

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Biokimia Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya, Malang pada bulan Februari sampai Mei 2017.

3.2 Alat dan Bahan Penelitian

3.2.1 Alat penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah peralatan gelas, ayakan ukuran 150 mesh, jarum ose, bunsen, *laminar air flow*, lemari es, pengaduk magnetik, pH meter (*Inolab WTW*), neraca analitik (*Mettler Toledo AL 204*), penangas air (*Memmert*), *shaker* (*Edmund Buhler SM 25 24B*), oven (*Memmert*), inkubator (*Heraeus Type B 5042*), autoklaf (*All American Model 20X*), sentrifuse dingin (*Hermle Labortechnik GmbH Siemenstr 25 Wehingen Type Z326 K*), tanur, dan Spektrometri Geneys.

3.2.2 Bahan penelitian

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah kapang *Trichoderma viride* yang digunakan sebagai sumber dari xilanase, diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi, jurusan Biologi, Fakultas MIPA, Universitas Negeri Malang.

Bahan kimia yang digunakan pada penelitian ini memiliki derajat kemurnian pro analis (pa), teknis dan *for microbiology* seperti kentang, tepung agar, dextrosa, klobot jagung, pepton, tween-80, kasein, urea, glukosa anhidrat, asam asetat glasial, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, CH_3COONa , KH_2PO_4 , $(NH_4)_2SO_4$, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, $NaKC_4O_6H_4$, $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, HCl, $BaCl_2$ 0,1 M, xilan, DNS (asam dinitrosalisilat), NaOH, Na_2SO_4 , ammonium sulfat dan fenol. Bahan yang lain yaitu aquades, membran selofan dan bentonit.

3.3 Tahapan penelitian

Penelitian ini dilakukan melalui beberapa tahapan, yaitu:

1. Pembuatan serbuk klobot jagung
2. Pembuatan media padat

3. Peremajaan biakan murni *Trichoderma viride*
4. Pembuatan media cair
5. Pembuatan inokulum
6. Produksi dan isolasi ekstrak kasar xilanase
7. Pemurnian xilanase
8. Penentuan aktivitas xilanase bebas
 - Penentuan panjang gelombang maksimum gula pereduksi
 - Pembuatan kurva baku gula pereduksi
 - Uji aktivitas xilanase bebas
9. Penentuan kadar protein awal
 - Penentuan panjang gelombang maksimum kasein
 - Pembuatan kurva baku kasein
 - Uji kadar protein awal
10. Amobilisasi xilanase
 - Aktivasi bentonit dengan HCl
 - Amobilisasi xilanase murni dengan matriks bentonit teraktivasi
11. Uji aktivitas xilanase amobil
12. Uji kadar protein sisa
13. Penentuan pengaruh suhu terhadap kestabilan aktivitas xilanase amobil
14. Penentuan pengaruh pH terhadap kestabilan aktivitas xilanase amobil
15. Analisis data

3.4 Prosedur Kerja

3.4.1 Pembuatan serbuk klobot jagung

Klobot jagung dipotong kecil-kecil dan dicuci bersih dengan akuades. Kemudian dikeringkan di dalam oven pada suhu 100 °C. Klobot jagung yang sudah kering dihaluskan menggunakan blender dan diayak menggunakan ayakan ukuran 150 mesh. Sehingga diperoleh serbuk klobot jagung yang digunakan sebagai induser.

3.4.2 Pembuatan media padat

Peremajaan kapang *Trichoderma viride* menggunakan media padat *Potatoes Dextrose Agar* (PDA) yang dibuat dengan cara kentang dikupas, dipotong kecil-kecil dan dicuci dengan akuades. Ditimbang sebanyak 20 g, dimasukkan ke dalam gelas kimia 250 mL

dan ditambahkan dengan 100 mL akuades. Lalu dipanaskan hingga mendidih selama 1 jam dan selama pemanasan ditambahkan dengan akuades supaya volumenya tetap 100 mL. Kemudian disaring menggunakan kertas saring, sari kentang yang diperoleh ditambahkan dengan 2 g dextrosa, 1 mL buffer asetat 0,2 M pH 5 dan 1,5 g tepung agar. Larutan PDA dipanaskan hingga mendidih sambil diaduk menggunakan pengaduk magnetik. Setelah larut semua, larutan PDA dimasukkan ke dalam tabung reaksi sebanyak 4 mL, ditutup dengan kapas dan dilapisi dengan kertas coklat. Larutan PDA disterilisasi di dalam autoklaf pada suhu 121 °C dengan tekanan 15 psi selama 15 menit. Larutan PDA steril didinginkan pada temperatur ruang dengan posisi miring, sehingga diperoleh media padat PDA.

