

**ISOLASI DAN KARAKTERISASI ENZIM AMILASE
DARI BAKTERI LAUT SEBAGAI PENDEGRADASI AMILUM SAGU**



LEONY KATHRIN POBUTI

H031201078



**PROGRAM STUDI KIMIA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2024**

**ISOLASI DAN KARAKTERISASI ENZIM AMILASE
DARI BAKTERI LAUT SEBAGAI PENDEGRADASI AMILUM SAGU**

**LEONY KATHRIN POBUTI
H031201078**



**PROGRAM STUDI KIMIA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2024**

**ISOLASI DAN KARAKTERISASI ENZIM AMILASE
DARI BAKTERI LAUT SEBAGAI PENDEGRADASI AMILUM SAGU**

LEONY KATHRIN POBUTI
H031201078

Skripsi

Sebagai salah satu syarat untuk mencapai gelar sarjana

**PROGRAM STUDI KIMIA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2024**

SKRIPSI

ISOLASI DAN KARAKTERISASI ENZIM AMILASE DARI BAKTERI LAUT SEBAGAI PENDEGRADASI AMILUM SAGU

LEONY KATHRIN POBUTI
H031201078

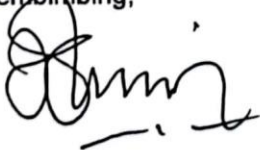


Skripsi

telah dipertahankan di depan Panitia Ujian Sarjana Sains pada tanggal
14 Agustus 2024 dan dinyatakan telah memenuhi syarat kelulusan
pada

Program Studi Kimia
Departemen Kimia
Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Universitas Hasanuddin
Makassar

Mengesahkan:
Pembimbing,



Prof. Dr. Hasnah Natsir, M.Si
NIP. 19620320 198711 2 001

Mengetahui:
Ketua Program Studi,



Dr. St. Fauziah, M.Si
NIP. 19720202 199903 2 002

PERNYATAAN KEASLIAN SKRIPSI DAN PELIMPAHAN HAK CIPTA

Dengan ini saya menyatakan bahwa, skripsi berjudul "Isolasi dan Karakterisasi Enzim Amilase dari Bakteri Laut Sebagai Pendegradasi Amilum Sagu" adalah benar karya saya dengan arahan dari pembimbing Prof. Dr. Hasnah Natsir, M.Si sebagai Pembimbing Utama. Karya ilmiah ini belum diajukan dan tidak sedang diajukan dalam bentuk apa pun kepada perguruan tinggi mana pun. Sumber informasi yang berasal atau dikutip dari karya yang diterbitkan maupun tidak diterbitkan dari penulis lain telah disebutkan dalam teks dan dicantumkan dalam Daftar Pustaka skripsi ini. Apabila di kemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan bahwa sebagian atau keseluruhan skripsi ini adalah karya orang lain, maka saya bersedia menerima sanksi atas pembuatan tersebut berdasarkan aturan yang berlaku.

Dengan ini saya melimpahkan hak cipta (hak ekonomis) dari karya tulis saya berupa skripsi ini kepada Universitas Hasanuddin.

Makassar, 14 Agustus 2024



Leony Kathrin Pobuti
NIM. H031201078

UCAPAN TERIMAKASIH

Puji syukur kepada Tuhan Yesus atas berkat, karunia, dan penyertaannya-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi dengan judul "**Isolasi dan Karakterisasi Enzim Amilase dari Bakteri Laut Sebagai Pendegradasi Amilum Sagu**" sebagai bentuk penyelesaian tugas akhir.

Ucapan terima kasih dan penghargaan penulis sampaikan kepada seluruh pihak yang membantu dalam proses penyelesaian skripsi ini, terutama kepada ibunda **Prof. Dr. Hasnah Natsir, M.Si** selaku pembimbing yang menjadi orang tua penulis di kampus dan senantiasa meluangkan waktu, tenaga, dan pikirannya dalam membimbing dan memberikan masukan yang baik terutama dalam penyelesaian skripsi ini. Tak lupa pula penulis menghaturkan permohonan maaf yang sebesar-besarnya atas semua kesalahan yang tidak disengaja yang pernah dilakukan penulis hingga penulisan skripsi ini diselesaikan.

Kepada kedua orang tua tercinta, ayahanda Yasmon Pobuti dan ibunda tercinta Heriani Kadama terima kasih untuk setiap semangat, motivasi, bantuan, kasih sayang, dan doa yang tak henti-hentinya diberikan kepada penulis. Terima kasih juga kepada saudara-saudara penulis, kak Endayani Pobuti dan adik Gilbert Pobuti atas bantuan dan semangat yang senantiasa diberikan hingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini.

