

III. METODOLOGI PENELITIAN

A. Waktu dan Tempat Penelitian

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

B. Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan penelitian ini antara lain alat-alat gelas, jarum ose, pembakar spirtus, autoklaf model S-90N, *laminar air flow* CURMA model 9005-FL, neraca analitik, *shaker incubator*, sentrifuga, lemari pendingin, mikropipet Eppendorff, *waterbath*, kolom kromatografi, *freeze dry*, dan spektrofotometer *UV-VIS Carry Win UV 32*.

Bahan-bahan yang akan digunakan adalah NA (*Nutrien Agar*), CMC (*Carboxymethyl Cellulose*), pepton, ammonium sulfat, akuades, alkohol, Na_2CO_3 , NaOH , MgSO_4 , CaCl_2 , $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, KH_2PO_4 , urea, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, CoCl_2 , reagen *folin ciocelteau*, Na(K) tartarat, NaCl , NaH_2PO_4 , Na_2HPO_4 , DNS (*dinitrosalisilic acid*), fenol, Na_2SO_3 , Sephadex G-100,

gliserol, dan sorbitol. Bakteri penghasil enzim selulase pada penelitian ini adalah *Bacillus subtilis* ITBCCB148 yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi dan Teknologi Bioproses Jurusan Teknik Kimia, Institut Teknologi Bandung.

C. Prosedur Penelitian

1. Penentuan kondisi optimum *Bacillus subtilis* ITBCCB148 untuk memproduksi enzim selulase

a. Pembuatan media inokulum dan fermentasi

Media inokulum dan fermentasi yang digunakan terdiri dari (g.L⁻¹) (NH₄)₂SO₄, 1,4; KH₂PO₄, 2,0; Urea, 0,3; CaCl₂, 0,3; MgSO₄, 0,3; FeSO₄.7H₂O, 0,005; ZnSO₄.7H₂O, 0,0014; CoCl₂, 0,002; CMC, 7,5; pepton, 0,75; pH 5,5-6,0; kemudian disterilkan dalam autoklaf pada suhu 121°C, tekanan 1 atm, selama 15 menit (Sternberg, 1976).

b. Inokulasi *Bacillus subtilis* ITBCCB148

Sebanyak 5 ose *Bacillus subtilis* ITBCCB148 dari media agar miring dipindahkan ke dalam 100 mL media inokulum secara aseptis lalu dikocok dalam *shaker incubator*, dengan kecepatan 150 rpm pada suhu 35°C selama 48 jam.

c. Penentuan pH optimum media fermentasi

pH optimum media fermentasi ditentukan dengan cara mengatur pH awal media fermentasi dengan variasi pH 5,5; 6,0; 6,5; 7,0; 7,5; dan 8,0 menggunakan buffer fosfat 0,1 M. Selanjutnya dipindahkan 2% media inokulum dari jumlah media fermentasi ke dalam 300 mL media

fermentasi secara aseptis dan dikocok dalam *shaker incubator* dengan kecepatan 150 rpm pada suhu 35°C. Lalu diuji aktivitas enzim selulase dengan metode Mandels pada interval waktu tertentu.

2. Produksi dan isolasi enzim selulase

a. Produksi enzim selulase

Produksi enzim selulase dilakukan pada kondisi optimum yang diperoleh pada tahap sebelumnya.

b. Isolasi enzim selulase

Setelah media fermentasi yang berisi *Bacillus subtilis* ITBCCB148 dikocok menggunakan *shaker inkubator* pada suhu 35°C selama waktu fermentasi optimum, selanjutnya dipisahkan enzim selulase dari komponen sel lainnya menggunakan sentrifuga dengan kecepatan putaran 5000 rpm, pada suhu 4°C selama 25 menit. Filtrat yang diperoleh merupakan ekstrak kasar enzim selulase yang selanjutnya diuji aktivitasnya dengan metode Mandels dan diukur kadar protein dengan metode Lowry.

3. Pemekatan enzim selulase

Sebelum dipekatkan, ekstrak kasar enzim selulase hasil isolasi ditempatkan dalam gelas kimia dan ditutup dengan kain kasa, kemudian dibekukan di dalam lemari pendingin. Ekstrak kasar enzim selulase yang

telah beku selanjutnya dikeringbekukan menggunakan *freeze dry* hingga volume enzim berkurang dan enzim semakin pekat yang ditandai dengan perubahan warna ekstrak kasar enzim dari tak berwarna menjadi kuning.

