

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Biokimia Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya mulai Februari hingga Mei 2017.

3.2 Alat dan Bahan Penelitian

3.2.1 Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah seperangkat alat gelas, ayakan 150 mesh, pemanas listrik (*Janke-Kunkel*), laminar air flow, autoklaf (All American Model 20X), shaker (*Edmund Buhler SM 25 24B*), neraca analitik (*Mettler Toledo AL 204*), sentrifus dingin (*Hermle Labortechnik GmbH Siemensstr 25 Wehingen, Type Z326 K*), *Spectronic Geneys*, kuvet, inkubator (*Heraeus Type B 5042*), *magnetic stirrer (Ikamag)*, penangas air (*Memmert W 200*), jarum ose, pH meter (*Inolab WTW*), oven (*Memmert*), *refrigerator*, aluminium foil, kapas steril, dan bunsen.

3.2.2 Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini memiliki derajat kemurnian pro analisa (p.a), teknis, dan *for microbiology*. Bahan kimia yang digunakan dengan kualitas pro analisis (p.a) antara lain Na_2HPO_4 , $(\text{HOCH}_2)_3\text{CNH}_2$, KH_2PO_4 , CaCl_2 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, asam dinitrosalisilat (DNS), NaOH 10%, $\text{NaKC}_4\text{O}_6\text{H}_4$, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, asam asetat glasial, CH_3COONa , BaCl_2 0,1M, glukosa anhidrat, asam oleat, dan dextrose. Bahan kimia dengan kualitas teknis adalah HCl 37%. Bahan kimia yang digunakan dengan kualitas *for microbiology* antara lain urea, pepton, *bacto* agar, xilan, zeolit alam, dan kasein. Serta bahan lainnya adalah kentang, klobot jagung, dan akuades.

3.3 Tahapan Penelitian

1. Aktivasi zeolit
2. Karakterisasi Zeolit teraktivasi dan non-aktivasi dengan *X-ray Fluorescence* (XRF) dan *X-ray Diffraction* (XRD)
3. Pembuatan serbuk klobot jagung sebagai substrat xilan

4. Pembuatan media padat
5. Peremajaan biakan murni *Trichoderma viride*
6. Pembuatan media cair
7. Pembuatan inokulum
8. Produksi dan isolasi ekstrak kasar xilanase dari biakan *Trichoderma viride*.
9. Penentuan aktivitas xilanase
 - Penentuan panjang gelombang maksimum gula pereduksi
 - Pembuatan kurva baku gula pereduksi
 - Uji aktivitas xilanase
10. Penentuan kadar protein awal
 - Penentuan panjang gelombang maksimum dan kurva baku larutan kasein
 - Uji kadar protein awal
11. Amobilisasi xilanase pada matriks zeolit teraktivasi dan non-aktivasi
12. Uji aktivitas xilanase amobil matriks zeolit teraktivasi dan non-aktivasi
13. Uji kadar protein sisa
14. Penentuan efisiensi pemakaian ulang xilanase amobil teraktivasi
15. Analisis data

3.4 Prosedur Penelitian

3.4.1 Aktivasi Zeolit

Zeolit ditimbang sebanyak 4 g. Zeolit ditambahkan 10 mL larutan HCl 0,4 M, lalu dikocok dengan *shaker* pada temperatur ruang selama 4 jam dengan kecepatan 100 rpm. Endapan disaring menggunakan kertas Whatman No.40. Endapan dicuci dengan akuades sampai pH filtrat menyerupai pH aquades. Endapan dikeringkan di dalam oven pada temperatur 105⁰C sampai berat konstan, lalu dilakukan kalsinasi pada temperatur 500⁰C selama 4 jam.

3.4.2 Karakterisasi Zeolit

3.4.2.1 X-ray Fluorescence (XRF)

Karakterisasi dilakukan terhadap empat sampel zeolit yaitu zeolit teraktivasi, zeolit non-aktivasi, zeolit aktivasi tersisipi enzim dan zeolit non-aktivasi tersisipi enzim. Pengukuran data difraksi sinar-X dilakukan pada temperatur kamar. Selanjutnya dianalisis dengan metode Rietveld menggunakan program RIETAN. Pengambilan data dilakukan pada kondisi operasi : *Target* : Cu-K α , *Voltage* : 30 KV, *Current* : 30 mA, pada jangkauan (*range*) sudut $2\theta = 5^\circ$ sampai 50° dengan selang antara (*step width*) $0,05^\circ$ dan panjang gelombang yang digunakan $\lambda = 1,540562 \text{ \AA}$.

