

III. METODOLOGI PENELITIAN

A. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan 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 digunakan pada penelitian ini adalah alat-alat gelas, jarum ose, mikropipet *Eppendroff*, neraca analitik, lemari pendingin, pembakar spirtus, sentrifuga, *magnetik stirer*, *autoclave* model S-90N, oven, *laminar air flow* CRUMA model 9005-FL, *waterbatch shaker incubator* HAAKE, *freeze dryer*, pH meter, penangas air, *waterbath incubator*, ayakan 100 mesh dan spektrofotometer *UV-VIS* Cary Win UV 32.

Adapun bahan-bahan yang digunakan adalah *Potato Dextrose Agar* (PDA), serbuk jerami, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 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, NaOH , glukosa, *Carboxymethyl Cellulase* (CMC), akuades, Na(K)-Tartarat, NaH_2PO_4 , Na_2HPO_4 , reagen folin-ciocalteu, pereaksi DNS (*dinitrosalisilic acid*), fenol, Na_2SO_3 , HCl , Na_2CO_3 , $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, *Bovine*

Serum Albumin (BSA), akuades, kantong selofan dan bentonit. 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. *Pretreatment* sumber selulosa serbuk jerami padi

Bahan baku berupa jerami padi diambil dari desa Sukarame kota Bandar Lampung. Sebelum digunakan sebagai media fermentasi, jerami dijemur di bawah sinar matahari selama 3 hari, dipotong kurang lebih 2 mm, dihaluskan menggunakan blender dan disaring lolos 100 mesh.

2. Pembuatan media inokulum

Media inokulum digunakan sebagai media adaptasi awal pertumbuhan dan media perkembangbiakan spora jamur pada media cair. Media inokulum dibuat dengan cara menimbang bahan-bahan yang terdiri dari $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,14 g; KH_2PO_4 0,2 g; urea 0,03 g; CaCl_2 0,03 g; MgSO_4 0,03 g; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,0005 g; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,00014 g; CoCl_2 0,0002 g; pepton 0,075 g; serbuk jerami 0,75g yang dilarutkan dalam *buffer* posfat pH 5,5 sebanyak 100 mL dalam labu erlenmeyer 250 mL dan disterilisasi menggunakan *autoclave* pada suhu 121°C, tekanan 1 atm selama 15 menit. Selanjutnya media inokulum dikocok dalam *waterbath shaker incubator* dengan kecepatan 130 rpm pada suhu 35°C selama 56 jam.

3. Pembuatan media fermentasi

Media fermentasi yang digunakan (gL^{-1}) terdiri dari $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1,4 g; KH_2PO_4 2,0 g; urea 0,3 g; CaCl_2 0,3 g; MgSO_4 0,3 g; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,005 g; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,0014 g; CoCl_2 0,002 g; pepton 0,75 g; serbuk jerami 7,5 g yang dilarutkan dalam *buffer* posfat pH 6 sebanyak 1000 mL dalam labu erlenmeyer 2000 mL dan media fermentasi tersebut disterilkan menggunakan *autoclave* pada suhu 121°C , tekanan 1 atm selama 15 menit. Selanjutnya dimasukkan larutan media inokulum sebanyak 2% total volume media fermentasi ke dalam masing-masing media fermentasi secara aseptis lalu dikocok dalam *waterbath shaker incubator* dengan kecepatan 130 rpm pada suhu 35°C selama 40 jam. Lalu diuji aktivitas enzim selulase dengan metode *Mandels*.

4. 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 aktifitas enzim (Suhartono, 1989). Untuk memisahkan enzim dari komponen sel lainnya digunakan metode sentrifugasi pada kecepatan 5000 rpm selama 25 menit. Filtrat yang diperoleh merupakan ekstrak kasar enzim yang selanjutnya dilakukan uji aktivitas enzim selulase dengan metode *Mandels*.

5. Uji aktivitas enzim selulase metode *Mandels* (Mandels *et al.*, 1976).
 - a. Pembuatan pereaksi untuk pengukuran aktivitas enzim selulase metode *Mandels* (Mandels *et al.*, 1976)

Ke dalam labu takar 100 mL, dimasukkan 1 g DNS (*Dinitrosalisilic Acid*), selanjutnya ditambahkan 1 g NaOH lalu dikocok hingga larut, kemudian ditambahkan 1 mL larutan Na(K)-tartarat 40%, 0,2 g fenol dan 0,05 g $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ kemudian dilarutkan dengan 100 mL aquades hingga tanda batas.

