

III. METODELOGI PENELITIAN

A. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan April-Juli 2014 di Laboratorium Biokimia Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lampung.

B. Alat dan Bahan

Alat-alat yang akan digunakan dalam penelitian ini antara lain alat-alat gelas, jarum ose, *autoclave* model S-90N, *laminar air flow* CURMA model 9005-FL, neraca analitik Ainsworth AA-160, *incubator* Precistern P' Selecta, *waterbath shaker incubator* GFL1092, *shaker incubator* Environ Shaker-Lab Line, sentrifuga model 225 Fisher Scientific dan model Labor 50 WIFUG-Lab, lemari pendingin, mikropipet Eppendorff, *waterbath* Haake W19, *waterbath* Memmert W 350, penangas Precistern JP' Selecta, *magnetic stirrer* STUART (*stir* CB161 dan *heat-stir* CB162), termometer, batang pengaduk, spatula, dan spektrofotometer UV-VIS Carry-100 *Agilent Technologies*.

Adapun bahan-bahan yang akan digunakan pada penelitian ini adalah NA (*Nutrient Agar*), CMC (*Carboxy Methyl Cellulose*), serbuk jerami padi, pepton, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, KH_2PO_4 , MgSO_4 , $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, CaCl_2 , $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, CoCl_2 , urea, akuades, alkohol, DNS (*dinitrosalisilic acid*), NaOH , fenol, Na_2SO_3 , Na(K) -tartarat, Na_2CO_3 , $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, reagen *follin ciocalteau*, NaH_2PO_4 , Na_2HPO_4 , $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$, K_2HPO_4 , H_3BO_3 , asam glioksilat, NaBH_4 , kantong selofan, dan TNBS.

Sedangkan mikroorganisme yang digunakan adalah bakteri *Bacillus subtilis* ITBCCB148 penghasil enzim selulase yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi dan Teknologi Bioproses Jurusan Teknik Kimia Institut Teknologi Bandung.

C. Prosedur Penelitian

1. Pembuatan media inokulum dan fermentasi, inokulasi *Bacillus subtilis* ITBCCB148 dan produksi enzim selulase

a. Pembuatan media inokulum dan fermentasi

Media inokulum dan fermentasi yang digunakan terdiri dari (g L^{-1}) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1,4; KH_2PO_4 2; MgSO_4 0,3; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,0014; CaCl_2 0,3; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,005; CoCl_2 0,002; urea 0,3; pepton 0,75; serbuk jerami 7,5 yang dilarutkan dengan akuades dalam labu erlenmeyer, kemudian disterilkan pada suhu 121°C , tekanan 1 atm, selama ± 15 menit dalam autoklaf.

b. Inokulasi *Bacillus subtilis* ITBCCB148

Sebanyak 3 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 24 jam.

c. Produksi enzim selulase

Produksi enzim selulase dilakukan dengan cara memindahkan sebanyak 2% media inokulum dari jumlah media fermentasi ke dalam media fermentasi secara aseptis lalu dikocok dalam *shaker incubator* dengan kecepatan 150 rpm pada suhu 35°C selama 72 jam.

2. Isolasi enzim selulase

Isolasi enzim adalah metode pemisahan enzim dari komponen selnya. Pada penelitian ini isolasi enzim dilakukan dengan cara sentrifugasi. Media fermentasi yang telah diinkubasi, selanjutnya disentrifugasi dengan kecepatan putaran 5000 rpm pada suhu 4°C selama 30 menit. Filtrat yang diperoleh merupakan ekstrak kasar enzim selulase. Ekstrak kasar enzim selulase kemudian diuji aktivitasnya dengan metode Mandels dan kadar protein dengan metode Lowry.

3. Uji aktivitas dan kadar proteinezim selulase

a. 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, 0,2 fenol, 0,05% Na₂SO₃ dan 1 mL Na(K)- tartarat 40%.

Kemudian dilarutkan dalam 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 dan 0,25 mL 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 (*dinitrosalisilic acid*) dididihkan selama 10 menit pada suhu 100°C dan didinginkan. Setelah dingin, campuran ditambahkan 1,5 mL akuades dan diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 510 nm. Kadar glukosa yang terbentuk ditentukan dengan menggunakan kurva standar glukosa.

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

Pereaksi A : 2 gram Na₂CO₃ dilarutkan dalam 100 mL NaOH 0,1 N.

