

III. METODE PENELITIAN

A. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan April - September 2015. Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Biokimia Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Universitas Lampung.

B. Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini adalah mortar, kertas saring, neraca analitik OHAUS GA 200, autoklaf *TOMY High Pressure Steam Sterilzer* ES-315, *inkubator shaker*, *waterbath*, pH meter, vortex, *magnetic stirrer*, spektrofotometer UV-Vis, Beckman *High Speed sentrifuge*, ultrasentrifus, mikropipet, *waterbath*, oven, spektrofotometer UV-vis, jarum ose dan alat-alat gelas lain seperti tabung reaksi, cawan petri, erlenmeyer, gelas beaker, gelas ukur, labu ukur, pipet tetes, batang pegaduk, serta pemanas bunsen.

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah Bahan yang digunakan ialah isolat lokal *A. niger*. Media pertumbuhan terdiri dari 1,2 % K_2HPO_4 , 0,1 % $MgSO_4$, 0,05 % KCl, 0,003 % $FeSO_4$, 0,08 % $(NH_4)_2SO_4$, 0,01 % $CaCl_2$, 0,5 % pepton, 0,5 % pati dan sitrakonat anhidrida.

C. Prosedur Penelitian

1. Pembuatan Media Inokulum, Media Fermentasi dan Pereaksi.

a. Pembuatan media agar kentang dekstroza (*Potato Dextrose Agar*)

Sebanyak 39 gram PDA dilarutkan dalam akuades hingga 1000 mL, kemudian dipanaskan sambil diaduk hingga homogen. Larutan dipanaskan di atas *hotplate* sambil terus diaduk hingga PDA melarut dan berwarna jernih. Medium disterilkan dalam autoklaf pada suhu 121°C, tekanan 2 atm selama 15 menit. Medium dimasukkan ke dalam tabung reaksi bersih medium miring, sumbat mulut tabung dengan kapas lemak dan dilapisi kertas lalu ikat tabung dengan karet, sebagian medium dimasukkan ke dalam Erlenmeyer, media dalam Erlenmeyer disimpan sebagai stok media pada suhu ruang atau dalam lemari pendingin.

b. Pembuatan media inokulum dan fermentasi

Media Inokulum dan fermentasi yang digunakan terdiri dari 1,2 % K_2HPO_4 , 0,1 % $MgSO_4$, 0,05 % KCl , 0,003 % $FeSO_4$, 0,08 % $(NH_4)_2SO_4$, 0,01 % $CaCl_2$, 0,5 % pepton, 0,5 % pati dan dilarutkan dalam buffer fosfat pH 7.

c. Pembuatan pereaksi untuk penentuan kadar protein enzim α -amilase metode Lowry

Pereaksi A : 2 gram Na_2CO_3 dilarutkan dalam 100 mL $NaOH$ 0,1 N.

Pereaksi B : 5 mL larutan $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 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 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.

d. Pembuatan pereaksi untuk uji aktivitas amilase metode Fuwa

- 1) Pereaksi Iodin : 2 gram serbuk KI dilarutkan dalam 10 mL aquades, ditambahkan 0,2 gram I₂, dan ditambahkan akuades sampai tanda batas pada labu takar 100 mL.
- 2) Larutan amilum : 0,1 gram amilum ditambahkan 100 mL aquades ke dalam labu ukur kemudian dipanaskan hingga larut. (Fuwa, 1954).

e. Pembuatan pereaksi untuk uji aktivitas amilase metode Mandels

Ke dalam labu ukur 100 mL, dimasukkan 1% DNS (*dinitrosalisilic acid*), 1% NaOH, 0,2 fenol, 0,05% Na₂SO₃, dan 1 mL Na(K) tartrat kemudian dilarutkan dengan akuades hingga tanda batas (Mandels, *et al.*, 1976).

