# III. METODELOGI PENELITIAN

## A. Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilakukan pada bulan April-Juli 2012 di Laboratorium Biokimia Jurusan Kimia, Laboratorium Biologi Molekular Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lampung, serta Laboratorium Biomassa Terpadu Universitas Lampung.

## B. Alat dan Bahan

Alat–alat yang digunakan pada penelitian ini adalah alat-alat gelas, jarum ose, pH Universal, mikropipet Eppendroff, kolom kromatografi, neraca analitik, lemari pendingin, pembakar spritus, pengaduk magnet, sentrifuga, autoklaf model S-90N, oven, *shaker incubator* STUART SSL2, *freeze dry*, *magnetic stirrer*, *laminar air flow* CRUMA model 9005-FL, *waterbath*, *waterbath incubator* HAAKE dan spektrofotometer *UV-Vis* Cary Win UV 32.

Adapun bahan–bahan yang digunakan *Potato Dextrose Agar* (PDA), serbuk gergaji, $(NH_4)_2SO_4$, $KH_2PO_4$, $CaCl_2$**,** $MgSO_4$, $FeSO_4.7H_2O$, $ZnSO_4.7H_2O$, $CoCl_2$, pepton, NaOH, $Na_2CO_3$, $CuSO_4.5H_2O$, CMC, reagen *folin-ciocalteu*, akuades, Na(K)-tartarat, kantong selofan, NaCl, $NaH_2PO_4$, $Na_2HPO_4$, pereaksi DNS (*dinitrosalisilic acid*), fenol, $Na_2SO_3$, Sephadex G-100, gliserol, dan sorbitol.

Sedangkan mikroorganisme yang digunakan adalah jamur *Aspergillus niger* L-51 penghasil enzim selulase yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi dan Teknologi Bioproses Jurusan Teknik Kimia Institut Teknologi Bandung.

## C. Prosedur Penelitian

### 1. Pembuatan Media Inokulum, Fermentasi, dan Larutan Pereaksi

a. *Pretreatment* sumber selulosa serbuk gergaji

Serbuk gergaji digiling sampai halus dengan lumpang, kemudian dikeringkan dalam oven pada suhu 70-80°C selama kurang lebih tiga jam. Selanjutnya serbuk gergaji yang telah kering tersebut didelignifikasi dengan NaOH 4% secukupnya. Campuran tersebut dipanaskan dengan autoklaf pada tekanan 1 atm selama 15 menit. Setelah didelignifikasi, larutannya dibuang dan endapannya diambil. Endapan tersebut kemudian dicuci dengan akuades sampai pH netral. Lalu dikeringkan dalam oven pada suhu 70-80°C selama 32 jam dan diayak dengan ayakan 200 mesh.

b. Pembuatan media inokulum dan fermentasi

Media inokulum dan fermentasi yang digunakan ($gL^{-1}$) terdiri dari $(NH_4)_2SO_4$ 1,4; $KH_2PO_4$ 2,0; Urea 0,3; $CaCl_2$ 0,3; $MgSO_4$ 0,3; $FeSO_4.7H_2O$ 0,005; $ZnSO_4.7H_2O$, 0,0014; $CoCl_2$ 0,002; serbuk gergaji 7,5; pepton, 0,75 yang dilarutkan dalam akuades, kemudian disterilkan pada suhu 121°C, tekanan 1 atm, selama 15 menit dalam autoklaf.

c. Pembuatan pereaksi untuk pengukuran kadar protein metode Lowry (Lowry *et al*., 1951)

| | |
|---|---|
| Pereaksi A | : 2 g $Na_2CO_3$ dilarutkan dalam 100 mL NaOH 0,1 N. |
| Pereaksi B | : 5 mL larutan $CuSO_4.5H_2O$ 1% ditambahkan ke dalam 5 mL larutan Na(K)-tartarat 1%. |
| Pereaksi C | : 2 mL pereaksi B ditambahkan 100 mL pereaksi A. |
| Pereaksi D | : reagen folin ciocalteu diencerkan dengan aquades 1:1. |
| Larutan standar | : larutan BSA (*Bovine Serum Albumin*) dengan kadar 20, 40, 60, 80, 100, 120, dan 140 ppm. |

d. Pembuatan pereaksi untuk pengukuran aktivitas selulase metode Mandels (Mandels *et al.*, 1976)