Pereaksi B : 5 mL larutan CuSO₄.5H₂O 1% ditambahkan ke dalam 5 mL larutan Na(K)-tartarat 1%.

Pereaksi C : 2 mL pereaksi B ditambah 100 mL pereaksi A.

Pereaksi D : reagen *follin 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. 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 0,1 mL enzim selulase ditambah dengan 0,9 mL akuades. Lalu direaksikan dengan 5 mL pereaksi C, diaduk rata dan dibiarkan selama 10 menit pada suhu ruang. Setelah itu, ditambahkan dengan cepat 0,5 mL pereaksi D dan diaduk dengan sempurna, dibiarkan selama 30 menit pada suhu ruang. Untuk kontrol, 0,1 mL enzim diganti dengan 0,1 mL akuades. Selanjutnya perlakuannya sama seperti sampel. Serapannya diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada λ 750 nm. Untuk menentukan kadar protein enzim digunakan kurva standar BSA (*Bovine Serum Albumin*).

4. Pemurnian enzim selulase

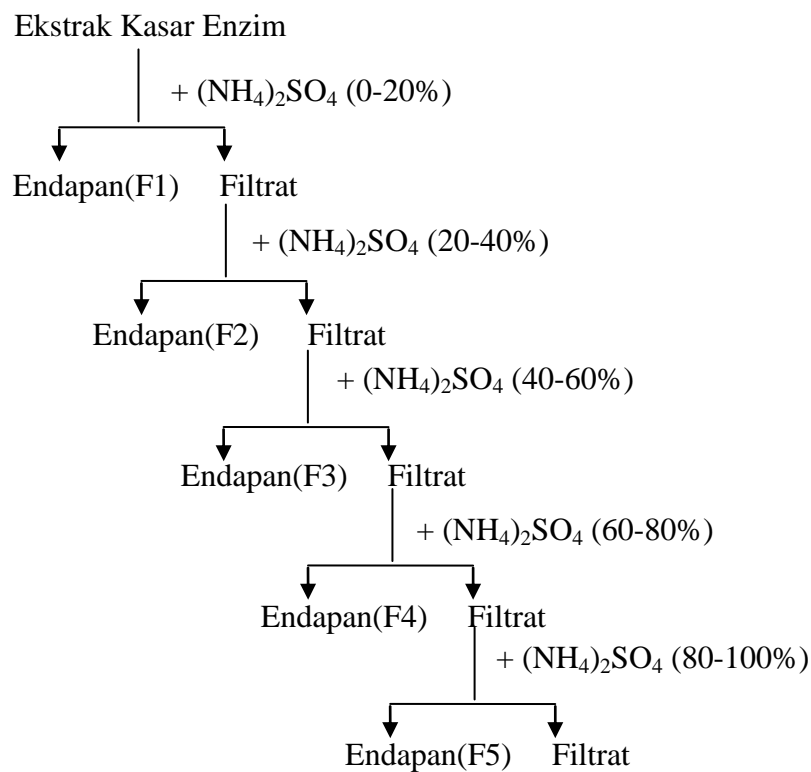
Pada penelitian akan dilakukan pemurnian enzim dengan fraksinasi menggunakan ammonium sulfat dan dialisis. Proses pengerjaannya sebagai berikut :

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

Ekstrak kasar enzim yang diperoleh diendapkan dengan garam ammonium sulfat pada berbagai derajat kejenuhan yaitu (0-20 %; (20-40)%; (40-60)%; (60-80)%; dan (80-100)% untuk mengetahui pada fraksi mana enzim selulase terendapkan. Skema proses pengendapan protein

enzim dengan penambahan garam ammonium sulfat ditunjukkan pada Gambar 11.

Sejumlah ekstrak kasar enzim yang diperoleh ditambahkan garam ammonium sulfat secara perlahan sambil diaduk dengan *magnetic stirrer* pada suhu 4°C. Endapan protein enzim yang didapatkan pada tiap fraksi kejenuhan ammonium sulfat dipisahkan dari filtratnya dengan sentrifugasi dingin pada kecepatan 5000 rpm selama 30 menit. Kemudian diuji aktivitasnya dengan metode Mandels dan kadar protein dengan metode Lowry. Selanjutnya, filtrat yang didapat dari fraksi (0-20)% digunakan untuk diendapkan dengan fraksi kejenuhan selanjutnya dengan prosedur yang sama.