Penulis juga tak lupa mengucapkan terima kasih dan penghargaan yang sebesar-besarnya kepada:

1. Bapak **Dr. Syarifuddin Liong, M.Si** dan Ibu **Dr. Herlina Rasyid, S.Si** selaku tim penguji yang telah memberikan saran, kritik, dan masukan yang bersifat membangun terhadap penulisan ini.
2. Ibu **Riska Mardiyanti, S.Si., M.Sc** selaku koordinator seminar yang telah memberi banyak masukan dan saran dalam penyelesaian skripsi ini.
3. Ibu **Dr. St. Fauziah, M.Si** dan ibu **Dr. Nur Umriani Permatasari, M.Si** selaku ketua dan sekretaris departemen kimia yang telah memberikan banyak kemudahan dan bantuan kepada penulis dalam menjalani studi dan dalam penyusunan skripsi ini.
4. Seluruh dosen Departemen Kimia, Staf FMIPA UNHAS, Staf Departemen Kimia, serta Staf Perpustakaan FMIPA UNHAS atas semua ilmu yang telah diajarkan dan pelayanan yang telah diberikan, serta bantuannya kepada penulis.
5. Seluruh Analis laboratorium di Departemen Kimia FMIPA Unhas, terkhusus Analis pada Laboratorium Biokimia beserta kakak peneliti terkhusus Kak **Anita** dan Kak **Yura** terima kasih atas bantuan semangat serta arahannya selama penelitian berlangsung.
6. Teman-teman terkasih Niuniuu, **Qalbi, Arya, Fiki, Harwan, Nalar, Imel, Kadek, Yeni**, dan **Putri**. Terimakasih atas segala bantuan, motivasi, semangat, dan kebersamaan dari mahasiswa baru hingga penulis dapat menyelesaikan tugas akhir ini.
7. Rekan penelitian enzim **Nayah** dan **Afifah**, terima kasih telah membantu penulis dalam menyelesaikan tugas akhir ini.

8. Teman-teman peneliti Biokimia **Sarah, Alfi, Firman, Ahul, Aspi, Gav, Febby, Dhea, Iluh, Yeni, Hafizah, Magfirah, Qadar** terima kasih atas dukungan, hiburan, dan bantuannya selama menjalani penelitian.
9. Teman-teman seperjuangan, terkhusus **ISOMER 2020**, terima kasih atas semangat dan kebersamaannya selama kuliah.
10. Teman-teman **GMKI Cabang Makassar Komisariat FMIPA Unhas, PMKO Filadelfia MIPA_Farmasi**, dan **GBI Oikoumene**. Terima kasih atas dukungan doa, cinta kasih, semangat, dan kebersamaan yang diberikan kepada penulis sehingga dapat menyelesaikan tugas akhir ini.
11. Keluarga **KKN Tematik 110 Unhas, Desa Tabarano, Kec. Wasuponda, Kab. Luwu Timur**, terima kasih atas kebersamaan dan pengalaman berharga selama di lokasi KKN.
12. Serta kepada seluruh pihak, tidak dapat penulis sebutkan satu persatu yang ikut serta membantu, sehingga skripsi ini dapat terselesaikan dengan baik, terima kasih.

Penulis menyadari masih banyak kekurangan dan kesalahan dalam penyusunan skripsi ini, oleh karena itu saran dan kritik yang bersifat membangun sangat Penulis harapkan. Semoga tulisan ini dapat memberikan manfaat bagi Penulis dan semua orang yang membaca tulisan ini. Aamiin.

Penulis

Leony Kathrin Pobuti

ABSTRAK

LEONY KATHRIN POBUTI. **Isolasi dan Karakterisasi Enzim Amilase dari Bakteri Laut Sebagai Pendegradasi Amilum Sagu** (dibimbing oleh Hasnah Natsir).

Latar Belakang. Industri enzim telah berkembang pesat dan menempati posisi penting dalam bidang industri yang disebabkan karena semakin pesatnya perkembangan teknologi aplikasi enzim, rekayasa genetika, dan teknologi fermentasi. Salah satu jenis enzim yang mempunyai peranan penting dalam industri adalah amilase. Amilase merupakan kelompok enzim yang mempunyai kemampuan untuk memutuskan ikatan glikosida pada amilum. **Tujuan.** Penelitian ini bertujuan untuk menentukan waktu optimum produksi, mengukur aktivitas, dan karakterisasi enzim amilase, serta menguji kemampuan enzim amilase yang dihasilkan sebagai pendegradasi amilum sagu. **Metode.** Penelitian ini terdiri dari beberapa tahapan, diantaranya: 1) isolasi amilum sagu; 2) uji amilolitik bakteri laut; 3) penentuan waktu optimum serta produksi enzim amilase; 4) karakterisasi enzim amilase; 5) uji enzim amilase sebagai pendegradasi amilum sagu. **Hasil.** Isolat bakteri laut Sed 1 memiliki waktu produksi optimum pada jam ke-12 yaitu pada fase eksponensial. Karakterisasi enzim amilase bekerja secara optimum pada pH 6, suhu 37 °C, konsentrasi substrat 0,5%. Ion logam Mg^{2+} 10 mM sebagai aktivator enzim amilase yang memiliki aktivitas relatif lebih tinggi dari kontrol. Enzim amilase dari bakteri laut Sed 1 mampu mengdegradasi amilum sagu. **Kesimpulan.** Isolat bakteri laut Sed 1 mampu menghasilkan enzim amilase yang dapat mendegradasi amilum sagu.

Kata kunci : amilum sagu, bakteri laut, degradasi, amilase

ABSTRACT

LEONY KATHRIN POBUTI. **Isolation and Characterization of Amylase Enzyme from Marine Bacteria as a Degradator of Sago Starch** (Supervised by Hasnah Natsir).

