

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Jenis Penelitian

Penelitian yang dilakukan termasuk penelitian dasar dengan metode penelitian eksperimen. Penelitian eksperimen adalah penelitian yang dilakukan dengan mengadakan manipulasi terhadap objek penelitian serta adanya kontrol terhadap variabel. Tujuan dari penelitian eksperimen adalah untuk menyelidiki ada-tidaknya hubungan sebab akibat, serta seberapa besar hubungan sebab akibat tersebut dengan cara memberikan perlakuan-perlakuan tertentu pada kelompok eksperimen dan menyediakan kontrol sebagai perbandingan (Hasan, 2004).

B. Desain Penelitian

Penelitian ini dilakukan melalui dua tahap yaitu tahap I dan tahap II. Tahap I merupakan uji pendahuluan meliputi tahap persiapan, pengamatan morfologi isolat dan pembuatan kurva standar glukosa. Kadar gula pereduksi dalam sampel di ukur dengan metode DNS untuk mengetahui kadar glukosa hasil hidrolisis amilase. Kadar gula pereduksi ditentukan melalui pembuatan kurva standar glukosa yang menyatakan hubungan antara nilai absorbansi spektrofotometer λ 540 nm sebagai sumbu x dan kadar glukosa sebagai sumbu y.

Pada tahap II merupakan uji enzimatik terdiri dari proses produksi enzim oleh kedua isolat *Bacillus subtilis* dengan suhu inkubasi yang bervariasi. Variasi suhu yang digunakan adalah pada suhu ruang, 30 °C, 35 °C, 40 °C, 45 °C, 50 °C, 60 °C,

70 °C, 80 °C dan 90 °C. Setelah diperoleh kondisi optimum suhu produksi amilase, kemudian enzim akan di ekstrak sehingga didapatkan enzim amilase kasar. Enzim tersebut diuji aktivitasnya dengan variasi suhu dan pH, variasi suhu yang digunakan adalah 35 °C, 40 °C, 45 °C, 55 °C, 65 °C dan 75 °C . Setelah didapatkan kondisi suhu optimum aktivitas enzim, suhu tersebut digunakan pada perlakuan aktivitas enzim variasi pH. Adapun variasi pH yang digunakan diantaranya pH 5, 6, 7, 8 dan 9. Parameter yang digunakan dalam penelitian ini adalah kadar glukosa yang diketahui melalui metode DNS.

Rancangan penelitian menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL), dengan faktor lingkungan yang terkontrol. Pada tahap produksi enzim dilakukan dengan sembilan perlakuan dengan tiga replikasi, begitupun untuk tahap aktivitas enzim baik untuk pengaruh variasi suhu inkubasi dan pH reaksi.

C. Sampel

Adapun yang menjadi sampel dalam penelitian ini menggunakan isolat bakteri termofilik amilolitik yaitu *Bacillus subtilis* beserta ekstrak amilase kasar pada *Bacillus subtilis*.

D. Waktu dan Lokasi Penelitian

Penelitian ini dilakukan mulai bulan Maret sampai Juli 2012 di Laboratorium Mikrobiologi Jurusan Pendidikan Biologi, Fakultas Pendidikan Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Pendidikan Indonesia, Jalan Dr. Setiabudhi No. 229 Bandung.

Tri Ekawati Heryanto, 2012

Penentuan Aktivitas Amilase Kasar Termofil *Bacillus Subtilis* Isolat Gunung Darajat Garut, Jawa Barat

Universitas Pendidikan Indonesia | repository.upi.edu

E. Alat dan Bahan Penelitian

Pada penelitian ini menggunakan peralatan dan bahan yang terdapat di Laboratorium Mikrobiologi Universitas Pendidikan Indonesia. Daftar alat dan bahan disajikan pada Lampiran I.

F. Prosedur Penelitian

1. Penelitian Tahap I (Uji Pendahuluan)

a. Pembuatan Stok Kultur

Stok kultur disiapkan dengan cara menggores satu ose dari tiap isolat bakteri yang tumbuh di kultur pemurnian sebelumnya, dalam bentuk media miring pada media Luria Bertani (LB). Kultur diinkubasi selama 24 jam pada suhu 50 °C, selanjutnya disimpan di kulkas untuk stok isolat. Isolat yang akan digunakan adalah *Bacillus subtilis*.

b. Pengamatan Morfologi

Bakteri yang telah diinkubasi selama 24 jam diinokulasikan dengan metode *strike-plate* ke medium LB pada cawan petri. Kemudian diinkubasi selama 24 jam untuk dilihat bentuk morfologinya. Adapun ciri morfologi yang diamati meliputi bentuk, tepian, elevasi, kepekatan dan warna. Pengamatan morfologi bakteri merujuk kepada Capuccino dan Sherman (2005).