2. Pembiakan fungi *Aspergillus niger* L-51

Biakan *A. niger* L-51 ditanam pada media agar miring PDA (*potato dextrose Agar*) dalam tabung reaksi, diinkubasi pada suhu 37°C selama 5 hari. Spora yang terbentuk dikerok dengan jarum ose, sehingga diperoleh biakan *A. niger*.

3. Inokulasi *A. niger* Pada Media Inokulum dan Media Fermentasi

Disiapkan media inokulum dan fermentasi yang terdiri dari 1,2 % K_2HPO_4 , 0,1 % $MgSO_4$, 0,05 % KCl, 0,08 % $(NH_4)_2SO_4$, 0,003 % $FeSO_4$, 0,01 % $CaCl_2$, 0,5 % pepton, 0,5 % pati dan dilarutkan dalam bufer fosfat pH 7. Ujung kawat ose dicelupkan ke dalam alkohol 96% lalu dipanaskan pada api bunsen sampai berwarna merah. Biakan *A. niger* dari media PDA diambil dengan menggunakan kawat ose lalu dicelupkan beberapa saat pada media cair hingga tampak keruh. Media cair ditutup dengan sumbat dan diinkubasi pada suhu ruang $\pm 25^\circ C$ selama 24 jam. Pekerjaan ini dilakukan di ruang aseptik.

Produksi enzim α -amilase dilakukan dengan memindahkan secara aseptis 20 mL (2% dari total volume media fermentasi) ke dalam media pertumbuhan yang komposisinya sama dengan media inokulum. Selanjutnya media fermentasi yang telah berisi 2% medium inokulum diinkubasi pada suhu ruang menggunakan shaker dengan kecepatan 150 rpm selama 72 Jam.

4. Isolasi dan Pemurnian Enzim α -amilase

a. Isolasi enzim α -amilase

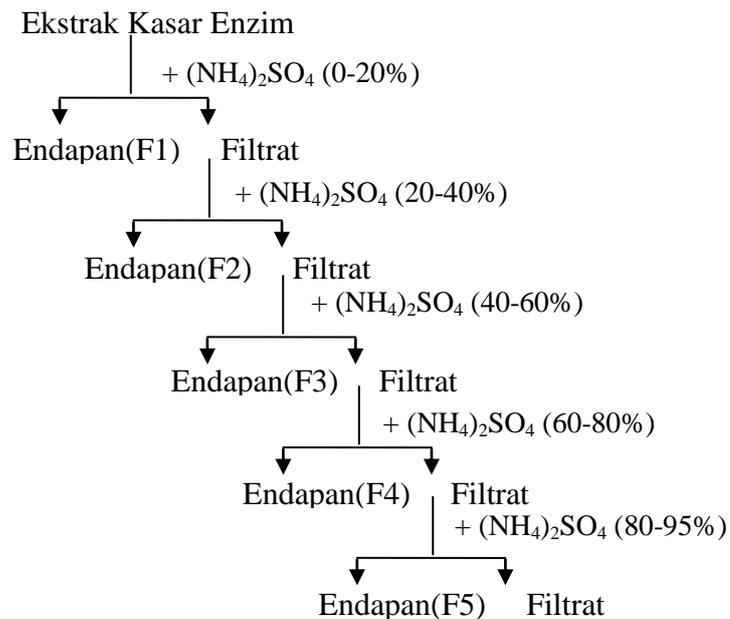
Tahapan pemurnian enzim dimulai dari sentrifugasi. Tujuan sentrifugasi ini adalah untuk memisahkan enzim ekstraseluler dari sel. Sentrifugasi ini dilakukan pada suhu rendah (dibawah suhu kamar) untuk menjaga kestabilan aktivitas enzim (Suhartono, 1989).

