

III. METODOLOGI PENELITIAN

A. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan dari bulan Maret sampai bulan Agustus 2013 di Laboratorium Instrumentasi dan Laboratorium Biokimia Jurusan Kimia FMIPA Universitas Lampung.

B. Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah neraca analitik, pH meter, *shaker* inkubator (inkubator goyang), autoklaf model S-90N, *Laminar air flow* CRUMA model 9005-FL, Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) KNAUER HPLC FLD & RID, Inkubator *P-Selecta*, spektrofotometer UV-VIS Hitachi U-2010, oven, lemari pendingin, *magnetic stirrer*, penangas air, jarum ose, kertas saring, Erlenmeyer, cawan petri, mikropipet, tabung reaksi dan peralatan umum laboratorium lainnya.

Bahan-bahan yang digunakan adalah jerami padi hasil bio-pretreatment dengan ukuran ± 40 mesh, Isolat *Actinomycetes* AcP-1 dan AcP-7, medium YMA (Yeast Malt Agar), media inokulum YM (Yeast Malt), (jerami padi, yeast ekstrak,

Na₂HPO₄, KH₂PO₄, MgSO₄·7H₂O, NaCl, CaCl₂·2H₂O, larutan mineral), buffer fosfat, buffer sitrat-fosfat, DNS, akuades, NaCl, antibiotik (Nistatine dan Streptomycine), *bircwood xylan* (Sigma Chemical Co.), CMC (Sigma Chemical Co), asam asetat glasial 80%, asam nitrat pekat dan kertas saring.

C. Prosedur Penelitian

1. Pembuatan Inokulum

Inokulum isolat *actinomyces* AcP-1 dan Acp-7 dibuat menggunakan media yeast maltosa cair (YM) dengan komposisi 4 g ekstrak khamir ditambahkan 10 g ekstrak malt dan 15 g glukosa dalam 1 liter media, kemudian disterilkan pada suhu 121°C dengan tekanan 1 atm selama 15 menit. Ke dalam 10 mL media inokulum diinokulasikan 1 ose isolat dan dinkubasi selama 96–120 jam hingga jumlah sel mencukupi.

2. Optimasi Fermentasi Substrat Jerami

Sebanyak 10 mL inokulum isolat *Actinomyces* Acp-1 dan AcP-7 yang telah ditumbuhkan pada media YM selama 96–120 jam diinokulasikan ke dalam media fermentasi steril yang berisi 10 g substrat jerami padi hasil bio-pretreatment dengan ukuran ± 40 mesh, yang telah ditambahkan dengan 30 mL buffer fosfat sebagai moisture (pelembab) dengan membuat variasi pH media masing-masing pH: 6,5; 7,0; 7,5; 8,0; 8,5, kemudian diinkubasi sampai dengan 21 hari (Beg *et al.*, 2000). Kultur dilakukan

dengan menggunakan wadah kaca dengan memperhatikan sisa ruang di atasnya untuk memberikan suasana fakultatif aerobik. Hal yang harus diperhatikan dalam fermentasi adalah perubahan substrat jerami secara fisik hingga semua substrat terdekomposisi untuk mendapatkan gambaran kondisi fermentasi yang ideal. Setiap selang waktu 3 hari dilakukan pemanenan dengan menambahkan 100 mL akuades yang telah disterilkan dan disaring untuk memisahkan filtratnya untuk diamati beberapa parameter fermentasi yang diuraikan pada prosedur 3.

3. Pengukuran Parameter Fermentasi

3.1. Pengukuran Kadar Selulosa

Sebanyak 1 g substrat jerami padi hasil bio-pretreatment berukuran \pm 40 mesh dimasukkan ke dalam labu bundar, tambahkan 15 mL asam asetat 80% dan 1,5 mL asam nitrat 14 M, kemudian direfluks selama 20 menit. Selanjutnya dilakukan penyaringan dengan menggunakan kertas saring Whatman No. 91 yang telah diketahui bobotnya (A). Setelah dilakukan penyaringan, padatan hasil dari refluks dicuci dengan etanol. Erlenmeyer dan corong dibilas dengan air suling sebanyak 3 kali. Kertas saring beserta residu dikeringkan pada oven dengan suhu 100-105°C selama 1-2 jam. Kertas saring didinginkan dan ditimbang bobotnya (B). Kertas saring dengan residu diabukan pada suhu 540°C, lalu didinginkan dan ditimbang bobotnya (C).

$$\text{Kadar Selulosa (\%)} = \frac{B - A - C}{\text{bobot sampel}} \times 100\%$$

Keterangan :

B = Bobot kertas saring dan residu setelah dioven (g)

A = Bobot kertas saring (g)

C = Bobot abu (g) (Soest and Wine, 1967)