3.4.2.2 X-ray Diffraction (XRD)

Karakterisasi Untuk mengetahui tentang jenis mineral dan tingkat kristalinitas struktur penyusun sampel dilakukan dengan menggunakan alat difraktometer sinar-X. Sekitar 0,5 gram bubuk zeolit ditempatkan dalam tempat sempel dan dianalisis langsung dengan difraktometer sinar-X Shimadzu model XRD-6000 menggunakan radiasi Cu K α pada tegangan 40 kV, arus 30 mA.

3.4.3 Pembuatan *Inducer* Xilan (Serbuk Klobot Jagung)

Klobot jagung dipotong kecil-kecil, kemudian dicuci dan dikeringkan dalam oven pada temperatur 100°C . Klobot jagung dihaluskan dengan blender, lalu diayak menggunakan ayakan 150 mesh. Sehingga, diperoleh serbuk klobot jagung yang digunakan sebagai *inducer*.

3.4.4 Pembuatan Media Padat

Peremajaan kapang *Trichoderma viride* menggunakan media padat *Potatoes Dextrose Agar* (PDA). Tahapan pembuatan media padat PDA adalah sebanyak 20 gram kentang dikupas, dipotong kecil, lalu dicuci. Aquades ditambahkan ke dalam beaker glass 250 mL hingga menunjukkan volume 100 mL. Kentang dipanaskan hingga mendidih selama 1 jam. Jika selama pemanasan volume aquades berkurang, aquades ditambahkan hingga volumenya mencapai 100 mL. Selanjutnya, campuran disaring menggunakan kertas saring, kemudian diambil filtratnya. Filtrat yang diperoleh ditambahkan 2 gram dextrosa, 1 mL buffer asetat pH 5, dan 1,5 gram tepung agar.

Larutan PDA dipanaskan hingga mendidih sambil diaduk dengan *magnetic stirrer*, lalu dimasukkan ke dalam tabung reaksi sebanyak 4 mL. Tabung reaksi ditutup dengan kapas dan dilapisi kertas coklat. Larutan PDA disterilisasi dalam autoklaf selama 15 menit pada temperatur 121°C dengan tekanan 15 psi. Larutan PDA steril didinginkan pada temperatur ruang dengan posisi miring, sehingga diperoleh media padat PDA.

3.4.5 Peremajaan Biakan Murni *Trichoderma viride*

Peremajaan biakan murni *Trichoderma viride* dilakukan secara aseptis di dalam laminar air flow. Jarum ose dipanaskan pada nyala api hingga berwarna kemerahan. Tabung biakan murni *Trichoderma viride* dan tabung media padat dilewatkan pada nyala api bunsen. Spora *Trichoderma viride* diambil dari biakan murni, lalu dipindahkan ke dalam media padat dengan menggunakan jarum ose yang telah dingin dengan bentuk zig-zag agar biakan tumbuh merata. Tabung media padat ditutup dengan kapas steril dan kertas coklat, lalu diinkubasi selama 144 jam (6 hari) pada temperatur 30°C.

3.4.6 Pembuatan Media Cair

Pembuatan media cair diawali dengan penimbangan bahan-bahannya, bahan-bahan tersebut antara lain 0,25 g pepton; 0,1 g KH_2PO_4 ; 0,15 g CaCl_2 ; 0,7 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 0,15 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,4 g klobot jagung; 0,5 mL unsur renik; dan 0,1 mL asam oleat menggunakan neraca analitik. Semua bahan dimasukkan ke dalam gelas kimia 100 mL. Campuran ditambahkan aquades hingga 100 mL, lalu dikondisikan pada pH 5 dengan penambahan 1 mL buffer asetat pH 5. Media cair diaduk dan dipanaskan hingga mendidih, lalu ditutup dengan kapas yang dibungkus kain kasa steril dan kertas coklat. Selanjutnya, Media cair disterilisasi di dalam autoklaf selama 15 menit pada temperatur 121°C dan tekanan 15 psi.