Media fermentasi yang berisi *Aspergillus niger* L-51 dikocok dengan menggunakan *shaker* pada suhu ruang selama 72 jam. Kemudian dilakukan pemisahan enzim dari komponen sel lainnya dengan setrifugasi pada 5000 rpm pada suhu 4°C selama 20 menit. Filtrat yang diperoleh merupakan ekstrak kasar enzim yang selanjutnya akan diukur aktivitas enzim α -amilase dengan metode Fuwa dan diukur kadar proteinnya dengan menggunakan metode Lowry.

b. Proses pemurnian enzim α -amilase

1) Pengendapan dengan amonium sulfat

Supernatan difraksinasi dengan menggunakan amonium sulfat pada konsentrasi (20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 95%) kemudian dilakukan sentrifugasi dengan kecepatan 6000 rpm selama 30 menit (lihat Gambar 6), endapan yang diperoleh dilarutkan dalam 5 mL buffer fosfat 0,1 M pH 6. Selanjutnya diukur aktivitas enzim dan kadar protein.



Gambar 6. Skema pengendapan protein enzim dengan amonium sulfat.

Endapan protein enzim yang didapatkan pada tiap fraksi kejenuhan amonium sulfat (Gambar 6), dipisahkan dari filtratnya dengan sentrifugasi pada kecepatan 5000 rpm selama 20 menit. Kemudian endapan yang diperoleh dilarutkan dengan buffer fosfat 0,1 M pH 6,0 dan diuji aktivitasnya dengan metode Fuwa dan diukur kadar proteinnya dengan metode Lowry untuk mengetahui pada fraksi-fraksi mana terdapat enzim α -amilase dengan aktivitas spesifik yang tinggi.

2) Dialisis

Endapan enzim yang telah dilarutkan dari tiap fraksi amonium sulfat dengan aktivitas spesifik tertinggi dimasukkan ke dalam kantong selofan dan didialisis dengan buffer fosfat 0,01 M pH 6

selama 24 jam pada suhu dingin (4-5°C) (Pohl, 1990). Selama dialisis, dilakukan pergantian buffer setiap 2-6 jam sekali agar konsentrasi ion-ion di dalam kantong dialisis dapat dikurangi. Proses ini dilakukan terus menerus hingga tidak ada amonium sulfat yang tersisa. Pengujian adanya amonium sulfat dalam buffer dilakukan dengan menambahkan larutan BaCl₂. Proses ini dihentikan sampai tidak terbentuk endapan putih pada saat penambahan BaCl₂. Selanjutnya dilakukan uji aktivitas dengan metode Mandels, serta diukur kadar proteinnya dengan metode Lowry.

5. Uji Aktivitas Enzim α -amilase

a. Metode Fuwa

Aktivitas enzim α -amilase ditentukan dengan menggunakan metode iodine (Fuwa, 1954). Sebanyak 0,1 mL larutan enzim ditambahkan 0,4 mL aquades dan 0,5 mL pati, kemudian diinkubasi pada suhu 60°C selama 10 menit. Reaksi dihentikan dengan penambahan 0,1 mL HCl 0,25 M dan kemudian ditambahkan 0,25 mL larutan iodine dan 4 mL aquades ke dalam campuran reaksi. Campuran tersebut dihomogenkan dan diukur serapannya menggunakan spektrofotometer UV-vis pada λ 600 nm. Kontrol dibuat dengan proses yang sama, namun menggunakan 0,25 mL larutan enzim yang sudah dinaktifkan. Penentuan aktivitas dengan menggunakan metode iodine dilakukan pada tahapan isolasi, pemurnian dan karakterisasi enzim.

b. Metode Mandels

Metode ini didasarkan atas glukosa yang terbentuk. Sebanyak 0,5 mL enzim, 0,5 mL larutan pati 0,1% dicampur lalu diinkubasi selama 30 menit pada suhu 60°C, kemudian ditambahkan 2 mL pereaksi DNS (*dinitrosalisilic acid*) dan dididihkan selama 10 menit pada penangas air dan selanjutnya didinginkan. Diukur serapan dengan menggunakan spektrofotometer UV-vis pada λ 510 nm. Kadar glukosa yang terbentuk ditentukan dengan menggunakan kurva standar glukosa. Uji ini akan dilakukan pada tahap penentuan K_M dan V_{Maks} .