3.2. Pengukuran Aktivitas Enzim Selulase

Aktivitas selulase diujikan dengan melihat aktivitas endoglukanase dengan pengujian enzim pada substrat karboksimetil selulosa (CMC, Sigma). Sebanyak 1 mL substrat 0,5% CMC ditambahkan 0,9 mL 0,02 M buffer fosfat pH optimum. Kemudian larutan ini ditambahkan 0,1 mL filtrat hasil fermentasi (ekstrak kasar enzim) dihomogenisasi dan diinkubasi pada suhu 30°C selama 30 menit lalu ditambahkan 2 mL pereaksi DNS dan dipanaskan pada suhu 100°C selama 15 menit, kemudian didinginkan pada suhu ruang. Kontrol: sebanyak 1 mL substrat 0,5% karboksimetil selulosa (CMC, sigma) ditambahkan 0,9 mL 0,2 M buffer fosfat pH optimum lalu diinkubasi pada suhu 30°C selama 30 menit. Kemudian ditambahkan 0,1 mL ekstrak enzim dan 2 mL filtrat hasil fermentasi dan 2 mL pereaksi DNS dan segera dipanaskan pada suhu 100°C selama 15 menit dan didinginkan pada suhu ruang. Pengukuran absorbansi masing-masing larutan dilakukan pada λ 540 nm (Miller, 1959).

Satu unit aktivitas enzim selulase didefinisikan sebagai jumlah 1 μ mol glukosa yang dihasilkan per menit untuk setiap mL enzim pada kondisi optimumnya.

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

Keterangan :

V = Volume sampel (mL)

FP = Faktor pengenceran (g)

4. Pengukuran Hasil Produk Fermentasi

4.1. Pengukuran Gula Pereduksi Total dengan Metode DNS

Sebanyak 2 mL filtrat hasil fermentasi dihomogenisasi lalu ditambahkan 2 mL pereaksi DNS dan dipanaskan pada suhu 100°C selama 15 menit, lalu didinginkan pada suhu ruang. Pengukuran absorbansi masing-masing larutan dilakukan pada λ 540 nm (Miller, 1959).

4.2. Pengukuran Produk Fermentasi dengan KCKT

Filtrat dianalisis dengan menggunakan KCKT pada kondisi reaksi sebagai berikut :

- Kolom : Karbohidrat
- Detektor : Indeks bias
- Pelarut : Akuabides
- Konsentrasi Standar : 400 ppm
- Volume injeksi : 10-20 μ L
- Temperatur kolom : Suhu ruang

Standar yang digunakan adalah glukosa dan xilosa.

5. Pembuatan Media

5.1. 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 121°C dan tekanan 2 atm, kemudian ditambahkan dengan 50 µg/L Nistatine dan 25 µg/L Streptomycine.

5.2. Pembuatan media inokulum YM (Yeast Malt)

Medium YM terdiri dari 4 g ekstrak khamir, 10 g ekstrak malt dan 15 g glukosa dalam 1 liter media, kemudian diautoklaf selama 15 menit pada suhu 121°C dan tekanan 2 atm.

5.3. Pembuatan media fermentasi

Sebanyak 10 g jerami padi dan buffer fosfat dengan variasi pH 6, 7 dan 8, serta perbandingan substrat: volume yaitu 1:1, 1:2 dan 1:3, kemudian diautoklaf selama 15 menit pada suhu 121°C dengan tekanan 1 atm (Yamac dan Tamer, 2008).

6. Pembuatan Pereaksi

6.1. Pembuatan Buffer Fosfat

6.1.1. Larutan Stok A ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,2 M)

Sebanyak 27,8 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ dilarutkan dengan air suling hingga volume 1000 mL.

6.1.2. Larutan Stok B ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,2 M)

Sebanyak 35,6 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ dilarutkan dengan air suling hingga volume 1000 mL.

6.2. Pembuatan Buffer Sitrat-Fosfat

6.2.1. Larutan Stok A (Asam Sitrat 0,1 M)

Sebanyak 19,21 g asam sitrat dilarutkan dengan air suling hingga volume 1000 mL.

6.2.2. Larutan Stok B ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,2 M)

Sebanyak 35,6 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ dilarutkan dengan air suling hingga volume 1000 mL.

6.3. 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.

6.4. Pembuatan NaCl 0,85%

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

7. Pembuatan Kurva Standar Glukosa

Konsentrasi gula pereduksi diperoleh dengan menggunakan kurva standar glukosa pada konsentrasi 0; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 3,5; 4,0; 4,5 dan 5,0

mg/mL. Sebanyak 2 mL larutan standar ditambahkan 2 mL pereaksi DNS dan dipanaskan pada suhu 100°C selama 15 menit, lalu didinginkan pada suhu ruang. Absorbansi larutan dibaca menggunakan spektrofotometri UV-Vis pada λ 540 nm. Hasil yang diperoleh diplotkan untuk memperoleh kurva regresi linier dengan absorbansi sebagai y dan konsentrasi larutan standar sebagai sumbu x .