4. Pemurnian enzim selulase dengan kromatografi kolom filtrasi gel

Pada penelitian akan dilakukan pemurnian enzim dengan kromatografi kolom filtrasi gel menggunakan Sephadex G-100 sebagai matriks. Proses pengerjaannya sebagai berikut:

a. Pengembangan dan penstabilan gel

Sephadex G-100 disuspensikan dalam akuades dan dibiarkan mengembang pada suhu ruang selama 2 hari. Partikel halus dihilangkan dengan cara dekantasi. Gel yang telah mengembang sempurna ditimbang dengan buffer fosfat pH 6.

b. Penyiapan kolom gel

Kolom berukuran 1,5 x 50 cm dibubuhi kapas pada ujung bawah. Kolom dipasang tegak lurus, bubur gel yang telah mengembang selanjutnya dimasukkan ke dalam kolom dan diusahakan jangan sampai ada gelembung udara dalam kolom gel. Kran pengatur tetesan dibuka sedemikian sehingga kecepatan tetes 15-20 mL/jam.

c. Penempatan cuplikan ke dalam kolom

Sebanyak 5 mL enzim diteteskan ke permukaan gel secara perlahan, kemudian dialiri buffer penstabil ke dalam matriks.

d. Penampungan eluen

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

e. Pengukuran eluen

Setiap fraksi diukur kadar proteinnya dengan spektrofotometer *UV-Vis* pada panjang gelombang 280 nm. Selanjutnya, absorbansi setiap fraksi diplotkan terhadap nomor fraksinya.

f. Pengukuran aktivitas enzim

Setiap fraksi pada puncak protein yang diperoleh dari pengukuran eluen ditentukan aktivitasnya. Semua fraksi yang menunjukkan aktivitas enzim dikumpulkan menjadi satu, kemudian ditentukan aktivitas unit dan aktivitas spesifiknya.

5. Uji aktivitas enzim selulase

a. Pembuatan pereaksi untuk pengujian aktivitas enzim selulase metode Mandels (Mandels *et al.*, 1976)

Ke dalam labu ukur 100 mL, dimasukkan 1% NaOH, 1 mL Na(K) tartarat 40%, 1% DNS (*dinitrosalisilic acid*), 0,2% fenol dan 0,05% Na₂SO₃ kemudian dilarutkan dengan 100 mL akuades hingga tanda batas.

b. Pengujian aktivitas enzim selulase metode Mandels

Metode ini berdasarkan glukosa yang terbentuk (Mandels *et al*, 1976). Sebanyak 0,25 mL enzim, 0,25 mL larutan CMC 0,5% dalam buffer fosfat pH 5,0 dicampur lalu diinkubasi selama 60 menit pada suhu 50°C. Kemudian ditambahkan 1 mL pereaksi DNS (*dinitrosalisilic acid*) dididihkan selama 10 menit pada penangas air dan didinginkan. Setelah dingin, campuran ditambahkan akuades sebanyak 1,5 mL dan diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer *UV-Vis* pada panjang gelombang 510 nm. Kadar glukosa yang terbentuk ditentukan dengan menggunakan kurva standar glukosa.

6. Penentuan kadar protein enzim selulase

a. Pembuatan pereaksi untuk penentuan kadar protein enzim selulase metode Lowry

- Pereaksi A : 2 gram Na_2CO_3 dilarutkan dalam 100 mL NaOH 0,1 N.
- Pereaksi B : 5 mL larutan $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 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 ciocelteau* diencerkan dengan akuades 1 : 1.
- Larutan standar : larutan BSA (*Bovine Serum Albumin*) dengan kadar 0, 20, 40, 60, 80, 100, 120, dan 140 ppm.

b. Penentuan kadar protein enzim selulase metode Lowry

Kadar protein enzim ditentukan dengan metode Lowry (Lowry *et al.*, 1951). Penentuan kadar protein ini bertujuan untuk mengukur aktivitas spesifik dari protein enzim selulase. Sebanyak 1 mL enzim selulase direaksikan dengan 5 mL pereaksi C dan diaduk rata kemudian dibiarkan selama 10 menit pada suhu ruang. 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 panjang gelombang 750 nm. Untuk menentukan konsentrasi protein enzim yang digunakan kurva standar BSA (*Bovine Serum Albumin*).

7. Penambahan gliserol dan sorbitol

Larutan gliserol dan sorbitol dengan perbedaan konsentrasi 0,5 M; 1,0 M; dan 1,5 M masing-masing ditambahkan kepada enzim hasil pemurnian dengan perbandingan 1:1.

8. 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 suhu dan pH.

a. Penentuan pH dan suhu optimum

1) Penentuan pH optimum

Untuk mengetahui pH optimum enzim sebelum dan sesudah penambahan gliserol dan sorbitol digunakan buffer fosfat 0,05 M dengan variasi pH sebagai berikut: 5,0; 5,5; 6,0; 6,5; 7,0; 7,5; dan 8,0. Suhunya tetap dijaga pada 50°C, kemudian dilanjutkan dengan pengujian aktivitas enzim dengan metode Mandels.

2) Penentuan suhu optimum

Untuk mengetahui suhu optimum kerja enzim dilakukan dengan variasi suhu yaitu 40; 45; 50; 55; 60; 65; dan 70°C, pH tetap dijaga pada pH optimum. Selanjutnya diuji 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 sesudah 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 fosfat pada pH 6 dan suhu 50°C selama 60 menit. Selanjutnya diuji aktivitas enzim dengan metode Mandels.