Ke dalam labu ukur 100 mL, dimasukkan 1% NaOH, Na(K)-tartarat 4%, 1% DNS (*dinitrosalisilic acid*), 0,2% fenol dan 0,05% $Na_2SO_3$ kemudian dilarutkan dengan 100 mL akuades hingga tanda batas.

**2. Penentuan Kondisi Optimum *Aspergillus niger* L-51 untuk Memproduksi Enzim Selulase**

Penentuan kondisi optimum pertumbuhan *Aspergillus niger* L-51 dilakukan dengan memvariasikan pH dan waktu inkubasi. Optimasi pH dilakukan dengan membuat variasi pH media fermentasi yaitu pH 4,0; 4,5; 5,0; 5,5; 6,0;

6,5; dan 7,0. Sebanyak 5 ose *Aspergillus niger* L-51 dari media agar miring dipindahkan ke dalam media inokulum secara aseptis lalu dikocok dengan *shaker incubator*, dengan kecepatan 150 rpm pada suhu 35°C selama 72 jam. Selanjutnya 2% media inokulum dipindahkan ke dalam 300 mL media fermentasi dan diinkubasi ke dalam *shaker incubator* dengan kecepatan 150 rpm pada suhu 35°C. Untuk mengetahui produksi optimal enzim selulase yang dihasilkan, dilakukan sampling dengan selang waktu 8 jam.

**3. Produksi Enzim Selulase**

Produksi enzim selulase dilakukan dengan cara 2% media inokulum dipindahkan ke dalam 2 L media fermentasi dengan pH optimum kemudian dikocok dengan *shaker incubator* pada kecepatan 150 rpm suhu 35°C selama waktu inkubasi optimum.

**4. Isolasi dan Pemurnian Enzim Selulase**

**a. Isolasi enzim selulase**

Isolasi enzim dilakukan dengan menggunakan metode sentrifugasi. Metode ini digunakan untuk memisahkan enzim dari sel-selnya. Sentrifugasi dilakukan pada suhu rendah (di bawah suhu kamar) untuk menjaga kehilangan aktivitas enzim. Setelah media fermentasi yang berisi *Aspergillus niger* L-51 dikocok menggunakan *shaker incubator* pada suhu 35°C selama waktu inkubasi optimum selanjutnya enzim dipisahkan dari komponen sel lainnya dengan sentrifugasi pada 5000 rpm dan suhu 4°C selama 25 menit. Filtrat yang diperoleh merupakan ekstrak kasar enzim

yang selanjutnya dilakukan uji aktivitas enzim selulase dengan metode Mandels serta pengukuran kadar protein dengan metode Lowry.

**b. Pemekatan enzim selulase**

Ekstrak kasar enzim selulase yang telah diisolasi kemudian dipekatkan dengan cara pengeringbekuan (*freeze dry*). Sebelum dilakukan *freeze dry*, enzim terlebih dahulu ditempatkan dalam suatu gelas kimia kemudian dibekukan di dalam lemari pendingin. Gelas kimia tersebut ditutup dengan kain kasa selanjutnya dimasukkan ke dalam *freeze dry* hingga volume enzim berkurang dan enzim menjadi semakin pekat yang ditandai dengan perubahan warna eksrak kasar enzim yaitu dari warna kuning menjadi kuning kecoklatan.