3.4.3 Peremajaan biakan murni *Trichoderma viride*

Peremajaan biakan murni *Trichoderma viride* dilakukan di dalam *laminar air flow*. Jarum ose, tabung media padat dan tabung biakan *Trichoderma viride* dilewatkan pada nyala api bunsen. Kemudian spora *Trichoderma viride* diambil menggunakan jarum ose dan dimasukkan ke dalam media padat PDA. Tabung media padat PDA dilewatkan kembali pada nyala api bunsen dan ditutup dengan kapas yang dilapisi kertas coklat. Selanjutnya diinkubasi di dalam inkubator pada suhu 30 °C selama 144 jam (6 hari).

3.4.4 Pembuatan media cair

Bahan-bahan pembuatan media cair ditimbang sebanyak 0,75 g serbuk klobot jagung; 0,12 g KH_2PO_4 ; 0,12 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 0,56 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 0,12 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,12 g urea; 0,4 mL unsur renik; 0,2 g pepton; dan 0,08 g Tween-80. Semua bahan yang sudah ditimbang dimasukkan ke dalam gelas kimia 250 mL, ditambahkan dengan akuades sampai volumenya 200 mL dan ditambahkan 1 mL buffer asetat 0,2 M pH 5. Larutan media cair diaduk dan dipanaskan hingga mendidih, kemudian ditutup dengan kapas yang dilapisi kertas coklat. Larutan media cair dimasukkan ke dalam autoklaf pada suhu 121 °C dengan tekanan 15 psi selama 15 menit.

3.4.5 Pembuatan inokulum

Pembuatan inokulum dilakukan secara aseptis di dalam *laminar air flow* dengan cara spora hasil biakan murni *Trichoderma*

viride disuspensikan ke dalam 1 mL akuades steril. Kemudian dimasukkan ke dalam erlenmeyer 250 mL yang berisi 200 mL media cair steril. Inokulum diinkubasi pada temperatur ruang dan dikocok menggunakan *shaker* dengan kecepatan 150 rpm sampai mencapai pertengahan fasa logaritma (jam ke-36).

3.4.6 Produksi dan isolasi xilanase

Media cair sebanyak 200 mL ditambahkan dengan 20 mL larutan inokulum ke dalam media cair yang dilakukan secara aseptis di dalam *laminar air flow*. Campuran larutan diinkubasi pada temperatur ruang selama 60 jam dan dikocok menggunakan *shaker* dengan kecepatan 100 rpm. Selanjutnya ditambahkan dengan 16 mL buffer asetat pH 5 dan disentrifugasi dingin pada suhu 4 °C dengan kecepatan 3000 rpm selama 30 menit. Hasil sentrifuse dingin diperoleh supernata yang merupakan ekstrak kasar xilanase.

3.4.7 Pemurnian xilanase

Pemurnian xilanase dilakukan dengan cara fraksinasi, yaitu penambahan garam ammonium sulfat pada ekstrak kasar xilanase. Ekstrak kasar xilanase difraksinasi menggunakan garam ammonium sulfat pada fraksi 0-40% dan fraksi 40-80%. Fraksi 0-40% dilakukan dengan cara penambahan 22,6 g garam ammonium sulfat secara sedikit demi sedikit ke dalam 100 mL ekstrak kasar xilanase sambil diaduk menggunakan pengaduk magnetik hingga larut. Kemudian larutan disentrifugasi dingin pada suhu 4 °C dengan kecepatan 8000 rpm selama 30 menit. Selanjutnya fraksi 40-80% diperoleh dari penambahan 26,3 g garam ammonium sulfat ke dalam 100 mL supernata yang diperoleh dari fraksi 0-40% dan diperlakukan sama seperti pada fraksi 0-40%.