c. Pembuatan Larutan Standar Glukosa

Larutan standar glukosa tersebut dibuat dengan membuat larutan-larutan glukosa pada berbagai konsentrasi mulai dari 300, 250, 200, 150, 100 dan 50 µg/ml. Setiap konsentrasi larutan glukosa diambil 1 ml, dan ditambahkan 1,5 ml

larutan DNS, divorteks, kemudian dididihkan selama 5 menit. Campuran didinginkan dengan air mengalir selama 15 menit, ditambah akuabides sebanyak 20 ml, divortex. Campuran lalu diukur absorbansinya pada panjang gelombang 540 nm. Dari tiap hasil absorbansi masing-masing larutan glukosa dengan konsentrasi yang berbeda tersebut dibuat garis regresi yang menunjukkan hubungan linier antara absorbansi dan kadar glukosa. Aktivitas enzim amilase yang akan diuji diplotkan ke kurva standar glukosa agar dapat diketahui berapa konsentrasi glukosa yang diperoleh dari hasil hidrolisis amilum yang dikatalis enzim amilase (Junaidi, 2008 dalam Sianturi, 2008).

2. Penelitian Tahap II

a. Produksi Amilase

1) Pengaruh Suhu Inkubasi terhadap Produksi Amilase dari Isolat

Satu ose kultur bakteri amilolitik dari stok kultur yang berumur 1 hari dimasukkan ke dalam media cair steril untuk perangsang pembentukan amilase. Media cair terbuat dari 2,55 g/L tepung beras, 8,4 g/L yeast ekstrak, 8,1 g/L sodium klorida, lalu semuanya dicampur kemudian diambil 25 ml dimasukkan kedalam Erlenmeyer 50 ml, larutan kemudian disterilisasi dalam *autoclave* 121°C selama 15 menit. Media yang mengandung kultur bakteri diinkubasi pada suhu yang bervariasi yaitu pada suhu ruang, 30 °C, 35 °C, 40 °C, 50 °C, 60 °C, 70 °C, 80 °C dan 90 °C selama 48 jam pada *shaker waterbath* dengan kecepatan 150 rpm lalu diukur kekeruhannya, menggunakan spektrofotometer dengan panjang

gelombang 600 nm, setiap perlakuan dilakukan replikasi masing-masing sebanyak tiga kali (Sumrin *et al.*, 2011).

2) Ekstraksi Enzim Kultur Cair Bakteri

Setelah diinkubasi selama 48 jam, kultur cair bakteri dimasukkan ke dalam tabung eppendorf dan disentrifuge selama 15 menit dengan kecepatan 10.000 rpm. Supernatan yang mengandung ekstrak dari enzim amilase kasar diambil dengan mikropipet untuk di uji aktivitasnya (Sumrin *et al.*, 2011).

b. Uji Enzimatik

1) Pengaruh Suhu Inkubasi Terhadap Aktivitas Amilase Kasar

Pengujian aktivitas amilase menggunakan metode DNS (Miller, 1959). 1 ml filtrat amilase kasar hasil sentrifugasi (supernatan) dimasukkan ke dalam tabung reaksi, lalu ditambahkan larutan pati 1g/100 ml yang dilarutkan dalam buffer sitrat posfat pH 7 lalu diambil sebanyak 1 ml. Larutan pati dan enzim tersebut diinkubasi pada *waterbath* dengan suhu yang bervariasi mulai suhu 35 °C, 40 °C, 45 °C, 55 °C, 65 °C dan 75 °C selama 10 menit. Pada tabung blanko ditambahkan larutan pati 1g/100 ml dalam buffer sitrat fosfat, pH 7 lalu diambil sebanyak 1 ml, kemudian diinkubasi selama 10 menit pada suhu yang bervariasi sama dengan sampel enzim, hanya saja tidak ditambahkan enzim seperti yang dilakukan pada perlakuan. Untuk menghentikan reaksi setelah 10 menit, ke dalam tiap tabung uji ditambahkan 2 ml reagen DNS (1 g 3,5 asam dinitrosalisilat, 20 ml NaOH dan 30 g *sodium potassium tartarate* dalam 100 ml larutan). Tabung dipanaskan hingga mendidih selama 5 menit, didinginkan dengan air mengalir selama 15 menit dan

ditambahkan akuabides sebanyak 20 ml. Tiap larutan dalam tabung uji kemudian dideterminasi intensitas warnanya dengan menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 540 nm. Nilai absorbansinya diplotkan dengan kurva standar glukosa yang dibuat dari larutan glukosa dengan konsentrasi antara 50-300 $\mu\text{g/ml}$ yang telah dibuat sebelumnya. Tiap sampel pengujian aktifitas enzim dibuat ulangnya sebanyak tiga kali (Ajayi *et al.*, 2007 dan Miller, 1959).