6. Penentuan Kadar Protein Metode Lowry

Sebanyak 0,1 mL enzim ditambahkan 0,9 mL akuades lalu direaksikan dengan 5 mL pereaksi C kemudian dihomogenkan dan dibiarkan selama 10 menit pada suhu ruang. Setelah itu ditambahkan dengan cepat 0,5 mL pereaksi D dan diaduk sempurna kemudian didiamkan selama 30 menit pada suhu ruang. Sebagai kontrolnya, 0,1 mL enzim diganti dengan 0,1 mL akuades dan diperlakukan sama seperti sampel. Kemudian diukur serapannya menggunakan spektrofotometer UV-vis pada λ 750 nm (Lowry *et al.*, 1951).

Untuk menentukan konsentrasi protein enzim digunakan kurva larutan standar BSA (*Bovine Serum Albumin*) yakni dengan mencari panjang gelombang maksimum dan pembuatan kurva larutan standar BSA. Penentuan Panjang gelombang maksimum larutan standar BSA dilakukan

dengan membuat larutan BSA 0,2 mg/mL dan direaksikan dengan reagen Lowry, kemudian diukur serapannya dengan spektrofotometer UV-vis pada rentang panjang gelombang 600-800 nm. Sedangkan, untuk membuat kurva standar BSA dapat dilakukan dengan membuat variasi konsentrasi larutan BSA antara 0,2- 1,4 mg/mL dengan rentang 0,2 mg/mL dan diukur serapannya pada panjang gelombang maksimum (Atmaja, 2013).

Setelah didapatkan kadar protein, dilakukan perhitungan Aktivitas spesifik untuk mengetahui unit aktivitas per mg protein. Perhitungan aktivitas spesifik enzim menurut Machfoed *et al.*, (1989) adalah sebagai berikut:

$$\text{Aktivitas Spesifik Enzim} = \frac{\text{Unit aktivitas (Unit/ml)}}{\text{Kadar Protein (mg/ml)}}$$

D. Modifikasi Kimia Enzim α -amilase dengan Sitratkonat Anhidrida

Residu amilase pada suatu enzim secara spesifik dapat dimodifikasi dengan sitratkonat anhidrida yang prosedurnya telah dilaporkan oleh Khajeh *et al.*, (2001). Sebanyak 10 mL enzim hasil pemurnian dalam 10 mL larutan buffer fosfat pH 8 ditambahkan reagen sitratkonat anhidrida sebanyak 30 μ L secara bertahap. Setiap penambahan reagen, pH larutan dijaga konstan pada pH 8 dengan menambahkan larutan $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ lalu diaduk menggunakan *magnetic stirrer* selama 60 menit. Penambahan reagen sitratkonat dilakukan

dengan variasi volume sebagai berikut : 3 μ L, 4 μ L dan 5 μ L dan dilakukan dengan prosedur yang sama.

E. Karakterisasi Enzim α -amilase Hasil Pemurnian dan Hasil Modifikasi

Karakterisasi enzim α -amilase hasil pemurnian dan hasil modifikasi yang dilakukan meliputi :

1. Penentuan derajat modifikasi

Derajat modifikasi enzim merupakan perbandingan antara residu lisin dalam enzim yang termodifikasi terhadap residu lisin sebelum dimodifikasi. Prosedur pengerjaannya adalah sebagai berikut: Untuk sampel, sebanyak 0,1 mL enzim yang telah dimodifikasi dilarutkan dalam 0,9 mL buffer borat (pH 9,0). Kemudian ditambahkan 25 μ L 0,03 M asam 2,4,6-trinitrobenzena-sulfonat (TNBS). Campuran ini kemudian dikocok dan dibiarkan pada suhu kamar selama 30 menit. Larutan standar dibuat dengan komposisi sama, namun menggunakan enzim hasil pemurnian (sebelum dimodifikasi). Sedangkan, blanko terdiri dari 1 mL buffer borat pH 9; 0,1 M dan 25 μ L TNBS 0,03 M. absorbansi diukur pada panjang gelombang 420 nm. Derajat modifikasi dapat dihitung dengan menggunakan rumus sebagai berikut:

Derajat Modifikasi:

$$= \frac{\text{Jumlah residu lisin yang termodifikasi}}{\text{Jumlah residu lisin awal}} \times 100\%$$

$$= \frac{(A_{St} - A_{B1}) - (A_{Sp} - A_{B1})}{(A_{St} - A_{B1})} \times 100\%$$

Keterangan :

A_{st} : Absorbansi larutan standar
 A_{BI} : Absorbansi larutan blanko
 A_{Sp} : Absorbansi larutan sampel

2. Penentuan pH dan suhu optimum

a. Penentuan pH optimum

Untuk mengetahui pH optimum enzim sebelum dan sesudah modifikasi digunakan buffer fosfat 0,1 M dengan variasi pH sebagai berikut : 4,5; 5; 5,5; 6; 6,5; 7; 7,5 dan 8. Suhunya dijaga tetap pada 60°C, kemudian dilanjutkan dengan pengukuran aktivitas enzim dengan metode Fuwa.

b. Penentuan suhu optimum

Untuk mengetahui suhu optimum kerja enzim dilakukan dengan variasi suhu yaitu 45; 50; 55; 60; 65; 70, 75 dan 80°C, pH tetap dijaga pada pH optimum. Selanjutnya diukur aktivitas enzim dengan metode Fuwa.

3. 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 modifikasi ditentukan dari kurva *Lineweaver-Burk*. Kurva *Lineweaver-Burk* dibuat dengan menguji aktivitas enzim α -amilase dengan variasi konsentrasi substrat 0,25 %; 0,5 %; 0,75 %; 1,0 % dan 1,25 % dalam buffer fosfat pH 5,5 dan suhu 50°C selama 60 menit. Selanjutnya diukur aktivitas enzim dengan metode Mandels.

4. Uji stabilitas termal enzim (Yang *et al.*, 1996)

Penentuan stabilitas termal enzim dilakukan dengan mengukur aktivitas sisa enzim setelah diinkubasi selama periode waktu 180 menit pada pH dan suhu optimum hasil penentuan sebelumnya. Caranya adalah dengan mengukur aktivitas enzim menggunakan metode Fuwa dengan proses pemanasan setiap interval waktu 30 menit. Aktivitas awal enzim (tanpa proses pemanasan) diberi nilai 100%.

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

5. Penentuan waktu paruh ($t_{1/2}$), konstanta laju inaktivasi (k_i) dan perubahan energi akibat denaturasi (ΔG_i)

Penentuan nilai k_i (konstanta laju inaktivasi termal) enzim α -amilase hasil pemurnian dan hasil modifikasi kimia dilakukan dengan menggunakan persamaan kinetika inaktivasi orde 1 yaitu :

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

Sedangkan untuk perubahan energi akibat denaturasi (ΔG_i) enzim hasil pemurnian dan hasil modifikasi kimia dilakukan dengan menggunakan persamaan (Yandri *et al.*, 2007) :

