

BAB III

BAHAN DAN METODE PENELITIAN

A. Tempat dan Waktu penelitian

Penelitian akan dilaksanakan di Laboratorium Pusat Penelitian dan Pengembangan Kimia Terapan (P3KT)–LIPI, PUSPIPTEK Serpong, pada bulan Maret 2004 sampai maret 2005.

B. Bahan dan Alat

B.1. Bahan

Mikroorganisme yang digunakan dalam produksi enzim xilanase adalah *Thermomyces lanuginosus* IFO 150, kultur ini berasal dari Institut Fermentation of Osaka Jepang, sedangkan untuk proses delignifikasi digunakan Jamur Pelapuk Putih PSM 01, yang merupakan kultur stok di laboratorium Mikrobiologi P3KT LIPI serpong.

Bagasse tebu sebagai media fermentasi diperoleh dari penjaja minuman jus tebu. Pada saat analisa kimia bagasse tebu dibutuhkan bahan antara lain n-heksan, asam sulfat pekat, kation selenium, NaOH, Indikator metil merah dan metil biru dan HCl 0,01 N.

Bahan untuk penyegaran inokulum adalah media PDA (Potatoes Dextrosa agar) dan Bacterial agar. Sedangkan bahan untuk media kultivasi terdiri dari bagasse tebu, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, KH_2PO_4 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, CaCl_2 , NaCl dan air destilasi. Untuk proses delignifikasi juga dibutuhkan Yeast ekstrak, pepton, Bufer laktat, tiamin dan Kirk mineral.

Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:

- a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
- b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.

2. Dilarang mengumumkan atau memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.

Bahan-bahan kimia untuk ekstraksi enzim adalah buffer fosfat pH 6,0. buffer suksinat 0.2M pH 4,5. Sebagai substrat dalam menguji aktivitas enzim adalah xilan *Birchwood* dan 2-6 dimetoksifenol dari Sigma. Pada analisa dengan metode Somogy-Nelson digunakan Reagen Nelson, Reagen Arsenomolibdad, pembuatan larutan ini dapat dilihat pada lampiran 1. Sebagai larutan standad digunakan xilosa dan glukosa yang diproduksi oleh Sigma. Analisa protein terlarut dengan metode Lowry (1951) menggunakan Serum Bovine Albumin sebagai larutan standad.

B.2. Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah spektrofotometer Hitachi tipe U-200, inkubator statis dari Yamato tipe IL-72 dan Sibata tipe SSI 450, *autoclave* dari ALP tipe KT-30L, HPLC Merck Hitachi (UV detector tipe L-400, pompa L-6200, *Degasser* ERC-3312, L-5025 *Collume thermostat* dan *Integrator* D-2500), pH meter dari Ohmmeter penangas air, timbangan analitis, termometer, *stop watch*, desikator, sokhlet, oven, *shaker*, *sentrifuse*. Alat-alat gelas antara lain cawan petri, labu erlenmeyer, gelas ukur, tabung *sentrifuge*, kuvet, tabung reaksi, finnpipette digital 40-200 µl dan 1-5 ml dari Labssystem dan botol sampel. Alat bantu lain seperti kapas, kertas parafilm, aluminium foil, kasa dan lain-lain.

C. Metode Penelitian

Tujuan utama dalam penelitian ini adalah untuk mendapatkan enzim xilanase termostabil dari *Thermomyces lanuginosus* IFO 150 pada substrat

Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:

- a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
- b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.

2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.

bagasse tebu. Untuk mencapai tujuan tersebut di tahap awal penelitian dilakukan pemilihan komposisi media fermentasi yang menghasilkan enzim xilanase dengan aktivitas tertinggi. Parameter yang digunakan dalam pemilihan komposisi media ini adalah proses delignifikasi, kadar air awal media bagasse tebu dan waktu fermentasi. Setelah diperoleh kondisi optimum bagasse tebu maka dilakukan produksi enzim xilanase dan sekaligus dilakukan uji aktivitas dan stabilitas enzim terhadap enzim xilanase yang dihasilkan.

