

### III. METODOLOGI PENELITIAN

#### A. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan Juli 2012 sampai bulan Desember 2012 di Laboratorium Biokimia Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lampung.

#### B. Alat dan Bahan

Alat-alat yang akan digunakan dalam penelitian ini antara lain spektrofotometer UV-Vis, sentrifuga, mikropipet, shaker (*orbit environ shaker*), laminar air flow, pH meter, pH universal, autoklaf, jarum ose, pembakar spiritus, neraca analitik dan alat-alat gelas laboratorium lainnya.

Bahan-bahan yang akan digunakan adalah pati singkong, glukosa, fruktosa, arabinosa, gula, pepton, Yeast Ekstrak,  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ,  $\text{NaCl}$ ,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{FeSO}_4$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{ZnSO}_4$ ,  $\text{NaOH}$ , pereaksi iodin, BSA (*Bovine Serum Albumin*),  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , Na-K- tartarat,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , reagen *folin ciocelteau*, alkohol, spiritus, akuades serta isolat LTE-6.

## **C. Prosedur Penelitian**

### **1. Peremajaan Isolat LTE-6**

Peremajaan isolat LTE-6 dilakukan dengan cara memasukan 2,8 gram Nutrien Agar (NA) dalam 100 ml air. Larutan dipanaskan hingga larutan jernih dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi sebanyak 5 mL. kemudian dilakukan sterilisasi, dimiringkan dan didiamkan pada suhu kamar. Setelah media memadat dilakukan inokulasi bakteri isolat LTE-6 pada media agar miring. Kemudian diinkubasi selama 3 hari dalam inkubator.

### **2. Penyiapan Medium dan Perekasi**

#### **a. Penyiapan Medium Kultur**

Medium yang digunakan adalah medium yang dalam setiap 100 ml mengandung 1% (w/v) pati singkong, 0,05% (w/v)  $K_2HPO_4$ , dan 0,05% (w/v)  $KH_2PO_4$ , kemudian medium diatur pada pH 6.0

#### **b. Pembuatan Perekasi untuk Pengukuran Aktivitas Enzim Amilase Metode *Fuwa* (Fuwa, 1954)**

Pembuatan perekasi iodine yaitu dengan cara melarutkan 3 g KI dengan sedikit akuades di dalam labu takar 100 mL, lalu ditambahkan 0,3 g  $I_2$  dan ditambahkan dengan akuades hingga tanda batas.

Pembuatan larutan pati yaitu dengan cara memasukkan 0,5 gram pati ke dalam labu takar 100 mL kemudian ditambahkan 0,1 M buffer asetat hingga tanda batas, lalu dipanaskan.

**c. Pembuatan Pereaksi *Lowry* untuk Pengukuran Kadar Protein (*Lowry et al., 1951*).**

Pereaksi *Lowry* terdiri atas 4 macam, yang meliputi pereaksi A,B,C, dan D.

Pereaksi A dapat dibuat dengan cara melarutkan 2 g  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  dengan 100 mL

$\text{NaOH}$  0,1N. Pereaksi B dapat dibuat dengan cara menambahkan 5 ml

$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  1% (w/v) ke dalam 5 mL larutan Na-K-tartarat 1%. Pereaksi C

dapat dibuat dengan cara menambahkan 2 mL pereaksi B dengan 100 mL pereaksi

A. Pereaksi D dapat dibuat dengan cara mengencerkan reagen *folin-ciocelteau*

dengan akuades 1:1.

**3. Pembuatan Medium Nutrien Broth (NB)**

Medium NB dibuat dengan komposisi 0,3% (w/v) ekstrak ragi, 0,5% (w/v) pepton

dan 0,5 %  $\text{NaCl}$ , kemudian disterilisasi. Medium NB digunakan sebagai

penyiapan inokulum (starter) dengan cara menginokulasikan 1 ose mikroba dari

isolat LTE-6 masing-masing ke dalam erlenmeyer yang telah berisi medium NB

cair steril yang telah berusia 3 hari kedalam masing-masing erlenmeyer yang

berisi 5 mL medium NB. Setelah diinokulasi, biakan diinkubasi pada *shaker*

dengan kecepatan 95 rpm pada suhu  $37^\circ\text{C}$  selama 1 malam (*overnight*: 16-20

jam).