**c. Pemurnian enzim selulase**

Pada penelitian ini, pemurnian enzim selulase dilakukan dengan kromatografi kolom filtrasi gel menggunakan Sephadex G-100 sebagai matriks. Adapun proses yang dilakukan adalah :

a. Pengembangan gel dan pencucian Sephadex G-100

Sephadex G-100 disuspensikan dalam akuades dan dibiarkan mengembang pada suhu ruang. Partikel halus dibuang dengan cara dekantasi.

b. Penyiapan kolom gel

Kolom berukuran 1,5 x 50 cm dibubuhi kapas di bagian ujung bawah. Kolom dipasang tegak lurus, selanjutnya bubur gel yang telah mengembang dimasukkan ke dalam kolom dengan kondisi tidak terlalu kental. Untuk menghindari adanya gelembung udara dalam kolom gel, kran pengatur dibiarkan terbuka.

c. Penstabilan gel

Gel yang telah sempurna berada di dalam kolom distabilkan dengan mengalirkan akuades sebanyak 2 kali volum matriks. Selanjutnya mengalirkan buffer phosfat 0,05 M pH 5 sebanyak 2 kali volum matriks atau sampai kondisi pH yang sesuai tercapai. Pengatur dibuka sedemikian rupa sehingga kecepatan tetesan 1-2 mL/menit.

d. Penempatan cuplikan enzim ke dalam kolom

Penempatan cuplikan enzim ke dalam kolom yaitu dengan meneteskan sejumlah cuplikan enzim ke permukaan gel, setelah buffer penstabil masuk ke dalam matriks dan kondisi kran tertutup. Setelah itu kran dibuka sehingga semua cuplikan masuk ke dalam matriks lalu dialirkan buffer phospat kembali. Kapasitas matriks memuat cuplikan sebanyak 5 mL.

e. Penampungan eluat

Eluat ditampung dengan volume 5 mL. Fraksi pertama dimulai pada saat cuplikan enzim telah dimasukkan.

f. Pengukuran eluat

Untuk mengetahui pola protein enzim hasil kromatografi kolom, maka setiap fraksi diukur pada λ 280 nm menggunakan spektrofotometer *UV-Vis*.

g. Pengukuran aktivitas enzim

Setiap fraksi pada puncak protein yang diperoleh dari pengukuran eluat yang ditentukan aktivitasnya. Semua fraksi yang menunjukkan aktivitas unit tertinggi dikumpulkan menjadi satu kemudian ditentukan kadar proteinnya untuk mengetahui aktifitas spesifiknya.

**4. Uji Aktivitas dan Kadar Protein Selulase**

a. Uji aktivitas metode Mandels ( Mandels *et al.*, 1976)

Metode ini berdasarkan glukosa yang terbentuk (Mandels *et al.*, 1976). Sebanyak 0,25 mL enzim, 0,25 mL larutan CMC 0,5% dalam buffer phospat pH 5,0 dicampur lalu diinkubasi selama 60 menit pada suhu 50$^{o}$C. Kemudian ditambahkan 1 mL pereaksi DNS (*dinitrosalisilic acid*) dididihkan selama 10 menit pada penangas air. Selanjutnya ditambahkan 1,5 mL akuades lalu didinginkan. Setelah dingin, serapannya diukur

menggunakan spektrofotometer *UV-Vis* pada λ 510 nm. Kadar glukosa yang terbentuk ditentukan dengan menggunakan kurva standar glukosa.

b. Penentuan kadar protein metode Lowry (Lowry *et al.*, 1951)

Kadar protein enzim ditentukan dengan metode Lowry (Lowry *et al.*, 1951). Sebanyak 1 mL enzim yang akan diukur kadar proteinnya direaksikan dengan 5 mL pereaksi C dan campuran diaduk rata kemudian 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, 1 mL enzim diganti dengan 1 mL akuades, selanjutnya perlakuannya sama seperti sampel. Serapannya diukur menggunakan spektrofotometer *UV-Vis* pada λ 750 nm. Untuk menentukan konsentrasi protein enzim yang digunakan kurva standar BSA (*Bovine Serum Albumin*).