Gambar 11. Skema proses pengendapan protein enzim dengan pengendapan ammonium sulfat

b. Dialisis

Endapan enzim yang telah dilarutkan dari tiap fraksi ammonium sulfat dengan aktivitas spesifik yang tinggi dimasukkan ke dalam kantong selofan dan didialisis dengan bufer fosfat 0,01 M pH 6 selama ± 24 jam pada suhu dingin. Selama dialisis, dilakukan pergantian larutan bufer selama 4-6 jam agar konsentrasi ion-ion di dalam kantong dialisis dapat dikurangi. Proses ini dilakukan secara kontinu sampai ion-ion di dalam kantong dialisis dapat diabaikan. Untuk mengetahui bahwa sudah tidak ada lagi ion-ion garam dalam kantong, maka diuji dengan menambahkan larutan $\text{Ba}(\text{OH})_2$ atau BaCl_2 . Bila masih ada ion sulfat dalam kantong, maka akan terbentuk endapan putih BaSO_4 . Semakin banyak endapan yang terbentuk, maka semakin banyak ion sulfat yang ada dalam kantong. Selanjutnya dilakukan uji aktivitas dengan metode Mandels dan kadar protein dengan metode Lowry.

5. Modifikasi kimia enzim selulase hasil pemurnian dengan asam glioksilat

Modifikasi enzim selulase dengan asam glioksilat dilakukan sesuai dengan prosedur yang dilaporkan oleh Melik-Nubarrov *et al.* (1987) dalam menstabilkan α -amilase kimotripsin. Sebanyak 10 mL enzim selulase (mengandung 0,4 $\mu\text{mol/mL}$) bersama selulosa 0,5% dalam bufer fosfat-borat (100 mM K_2HPO_4 dan 500 mM H_3BO_3) pH 8,4 ditambah dengan 10 μmol asam glioksilat dan 8 μmol NaBH_4 , reaksi dilakukan selama 30 menit pada 4°C.

6. Karakterisasi enzim selulase hasil pemurnian dan hasil modifikasi

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

a. Penentuan derajat modifikasi

Derajat modifikasi enzim merupakan perbandingan antara residu lisin dalam enzim yang termodifikasi terhadap residu lisin sebelum dimodifikasi. Cara penentuannya sebagai berikut : untuk sampel, sebanyak 0,1 mL enzim yang telah dimodifikasi dilarutkan dalam 0,9 mL bufer borat (pH 9,0). Kemudian ditambahkan 25 μ L 0,03 M asam 2,4,6-trinitrobenzena-sulfonat (TNBS). Campuran ini dikocok dan dibiarkan pada suhu kamar selama 30 menit. Larutan standar dibuat dengan komposisi yang sama, tetapi menggunakan enzim hasil pemurnian (sebelum modifikasi). Blanko terdiri dari 1 mL bufer borat pH 9,0; 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 :

$$\begin{aligned} \text{Derajat modifikasi} &= \frac{\text{Jumlah residu lisin yang termodifikasi}}{\text{Jumlah residu lisin awal}} \times 100\% \\ &= \frac{(A_{St} - A_{B1}) - (A_{Sp} - A_{B1})}{(A_{St} - A_{B1})} \times 100\% \end{aligned}$$

(Snyder *and* Sobocinski, 1975).

b. Penentuan pH optimum

Untuk mengetahui pH optimum enzim sebelum dan sesudah modifikasi kimia, digunakan bufer fosfat 0,1 M dengan variasi pH sebagai berikut :

4,0; 5,0; 6,0; 7,0; dan 8,0. Suhu dijaga tetap pada 60°C, kemudian dilanjutkan dengan pengukuran aktivitas enzim metode Mandels.

c. Penentuan suhu optimum

Untuk mengetahui suhu optimum kerja enzim dilakukan dengan variasi suhu yaitu 40; 50; 60; dan 70°C, pH tetap dijaga pada pH optimum yang telah dilakukan. Selanjutnya diukur aktivitas enzim dengan metode Mandels.

d. 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 yaitu 0,25; 0,5; 0,75; 1,0; dan 1,25% dalam bufer fosfat pada pH dan suhu optimum. Selanjutnya diukur aktivitas enzim dengan metode Mandels dan data aktivitas enzim dan konsentrasi substrat diplotkan ke dalam kurva *Lineweaver-Burk* untuk penentuan nilai K_M dan V_{maks} .

e. Uji stabilitas termal dan stabilitas 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 dan pH optimum. Caranya adalah dengan mengukur aktivitas enzim setelah proses pemanasan setelah 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).