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

Penentuan stabilitas termal dan pH enzim dilakukan dengan mengukur aktivitas sisa enzim setelah diinkubasi selama periode waktu 100 menit pada suhu 50°C dan pH 5,5. 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 (G_i)

Penentuan nilai k_i (konstanta laju inaktivasi termal) enzim selulase hasil pemurnian 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 (G_i) enzim hasil pemurnian dan hasil modifikasi kimia dilakukan dengan menggunakan persamaan (Kazan *et al.*, 1997):

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

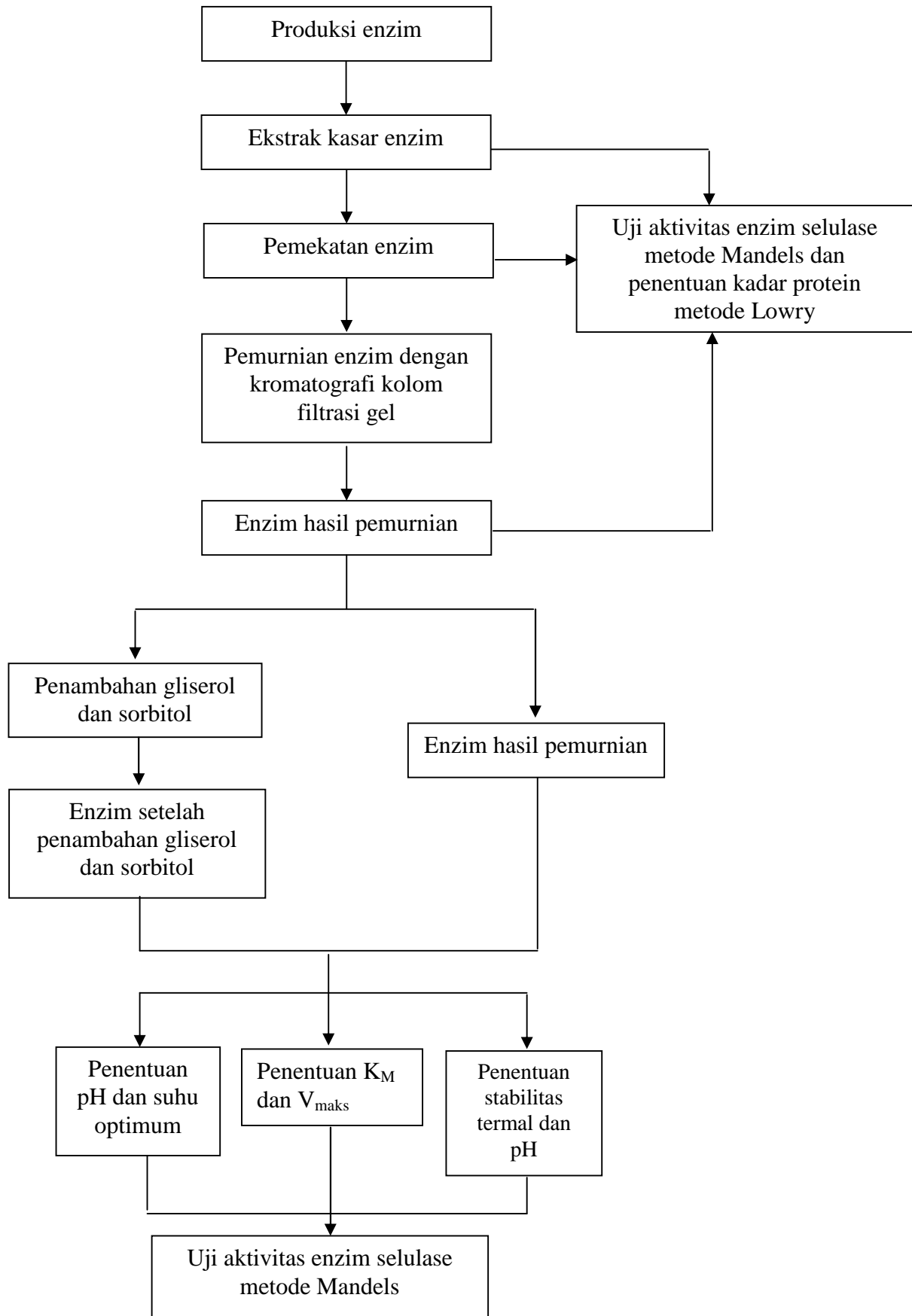
Keterangan :

R = konstanta gas (8,315 J K⁻¹ mol⁻¹)

T = suhu absolut (K)

k_i	= konstanta laju inaktivasi termal
h	= konstanta Planck ($6,63 \times 10^{-34}$ J det)
k_B	= konstanta Boltzmann ($1,381 \times 10^{-23}$ J K ⁻¹)

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



Gambar 11. Diagram alir penelitian