

III. METODELOGI PENELITIAN

A. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini akan dilakukan pada bulan Mei-November 2013 di Laboratorium Biokimia Jurusan Kimia, Laboratorium Instrumentasi Jurusan Kimia 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, pembakar spiritus, jarum ose, kertas pH universal, mikropipet Eppendroff, neraca analitik, termometer, *magnetic stirrer*, lemari pendingin, kantong selofan, batang pengaduk kaca, kompor gas, sentrifuga, *autoclave* model S-90N, oven, penangas, *waterbath shaker incubator* STUART SSL2, *laminar air flow* CRUMA model 9005-FL, *waterbath incubator* HAAKE dan spektrofotometer UV-VIS Cary Win UV 32.

Adapun bahan-bahan yang digunakan adalah *Potato Dextrose Agar* (PDA), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, KH_2PO_4 , CaCl_2 , MgSO_4 , urea, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, CoCl_2 , pepton, glukosa, NaOH , Na_2CO_3 , $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, *Carboxymethyl Cellulase* (CMC), reagen folin-ciocalteu, akuades, Na(K)-Tartarat, NaH_2PO_4 , Na_2HPO_4 , Na-sitrat,

asam sitrat, pereaksi DNS (*dinitrosalisilic acid*), fenol, Na₂SO₃, alkohol, *Bovine Serum Albumin* (BSA), dan sitrakonatan anhidrida (Merck kode produk: 8413210100). Adapun 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 Medium Inokulum, Inokulasi *Aspergillus niger* L-51, Produksi Enzim selulase dan Pembuatan Larutan Pereaksi

a. Pembuatan medium inokulum

Medium inokulum yang digunakan (gL⁻¹) terdiri dari (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; pepton 0,75; glukosa 7,5 yang dilarutkan dalam bufer fosfat pH 5,5, kemudian disterilkan pada suhu 121°C, tekanan 1 atm, selama 15 menit dalam *autoclave*.

b. Inokulasi *Aspergillus niger* L-51

Sebanyak 5 ose *Aspergillus niger* L-51 dari media agar miring dipindahkan ke dalam 100 mL medium inokulum secara aseptis lalu dikocok dalam *Waterbath shaker incubator* dengan kecepatan 130 rpm pada suhu 35°C selama 56 jam.

c. Produksi enzim selulase

Produksi enzim selulase dilakukan dengan memindahkan secara aseptis 20 mL (2% dari total volume media fermentasi) ke dalam media fermentasi yang terdiri dari (g.L^{-1}) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1,4; KH_2PO_4 2,0; urea 0,3; CaCl_2 0,3; MgSO_4 0,3; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,005; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,0014; CoCl_2 0,002; pepton 0,75; CMC 7,5, dilarutkan dalam bufer fosfat pH 5. Selanjutnya media fermentasi yang telah berisi 2% medium inokulum dikocok dalam *waterbath shaker incubator* dengan kecepatan 130 rpm pada suhu 32°C selama 64 jam.

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

Ke dalam labu ukur 100 ml, dimasukkan 1% DNS (*dinitrosalisilic acid*), 1% NaOH, 1 mL Na(K) tartarat 40%, 0,2% fenol, dan 0,05% Na_2SO_3 , kemudian dilarutkan dalam 100 mL akuades hingga tanda batas.

e. 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.

2. Isolasi dan Pemurnian Enzim Selulase

a. Isolasi enzim selulase

Isolasi enzim selulase dilakukan menggunakan metode sentrifugasi. Prinsip sentrifugasi berdasarkan kecepatan sedimentasi dengan cara pemusingan. Sentrifugasi digunakan untuk memisahkan enzim ekstraseluler dari sisa-sisa sel. Sentrifugasi dilakukan pada suhu rendah (di bawah suhu kamar) untuk menjaga kehilangan aktivitas enzim (Suhartono, 1989). Setelah media fermentasi yang berisi *Aspergillus niger* L-51 dikocok menggunakan *Waterbath shaker incubator* pada suhu 32°C selama 64 jam, selanjutnya enzim dipisahkan dari komponen sel lainnya dengan sentrifugasi pada kecepatan 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.