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

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

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

Keterangan :

R = konstanta gas ($8,3 \text{ JK}^{-1} \text{ mol}^{-1}$)

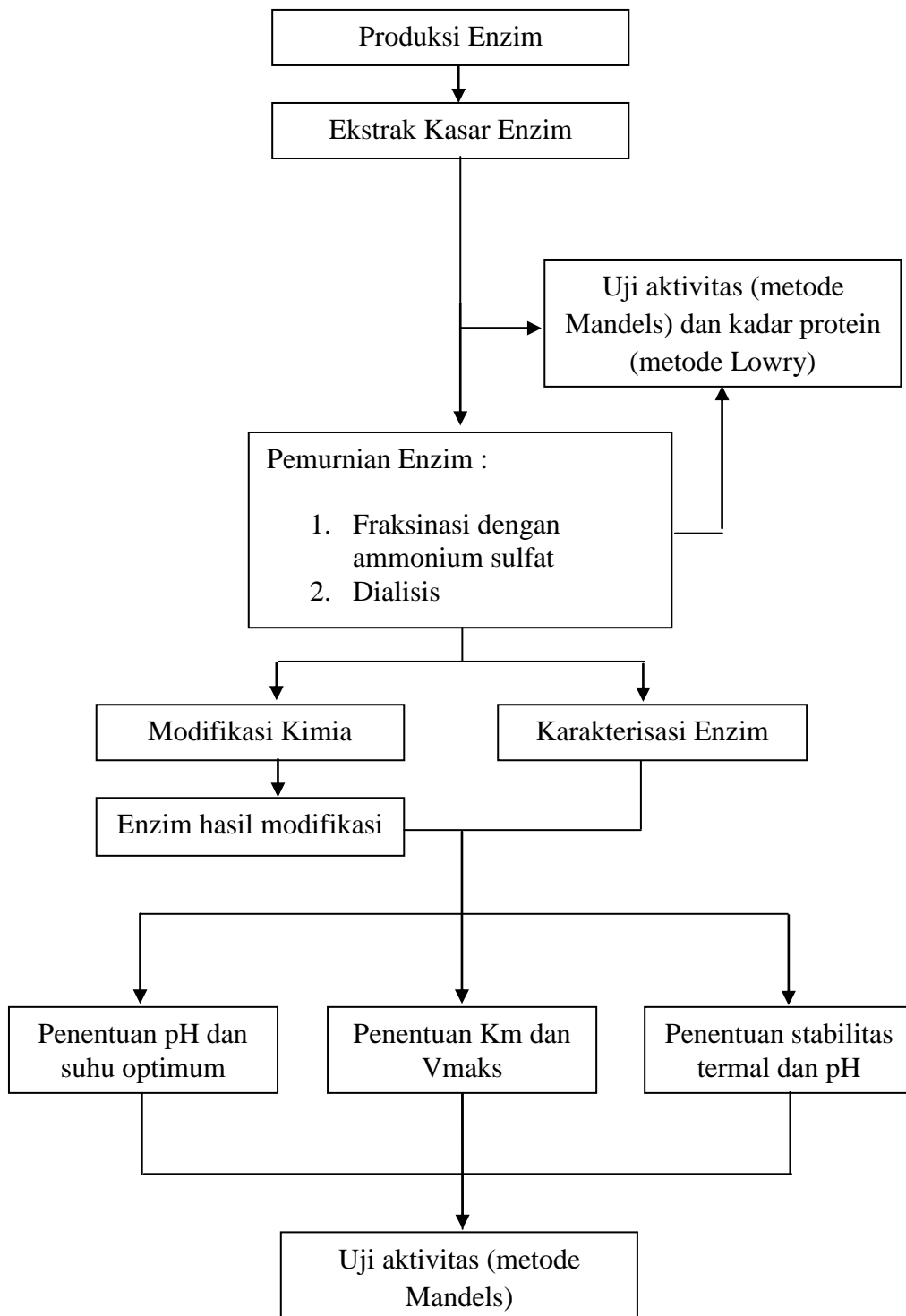
T = suhu absolut (K)

k_i = konstanta laju inaktivasi termal

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

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

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



Gambar 12. Diagram alir penelitian