III. METODOLOGI PENELITIAN

A. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan dari bulan Juli sampai bulan September 2010 di Laboratorium Instrumentasi dan Laboratorium Biokimia Jurusan Kimia FMIPA Universitas Lampung.

B. Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah *shaker* inkubator (inkubator goyang) merek Edmund Buhler Swip KL-2, autoklaf merek Speed Clave Model S-90 N, *Laminar air flow* CRUMA model 9005-FL, Inkubator merek *P-Selecta*, spektrofotometer UV-VIS merek Hitachi 150-280, oven, lemari pendingin, *magnetic stirrer*, penangas air, timbangan analitik, pH meter, erlenmeyer, cawan petri, jarum ose, mikropipet, dan peralatan umum laboratorium lainnya.

Bahan-bahan yang digunakan adalah medium YMA (Yeast Malt Agar), media inokulum YM (Yeast Malt), buffer fosfat, NaCl, antibiotik (Nistatine dan Streptomycine), *bircwood xylan* (Sigma Chemical Co.), indikator *congo red*,

pereaksi DNS, air suling, dan kertas saring. Sampel yang digunakan yaitu jerami padi dan tanah yang berasal dari Pringsewu, Lampung.

C. Prosedur Penelitian

1. Pembuatan Media
   a. Pembuatan media YMA (Yeast Malt Agar)

      Medium YMA terdiri dari 4 g ekstrak khamir, 10 g ekstrak malt, 15 g glukosa, 15 g agar-agar per 1 Liter media, diautoklaf selama 15 menit pada suhu 121ºC dan tekanan 2 atm, kemudian ditambahkan dengan 50 µg/L Nistatine dan 25 µg/L Streptomycine.

   b. Pembuatan media inokulum YM (Yeast Malt)

      Medium YM terdiri dari 4 g ekstrak khamir, 10 g ekstrak malt dan 15 g glukosa per 1 Liter media, kemudian diautoklaf selama 15 menit pada suhu 121ºC dan tekanan 2 atm.

2. Pembuatan pereaksi
   a. Pembuatan Buffer fosfat
      1) Larutan Stok A ($NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ 0,2 M)

         Sebanyak 27,8 g $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ dilarutkan dengan air suling hingga volume 1000 mL.

      2) Larutan Stok B ($Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ 0,2 M)

         Sebanyak 35,6 g $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ dilarutkan dengan air suling hingga volume 1000 mL.

b. Pembuatan Pereaksi DNS

Larutan A : 3 g NaOH; 0,6 g fenol; 3 g DNS dalam 240 mL air suling.

Larutan B : 0,25 g Na-sulfit; 2 g Na-K-tartarat dan 5 mL air suling.

Sebanyak 3 mL larutan B ditambahkan pada 240 mL larutan A dan ditambahkan air suling hingga volume 300 mL.

c. Pembuatan NaCl 0,85%

Sebanyak 0,85 g NaCl dilarutkan dengan air suling hingga volume 100 mL.

3. Isolasi dan Pemurnian *Actinomycetes*

Pada isolasi dan pemurnian *Actinomycetes* diharapkan dapat memperoleh isolat *Actinomycetes* yang murni. Bakteri *Actinomycetes* diisolasi dari fermentasi jerami padi pada media mineral tanah. Sebanyak 5 g jerami padi yang telah dikeringkan dipotong 2-3 cm (Mishar *et al.*, 2001) kemudian disterilkan dengan menggunakan autoklaf. Pengkayaan media dilakukan dengan cara jerami padi dimasukkan ke dalam erlenmeyer dan ditambahkan 500 mL air suling. Wadah ditutup dengan sumbat dan diinkubasi pada suhu ruang selama 7 hari. Selanjutnya sebanyak ± 2 g substrat jerami dimasukkan ke dalam 9 mL larutan garam NaCl 0.85% dan dihomogenisasi. Kemudian filtratnya diencerkan berseri hingga 10^{-3} dan dilakukan plating pada media YMA dengan antibiotik Nistatine 50 µg/L dan Streptomycine 25 µg/L. Inkubasi dilakukan pada inkubator selama 4-7 hari bila perlu dilanjutkan hingga 14 hari. Untuk memperoleh koloni

tunggal dilakukan dengan cara memindahkan koloni yang terbentuk ke media YMA baru dan digores secara kuadran hingga diperoleh koloni tunggal.

4. Penetapan Kadar Hemiselulosa Jerami Padi

Analisis hemiselulosa dilakukan dengan metode *Chesson* (Datta, 1981). Sebanyak 1 g (a) jerami padi ditambahkan 150 mL air suling kemudian direfluk pada suhu 100^{o}C selama 1 jam. Hasilnya disaring, residu dicuci dengan air panas sebanyak 300 mL. Residu kemudian dikeringkan dengan oven sampai konstan kemudian ditimbang (b). Residu ditambahkan 150 mL H_2SO_4 1 N kemudian direfluk selama 1 jam suhu 100^{o}C. Hasilnya disaring dan dicuci dengan air suling sebanyak 300 mL. Residu dikeringkan dan ditimbang (c). Residu kering ditambahkan 10 mL H_2SO_4 72% dan direndam pada suhu kamar selama 4 jam. Ditambahkan 150 mL H_2SO_4 1 N dan direfluk selama 1 jam. Residu disaring dan dicuci dengan air suling sebanyak 400 mL, kemudian dipanaskan dengan oven dengan suhu 105^{o}C dan hasilnya ditimbang (d), selanjutnya residu diabukan dan ditimbang (e).