Secara terperinci tahapan metodologi penelitian terdiri dari enam tahap yaitu tahap persiapan, tahap pembuatan media, tahap penyegaran inokulum, tahap delignifikasi, produksi enzim xilanase dengan fermentasi padat dan uji sifat-sifat ekstrak enzim.

C.1. Tahap Persiapan

Pada tahap persiapan dilakukan pembuatan media yang disterilisasi dan dilakukan awal terhadap bagasse tebu. Ampas tebu yang telah diambil niranya, dicuci dengan air, kemudian dijemur selama 3 hari sampai kadar air 14 %. Kemudian bagasse tebu digiling dan untuk mendapatkan ukuran yang homogen dilakukan pengayakan. Bagasse tebu yang digunakan sebagai substrat adalah yang lolos saringan 18 mesh. Analisa kimia bagasse tebu meliputi kadar air (Pengeringan, AOAC 1995), abu (AOAC 1995), lemak (AOAC, 1995), dan protein dengan metode Kjeldahl (AOAC 1995) (lampiran 3).

C.2. Pembuatan Media

Media yang digunakan dalam penelitian ini ada tiga macam yaitu media agar untuk mempersiapkan inokulum, medium Mendels yang dimodifikasi untuk produksi enzim xilanase dan medium Kirk untuk proses delignifikasi.

Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:

- a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
- b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.

2. Dilarang mengumunkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.

Komposisi medium agar untuk penyegaran digunakan *potatoes dextrose agar* 3,9 gr dan *bacteriological agar* 0,5 gr dan air destilasi 100 ml. Bahan-bahan tersebut setelah ditimbang dimasukkan kedalam air destilasi hingga larut. Larutan kemudian disterilisasi di dalam *autoclaf* pada suhu 121°C, tekanan 1 atm selama 15 menit. Setelah disterilisasi, larutan medium dituangkan ke dalam cawan petri 15 ml/petri dalam ruang steril. Medium dibiarkan membeku dan siap digunakan untuk membuat inokulum bagi *Thermomyces lanuginosus* dan Jamur Pelapuk putih PSM 01.

Pada proses delignifikasi media nutrisi yang ditambahkan dalam bagasse tebu adalah media kirk yang terdiri dari Yeast ekstrak 0,02%, pepton 0,62%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,02%, Buffer laktat 5% dengan 0.5 M pH 4,5, dan kirk salt sebanyak 1% dan aquadest 94%. Untuk menumbuhkan jamur pelapuk putih, dalam setiap gram bagasse ditambahkan 5 ml media kirk. Selanjutnya disterilisasi dengan autoclaf.

Media fermentasi yang digunakan dalam produksi enzim adalah bagasse tebu yang ditambah dengan nutrisi berupa medium Mendel yang sudah dimodifikasi, dengan komposisi $(NH_4)_2SO_4$ 0.1%, KH_2PO_4 0,05 %, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,01 %, $CaCl_2$ 0,1 %, NaCl 0,6 %, Yeas ekstrak 1,75% dan air destilasi Semua bahan tersebut dilarutkan dalam aquadest dan diaduk sampai merata dan homogen. Pada setiap 3 gram substrat ditambahkan larutan nutrisi dengan volume tertentu sesuai dengan variasi kadar air 50%, 65% dan 80%. Setelah substrat ditambahkan dengan media nutrisi maka dilakukan sterilisasi dengan autoclaf

pada suhu 121°C, tekanan 1 atm selama 15 menit. Setelah disterilisasi, medium fermentasi dibiarkan dingin dan siap digunakan dalam produksi enzim xilanase.