Setelah diperoleh fraksi 40-80%, dilakukan proses dialisis. Dialisis dilakukan dengan cara penambahan 5 mL buffer asetat 0,2 M pH 5 ke dalam endapan hasil fraksi 40-80%. Kemudian larutan enzim dimasukkan ke dalam membran selofan yang diikat pada kedua ujungnya. Kantong selofan yang berisi enzim direndam di dalam 250 mL buffer asetat 0,1 M pH 5 dan diaduk menggunakan pengaduk magnetik secara perlahan pada suhu 4 °C. Proses dialisis dilakukan sampai garam ammonium sulfat yang terdapat di dalam ekstrak kasar xilanase terpisah dan selama dialisis dilakukan penggantian larutan buffer asetat 0,1 M pH 5 (perendam) setiap 2

jam sekali. Dialisis dihentikan apabila sudah diperoleh xinalase murni yang ditandai dengan tidak terbentuknya endapan putih (BaSO_4) yang diuji dengan penambahan 1 mL HCl 0,1 M dan 1 mL BaCl_2 0,1 M ke dalam 5 mL buffer asetat (perendam).

3.4.8 Penentuan aktivitas xilanase bebas

3.4.8.1 Penentuan panjang gelombang maksimum gula pereduksi

Larutan glukosa 300 $\mu\text{g/mL}$ dipipet sebanyak 1 mL dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Kemudian ditambahkan dengan 1 mL buffer asetat 0,2 M pH 5 dan 2 mL reagen DNS. Larutan dipanaskan di dalam penangas air mendidih selama 15 menit. Larutan didinginkan menggunakan air mengalir. Setelah dingin, larutan dimasukkan ke dalam labu takar 25 mL dan ditambahkan dengan akuades sampai tanda batas serta dikocok hingga homogen. Larutan diukur absorbansinya menggunakan Spektrometri UV pada kisaran panjang gelombang 480-550 nm. Pada penentuan panjang gelombang maksimum, digunakan akuades sebagai larutan blanko yang diperlakukan sama seperti pada larutan glukosa 300 $\mu\text{g/mL}$.

3.4.8.2 Pembuatan kurva baku gula pereduksi

Larutan stok glukosa 1500 $\mu\text{g/mL}$ dipipet dengan volume yang berbeda, yaitu 2; 4; 6; 6,8 dan 8 mL dan dimasukkan ke dalam labu takar 100 mL. Ditambahkan dengan akuades sampai tanda batas dan dikocok hingga homogen sehingga diperoleh larutan glukosa dengan konsentrasi 300, 600, 900, 1000 dan 1200 $\mu\text{g/mL}$. Masing-masing konsentrasi larutan glukosa dipipet sebanyak 1 mL dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Ditambahkan dengan 1 mL buffer asetat 0,2 M pH 5 dan 2 mL reagen DNS. Kemudian semua larutan dipanaskan di dalam penangas air mendidih selama 15 menit dan didinginkan menggunakan air mengalir. Masing-masing larutan dimasukkan ke dalam labu takar 25 mL, ditambahkan dengan akuades sampai tanda batas dan dikocok hingga homogen. Larutan diukur absorbansinya menggunakan Spektrometri UV pada panjang gelombang maksimum. Kemudian dibuat kurva baku hubungan antara konsentrasi glukosa (sumbu x) dengan absorbansi (sumbu y).

3.4.8.3 Uji Aktivitas xilanase bebas

Substrat xilan 1% (b/v) dipipet sebanyak 1 mL, dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan dipanaskan di dalam penangas air selama 15 menit pada suhu 60 °C. Kemudian ditambahkan dengan 1 mL xilanase hasil pemurnian, 1 mL buffer asetat 0,2 M pH 5 dan 1 mL air bebas reduktor. Larutan diinkubasi di dalam penangas air selama 55 menit pada suhu 60 °C. Larutan dipanaskan di dalam penangas air mendidih selama 15 menit. Kemudian ditambahkan dengan 2 mL reagen DNS dan dipanaskan kembali di dalam penangas air mendidih selama 5 menit. Larutan didinginkan menggunakan air mengalir, dimasukkan ke dalam labu takar 25 mL dan ditambahkan dengan akuades sampai tanda batas serta dikocok hingga homogen. Larutan diukur absorbansinya menggunakan Spektrometri UV pada panjang gelombang maksimum.