2) Pengaruh pH Terhadap Aktivitas Amilase Kasar

Aktivitas amilase ditentukan melalui metode DNS (3,5-dinitro salicylic acid) dengan menggunakan pati sebagai substrat. Filtrat dari kultur enzim amilase kasar digunakan sebagai sampel enzim. Sebanyak 1 ml ekstrak amilase kasar hasil sentrifugasi dimasukkan ke dalam tabung uji, lalu ditambahkan 1% larutan pati yang sudah dilarutkan dalam buffer sitrat posfat dengan variasi pH 5, pH 6, pH 7, pH 8 dan pH 9 sebanyak 1 ml, tiap sampel diinkubasi pada *waterbath* dengan menggunakan suhu optimum dari hasil sebelumnya selama 10 menit, setelah itu ditambahkan masing-masing 2 ml reagen DNS, dididihkan selama 5 menit, didinginkan pada air mengalir selama 15 menit, ditambahkan masing-masing akuades sebanyak 20 ml, divortex dan absorbansinya diukur dengan menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 540 nm. Pada tabung blanko ditambahkan juga larutan pati 1g/100 ml dalam buffer sitrat fosfat, dengan variasi pH yang sama dengan perlakuan lalu diambil sebanyak 1 ml, kemudian diinkubasi pada suhu yang bervariasi sama dengan sampel enzimnya yang aktif selama 10 menit, hanya saja tidak ditambahkan enzim seperti pada perlakuan (Miller, 1959).

3) Pengukuran Aktivitas Amilase Kasar dari *Bacillus subtilis*

Aktivitas amilase ditentukan melalui metode DNS dengan menggunakan pati sebagai substrat. Supernatan dari kultur enzim amilase kasar digunakan sebagai sampel enzim. Aktivitas amilase dihitung berdasarkan data kadar glukosa relatif sebagai mg glukosa yang dihasilkan oleh 1 ml filtrat kasar amilase. Satu unit aktifitas enzim didefinisikan sebagai banyaknya μmol glukosa yang dihasilkan dari hidrolisa pati oleh 1 ml ekstrak kasar amilase selama masa inkubasi. Untuk melihat besarnya satu unit aktifitas enzim tersebut digunakan rumus:

$$AE = \frac{Mg \times 100}{BMg \times MI}$$

di mana :

AE = Aktifitas enzim (Unit/mL filtrat enzim).

MG = Glukosa yang dihasilkan dari reaksi hidrolisa pati.

BMg = Mr Glukosa = 180

MI = Masa Inkubasi = 10 menit (Kombong, 2004)