C.3. Penyegaran Inokulum

Penyegaran isolat jamur dilakukan dengan memindahkan kultur jamur dari agar miring ke dalam cawan petri dengan media Potatoes dekstrose agar dan Bacteriological Agar, selanjutnya diinkubasi selama 7 hari pada suhu 45 °C untuk *Thermomyces lanuginosus* IFO 150 dan pada suhu kamar selama 5 hari bagi jamur pelapuk putih PSM 01. Dari hasil penyegaran ini dibuat bulatan kecil berdiameter 5 mm dan siap ditanam di substrat bagasse tebu fermentasi media padat untuk delignifikasi dan memproduksi enzim xilanase.

C.4. Proses Delignifikasi

Substrat bagasse tebu dilakukan delignifikasi secara mikrobiologi. dengan jamur Pelapuk putih PSM 01. Dalam setiap 5 gr bagasse tebu dalam labu erlenmeyer 250 ml ditambahkan 15 ml medium Kirk, setelah disterilisasi dengan *autoclaf* diinokulasikan 5 keping jamur pelapuk putih PSM 01 dari tahap penyegaran. Inkubasi dilakukan pada suhu ruang selama 6 hari. Tanpa dilakukan pencucian, bagasse tebu dikeringkan pada suhu 65°C dan siap digunakan sebagai substrat dalam proses fermentasi produksi enzim xilanase. Waktu inkubasi 6 hari didasarkan pada penelitian yang dilakukan Prasetya (1996), pada waktu inkubasi 6-9 hari pengurangan kadar lignin sudah mendekati konstan.

Untuk mengetahui aktivitas lakase, diambil beberapa sampel dan diekstraksi enzimnya dengan buffer suksinat 0,2M pH 4,5. Aktivitas enzim lakase diuji dengan metode Watanabe (2002) dan kadar protein terlarut diuji dengan metode

Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:

- a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
- b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.

2. Dilarang mengumumkan atau memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.

Lowry (1951). Analisis lakase diukur secara langsung dengan metode spektrofotometri, substrat yang digunakan adalah 2,6-dimetoksifenol 4 mM dan mediatornya adalah buffer suksinat 0,2 M pH 4,5. Sejumlah enzim (25-50 μ l) ditambahkan pada campuran 3,0 ml buffer suksinat dan 3,0 ml 2,6-dimetoksifenol, dikocok lalu diukur absorbansinya dengan pada panjang gelombang 470 nm. Larutan blangko terdiri dari 3,0 ml buffer suksinat, 3,0 ml 2,6-dimetoksifenol. Larutan kontrol dibuat dari campuran 6,0 ml bufer suksinat dan sejumlah enzim (25-50 μ l). Satu unit lakase didefinisikan sebagai jumlah enzim yang dapat meningkatkan absorbans pada panjang gelombang 470 nm selama satu menit dalam kondisi standar pH 4,5 dan suhu 25°C.

C.5. Produksi Xilanase Dengan Variasi Kadar Air Awal Media; Perlakuan Delignifikasi Dan Waktu Fermentasi Optimum

Pada produksi enzim xilanase ini digunakan tiga variabel: kadar air awal media dengan taraf 50%, 65% dan 80%, pengaruh delignifikasi dengan dua taraf yaitu delignifikasi dan tanpa delignifikasi serta variabel waktu dengan taraf 0, 3, 6, 9, dan 12 hari. Inkubasi dilakukan selama 12 hari pada suhu 45°C. Enzim dipanen dengan cara diekstraksi dengan menambahkan 27 ml buffer fosfat 0,2M pada pH 6. Ekstraksi dilakukan dengan *shaker* 120 rpm selama 60 menit. Tahap berikutnya adalah mendapatkan *crude* enzim dengan cara sentrifugasi 12.000 rpm pada suhu 4°C sehingga diperoleh filtrat yang bebas sel.

Supernatan yang dihasilkan merupakan ekstrak enzim dimasukkan ke dalam botol sampel dan siap untuk dianalisis aktivitas xilanase dan kadar gula tereduksi

dengan metode Somogy –Nelson (1952) sedangkan kadar protein terlarut dengan metode Lowry (1951).