**4. Penentuan Pertumbuhan Sel (OD)**

Penentuan Pertumbuhan sel bakteri digunakan untuk mengetahui pertumbuhan

dari sel bakteri. Sebanyak 0,3 mL kultur dimasukkan kedalam tabung reaksi

kemudian ditambahkan 2,7 mL akuades lalu diukur serapannya menggunakan

spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 600 nm.

## 5. Penentuan Kadar Protein

Metode *Lowry* digunakan untuk mengetahui kadar protein (*Lowry et al.*, 1951). Sebanyak 0,1 mL 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. Untuk kontrol sama dengan perlakuan pada sampel. Pengukuran serapan dilakukan pada  $\lambda$  600 nm. Konsentrasi protein enzim ditentukan dengan menggunakan kurva standar Bovine Serum Albumin (BSA).

## 6. Penentuan Aktivitas Enzim

Aktivitas  $\alpha$ -amilase ditentukan oleh metode iodine (*Fuwa*, 1954). Pati *soluble* 0,5% di dalam buffer asetat 0,1 M sebanyak 300  $\mu$ L ditambahkan dengan enzim sebanyak 100  $\mu$ L dipanaskan pada suhu 55°C selama 10 menit lalu ditambahkan 0,2 M HCl sebanyak 4 mL, ditambahkan larutan iodine 0,5 mL, dan ditambahkan H<sub>2</sub>O hingga volumenya 10 mL, lalu diukur dengan spektrofotometer UV-Vis pada  $\lambda_{\max}$  700 nm. Kontrol dibuat dengan cara memanaskan enzim pada suhu 100°C selama 30 menit. Aktivitas unit dihitung dari jumlah enzim yang mereduksi warna biru 10% permenit.

## 7. Variasi komposisi

### a. Sumber Karbon (C)

Sumber C yang digunakan adalah glukosa, fruktosa, arabinosa, dan gula. Masing-masing sumber C sebesar 0,5% (w/v) ditambahkan ke dalam medium standar. Medium kultur dengan komposisi tersebut kemudian diinokulasi dengan starter

dan ditumbuhkan seperti yang dijelaskan pada prosedur 4. Sampling dilakukan pada rentang waktu 12, 24, 36, 48, 60, dan 72 jam. Sampel kultur diukur nilai OD, kadar protein, dan aktivitas enzim seperti pada prosedur 4, 5 dan 6.

#### **b. Sumber Nitrogen (N)**

Sumber N yang digunakan adalah pepton,  $\text{NaNO}_3$ ,  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , dan ekstrak ragi.

Masing-masing sumber N sebanyak 0,5% (w/v) ditambahkan ke dalam medium tanpa perlakuan. Medium kultur dengan komposisi tersebut kemudian diinokulasi dengan starter dan ditumbuhkan seperti yang dijelaskan pada prosedur 4.

Sampling dilakukan pada setiap 12 jam selama 72 jam. Sampel kultur diukur nilai OD, kadar protein, dan aktivitas enzim seperti pada prosedur 4, 5 dan 6.

#### **c. Ion Logam**

Sumber ion logam yang digunakan adalah  $\text{MgSO}_4$ ,  $\text{ZnSO}_4$ ,  $\text{MnSO}_4$ , dan  $\text{FeSO}_4$ .

Masing-masing sumber ion logam sebanyak 0,01 % (w/v) ditambahkan ke dalam medium tanpa perlakuan. Medium kultur dengan komposisi tersebut kemudian diinokulasi dengan starter dan ditumbuhkan seperti yang dijelaskan pada prosedur 4. Sampling dilakukan pada rentang waktu 12, 24, 36, 48, 60, dan 72 jam.

Sampel kultur diukur nilai OD, kadar protein, dan aktivitas enzim seperti pada prosedur 4, 5 dan 6. Untuk sumber ion logam terbaik kemudian dilakukan uji variasi pH.

#### **d. Variasi pH**

Medium yang digunakan untuk menginokulasi bakteri divariasikan pHnya yaitu pH 5, pH 6, pH 7 dan pH 8. Medium kultur dengan komposisi tersebut kemudian diinokulasi dengan starter dan ditumbuhkan seperti yang dijelaskan pada prosedur

4. Sampling dilakukan pada rentang waktu 12, 24, 36, 48, 60, 72 jam. Sampel kultur diukur nilai OD, kadar protein dan aktivitas enzim seperti pada prosedur 3, 5 dan 6.