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

Metode ini didasarkan pada glukosa yang terbentuk (Mandels *et al.*, 1976). Dengan membandingkan antara sampel [0,25 mL enzim ditambah 0,25 mL (larutan CMC 0,5% dalam *buffer* posfat pH 5,0)] dan kontrol (0,25 mL enzim), yang masing-masing diinkubasi selama 60 menit dalam *waterbath incubator* pada suhu 50°C. Kemudian kontrol ditambahkan dengan 0,25 mL (larutan CMC 0,5% dalam *buffer* posfat pH 5,0) dan selanjutnya sampel dan kontrol ditambahkan 1 mL pereaksi DNS dan dididihkan selama 10 menit pada penangas air. Kemudian masing-masing 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.

6. Penentuan kadar protein metode Lowry (Lowry *et al.*, 1951).
 - a. Pembuatan pereaksi untuk penentuan kadar protein enzim selulase metode Lowry
 1. Pereaksi A : 2 g Na_2CO_3 dilarutkan dalam 100 mL NaOH 0,1 N
 2. Pereaksi B : 5 mL larutan $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 1% ditambahkan kedalam 5 mL larutan Na(K) tartarat 1%
 3. Pereaksi C : 2 mL pereaksi B ditambahkan 100 mL pereaksi A
 4. Pereaksi D : reagen *folin ciocelteau* diencerkan dengan akuades 1:1.
 5. Larutan standar : larutan BSA (Bovine Serum Albumin) dengan kadar 0, 20, 40, 60, 80, 100, 120, dan 140 ppm.
 - b. Penentuan kadar protein

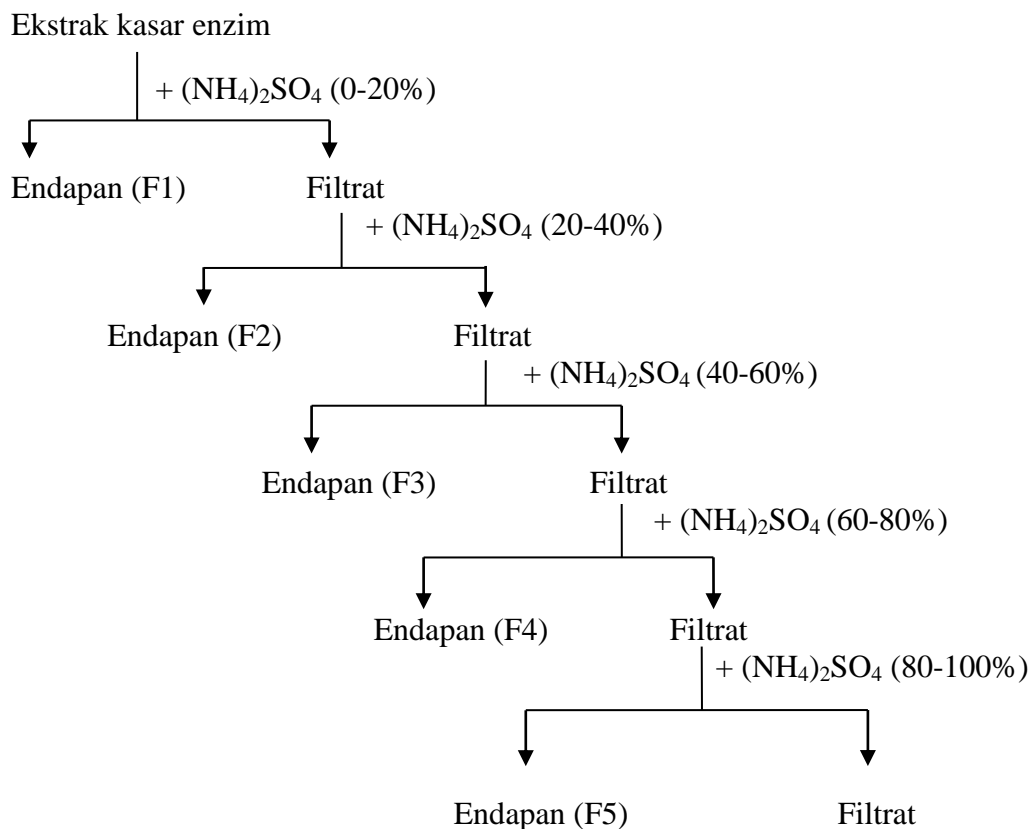
Sebanyak 0,1 mL enzim selulase ditambahkan 0,9 mL akuades lalu direaksikan dengan 5 mL pereaksi C dan diaduk rata. Kemudian dibiarkan selama 10 menit pada suhu ruang. Setelah itu ditambahkan dengan cepat 0,5 mL pereaksi D dan diaduk dengan sempurna, didiamkan selama 30 menit pada suhu kamar. Untuk kontrol, 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*).