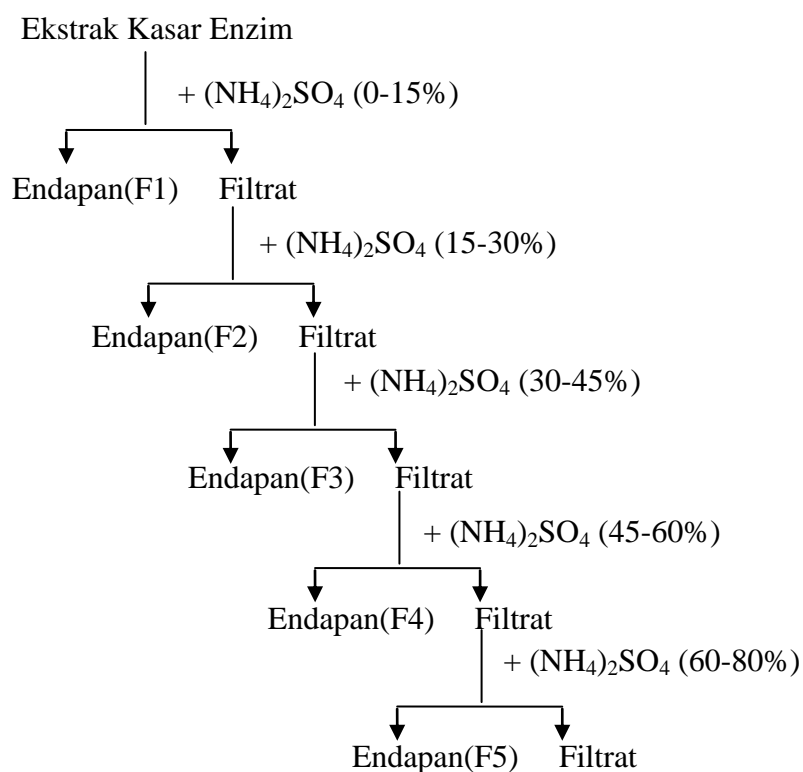
b. Pemurnian enzim selulase

Pemurnian enzim selulase dilakukan dengan 2 tahap, yaitu fraksinasi menggunakan ammonium sulfat dan dialisis.

1. Fraksinasi dengan ammonium sulfat $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$

Ekstrak kasar enzim yang diperoleh dimurnikan dengan metode fraksinasi menggunakan garam ammonium sulfat pada berbagai

derajat kejenuhan yaitu 0-15%; 15-30%; 30-45%; 45-60% dan 60-80%. Skema proses pengendapan protein enzim dengan penambahan ammonium sulfat ditunjukkan pada Gambar 11. Adapun proses pengerjaannya yaitu ekstrak kasar enzim yang diperoleh diukur volumnya, selanjutnya dilakukan penambahan garam ammonium sulfat yang telah dihaluskan secara perlahan sambil diaduk dengan *magnetik stirer* pada suhu 4°C. Endapan protein enzim yang didapatkan pada tiap fraksi kejenuhan ammonium sulfat selanjutnya dipisahkan dari filtratnya dengan sentrifugasi dingin pada kecepatan 5000 rpm selama 20 menit. Kemudian endapan yang diperoleh dilarutkan dengan bufer fosfat 0,1 M pH 6,0 dan diuji aktivitasnya dengan metode Mandels, serta diukur kadar proteinnya dengan metode Lowry untuk mengetahui fraksi-fraksi yang mengandung enzim selulase dengan aktivitas spesifik yang tinggi. Filtrat yang didapat dari fraksi 0-15% digunakan untuk diendapkan kembali dengan fraksi kejenuhan 15-30% dengan prosedur yang sama dan seterusnya sampai fraksi 60-80%. Setelah diketahui fraksi-fraksi yang mengandung enzim selulase dengan aktivitas spesifik tertinggi, maka langkah selanjutnya adalah melakukan fraksinasi ulang pada tingkat fraksi tersebut, sehingga enzim dapat terendapkan secara maksimal (Yandri *et al.*, 2010).



Gambar 11. Skema pengendapan protein enzim dengan ammonium sulfat.

2. Dialisis

Endapan enzim yang telah dilarutkan dari tiap fraksi amonium sulfat dengan aktivitas spesifik tertinggi dimasukkan ke dalam kantong selofan dan didialisis dengan bufer fosfat 0,01 M pH 6 selama 24 jam pada suhu dingin (Pohl, 1990). Selama dialisis, dilakukan pergantian bufer setiap 6 jam agar konsentrasi ion-ion di dalam kantong dialisis dapat dikurangi. Proses ini dilakukan secara kontinyu sampai ion-ion di dalam kantong dialisis dapat diabaikan. Selanjutnya dilakukan uji aktivitas dengan metode Mandels, serta diukur kadar proteinnya dengan metode Lowry.