Background. The enzyme industry has developed and occupied an important position in the industrial sector due to the rapid advancements in enzyme application technology, genetic engineering, and fermentation technology. One type of enzyme that plays a significant role in industry is amylase. Amylase is a group of enzymes capable of breaking the glycosidic bonds in starch. **Aims.** This study aims to determine the optimum production time, measure the activity, and characterize the amylase enzyme, as well as test the ability of the produced amylase enzyme as a degrader of sago starch. **Method.** This research consists of several stages, including: 1) isolation of sago starch; 2) amylolytic test of marine bacteria; 3) determination of optimum time and production of amylase enzyme; 4) characterization of the amylase enzyme; 5) testing of the amylase enzyme as a degrader of sago starch. **Results.** The marine bacterial isolate Sed 1 had an optimum production time at the 12th hour, which is during the exponential phase. The characterization of the amylase enzyme showed that it works optimally at pH 6, a temperature of 37°C, and a substrate concentration of 0.5%. The Mg²⁺ ion at 10 mM acts as an activator for the amylase enzyme, showing relatively higher activity than the control. The amylase enzyme from the marine bacterium Sed 1 was able to degrade sago starch. **Conclusion.** The marine bacterial isolate Sed 1 can produce an amylase enzyme capable of degrading sago starch.

Keywords: sago starch, marine bacteria, degradation, amylase

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
PERNYATAAN PENGAJUAN	ii
HALAMAN PENGESAHAN.....	iii
UCAPAN TERIMAKASIH	v
ABSTRAK	vii
<i>ABSTRACT</i>	viii
DAFTAR ISI	ix
DAFTAR TABEL.....	xi
DAFTAR GAMBAR	xii
DAFTAR LAMPIRAN	xiii
DAFTAR SIMBOL DAN SINGKATAN.....	xiv
BAB I PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah.....	3
1.3 Tujuan Penelitian	3
1.4 Manfaat Penelitian.....	3
BAB II METODE PENELITIAN.....	4
2.1 Bahan Penelitian	4
2.2 Alat Penelitian	4
2.3 Waktu dan Tempat Penelitian	4
2.4 Prosedur Penelitian	4
2.4.1 Pembuatan Substrat Amilum Sagu	4
2.4.2 Pembuatan Media	5
2.4.3 Pembuatan Reagen DNS.....	5
2.4.4 Peremajaan Bakteri.....	5
2.4.5 Pengujian Secara Kualitatif Enzim Amilase pada Bakteri Laut.....	6
2.4.6 Penentuan Waktu Produksi Optimum Enzim Amilase	6
2.4.7 Produksi Ekstrak Kasar Enzim Amilase.....	6
2.4.8 Penentuan Aktivitas Enzim dan Aktivitas Spesifik Enzim Amilase	6
2.4.9 Karakterisasi Enzim Amilase dari Bakteri Laut	7
2.4.10 Pengujian Enzim Amilase Sebagai Pendegradasi Amilum Sagu	9

BAB III HASIL DAN PEMBAHASAN	10
3.1 Isolasi Amilum Sagu	10
3.2 Pengujian Secara Kualitatif Enzim Amilase pada Bakteri Laut	13
3.3 Penentuan Waktu Optimum Produksi Enzim Amilase dari Bakteri Laut	13
3.4 Karakterisasi Enzim Amilase dari Bakteri Laut	18
3.4.1 Pengaruh pH terhadap Aktivitas Enzim Amilase	18
3.4.2 Pengaruh Suhu terhadap Aktivitas Enzim Amilase.....	19
3.4.3 Pengaruh Konsentrasi Substrat terhadap Aktivitas Enzim Amilase...	20
3.4.4 Pengaruh Ion Logam terhadap Aktivitas Enzim Amilase	20
3.5 Pengujian Enzim Amilase Sebagai Pendegradasi Amilum Sagu	21
BAB IV KESIMPULAN DAN SARAN	23
4.1 Kesimpulan.....	23
4.2 Saran.....	23
DAFTAR PUSTAKA	24
LAMPIRAN	29

DAFTAR TABEL

Nomor	Halaman
1. Indeks amilolitik bakteri laut	13

DAFTAR GAMBAR

Nomor	Halaman
1. Struktur (a) amilosa (b) amilopektin	10
2. Pohon sagu	11
3. Amilum sagu	12
4. Penentuan waktu produksi optimum amilum standar	14
5. Penentuan waktu produksi optimum amilum sagu.....	15
6. Reaksi antara amilum dan enzim amilase.....	15
7. Reaksi antara DNS dan gula pereduksi	15
8. Reaksi penentuan kadar protein metode Lowry	18

DAFTAR LAMPIRAN

Nomor	Halaman
1. Diagram alir penelitian	29
2. Prosedur penelitian	30
3. Peta lokasi pengambilan sampel amilum sagu	38
4. Dokumentasi penelitian.....	39

DAFTAR SIMBOL DAN SINGKATAN

Simbol/singkatan	Arti dan Penjelasan
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i>
mM	Milimolar
OD	<i>Optical Density</i>
pH	<i>Potential of Hydrogen</i>
Rpm	<i>Rotation per minute</i>
U/mL	Unit per mililiter
μL	Mikroliter
α	Alpha
λ	Panjang Gelombang