Satu unit aktivitas enzim bebas merupakan 1 µg xilosa yang dihasilkan per menit per mL enzim. Pengukuran aktivitas enzim bebas dilakukan dengan cara memplotkan nilai absorbansi yang diperoleh pada persamaan kurva baku, sehingga dapat diketahui konsentrasi gula pereduksi hasil hidrolisis xilan oleh xilanase. Besarnya satu unit aktivitas enzim dapat diperoleh dari persamaan:

$$AE = \frac{X \times V \times fp}{p \times q} \times \frac{Mr \text{ xilosa}}{Mr \text{ glukosa}}$$

Keterangan :

AE	= aktivitas enzim (µg.mL ⁻¹ .menit ⁻¹)
X	= konsentrasi gula pereduksi (µg.mL ⁻¹)
V	= volume total sampel (mL)
fp	= faktor pengenceran
p	= volume ekstrak xilanase (mL)
q	= waktu retensi (menit)
Mr xilosa	= 150,13 g/mol
Mr glukosa	= 180 g/mol

3.4.9 Penentuan kadar protein awal

3.4.9.1 Penentuan panjang gelombang maksimum

Larutan kasein 5000 ppm dipipet sebanyak 2 mL dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Ditambahkan dengan 8 mL reagen biuret dan 2 mL buffer setat 0,2 M pH 5. Larutan dikocok dan diinkubasi di dalam penangas air pada suhu 50 °C selama 30 menit.

Larutan yang sudah dipanaskan didinginkan menggunakan air mengalir. Kemudian absorbansinya diukur menggunakan Spektrometri Geneys pada rentang panjang gelombang 460-640 ppm.

3.4.9.2 Pembuatan kurva baku kasein

Larutan stok kasein 10000 ppm dipipet dengan volume yang berbeda, yaitu 1; 2; 3; 4; 5; 6; 7; 8 dan 9 mL dimasukkan ke dalam labu takar 10 mL. Kemudian ditambahkan akuades sampai tanda batas dan dikocok hingga homogen, sehingga diperoleh larutan kasein dengan konsentrasi 1000, 2000, 3000, 4000, 5000, 6000, 7000, 8000 dan 9000 ppm. Masing-masing konsentrasi larutan kasein dipipet sebanyak 2 mL dimasukkan ke dalam tabung reaksi, ditambahkan dengan 8 mL reagen Biuret dan 2 mL buffer asetat 0,2 M pH 5. Kemudian dikocok dan diinkubasi di dalam penangas air pada suhu 50 °C selama 30 menit. Campuran larutan yang sudah dipanaskan didinginkan menggunakan air mengalir. Setelah dingin diukur absorbansinya menggunakan Spektrometri Geneys pada panjang gelombang maksimum. Kemudian dibuat kurva baku hubungan antara konsentrasi kasein (sumbu x) dengan absorbansi (sumbu y).

3.4.9.3 Uji kadar protein awal

Xilanase hasil pemurnian dipipet sebanyak 2 mL dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Ditambahkan dengan 8 mL reagen Biuret dan 2 mL larutan kasein 5000 ppm. Larutan dikocok dan diinkubasi di dalam penangas air pada suhu 50 °C selama 30 menit. Blanko yang digunakan untuk uji kadar protein menggunakan 8 mL reagen Biuret yang diinkubasi di dalam penangas air pada suhu 50 °C selama 30 menit. Kemudian larutan diukur absorbansinya menggunakan Spektrometri Geneys pada panjang gelombang maksimum.

3.4.10 Amobilisasi xilanase hasil pemurnian

3.4.10.1 Aktivasi matriks bentonit dengan HCl

Bentonit yang akan diaktivasi dikeringkan terlebih dahulu di dalam oven pada suhu 105 °C. Bentonit yang sudah kering dimasukkan ke dalam erlenmeyer 250 mL dan ditambahkan dengan 200 mL larutan HCl 0,4 M. Kemudian dikocok menggunakan *shaker* dengan kecepatan 100 rpm selama 4 jam. Setelah dikocok, disaring

menggunakan kertas Whatman No. 40 dan dicuci menggunakan aquades sampai pH pada filtrat netral. Apabila sudah netral, bentonit dikeringkan di dalam oven pada suhu 105 °C sampai diperoleh berat konstan. Bentonit yang sudah diaktivasi dikalsinasi pada suhu 500 °C selama 4 jam.