**5. Penambahan Gliserol dan Sorbitol**

Larutan poliol yang digunakan yaitu gliserol dan sorbitol. Larutan poliol ditambahkan pada enzim hasil pemurnian dengan konsentrasi 0,5; 1; dan 1,5 M dengan perbandingan 1:1.

**6. Karakterisasi Enzim (sebelum dan setelah penambahan gliserol dan sorbitol)**

Karakterisasi enzim sebelum dan setelah penambahan gliserol dan sorbitol meliputi: penentuan pH dan suhu optimum, penentuan data kinetika ($K_M$ dan $V_{maks}$), serta penentuan kestabilan terhadap pH dan suhu.

a. Penentuan pH dan suhu optimum

1) Penentuan pH optimum

Untuk mengetahui pH optimum enzim sebelum dan setelah penambahan gliserol dan sorbitol digunakan variasi pH sebagai berikut : 4,0: 4,5: 5,0; 5,5; 6,0; 6,5; dan 7,0. Suhunya dijaga tetap pada 50°C, kemudian dilanjutkan dengan pengukuran aktivitas enzim dengan metode Mandels.

2) Penentuan suhu optimum

Untuk mengetahui suhu optimum kerja enzim sebelum dan setelah penambahan gliserol dan sorbitol dilakukan dengan variasi suhu yaitu 40; 45; 50; 55; 60; 65; dan 70°C, pH tetap dijaga pada pH optimum. Selanjutnya diukur aktivitas enzim dengan metode Mandels.

b. Penentuan data kinetika enzim (nilai $K_M$ dan $V_{maks}$)

Konstanta Michaelis-Menten ($K_M$) dan laju reaksi maksimum ($V_{maks}$) enzim sebelum dan setelah penambahan gliserol dan sorbitol ditentukan dari kurva *Lineweaver-Burk*. Kurva *Lineweaver-Burk* dibuat dengan menguji aktivitas enzim selulase dengan variasi konsentrasi substrat 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1 dan 1,25% dalam buffer phosfat pada pH 4,5 dan suhu 50°C selama 60 menit. Selanjutnya diukur aktivitas enzim dengan metode Mandels.

c. Uji stabilitas termal dan pH enzim (Yang *et al.*, 1996)

Penentuan stabilitas termal enzim dilakukan dengan mengukur aktivitas sisa enzim setelah diinkubasi selama 100 menit pada suhu 50°C dan pH 4,5. Caranya adalah dengan mengukur aktivitas enzim setelah proses pemanasan setiap interval waktu 10 menit. Aktivitas awal enzim (tanpa proses pemanasan) diberi nilai 100%.

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

(Virdianingsih, 2002).

d. Penentuan waktu paruh ($t_{1/2}$), konstanta laju inaktivasi ($k_i$), dan perubahan energi akibat denaturasi ($\Delta G_i$)

Penentuan nilai $k_i$ (konstanta laju inaktivasi termal) enzim selulase hasil pemurnian sebelum dan setelah penambahan gliserol dan sorbitol dilakukan dengan menggunakan persamaan kinetika inaktivasi orde 1 (Kazan *et al.*, 1997)

dengan persamaan:

$$\ln (E_i/E_0) = - k_i\, t$$

Sedangkan untuk perubahan energi akibat denaturasi ($\Delta G_i$) enzim hasil pemurnian sebelum dan setelah penambahan gliserol dan sorbitol dilakukan dengan menggunakan persamaan :

$$\Delta G_i = - RT \ln (k_i\, h/k_B\, T)$$

Keterangan :

R = konstanta gas (8,315 J $K^{-1}$ $mol^{-1}$)