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Industri enzim telah berkembang pesat dan menempati posisi penting dalam bidang industri yang disebabkan karena semakin pesatnya perkembangan teknologi aplikasi enzim, rekayasa genetika, dan teknologi fermentasi. Enzim digunakan di berbagai bidang, contohnya industri makanan, kimia, medis, dan pembuatan bahan bakar bioetanol. Enzim dijadikan salah satu bahan produksi di industri karena mudah diperoleh dan ekonomis serta sumbernya melimpah (Baharuddin et al., 2022). Pada tahun 2023, permintaan dan perdagangan global untuk enzim industri tumbuh dengan stabil dan diperkirakan akan mencapai 7 miliar USD. Sekitar 60% enzim industri diproduksi dari jamur, 24% dari bakteri, 4% dari ragi, dan sisanya 10% dari sumber tumbuhan dan hewan (Fasim et al., 2021).

Enzim amilase merupakan salah satu jenis enzim yang mempunyai peranan penting dalam industri. Amilase banyak diproduksi dari berbagai jenis bakteri, fungi, tanaman, dan hewan baik yang berasal dari daratan maupun laut. Saat ini mikroba yang banyak digunakan untuk produksi amilase berasal dari tanah, mikroba yang berasal dari laut belum banyak dimanfaatkan padahal karakteristik mikroba laut sangat unik dan spesifik (Purnawan et al., 2015). Daerah lautan yang meliputi 71 persen dari permukaan bumi memiliki sangat banyak sumber enzim yang bermanfaat yang belum tereksplor. Bakteri dan jamur dari laut menghasilkan enzim-enzim berbeda bergantung dari habitat dan fungsi ekologiannya. Komunitas mikroba dari jenis bakteri, arkea, protista dan fungi bersel tunggal merupakan biomassa laut terbesar. Jumlah total sel bakteri di laut diperkirakan sebanyak $3,6 \times 10^{29}$ jumlah koloni/mL dengan total kandungan karbon selulernya sebesar 3×10^{17} g. Keanekaragaman yang sangat tinggi, mendorong banyaknya penelitian yang menggunakan bakteri laut, termasuk pencarian sumber enzim amilase baru (Rahmasari et al, 2016).

Pemilihan bakteri laut sebagai sumber enzim karena mempunyai beberapa keuntungan bila dibandingkan dengan enzim yang diisolasi dari tumbuhan maupun hewan, seperti mudah ditumbuhkan, pertumbuhan cepat, skala produksi sel mudah ditingkatkan, biaya produksi relatif lebih murah, dan kondisi produksi tidak tergantung perubahan musim dan waktu (Silaban dan Simamora, 2018). Bakteri laut merupakan sumber yang menjanjikan untuk menemukan enzim baru karena lingkungan alamnya yang khas, sifat fisiologisnya, proses metabolismenya, dan penggunaan berbagai nutrisi. Bakteri laut juga termasuk kelompok mikroorganisme laut yang beragam dan telah mengembangkan adaptasi fisiologis sebagai respons terhadap berbagai faktor lingkungan dan proses evolusi (Erfanimoghadam dan Homaei, 2023).

Enzim amilase berperan dalam mendegradasi amilum menjadi gula yang lebih sederhana seperti maltosa, dekstrin, dan glukosa. Amilum diperoleh dari berbagai macam sumber contohnya singkong, jagung, kentang, dan sagu (Silaban dan Simamora, 2018). Tanaman sagu merupakan salah satu sumber amilum yang

melimpah di Indonesia dan memiliki potensi besar untuk dikonversi menjadi produk yang mempunyai nilai tambah. Komponen yang paling krusial dari tanaman sagu yaitu batang sagu yang merupakan tempat penyimpanan karbohidrat dan cadangan makanan. Pada umumnya, batang bawah memiliki diameter lebih besar dan mengandung lebih banyak amilum daripada batang atas. Tanaman sagu memiliki akar yang berjenis serabut. Senyawa terpenting tanaman sagu adalah amilumnya, yang dapat digunakan untuk membuat pangan dan produk lainnya. Potensi sagu di Indonesia menemamilum $\pm 50\%$ potensi sagu dunia dengan produktivitas 25 ton/ha setiap tahunnya (Payu et al., 2023).

Menurut Derosya dan Kasim (2017) jumlah kesediaan tanaman sagu yang melimpah di Indonesia tersebut belum dimanfaatkan secara optimal. Pemanfaatan sagu masih rendah yaitu 15-20% ditandai dengan banyaknya tanaman sagu layak panen namun rusak karena tidak dipanen. Agar dapat digunakan dalam industri, modifikasi amilum alami perlu dilakukan terkait sifat alami amilum seperti susah larut dalam air dingin, gel tidak bening dan tidak stabil, membutuhkan suhu yang tinggi untuk proses pemasakan. Pemanfaatan sagu secara optimal masih terbatas karena kurangnya teknologi dan pengetahuan tentang proses degradasinya. Proses degradasi amilum dapat menggunakan dua metode, yaitu metode kimiawi dan enzimatis.