Pengukuran analisis aktivitas xilanase dilakukan dengan mencampurkan 1ml buffer fosfat 0,2 M pH 6, 1ml enzim, 1ml substrat xilan *birchwood* 1% dan diinkubasi pada suhu 55 °C selama 10 menit. Selanjutnya diambil 0.1ml larutan campuran tersebut ditambahkan 1ml reagen Nelson dan dipanaskan selama 20 menit pada air mendidih, setelah didinginkan selama 5 menit pada air mengalir, reaksi dihentikan dengan menambahkan 1 ml reagen arsenomolibdat dan ditepatkan sampai 10 ml. Pembacaan dengan *spektrofotometer* dilakukan pada panjang gelombang 520 nm. Kadar xilosa yang terbentuk karena aktivitas enzim merupakan kadar xilosa setelah inkubasi dikurangi kontrol. Sebagai larutan kontrol digunakan enzim yang diinaktivasi (pemanasan 100 °C selama 10 menit) dan diperlakukan sama pada saat analisis xilanase. Sedangkan blangko adalah 2 ml buffer fosfat pH 6 dan 1 ml xilan 1%. Satu unit aktivitas xilanase adalah banyaknya enzim yang dapat memproduksi 1 μ mol xilosa per menit setelah diinkubasi dengan xilan pada suhu 55 °C selama 10 menit.

Analisis kadar protein metode Lowry (1951) merupakan salah satu reaksi warna uji protein yang konsentrasinya rendah (1-300 μ g/ml), ditandai dengan terbentuknya kompleks berwarna biru keunguan. Intensitas warna kompleks sebanding dengan kadar protein. Pereaksi yang digunakan adalah Lowry A, B, C, dan D. Lowry A dibuat dengan melarutkan 2%(b/v) Na_2CO_3 dalam NaOH 0,1 N. Lowry B dibuat dengan melarutkan 0,5%(b/v) $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ dalam Na, K tartrat 1%(b/v). Komposisi Lowry C terdiri dari Lowry A dan Lowry B (50:1) dan

komposisi Lowry D adalah pereaksi Folin Ciocalteau dan akuades (1:1). Lowry C dan Lowry D dibuat *in situ*.

Untuk mengukur kadar protein terlarut, sejumlah enzim (50-500 μ l) ditambahkan 5,0 ml Lowry C, dikocok, dan didiamkan selama 10 menit. Lalu Lowry D ditambahkan sebanyak 0.5 ml, dikocok dan didiamkan selama 30 menit. Serapannya diukur pada panjang gelombang 500 nm. Kurva Standard protein dibuat dengan stok Bovine Serum Albumin Fraktion V 300 μ g/ml. Sederetan standard BSA dibuat dengan konsentrasi 0, 30, 60, 90, sampai 300 μ g/ml.

Pada tahapan ini diharapkan dapat diperoleh kondisi fermentasi yang optimal berdasarkan kadar air awal media dan pengaruh delignifikasi substrat, serta waktu inkubasi yang optimum bagi produksi enzim xilanase.

C.6. Karakterisasi Enzim Xilanase

Terhadap enzim kasar yang diperoleh dari media terpilih dan waktu fermentasi optimum dilakukan karakterisasi untuk mengetahui sifat enzim xilanase dari *Thermomyces lanuginosus* IFO 150 pada substrat bagasse tebu. Sifat-sifat enzim yang dipelajari adalah pengaruh perubahan pH dan suhu terhadap aktivitas enzim, pengaruh perubahan pH dan suhu terhadap kestabilan enzim xilanase serta pengaruh penambahan larutan ion logam terhadap aktivitas enzim xilanase.

a. Pengaruh pH atau suhu terhadap aktivitas enzim

Penentuan pH optimum xilanase sama halnya dengan analisis aktivitas xilanase, tapi menggunakan berbagai buffer dengan kisaran pH 2,0 sampai 11,0 yaitu buffer sitrat 0,2 M (pH 2,0-5,0), buffer fosfat 0,2M (pH 6,0-11,0).