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

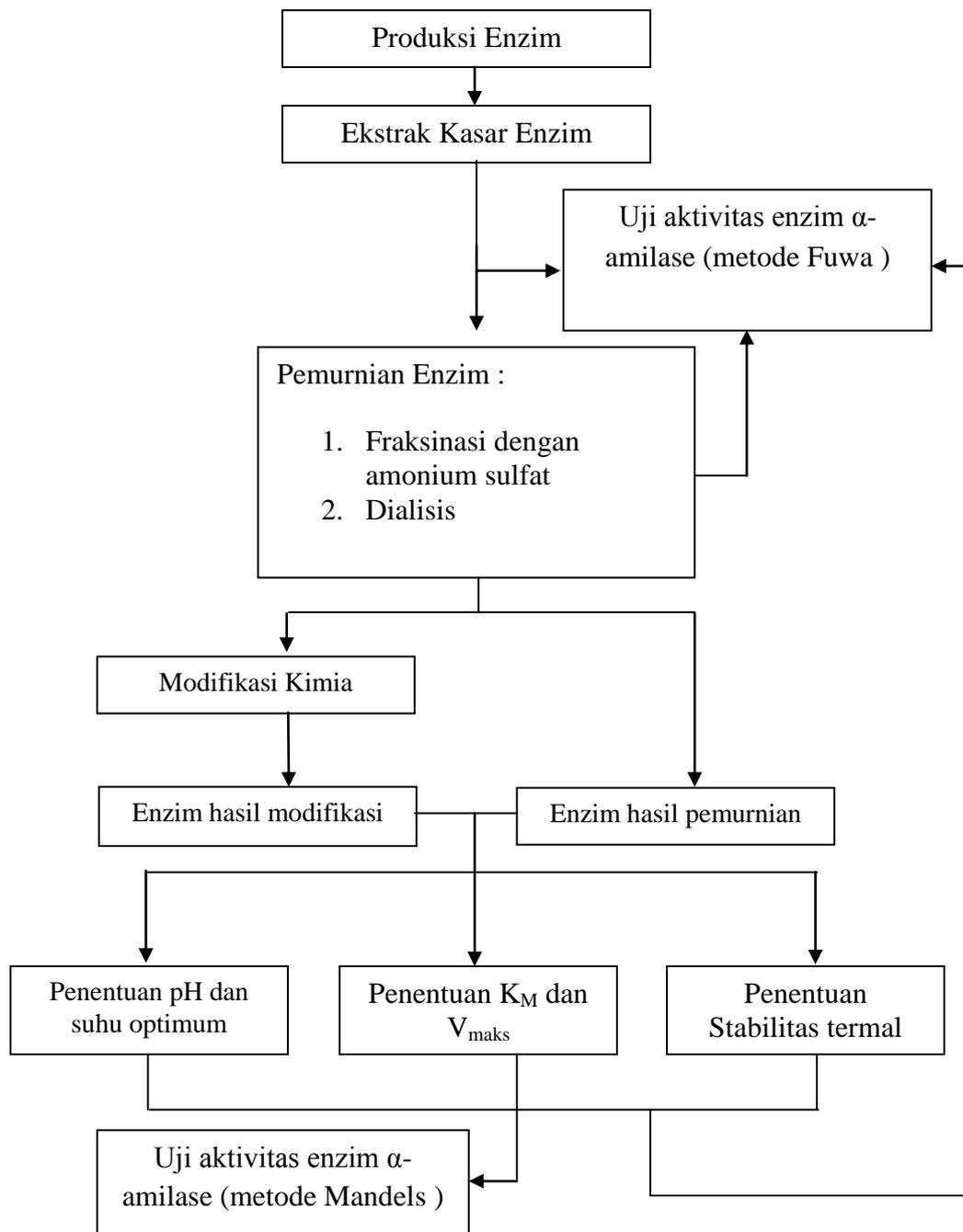
Keterangan :

- R = konstanta gas ($8,315 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$)
- T = suhu absolut (K)
- k_i = konstanta laju inaktivasi termal

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

Tahapan secara keseluruhan modifikasi kimia enzim α -amilase dengan menggunakan sitrakonat anhidrida dapat dilihat pada Gambar 7.

F. Kerangka Penelitian



Gambar 7. Kerangka penelitian produksi, pemurnian, dan modifikasi enzim α -amilase dari *A.niger* L-51