Degradasi amilum secara kimiawi yaitu pemecahan amilum menggunakan senyawa asam, seperti H_2SO_4 , HNO_3 , dan HCl . Sementara degradasi secara enzimatis yaitu proses pemecahan amilum menggunakan bantuan enzim, contohnya amilase dan mempunyai kelebihan yaitu ramah lingkungan dan prosesnya lebih cepat (Wang dan Copeland, 2015). Penelitian yang dilakukan oleh Ainezzahira et al., (2019) enzim amilase yang diisolasi dari bakteri *Bacillus amyloliquefaciens* dapat mendegradasi amilum sehingga dapat memperoleh maltodekstrin dalam jumlah yang optimal. Oleh karena itu, penemuan enzim amilase yang efektif dan efisien dari bakteri laut untuk pendegradasi amilum sagu dapat membuka peluang baru dalam pengembangan industri berbasis sagu.

Produksi enzim amilase yang tinggi, tentunya tidak lepas dari beberapa faktor pendukung. Beberapa faktor yang sangat penting adalah pH, suhu, substrat, dan pengaruh ion logam. Penelitian yang dilakukan oleh Purnawan et al., (2015) produksi optimum enzim amilase bakteri laut *Arthrobacter arilaitensis* pada konsentrasi substrat amilum 1%, pH 7, suhu 30 °C, maltosa sebagai ko-substrat produksi dengan aktivitas 2.7 U/mL. Sedangkan penambahan beberapa sumber nitrogen memberikan pengaruh terhadap penurunan aktivitas amilase, seperti kasein menurunkan aktivitas enzim amilase menjadi 2.3 U/mL. Begitu pula penelitian yang dilakukan oleh Istia'nah et al., (2020) yang memproduksi enzim amilase dari bakteri *Bacillus megaterium* dapat memproduksi enzim amilase pada suhu 37 °C sebesar 1,279 U/mL, pH 5 sebesar 1,241 U/mL dan konsentrasi substrat 1,5% sebesar 0,548 U/mL. Selain itu untuk pengaruh ion logam pada penelitian yang dilakukan oleh Arfah et al., (2015) dari isolat bakteri *Bacillus sp* RSA11-1b aktivitas amilase pada ekstrak kasar kondisi optimum dengan penambahan ion Ca^{2+} 10 mM dapat meningkatkan

aktivitas amilase hingga 32,89% sedangkan ion Zn^{2+} dapat menurunkan aktivitas amilase hingga 25%.

Berdasarkan uraian tersebut, maka dilakukan isolasi dan karakterisasi enzim amilase dari bakteri laut. Karakterisasi enzim ini meliputi pengujian aktivitas enzim terhadap pH, suhu, substrat, dan pengaruh ion logam untuk mendapatkan produksi enzim amilase yang optimal sehingga mampu untuk mendegradasi amilum sagu.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan uraian pada latar belakang, maka dapat dirumuskan masalah sebagai berikut:

1. berapa lama waktu produksi optimum enzim amilase dari bakteri laut?
2. bagaimana karakteristik enzim amilase dari bakteri laut?
3. apakah enzim amilase yang dihasilkan mampu mendegradasi amilum sagu?

1.3 Tujuan Penelitian

Adapun tujuan dari penelitian ini adalah:

1. menentukan waktu produksi optimum enzim amilase dari bakteri laut.
2. mengkarakterisasi enzim amilase dari bakteri laut.
3. menguji kemampuan enzim amilase dalam mendegradasi amilum sagu.

1.4 Manfaat Penelitian

Manfaat dari penelitian ini meliputi peningkatan efisiensi produksi enzim amilase dengan menentukan waktu produksi optimum yang dapat mengurangi biaya dan waktu produksi. Karakterisasi enzim amilase akan membantu dalam pengembangan produk enzimatik baru yang lebih stabil dan efektif untuk berbagai aplikasi industri. Kemudian, pengujian kemampuan enzim amilase dalam mendegradasi amilum sagu diharapkan dapat mengidentifikasi potensi aplikasi enzim ini dalam pengembangan produk-produk baru yang ramah lingkungan, berbasis sumber daya alam yang dapat diperbaharui.

BAB II METODE PENELITIAN

2.1 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah isolat bakteri laut, *yeast* ekstrak, *Nutrient Agar* (NA), *agar base*, pepton, KH_2PO_4 (Merck), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Merck), CaCl_2 (Merck), KCl (Merck), NaCl (Merck), MgCl_2 (Merck), HgCl_2 (Merck), CaCl_2 (Merck), NaOH (Merck), CuSO_4 (Merck), K-Na tartrat, amilum standar, amilum sagu, iodine, DNS (*3,5-dinitro salisilat acid*), *Bovin Serum Albumin* (BSA), maltosa (Merck), *folin-ciocalteu* (Merck), buffer fosfat, buffer asetat, etanol 95%, akuades, dan air laut.

2.2 Alat Penelitian

Peralatan utama yang digunakan adalah pH meter, *vortex*, jarum ose, *shaker waterbath* (WBS-18), spektrofotometer UV-Vis, *autoclave* (Model 8000 DNE Napco), lampu spiritus, *centrifuge* (Hermle Z 366 K), mikropipet (100-1000 μL), neraca analitik (Ohaus), *hotplate* magnetik strirer, cawan petridis, inkubator (Mettler), kain saring, kertas saring, dan alat-alat gelas yang umum digunakan di laboratorium.