3. Uji Aktivitas Enzim Selulase

a. Pembuatan standar glukosa metode Mandels

Standar glukosa dibuat dengan variasi konsentrasi 0-1,4 mg/mL. Sebanyak 0,25 mL akuades, 0,25 larutan glukosa konsentrasi 0-1,4 mg/mL dalam bufer fosfat pH 5,0 dicampur lalu diinkubasi selama 60 menit pada suhu 50°C. Kemudian ditambahkan 1 mL pereaksi DNS dan 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. Selanjutnya, absorbansi masing-masing larutan diplotkan terhadap konsentrasinya sehingga diperoleh nilai *slope*, *intercept*, dan R^2 .

b. Uji aktivitas enzim selulase metode Mandels (Mandels *et al.*, 1976)

Metode ini didasarkan pada glukosa yang terbentuk (Mandels *et al.*, 1976). Sebanyak 0,25 mL enzim, 0,25 larutan CMC 0,5% dalam bufer fosfat pH 5,0 dicampur lalu diinkubasi selama 60 menit pada suhu 50°C. Kemudian ditambahkan 1 mL pereaksi DNS dan 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. Penentuan aktivitas enzim selulase dengan menggunakan metode Mandels ini dilakukan pada tahap isolasi, pemurnian, penentuan K_M dan V_{maks} , dan karakterisasi enzim.

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

Kadar protein enzim ditentukan dengan metode Lowry (Lowry *et al.*, 1951). Sebanyak 0,1 mL enzim selulase ditambahkan 0,9 mL akuades lalu 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, 0,1 mL enzim diganti dengan 0,1 mL akuades, selanjutnya perlakuannya sama seperti sampel. Serapannya diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 750 nm. Untuk menentukan konsentrasi protein enzim digunakan kurva standar BSA (*Bovine Serum Albumin*). Penentuan kadar protein enzim selulase dengan menggunakan metode Lowry ini dilakukan pada tahap isolasi dan pemurnian.

4. Modifikasi Kimia Enzim Selulase dengan Sitratonat Anhidrida

Residu lisin pada suatu enzim secara spesifik dapat dimodifikasi dengan sitratonat anhidrida yang prosedurnya telah dilaporkan oleh Khajeh *et al.*, (2001). Sebanyak 10 mL enzim hasil pemurnian dalam 10 mL larutan bufer fosfat pH 8 ditambahkan reagen sitratonat anhidrida sebanyak 20 μL 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 sitratonat dilakukan dengan variasi volume sebagai berikut : 30 μL , 40 μL dan 50 μL dan dilakukan dengan prosedur yang sama.

5. Karakterisasi Enzim Selulase Hasil Pemurnian dan Hasil Modifikasi

Karakterisasi enzim selulase hasil pemurnian dan hasil modifikasi yang dilakukan meliputi :

a. Penentuan pH dan suhu optimum

1) Penentuan pH optimum

Untuk mengetahui pH optimum enzim sebelum dan sesudah modifikasi digunakan bufer sitrat 0.1 M dan bufer fosfat 0,1 M dengan variasi pH sebagai berikut : 4; 4,5; 5; 5,5; 6; 6,5; 7; 7,5 dan 8. Suhunya dijaga tetap pada 50°C, kemudian dilanjutkan dengan pengukuran aktivitas enzim dengan metode Mandels dan kadar proteinnya dengan metode Lowry.

2) 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 Mandels dan kadar proteinnya dengan metode Lowry.

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 modifikasi 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 dan 1% dalam bufer fosfat pH 5 dan suhu 50°C selama 60 menit. Selanjutnya diukur aktivitas enzim dengan metode Mandels.