7. Pemurnian enzim selulase

Setelah enzim selulase diisolasi, selanjutnya enzim tersebut dimurnikan menggunakan metode fraksinasi dengan menggunakan ammonium sulfat $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ dan dialisis.

a. Fraksinasi

Ekstrak kasar enzim yang telah diperoleh selanjutnya diendapkan dengan menggunakan ammonium sulfat $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ pada berbagai derajat kejenuhan yaitu 0-20%; 20-40%; 40-60%; 60-80%; dan 80-100%. Skema fraksinasi dapat dilihat pada Gambar 11.



Gambar 11. Skema proses fraksinasi enzim dengan ammonium sulfat

Endapan protein enzim yang didapatkan pada tiap fraksi kejenuhan ammonium sulfat, 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 *Mandels* dan diukur kadar proteinnya dengan metode *Lowry* untuk mengetahui pada fraksi-fraksi mana terdapat enzim selulase dengan aktifitas spesifik yang tinggi.

b. Dialisis

Endapan enzim dari tiap fraksi hasil fraksinasi kemudian dimurnikan dengan cara dialisis melalui membran semipermeabel (kantong selofan). Endapan tersebut dimasukkan kedalam kantong selofan dan didialisi menggunakan buffer fosfat pH 6 0,01 M selama 24 jam pada suhu dingin (Pohl, 1990). Selama dialisis, dilakukan pergantian bufer selama 4-6 jam agar konsentrasi ion-ion di dalam kantong dialisis dapat dikurangi.

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 diukur kadar proteinnya dengan metode *Lowry*.

8. Amobilisasi enzim selulase menggunakan bentonit

a. Preparasi matriks bentonit

Serbuk bentonit diayak menggunakan ayakan berukuran 120 mesh. Sebanyak 4 g bentonit dikocok dengan 16 mL larutan HCl 2 M pada temperatur kamar dengan kecepatan pengocokan 150 rpm selama 4 jam. Kemudian campuran disaring menggunakan kertas saring *Whatman* no. 42 dan residunya (padatan) dicuci dengan akuades sampai pH 6,0. Kemudian padatan dikeringkan pada temperatur 105°C hingga diperoleh berat konstan.

b. Penetapan pH untuk proses pengikatan enzim selulase pada bentonit

Enzim selulase diikatkan pada matriks dengan variasi pH 5 ; 5,5 ; 6 ; 6,5 ; 7 ; 7,5 dan 8 dengan menggunakan buffer fosfat 0,1 M. Kemudian matriks diisi dengan 0,5 mL enzim dan dielusi dengan buffer yang sesuai, diaduk 5-10 menit. Campuran tersebut dibiarkan hingga matriks mengendap. Selanjutnya supernatan didekantasi dan diuji aktivitas enzim dan kadar proteinnya.

c. Amobilisasi enzim selulase

Sebanyak 1 mL enzim selulase di amobil dengan bentonit pada pH optimum pengikatan. 1 mL enzim selulase diikatkan pada 1 g bentonit. Kemudian campuran diaduk hingga rata dan simpan dalam *fryzer* selama 30 menit.

Selanjutnya dicuci dengan akuades sebanyak tiga kali. Lalu dikeringkan pada suhu kamar.

d. Pemakaian berulang enzim amobil

Enzim amobil yang telah dipakai (direaksikan dengan substrat), dipakai kembali untuk direaksikan kembali dengan substrat dengan uji metode *Mandels*. Pemakaian berulang ini dilakukan hingga 7 kali.