2.3 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan Maret - Juni 2024. Pengambilan sampel sagu dilakukan di Desa Kawata, Kabupaten Luwu Timur. Penelitian dilakukan di Laboratorium Biokimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam dan di Laboratorium Terpadu Bioteknologi, Fakultas Peternakan, Universitas Hasanuddin.

2.4 Prosedur Penelitian

2.4.1 Pembuatan Substrat Amilum Sagu

Batang sagu dikupas, dicuci, dan ditimbang sebanyak 250 g. Batang sagu tersebut kemudian dihomogenkan dengan 250 mL akuades dan diblender sehingga terbentuk suspensi. Campuran tersebut disaring dengan kain saring dan cairannya ditampung dalam gelas kimia hingga terbentuk endapan sedangkan residunya dibuang. Setelah terbentuk endapan, cairan di atasnya dibuang dan endapan yang tersisa ditambahkan 100 mL akuades dan dibiarkan mengendap. Endapan yang terbentuk didekantasi lagi dengan 100 mL akuades hingga endapan bersih. Proses dekantasi selanjutnya dilakukan dengan 100 mL etanol 95%. Endapan kemudian disaring dengan kertas saring yang sudah diketahui bobotnya. Setelah itu amilum tersebut dikeringkan dalam desikator dan setelah kering ditimbang menggunakan neraca analitik. Hasil penimbangan dihitung kadar amilum pada sagu menggunakan rumus perhitungan pada Persamaan 1 (Maherawati et al., 2011).

$$\text{Kadar Amilum Sagu (\%)} = \frac{\text{Berat amilum (g)}}{\text{Berat sagu (g)}} \times 100\% \quad (1)$$

2.4.2 Pembuatan Media

a. Pembuatan Media Peremajaan

Sebanyak 2,8 g *nutrient* agar ditimbang, kemudian dilarutkan dengan 100 mL air laut. Larutan tersebut dituangkan ke dalam Erlenmeyer dan disterilkan dalam *autoclave* pada suhu 121°C dan tekanan 2 atm selama 15 menit. Setelah didinginkan, larutan dituangkan ke dalam cawan petri steril (Anggraeni dan Triajie, 2021).

b. Pembuatan Media *Yeast Pepto Souble starch* (YPSs)

Sebanyak 0,2 g ekstrak yeast, 0,5 g pepton, 0,5 g amilum sagu, 2 g agar, 0,3 g KH_2PO_4 , 0,05 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, dan 0,01 g CaCl_2 dilarutkan dengan air laut hingga mencapai volume 100 mL. Larutan tersebut dituangkan ke dalam Erlenmeyer dan disterilkan dalam *autoclave* pada suhu 121°C dan tekanan 2 atm selama 15 menit. Setelah didinginkan, larutan dituangkan ke dalam cawan petri steril. Prosedur yang sama dilakukan dengan mengganti amilum sagu dengan 1 g amilum standar (Soeka, 2016).

c. Pembuatan Media Inokulum

Sebanyak 0,2 g *yeast* ekstrak, 0,5 g pepton, 0,5 g amilum sagu, 0,3 g KH_2PO_4 , 0,05 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, dan 0,01 g CaCl_2 dilarutkan dengan air laut hingga mencapai 100 mL. Larutan dituang ke dalam Erlenmeyer dan disterilkan dalam *autoclave* pada suhu 121 °C dan tekanan 2 atm selama 15 menit. Prosedur yang sama dilakukan dengan mengganti amilum sagu dengan 1 g amilum standar (Soeka, 2016).

d. Pembuatan Media Produksi

Sebanyak 0,6 g *yeast* ekstrak, 1,5 g pepton, 1,5 g amilum sagu, 0,9 g KH_2PO_4 , 0,15 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ dan 0,03 g CaCl_2 dilarutkan dengan air laut hingga 300 mL. Larutan dituang ke dalam Erlenmeyer dan disterilkan dalam *autoclave* pada suhu 121 °C dan tekanan 2 atm selama 15 menit. Prosedur yang sama dilakukan dengan mengganti amilum sagu dengan 3 g amilum standar (Soeka, 2016).

2.4.3 Pembuatan Reagen DNS

Sebanyak 1 g asam 3,5-dinitrosalisilat (DNS) ditimbang dan dilarutkan ke dalam 20 mL larutan NaOH 2 N dan 50 mL akuades. Setelah itu, 30 g K-Na tartrat ditambahkan dan diaduk dengan magnetik *stirrer*. Volume akhir digenapkan menjadi 100 mL dengan akuades (Elfirta et al., 2023).

2.4.4 Peremajaan Bakteri

Sebanyak 2 ose bakteri laut diambil, kemudian digores pada media peremajaan dan diinkubasi pada suhu 37 °C selama 24 jam (Anggraeni dan Triajie, 2021).

