M; 1,5 M. Selanjutnya sebanyak 250 μ L campuran enzim–polioliol, kemudian di inkubasi selama 10 menit pada suhu 55, 60, 65, 70, 75 dan 80⁰C dalam *waterbath*. Reaksi dihentikan dengan menambahkan 250 μ L HCl 1 N dan ditambahkan 250 μ L larutan KI dan 4 ml aquades. Sebagai kontrol, enzim yang telah diinaktifkan diinkubasi pada suhu dan waktu yang sama.

f. Penentuan K_M dan V_{Maks} Setelah Penambahan Polioliol

Nilai K_M dan V_{Maks} enzim setelah penambahan polioliol ditentukan dengan memvariasikan substrat yaitu 0,1; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; dan 1% . Dengan menggunakan data hasil penentuan pH dan suhu optimum enzim setelah penambahan polioliol, aktivitas enzim ditentukan dengan metode *Mandels*. Kemudian data diplotkan ke dalam kurva *Lineweaver – Burk* untuk penentuan nilai K_M dan V_{Maks} .

g. Uji stabilitas termal enzim (Yang *et al.*, 1996)

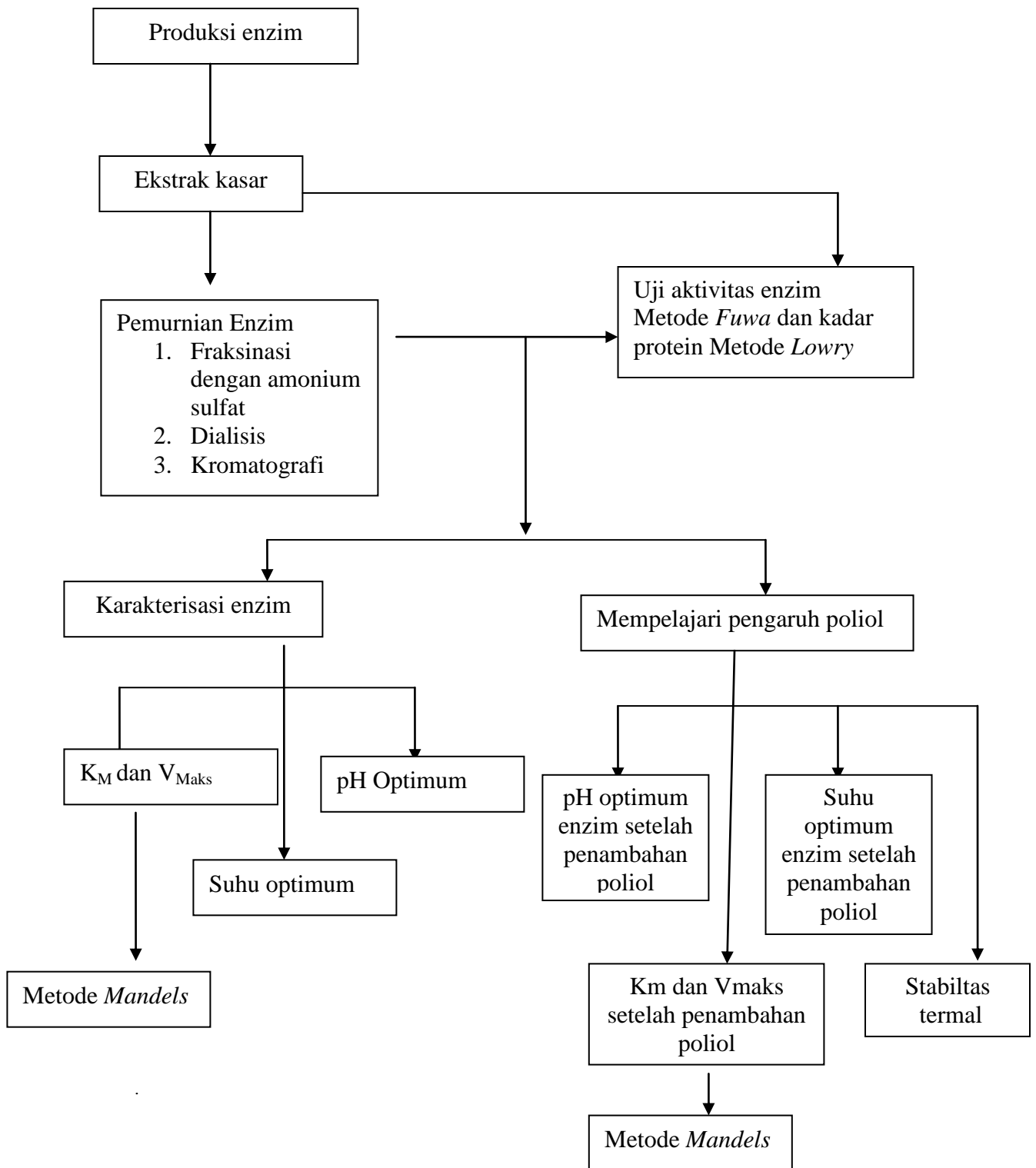
Penentuan stabilitas termal enzim dilakukan dengan mengukur aktivitas sisa enzim setelah diinkubasi selama suhu dan pH tertentu (suhu dan pH optimum). Caranya adalah dengan mengukur aktivitas enzim setelah proses pemanasan selama waktu tertentu sesuai dengan pengukuran aktivitas enzim.

Aktivitas awal enzim (tanpa perlakuan) di beri nilai 100%.

$$\text{Aktivitas sisa} = \frac{\text{Aktivitas enzim setelah perlakuan}}{\text{Aktivitas enzim awal (tanpa perlakuan)}} \times 100\%$$

(Virdianingsih, 2002)

Diagram alir penelitian dapat dilihat pada Gambar 5.



Gambar 5. Diagram alir Penelitian