9. Karakterisasi enzim selulase

a. Penentuan suhu optimum

Untuk mengetahui suhu optimum kerja enzim dilakukan dengan memvariasikan suhu yaitu 50; 55; 60; 65; 70; 75 dan 80. Selanjutnya aktivitas enzim diukur dengan metode *Mandels*.

b. Penentuan K_M dan V_{maks}

Konstanta Michaelis-Menten (K_M) dan laju reaksi maksimum (V_{maks}) enzim selulase ditentukan dengan memvariasikan konsentrasi substrat 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 dan 1% dalam buffer fosfat pada pH 5 dan suhu 50°C selama 60 menit. Selanjutnya data aktivitas enzim dengan konsentrasi substrat diplotkan ke dalam kurva *Lineweaver-Burk* untuk penentuan K_M dan V_M (Fuwa, 1954) dan diukur aktivitas enzim dengan metode *Mandels*.

c. Uji stabilitas termal enzim

Penentuan stabilitas termal enzim dilakukan dengan mengukur aktivitas sisa enzim setelah diinkubasi dengan variasi waktu inkubasi 0, 10, 20, 30, 40, 50, dan 60 menit pada suhu 50°C dan pH 5.

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

(Virdianingsih, 2002).

10. 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 amobilisasi 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 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 ($8,315 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$)

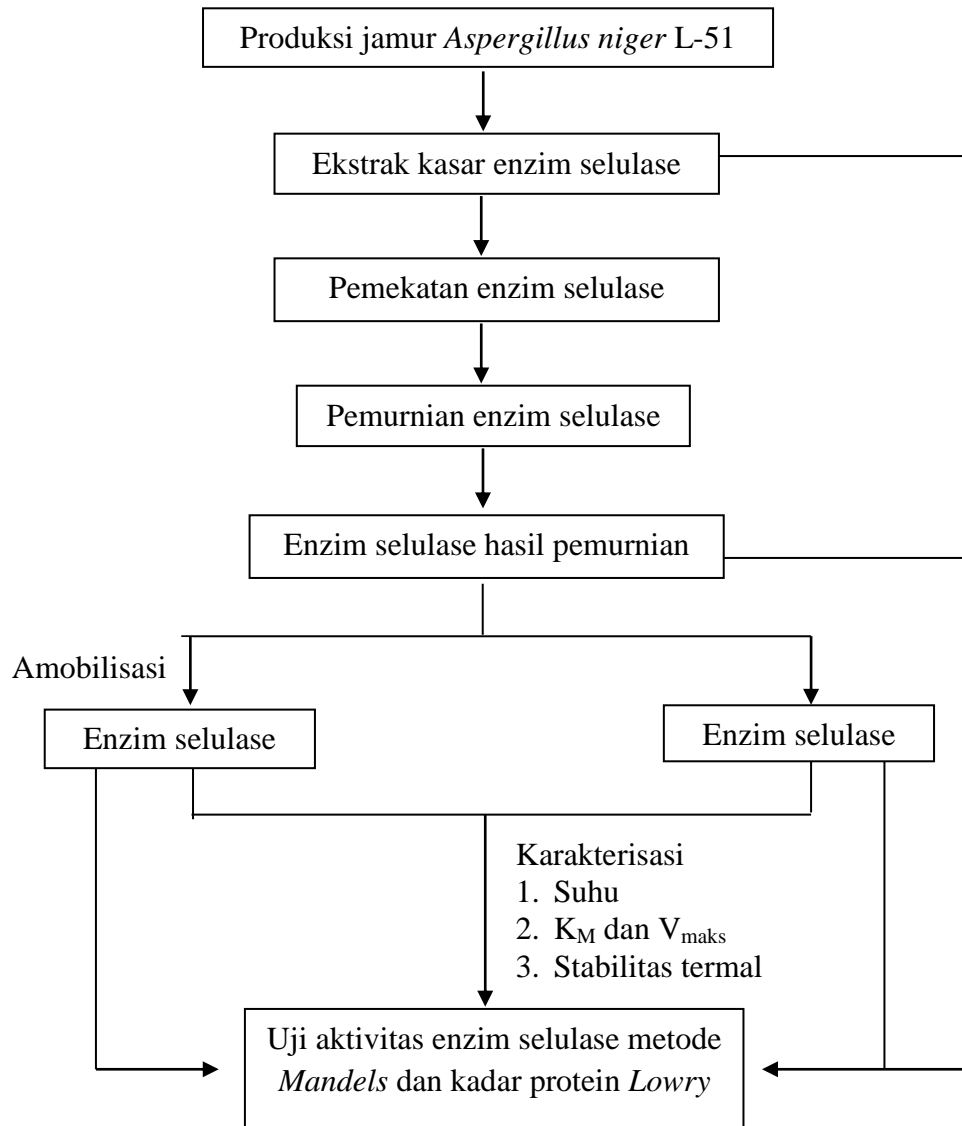
T = suhu absolut (K)

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