2.4.5 Pengujian Secara Kualitatif Enzim Amilase pada Bakteri Laut

Pengujian secara kualitatif dilakukan untuk mengetahui adanya enzim amilase pada bakteri yang diuji. Pengujian ini dilakukan dengan koloni bakteri digoreskan pada media YPSs yang telah memadat dan diinkubasi pada suhu 37 °C di dalam inkubator selama 2 hari. Adanya aktivitas enzim amilase dapat dilihat dengan munculnya zona bening di sekitar koloni bakteri setelah ditetesi dengan larutan iodin. Diameter zona bening diukur dan digunakan untuk menghitung indeks amilolitik menggunakan rumus pada Persamaan 2 (Istia'nah dkk., 2020):

$$\text{Indeks Amilolitik (IA)} = \frac{\text{Diameter zona bening (mm)}}{\text{Diameter koloni bakteri (mm)}} \quad (2)$$

2.4.6 Penentuan Waktu Produksi Optimum Enzim Amilase

Isolat bakteri laut dimasukkan ke dalam media inokulum, selanjutnya diinkubasi menggunakan *shaker waterbath*, selama 24 jam pada suhu 37 °C dengan kecepatan 150 rpm. Kemudian 10% media inokulum dimasukkan dalam media produksi. Pembuatan kurva pertumbuhan bakteri dilakukan dengan mengambil 30 mL inokulum setiap 12 jam sekali yaitu pada jam ke-0, 12, 24, 36, 42, 60, dan 72. Kurva pertumbuhan ditentukan dengan membuat plot antara waktu, absorbansi dengan panjang gelombang 660 nm menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Setelah itu disentrifugasi pada suhu 4 °C pada kecepatan 4.500 rpm selama 10 menit. Aktivitas amilase ditentukan dengan mengukur aktivitas enzim dengan metode DNS dan uji kadar protein dengan metode Lowry (Istia'nah dkk., 2020).

2.4.7 Produksi Ekstrak Kasar Enzim Amilase

Produksi enzim amilase dilakukan pada waktu produksi optimum yang telah didapatkan. Sebanyak 10% inokulum aktif diambil kemudian dimasukkan kedalam Erlenmeyer yang berisi media produksi. Selanjutnya media yang mengandung koloni bakteri diinkubasi menggunakan *shaker waterbath* pada suhu 37 °C dengan kecepatan 150 rpm selama waktu produksi optimum (12 jam). Kultur bakteri yang didapatkan selanjutnya disentrifugasi dengan suhu 4 °C pada kecepatan 4.500 rpm selama 10 menit. Filtrat yang diperoleh merupakan ekstrak kasar enzim amilase. Kemudian ekstrak kasar enzim amilase diuji aktivitasnya dan dikarakterisasi dengan metode DNS (Istia'nah dkk., 2020).

2.4.8 Penentuan Aktivitas Enzim dan Aktivitas Spesifik Enzim Amilase

a. Penentuan Aktivitas Enzim Amilase

Prinsip uji aktivitas amilase didasarkan pada jumlah gula reduksi (maltosa) yang dihasilkan dari hidrolisis amilum dengan menggunakan metode DNS. Sebanyak 0,5 mL ekstrak kasar amilase, 0,5 mL larutan buffer fosfat pH 7, dan 0,5 mL substrat amilum sagu 0,5% diinkubasi pada suhu 37°C selama 15 menit. Setelah itu, sebanyak 1,5 mL larutan DNS ditambahkan pada larutan tersebut dan dihomogenkan

menggunakan *vortex*. Campuran dipanaskan selama 10 menit. Kemudian, pengukuran absorbansi dikerjakan menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum ($\lambda = 517 \text{ nm}$). Dilakukan prosedur yang sama dengan mengganti substrat amilum sagu 0,5% menjadi amilum standar 1%.

Perhitungan kadar maltosa dilakukan dengan mensubstitusikan absorbansi larutan yang diperoleh pada penentuan kadar maltosa ke dalam persamaan regresi kurva kalibrasi larutan standar maltosa. Kadar maltosa yang diperoleh, digunakan untuk menentukan aktivitas enzim amilase pada Persamaan 3 (Rafsen, 2018):

$$\text{Aktivitas enzim amilase (U/mL)} = \frac{[\text{maltosa}] \times F_p}{\text{BM} \times V \times t} \quad (3)$$

Keterangan:

[Maltosa] : konsentrasi maltosa (ppm)

BM : bobot molekul maltosa (g/mol)

V : volume enzim (mL)

t : waktu inkubasi (menit)

fp : faktor pengenceran

Aktivitas enzim amilase yang diperoleh dinyatakan dalam unit/mL, dimana satu unit aktivitas amilase adalah sejumlah enzim yang menghasilkan 1 μmol gula reduksi (maltosa) permenit pada kondisi tertentu.

b. Penentuan Kadar Protein dan Aktivitas Spesifik

Penentuan kadar protein ditentukan berdasarkan metode Lowry. Campuran 2 mL larutan enzim, 2,75 mL pereaksi Lowry B, dikocok dengan *vortex* selama 10 detik. Campuran tersebut kemudian didiamkan pada suhu kamar selama 15 menit, selanjutnya ditambahkan 0,25 mL pereaksi *folinciocalteu* (Lowry A) dan dikocok dengan *vortex* selama 10 detik. Setelah itu, campuran tersebut didiamkan pada suhu kamar selama 30 menit agar reaksi berjalan sempurna. Absorbansi diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum ($\lambda = 749 \text{ nm}$) (Melisha et al., 2016).

