

III. METODOLOGI PENELITIAN

Untuk penelitian ini dipilih pisang barangan sebagai sumber enzim karena pada penelitian yang dilakukan Nugroho, dkk. (2001) menunjukkan hasil persen rendemen tertinggi dibandingkan jenis pisang lainnya. Selain itu pisang barangan juga mudah diperoleh di pasaran. Pati jagung dan tapioka yang digunakan diperoleh dari pasar di Pekanbaru. Pati kentang yang digunakan adalah keluaran MERCK, Darmstadt (No. Katalog E 716252) pro analisis sehingga sebelum proses sakarifikasi tidak perlu dilakukan likuifikasi seperti halnya pati jagung dan tapioka.

3.1 Pembuatan sistem amobil enzim bubur pisang amobil barangan pada Ca-alginat

Amobilisasi sistem enzim bubur pisang barangan pada Ca-alginat mengikuti metode yang dikemukakan oleh Glass dan Rand (1982). Pembuatan dioptimalisasikan waktu yang dibutuhkan proses dialisis akhir sistem amobil ini agar sistem bebas fenol dan gula pereduksi sesuai hasil penelitian Nugroho, dkk (2001).

3.2. Persiapan substrat untuk proses sakarifikasi : Proses likuifikasi pati

Proses likuifikasi pati dilakukan untuk pati jagung dan tapioka dimana 40% (b/v) pati dalam buffer pH 6,4 ditambahkan α -amilase *Bacillus licheniformis* sebesar 31.500 unit per kg pati kering dan CaCl_2 75 ppm sebagai aktivator. Campuran ini diinkubasi selama 30 menit pada suhu 90°C , lalu didinginkan ke suhu 85°C dan ditambahkan lagi 147.000 unit α -amilase *Bacillus licheniformis* per kg pati kering. Inkubasi dengan suhu 85°C dilanjutkan selama 90 menit. Hasil likuifikasi dididihkan selama 5 menit untuk mematikan aktivitas enzim dan siap digunakan sebagai substrat.

3.3. Penentuan konsnetrasi substrat optimum untuk proses hidrolisis pati menggunakan sistem enzim bubur pisang barangan amobil pada Ca-alginat

Konsentrasi substrat mempengaruhi kecepatan awal suatu reaksi enzimatik, hingga pada suatu nilai konsentrasi tertentu, dimana penambahan konsentrasi tidak lagi menambah kecepatan reaksi enzimatik tersebut. Penentuan konsentrasi substrat yang akan memberikan aktivitas tertinggi (kecepatan konversi substrat ke enzim tertinggi) dapat didekati dengan penentuan konstanta Michaelis Menten, K_m . K_m merupakan

konsentrasi substrat dimana kecepatan reaksi awal adalah sama dengan separuh kecepatan reaksi maksimum yang akan dicapai. Dengan demikian konsentrasi substrat yang akan memberikan aktivitas enzim tertinggi adalah $2 \times K_m$.

Penentuan K_m sistim enzim bubur pisang amobil dilakukan dengan menentukan aktivitas sistim enzim bubur pisang amobil pada pH dan temperatur optimum yang diperoleh dari penelitian sebelumnya (Nugroho, 2001), dengan memvariasikan konsentrasi substrat. Data aktivitas enzim amobil persatuan waktu untuk setiap konsentrasi substrat diolah menggunakan grafik Lineweaver-Burke untuk memperoleh nilai K_m (Price dan Dweek, 1982).

3.4. Penentuan Waktu hidrolisis optimum amilum oleh sistim enzim bubur pisang amobil pada Ca- alginat.

Hidrolisis pati terlikuifikasi dilakukan dengan memvariasikan waktu hidrolisis dari 24 jam sampai dengan 96 jam atau lebih hingga tidak diperoleh perubahan lagi. Proses ini dilakukan pada kondisi katalitik optimum yang diperoleh pada penelitian sebelumnya (Nugroho, 2001). Data kadar sirup glukosa yang diperoleh diplot dalam suatu grafik terhadap variasi waktu, untuk menentukan waktu hidrolisis yang akan memberikan kadar glukosa maksimum (optimum). Kadar gula reduksi ditentukan dengan cara Nelson Somogyi (Somogyi, 1945; Somogyi, 1952). Kadar glukosa ditentukan dengan Metode *Glucose Oksidase Parahydroxybenzen Sulfonate Aminoantipyrine Peroxidase* (GOD-PAP) atau dikenal juga sebagai Metode Trinder (Frederick dkk., 1990)

3.5. Analisis Data

Data-data yang diperoleh merupakan aktivitas sistem enzim bubur pisang barangan amobil pada Ca-alginat dalam satuan $\mu\text{g/ml.menit}$. Data yang diperoleh dari penentuan V_m dan K_m diplotkan dengan grafik Lineweaver dan Burke. Perhitungan untuk menentukan V_m dan K_m menggunakan persamaan Michaelis-Menten yang telah disederhanakan Lineweaver-Burke. Data kadar sirup glukosa yang diperoleh diplot dalam suatu grafik terhadap variasi waktu, untuk menentukan waktu hidrolisis yang akan memberikan kadar glukosa maksimum. Untuk menentukan waktu sakarifikasi optimum, data yang diperoleh dianalisis dengan uji statistik Duncan jarak berganda (Bender dkk., 1982).