G. Analisis Pengolahan Data

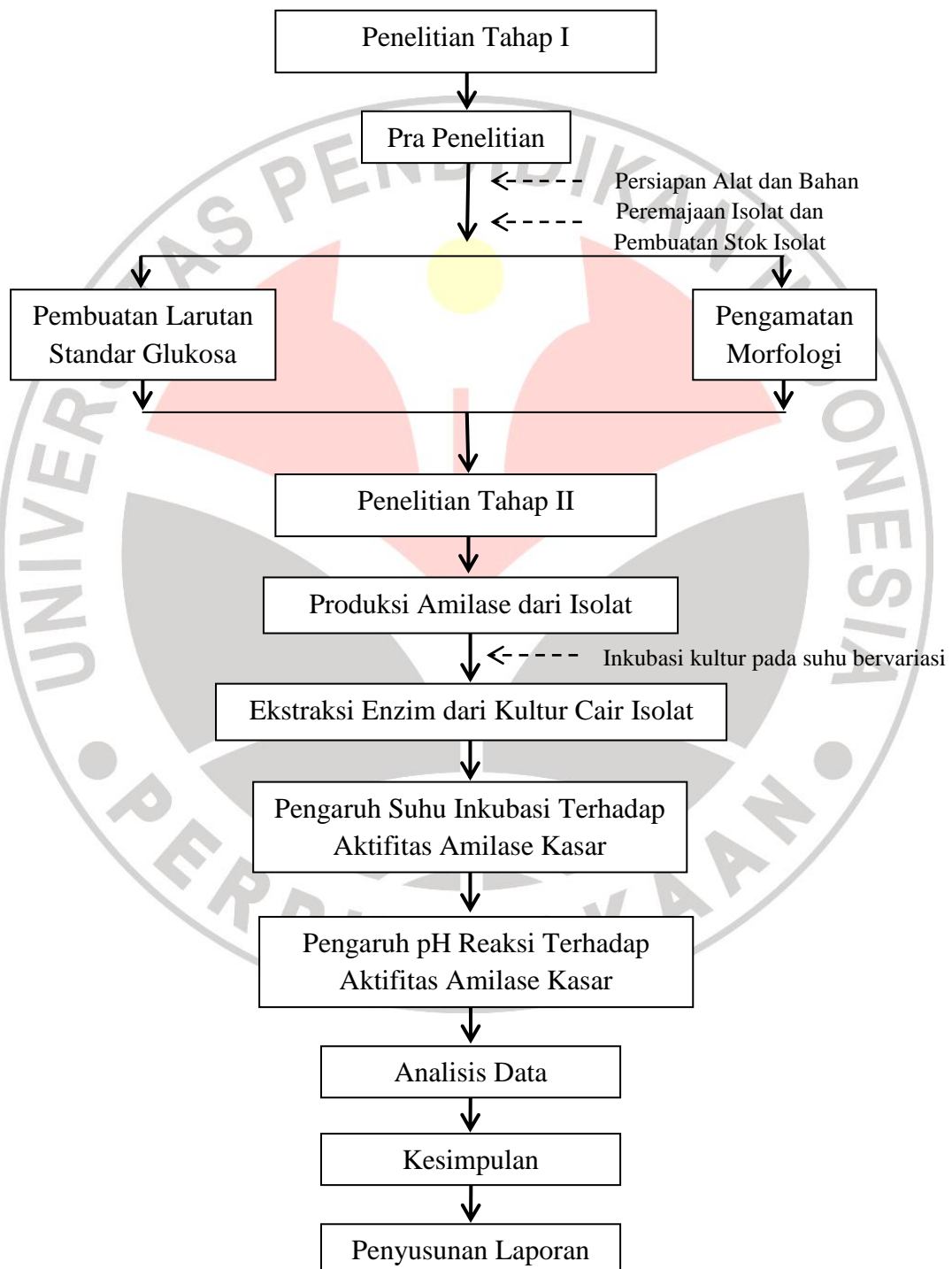
Data hasil pengukuran larutan standar glukosa akan diplotkan menggunakan regresi linier, begitupun dengan hasil aktivitas amilase pada perlakuan perbedaan suhu dan pH yang kemudian dihitung melalui rumus untuk mengetahui aktivitas enzim. Pengolahan data dilakukan dengan menggunakan *software SPSS 17.0 for windows*. Adapun tahap analisis statistik yang dilakukan adalah sebagai berikut:

1. Uji Normalitas dan Homogenitas

2. Jika data terbukti normal dan homogen dilanjutkan Uji Anova satu jalur (*One Way ANOVA*), merupakan pengujian hipotesis komparatif untuk data interval atau rasio dari k sampel (lebih dari dua sampel) yang berkorelasi terhadap satu faktor yang berpengaruh (Iqbal, 2004). Pengujian ini dilakukan untuk menentukan bahwa terdapat perbedaan jumlah produksi amilase yang dihasilkan oleh *Bacillus subtilis* pada berbagai suhu inkubasi yang berbeda. Selain itu untuk menentukan perbedaan jumlah gula pereduksi yang dihasilkan dari proses hidrolisis pati oleh amilase pada variasi suhu inkubasi dan pH reaksi yang berbeda.
3. Jika data tidak normal dan homogen dilanjutkan ke statistika non parametrik yaitu Uji *Kruskal Walls* yang merupakan pengujian hipotesis komparatif untuk data ordinal dari k sampel (lebih dari dua sampel) yang independen dengan satu faktor yang berpengaruh sehingga merupakan alternatif dari analisis varians satu arah (Iqbal, 2004).
4. Jika data menunjukkan perbedaan yang signifikan oleh Uji Anova, uji dilanjutkan dengan menggunakan Uji *Tukey* untuk menentukan faktor-faktor dari perlakuan yang menghasilkan kadar gula pereduksi paling banyak.

H. Alur Penelitian

Penjelasan mengenai prosedur penelitian ini dapat dilihat pada diagram alir sebagai berikut:



Tri Ekawati Heryanto, 2012
 Penentuan Aktivitas Amilase Kasar Termofil *Bacillus Subtilis* Isolat Gunung Darajat
 Garut, Jawa Barat