3.4.10.2 Amobilisasi xilanase pada matriks bentonit teraktivasi

Bentonit teraktivasi ditimbang sebanyak 11 g dan dimasukkan ke dalam erlenmeyer 50 mL. Kemudian ditambahkan dengan xilanase hasil pemurnian sebanyak 45 mL. Larutan dikocok menggunakan *shaker* dengan kecepatan 100 rpm selama 3 jam. Larutan disaring menggunakan kertas Whatman No. 40. Filtrat yang diperoleh diuji kadar protein sisanya. Sedangkan endapan (xilanas amobil) diuji aktivitas enzim amobil.

3.4.11 Uji aktivitas xilanase amobil

Xilan 1% dipipet sebanyak 0,2 mL dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi, dipanaskan di dalam penangas air pada suhu 50 °C selama 15 menit. Kemudian ditambahkan 0,1 g xilanase amobil, 0,2 mL buffer asetat 0,2 M pH 5 dan 0,2 mL air bebas reduktor. Larutan diinkubasi di dalam penangas air pada suhu 50 °C selama 55 menit dan disaring menggunakan kertas saring. Selanjutnya ditambahkan dengan 0,4 mL reagen DNS dan dipanaskan kembali di dalam penangas air mendidih selama 5 menit. Larutan didinginkan menggunakan air mengalir, dimasukkan ke dalam labu takar 10 mL dan ditambahkan dengan akuades sampai tanda batas serta dikocok hingga homogen. Larutan diukur absorbansinya menggunakan Spektrometri Geneys pada panjang gelombang maksimum.

3.4.12 Uji kadar protein sisa

Filtrat hasil amobilisasi dipipet sebanyak 2 mL dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Kemudian ditambahkan dengan 8 mL reagen Biuret dan 2 mL larutan kasein 5000 µg/mL. Larutan dikocok dan diinkubasi di dalam penangas air pada suhu 50 °C selama 30 menit. Larutan diukur absorbansinya menggunakan Spektrometri Geneys pada panjang gelombang maksimum.

3.4.13 Penentuan pengaruh suhu terhadap kestabilan aktivitas xilanase amobil

Kestabilan aktivitas enzim dilakukan dengan menginkubasi xilanase amobil pada suhu yang berbeda, yaitu pada suhu 0 °C (*freezer*), 5 °C (*refrigerator*), 30 °C, dan 50 °C. Xilanase amobil sebanyak 1 g dimasukkan ke dalam botol sampel yang berbeda dan ditambahkan dengan buffer asetat 0,2 M pH 5 dan waktu inkubasi selama 7 hari. Uji aktivitas dilakukan setiap hari selama waktu inkubasi berdasarkan prosedur **3.4.11**.

3.4.14 Penentuan pengaruh pH terhadap kestabilan aktivitas xilanase amobil

Kestabilan aktivitas enzim dilakukan dengan menginkubasi xilanase amobil pada pH yang berbeda. Xilanase amobil sebanyak 1 g dimasukkan ke dalam botol sampel yang berbeda dan ditambahkan dengan buffer asetat pH 3, 4, 5 dan 6, kemudian diinkubasi pada suhu 50 °C selama 7 hari. Uji aktivitas dilakukan setiap hari selama waktu inkubasi berdasarkan prosedur **3.4.11**.

3.4.15 Penentuan aktivitas enzim sisa xilanase

Aktivitas enzim sisa xilanase ditentukan dengan cara mencari persentase hasil bagi aktivitas enzim setelah perlakuan dan sebelum perlakuan, yaitu sebagai berikut :

$$\% \text{ Aktivitas sisa} = \frac{\text{Aktivitas Enzim setelah Penyimpanan}}{\text{Aktivitas Enzim sebelum Penyimpanan}} \times 100\%$$

3.4.16 Analisis data

Data aktivitas enzim xilanase amobil dianalisis menggunakan suatu program SPSS 23 yang menggunakan uji ANOVA dua arah dan dilanjutkan dengan uji Beda Nyata Jujur (BNJ) 5%.