Perhitungan kadar hemiselulosa sebagai berikut:

$$\text{Kadar selulosa} = \frac{c - d}{a} \text{x } 100\%$$

$$\text{Kadar lignin} = \frac{d - e}{a} \text{x } 100\%$$

$$\text{Kadar Hemiselulosa} = 100\% - (\%\text{selulosa} + \%\text{Lignin})$$

5. Penapisan Isolat Xilanolitik

Penapisan isolat xilanolitik dilakukan untuk mengetahui isolat yang mempunyai kemampuan untuk mendegradasi xilan dengan menggunakan media YMA yang mengandung 4 g ekstrak khamir, 10 g ekstrak malt, 15 g glukosa, 15 g agar-agar per 1 Liter media. Untuk pengujian aktivitas xilanolitik pada media ditambahkan 5 g *birchwood xylan* (Sigma Chemical Co.). Koloni murni ditumbuhkan diatas media YMA diinkubasi selama 7 hari. Pada bagian atas permukaan media disebar larutan 1% *congo red* dan dibiarkan selama 15 menit, kemudian ditambahkan larutan NaCl 1M dan dibiarkan selama 15 menit. Koloni yang memiliki aktivitas xilanolitik akan membentuk zona jernih (Teather and Wood, 1982).

6. Optimasi Fermentasi Fase Padat

Pada tahap ini dilakukan untuk mendapatkan variasi perbandingan substrat:buffer dan variasi pH optimum pada fermentasi fase padat. Isolat yang memiliki aktivitas xilanolitik tertinggi ditumbuhkan pada media YM selama 4-5 hari untuk memperoleh jumlah sel yang cukup. Sebanyak 10 mL inokulum ditambahkan kepada 10 g jerami padi ukuran 1-2 cm yang telah disterilkan. Kemudian digunakan variasi perbandingan substrat:buffer fosfat sebesar 1:1, 1:2, 1:3 dan variasi pH 6, 7 dan 8 (Beg *et al*., 2000). Proses fermentasi dilakukan selama 21 hari, dimana pemanenan dilakukan dengan menambahkan 100 mL akuades, kemudian diaduk dan disaring untuk memisahkan filtratnya. Kontrol juga dilakukan

dengan prosedur fermentasi fase padat dengan variasi perbandingan substrat:buffer dan variasi pH namun tidak ditambahkan dengan isolat *Actinomycetes* terpilih. Hal yang diamati dalam fermentasi adalah kadar xilosa yang dihasilkan. Pengukuran kadar xilosa dilakukan dengan menggunakan metode kolometri DNS (Miller, 1959) pada panjang gelombang 540 nm.

7. Penetapan Waktu Optimum Hidrolisis Jerami Padi

Pada tahap ini dilakukan untuk memperoleh waktu optimum dalam proses hidrolisis. Isolat yang memiliki aktivitas xilanolitik di fermentasi pada kondisi pH dan perbandingan substrat:buffer optimum yang diperoleh pada tahap sebelumnya. Sebanyak 10 mL inokulum ditambahkan kepada 10 g jerami padi ukuran 1-2 cm yang telah disterilkan. Fermentasi dilakukan selama 30 hari, setiap 5 hari secara periodik dilakukan pemanenan dengan menambahkan 100 mL 0,2 M buffer fosfat pH optimum, kemudian diaduk dan disaring dengan menggunakan kertas saring. Filtrat yang diperoleh digunakan untuk mengkuantifikasi kadar xilosa dan aktivitas enzim (Ramachandra *et al*., 1987).

8. Produksi Enzim Xilanase

Pada tahap ini dilakukan untuk mendapatkan enzim xilanase dalam jumlah besar yang akan digunakan pada tahap selanjutnya. Produksi enzim xilanase dilakukan dengan mengikuti prosedur fermentasi fase padat

dengan menggunakan kondisi optimum pada penetapan waktu optimum hidrolisis jerami padi. Sebanyak 100 mL inokulum ditambahkan pada 100 g jerami padi ukuran 1-2 cm. Pemanenan dilakukan pada waktu optimum dengan menambahkan 1000 mL 0,2 M buffer fosfat pH optimum kemudian diaduk dan disaring dengan menggunakan kertas saring. Filtrat yang diperoleh digunakan sebagai ekstrak kasar enzim xilanase yang akan diukur aktivitasnya.