Suhu optimum xilanase dilakukan dengan menginkubasikan campuran substrat xilan 1%, dan bufer fosfat 0,2M pH 6 pada kisaran suhu 30°C sampai 80 °C selama 10 menit. Lalu diukur aktivitasnya dengan analisis xilanase.

b. Pengaruh perubahan pH dan perubahan suhu terhadap stabilitas enzim.

Pengaruh pH terhadap stabilitas enzim dilakukan dengan cara menginkubasikan filtrat enzim berbagai bufer dengan kisaran pH 2,0-11,0 (1:4) selama 24 jam pada suhu 4 °C. Setelah disimpan, enzim diukur aktivitasnya sesuai analisis xilanase. Stabilitas xilanase terhadap suhu, sejumlah filtrat enzim dalam bufer fosfat pH 6 (1:4) diinkubasi pada suhu 30, 40, 60, 70 dan 80°C, selama 24 jam. Setelah penyimpanan diukur aktivitas xilanase sesuai esai enzim.

c. Pengaruh penambahan ion logam terhadap aktivitas enzim

Untuk mengetahui jenis ion logam yang berpengaruh terhadap aktivitas enzim xilanase, campuran larutan ion logam 1.0 mM dan enzim diinkubasi selama 24 jam pada suhu 4°C, lalu diuji aktivitasnya dengan essay enzim xilanase. Larutan ion logam yang digunakan Fe^{2+} , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Cu^{2+} dan Zn^{2+}

D. Analisa Kimia

D.1. Analisa kadar total gula tereduksi dengan Metode Somogy-Nelson (1952)

Terhadap 1 ml sampel filtrat hasil fermentasi ditambahkan 1 ml reagen Nelson C, kemudian dipanaskan selama 20 menit pada suhu 100 °C. Selanjutnya didinginkan dan ditambah 1 ml reagen Arsenomolibdat, dikocok dan diencerkan dengan air destilasi hingga volumenya menjadi 10 ml. Absorbansinya dibaca pada

spektrofotometer dengan panjang gelombang 520 nm, sebagai blanko digunakan air destilasi pengganti sampel.

D.2. Analisa jenis gula hasil hidrolisis enzim dengan metode HPLC

Hidrolisis substrat oleh enzim kasar yang telah dihasilkan dilakukan dengan cara menginkubasi substrat xilan birchwood (Sigma) 1% dan enzim dalam erlenmeyer pada inkubator bergoyang selama 10 menit, pada pH dan suhu inkubasi yang memberikan hasil hidrolisis maksimum. Filtrat hasil hidrolisis dianalisa jenis gulanya dengan menggunakan metode HPLC.

Larutan sampel yang akan dianalisis komponen gulanya disaring terlebih dahulu dengan kertas saring *millipore* yang memiliki ukuran pori-pori sebesar 0,2 mikrometer. Contoh yang telah disaring kemudian disuntikkan sebanyak 10 µl pada HPLC yang menggunakan kolom LiChrocart liChropher dan suhu 60 °C. Elusi contoh dari kolom menggunakan pengelusi Acetonitril dan air bebas ion (75 :25) dengan laju alir 0,5 ml/menit. Gula yang telah keluar dari kolom dideteksi oleh pendeteksi (*UV detector*) dan dihubungkan dengan *integrator chromatopack*.

E. Rancangan Percobaan

Rancangan percobaan penelitian produksi enzim xilanase dari *Thermomyces lanuginosus IFO 150* pada substrat bagasse tebu adalah menggunakan Rancangan acak lengkap faktorial 3 faktor dengan 2 kali ulangan. Rancangan ini dipilih karena ingin melihat pengaruh-pengaruh utama, interaksi derajat ketelitian dan kepentingan setara.