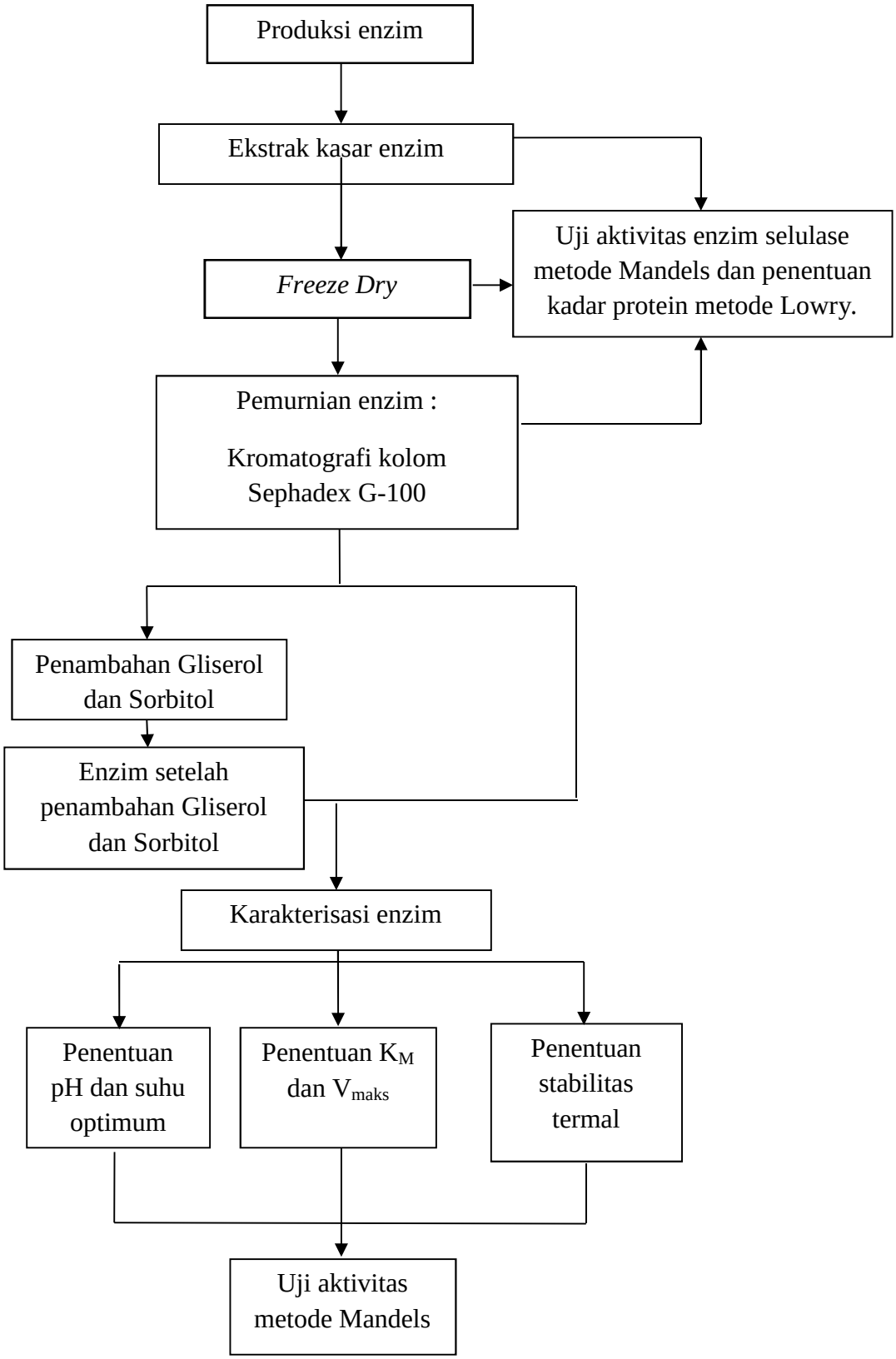
T = suhu absolut (K)

$k_i$ = konstanta laju inaktivasi termal

h = konstanta Planck (6,63 x $10^{-34}$ J det)

$k_B$ = konstanta Boltzmann (1,381 x $10^{-23}$ $JK^{-1}$)

Secara keseluruhan, penelitian ini terangkum dalam diagram alir penelitian yang ditunjukkan dalam Gambar 11.




**Gambar 11.** Diagram alir penelitian