Perhitungan kadar protein enzim dilakukan dengan mensubstitusikan absorbansi larutan yang diperoleh pada penentuan kadar protein enzim ke dalam persamaan regresi kurva kalibrasi larutan standar protein. Kadar protein yang diperoleh, selanjutnya digunakan untuk menentukan aktivitas enzim spesifik menggunakan rumus perhitungan pada Persamaan 4 (Al-Agamy et al., 2021):

$$\text{Aktivitas spesifik (U/mg)} = \frac{\text{Aktivitas Enzim (U/mL)}}{\text{Kadar Protein (mg/mL)}} \quad (4)$$

2.4.9 Karakterisasi Enzim Amilase dari Bakteri Laut

a. Pengaruh pH Terhadap Aktivitas Enzim Amilase

Sebanyak 0,5 mL larutan substrat amilum sagu 0,5% dan 0,5 mL larutan buffer (buffer sitrat masing-masing pH 4, 5, 6 dan buffer fosfat masing-masing pH 7, 8) dimasukan

kedalam lima tabung reaksi. Sebanyak 0,5 mL ekstrak kasar enzim amilase ditambahkan pada campuran tersebut. Campuran diinkubasi pada suhu 37 °C selama 15 menit. Setelah itu, sebanyak 1,5 mL larutan DNS ditambahkan pada larutan tersebut dan dihomogenkan menggunakan *vortex*. Campuran dipanaskan selama 10 menit. Kemudian, pengukuran absorbansi dikerjakan menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum ($\lambda = 517 \text{ nm}$) (Istia'nah et al., 2020).

b. Pengaruh Suhu Terhadap Aktivitas Enzim Amilase

Sebanyak 0,5 mL larutan substrat amilum sagu 0,5% dan 0,5 mL larutan buffer sitrat/fosfat pH optimum pada poin (a) dimasukkan ke dalam lima tabung reaksi. Ekstrak kasar enzim amilase sebanyak 0,5 mL ditambahkan pada masing-masing tabung reaksi. Campuran diinkubasi pada suhu 35 °C, 37 °C, 40 °C, 45 °C, dan 50 °C selama 15 menit. Setelah itu, sebanyak 1,5 mL larutan DNS ditambahkan pada larutan tersebut dan dihomogenkan menggunakan *vortex*. Campuran dipanaskan selama 10 menit. Kemudian, pengukuran absorbansi dikerjakan menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum ($\lambda = 517 \text{ nm}$) (Istia'nah et al., 2020).

c. Pengaruh Konsentrasi Substrat Terhadap Aktivitas Enzim Amilase

Sebanyak 0,5 mL larutan substrat amilum sagu dengan konsentrasi masing-masing 0,2%, 0,3%, 0,4%, 0,5%, dan 0,6% ditambahkan 0,5 mL larutan buffer sitrat/buffer fosfat pH optimum pada poin (a) ke dalam lima tabung reaksi. Kemudian ke dalam campuran ditambahkan 0,5 mL ekstrak kasar enzim amilase. Campuran diinkubasi pada suhu optimum pada poin (b) selama 15 menit. Setelah itu, sebanyak 1,5 mL larutan DNS ditambahkan pada larutan tersebut dan dihomogenkan menggunakan *vortex*, kemudian campuran dipanaskan selama 10 menit. Kemudian, pengukuran absorbansi dikerjakan menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum ($\lambda = 517 \text{ nm}$) (Istia'nah et al., 2020).

d. Pengaruh Ion Logam Terhadap Aktivitas Enzim Amilase

Penambahan ion logam untuk mengetahui jenis logam yang berperan sebagai aktivator atau inhibitor. Ekstrak kasar enzim amilase dan larutan buffer sitrat/buffer fosfat pH optimum pada poin (a) disiapkan masing-masing 0,5 mL. Campuran tersebut ditambahkan berbagai jenis ion logam seperti: K^+ , Na^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , dan Hg^{2+} pada konsentrasi 10 dan 50 mM dan dihomogenkan menggunakan *vortex*. Campuran tersebut diinkubasi pada suhu optimum (b) selama 10 menit. Setelah itu, substrat amilum sagu 0,5% ditambahkan sebanyak 0,5 mL lalu diinkubasi pada suhu optimum pada poin (b) selama 15 menit. Selanjutnya, sebanyak 1,5 mL larutan DNS ditambahkan pada larutan tersebut dan dihomogenkan menggunakan *vortex*, kemudian campuran dipanaskan selama 10 menit. Kemudian, pengukuran absorbansi dikerjakan menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum ($\lambda = 517 \text{ nm}$) (Arfah et al., 2015).

2.4.10 Pengujian Enzim Amilase Sebagai Pendegradasi Amilum Sagu

Pengujian amilase dilakukan untuk mengetahui kemampuan enzim amilase dalam mendegradasi amilum sagu. Pengujian ini dilakukan dengan menempelkan *paper disc* yang sudah ditetesi ekstrak kasar enzim amilase substrat amilum sagu 0,5% dengan konsentrasi 10 μ L dan 20 μ L pada media YPSs yang telah memadat. Setelah itu, diinkubasi pada suhu 37 °C di dalam inkubator selama 24 jam. Munculnya zona bening di sekitar *paper disc* setelah dituang larutan iodin menandakan kemampuan ekstrak kasar enzim amilase dalam mendegradasi amilum sagu (Soeka, 2016).