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:

- a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
- b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.

2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.

Nilai pengamatan hasil percobaan (Y) secara umum dinyatakan dalam model matematika:

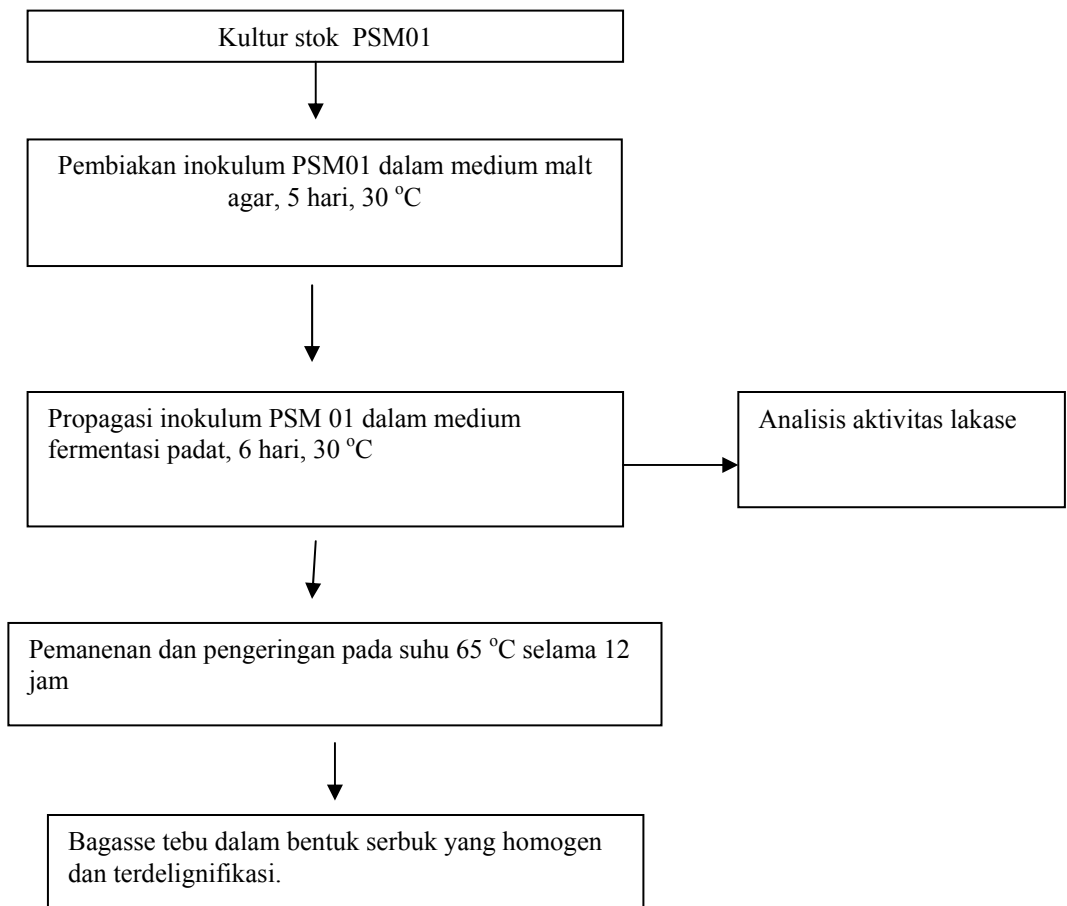
$$Y = \mu + \tau + \varepsilon$$

Dimana: Y = Nilai –nilai pengamatan hasil percobaan

μ = Rataan umum

τ = Pengaruh perlakuan (delignifikasi, kadar air awal dan waktu fermentasi)