9. Pengukuran Aktivitas Enzim

Pengukuran aktivitas enzim dilakukan untuk mengetahui kemampuan enzim dalam menghasilkan xilosa per menit. Aktivitas xilanase diujikan dengan substrat *bircwood xylan*. Sampel: Sebanyak 1 mL substrat 0,5% *birchwood xylan* ditambahkan 0,9 mL 0,2M buffer fosfat pH optimum. Kemudian larutan ini ditambahkan 0,1 mL ekstrak kasar enzim dihomogenisasi lalu diinkubasi pada suhu 30^{o}C selama 30 menit lalu ditambahkan 2 mL pereaksi DNS dan segera dipanaskan pada suhu 100^{o}C selama 15 menit dan didinginkan pada suhu ruang. Kontrol: Sebanyak 1 mL substrat 0,5% *birchwood xylan* ditambahkan 0,9 mL 0,2M buffer fosfat pH optimum lalu diinkubasi pada suhu 30^{o}C selama 30 menit. Kemudian ditambahkan 0,1 mL ekstrak enzim dan 2 mL pereaksi DNS dan segera dipanaskan pada suhu 100^{o}C selama 15 menit dan didinginkan pada suhu ruang. Pengukuran absorbansi masing-masing larutan dilakukan pada λ 540 nm. Satu unit aktivitas xilanase didefinisikan

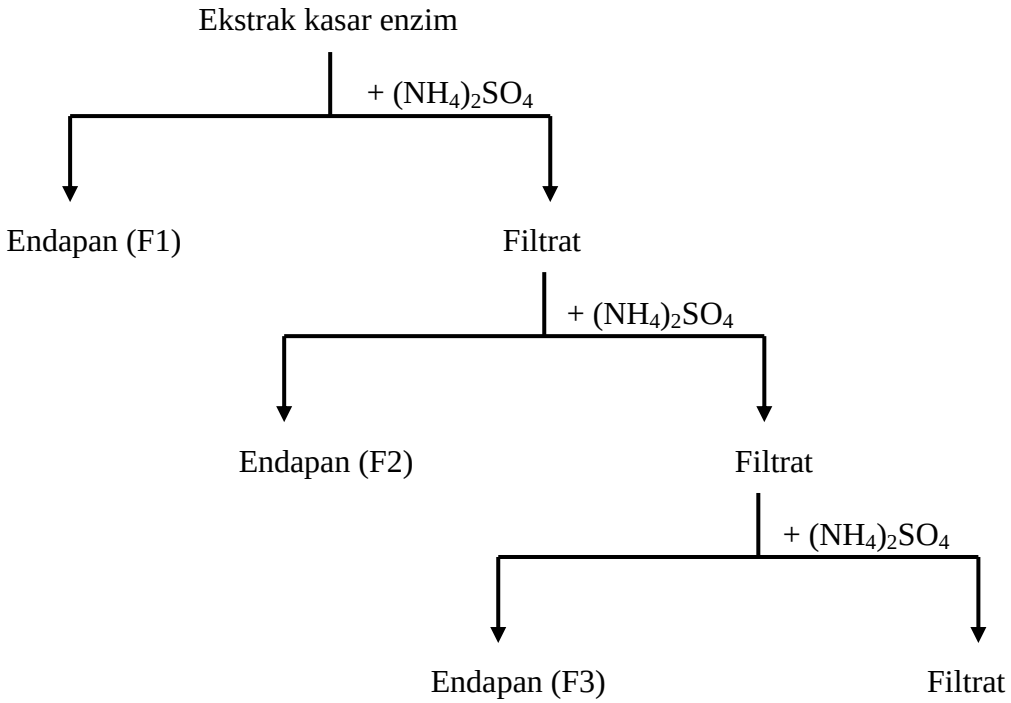
sebagai jumlah μmol xilosa yang diihasilkan per menit untuk setiap ml enzim pada kondisi optimumnya.

$$\text{Aktivitas Unit } \left(\frac{\text{U}}{\text{ml}}\right) = \frac{\text{Kadar xilosa } (\mu\text{g})}{\text{Mr Xilosa } \left(\frac{\text{g}}{\text{mol}}\right) \text{ x V(mL) x t.inkubasi(menit)}} \text{ x F. P}$$

10. Pengendapan Enzim dengan Amonium sulfat

Pengendapan dengan amonium sulfat ini dilakukan untuk memurnikan enzim dengan cara ekstrak kasar enzim yang diperoleh selanjutnya difraksinasi dengan amonium sulfat. Fraksinasi dilakukan secara bertingkat menggunakan amonium sulfat dengan tingkat kejenuhan yang berbeda, yaitu dengan derajat kejenuhan 0-35% (F1), 35-70% (F2), dan 70-95% (F3).

Supernatan enzim kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm selama 20 menit pada suhu 25^{o}C. Enzim yang mengendap dilarutkan dalam 0,2 M buffer fosfat pH optimum, kemudian ditentukan aktivitasnya dengan metode DNS (Miller, 1959).



Gambar 3 : Skema proses fraksinasi enzim dengan amonium sulfat

Dimana berat ammonium sulfat yang ditambahkan sebanyak volume ekstrak kasar dibagi dengan 1000 dan dikalikan dengan persentase $(NH_4)_2SO_4$ pada tingkat kejenuhan tertentu yang sesuai dengan tabel presentase saturasi ammonium sulfat.