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

Penentuan stabilitas termal enzim dilakukan dengan mengukur aktivitas sisa enzim setelah diinkubasi selama periode waktu 100 menit pada pH dan suhu optimum hasil penentuan sebelumnya. Caranya adalah dengan mengukur aktivitas enzim menggunakan metode Mandels 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 (ΔG_i)

Penentuan nilai k_i (konstanta laju inaktivasi termal) enzim selulase hasil pemurnian dan hasil modifikasi kimia dilakukan dengan menggunakan persamaan kinetika inaktivasi orde 1 (Kazan *et al.*, 1997) 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) :

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

Keterangan :

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

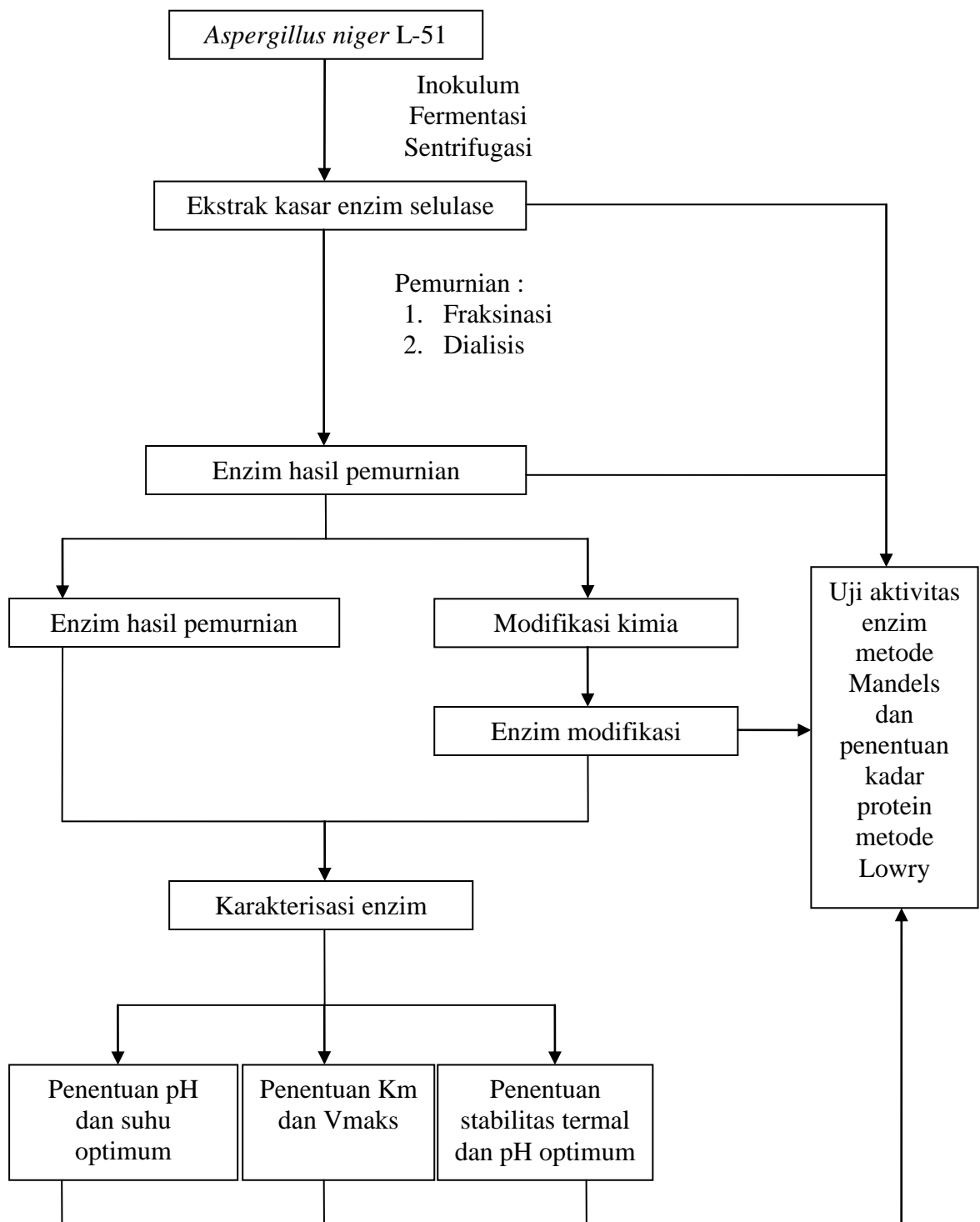
T = suhu absolut (K)

k_i = konstanta laju inaktivasi termal

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

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

Secara keseluruhan, penelitian ini terangkum dalam diagram alir penelitian yang ditunjukkan dalam Gambar 12.



Gambar 12. Diagram alir penelitian.