ε = Pengaruh acak

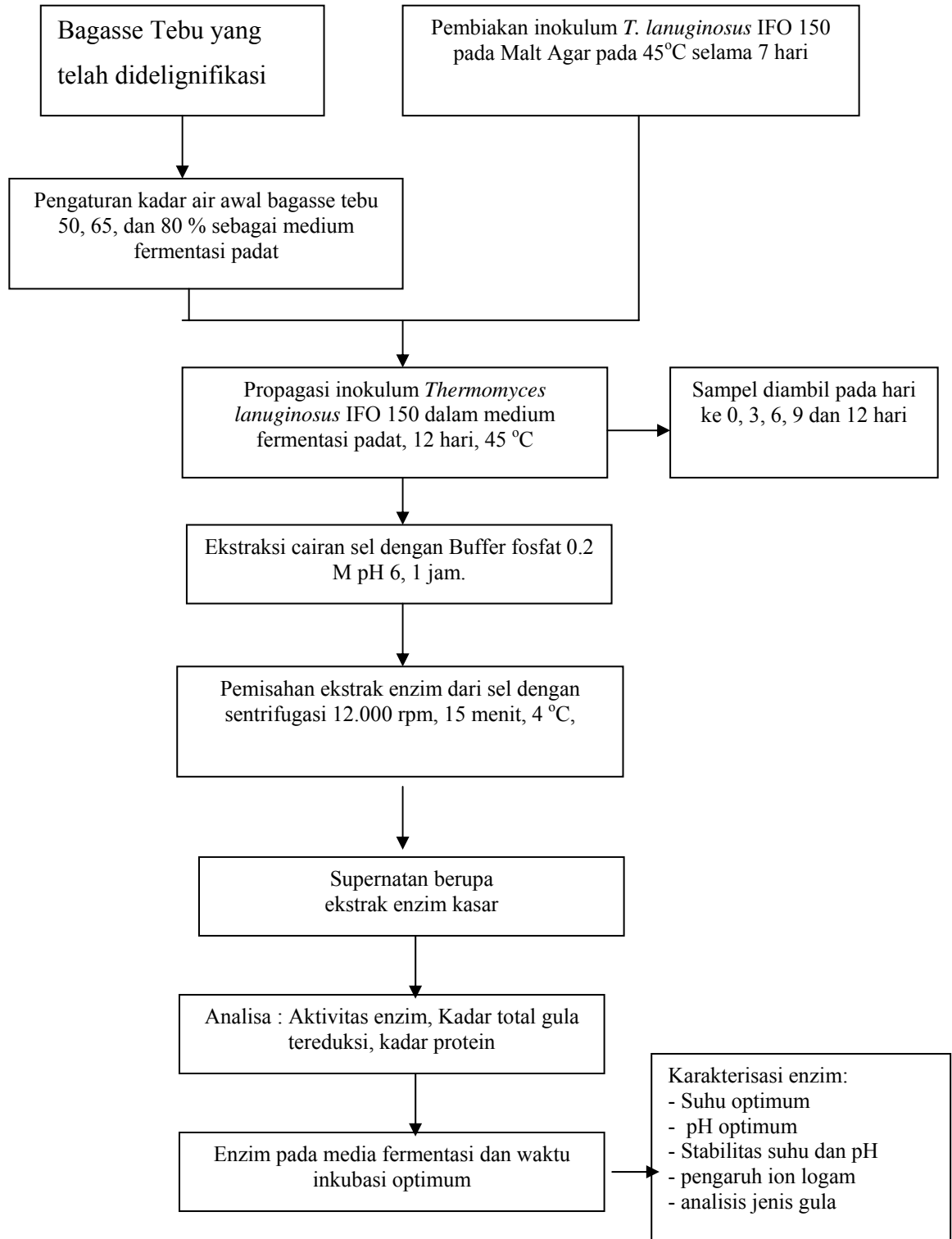


Gambar 3. Diagram alir proses delignifikasi bagasse tebu dengan jamur Pelapuk Putih PSM 01.

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:

- a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
- b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.

2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.



Gambar 4. Optimasi media fermentasi, produksi dan karakterisasi enzim xilanase