3.4.7 Pembuatan Inokulum

Pembuatan inokulum dilakukan secara aseptis di dalam laminar air flow. Spora hasil biakan murni *Trichoderma viride* dibasahkan dengan 1 mL aquades steril, lalu dimasukkan ke dalam erlenmeyer 250 mL yang telah berisi 100 mL media cair steril. Selanjutnya, campuran

diinkubasi sampai mencapai pertengahan fase logaritma (jam ke-36) dengan menggunakan shaker.

3.4.8 Produksi dan Isolasi Xilanase

Sebanyak 65 mL media cair dimasukkan ke dalam erlenmeyer 250 mL. Campuran disterilisasi menggunakan autoklaf selama 15 menit pada temperatur 121°C, tekanan 15 psi. Sebanyak 10 mL inokulum ditambahkan secara aseptis di dalam laminar air flow. Campuran larutan diinkubasi selama 60 jam pada temperatur kamar dan dikocok menggunakan *shaker* pada kecepatan 100 rpm. Selanjutnya, ditambahkan 30 mL buffer asetat pH 5, lalu disentrifugasi dingin selama 30 menit dengan kecepatan 3000 rpm. Supernatan yang dihasilkan merupakan ekstrak kasar xilanase.

3.4.9 Penentuan Aktivitas Xilanase

3.4.9.1 Penentuan Panjang Gelombang Maksimum Gula Pereduksi

Larutan glukosa 300 µg/mL sebanyak 1 mL dimasukkan ke dalam tabung reaksi, lalu ditambahkan 1 mL buffer asetat pH 5 dan 2 mL reagen DNS. Campuran larutan dididihkan dalam penangas air selama 15 menit dan didinginkan pada temperatur ruang. Campuran larutan dimasukkan ke dalam labu takar 25 mL. Ditambahkan aquades hingga tanda batas, lalu dikocok sampai homogen. Absorbansi diukur pada kisaran panjang gelombang 480-550 nm. Larutan blanko yang digunakan adalah aquades.

3.4.9.2 Pembuatan Kurva Standar Gula Pereduksi

Glukosa anhidrat sebanyak 0,15 g dilarutkan dengan aquades di dalam gelas kimia 100 mL. Larutan dimasukkan ke dalam labu takar 100 mL. Aquades ditambahkan hingga tanda batas, lalu dikocok hingga homogen dan dihasilkan larutan stok glukosa 1500 µg/mL. Larutan stok glukosa 1500 µg/mL dipipet sebanyak (2; 4; 6; 6,8; dan 8) mL, lalu dimasukkan ke dalam 5 buah labu takar 100 mL berbeda. Aquades ditambahkan hingga tanda batas dan dikocok sampai homogen, sehingga dihasilkan larutan glukosa (300, 600, 900, 1000, dan 1200) µg/mL. Setiap variasi konsentrasi larutan glukosa dimasukkan sebanyak 1 mL ke dalam tabung reaksi yang berbeda. Ditambahkan 1 mL buffer asetat pH 5 dan 2 mL reagen DNS pada

masing-masing tabung reaksi. Semua larutan dididihkan dalam penangas air selama 15 menit dan didinginkan pada temperatur ruang. Masing-masing larutan dimasukkan ke dalam labu takar 25 mL yang berbeda, lalu diencerkan. Selanjutnya, absorbansi diukur pada panjang gelombang maksimum glukosa dengan menggunakan *Spectronic Genesys*. Kurva baku dibuat dengan memplotkan data konsentrasi glukosa (ppm) pada sumbu x dan absorbansi pada sumbu y.

3.4.9.3 Uji Aktivitas Xilanase

Substrat xilan 1% (b/v) sebanyak 1 mL dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Dipanaskan selama 15 menit dalam penangas air dengan temperatur 60°C. Ditambahkan 1 mL xilanase, 1 mL buffer asetat pH 5 dan 1 mL air bebas reduktor. Larutan hasil campuran tersebut diinkubasi selama 55 menit pada temperatur 60°C, lalu dididihkan dalam penangas air selama 15 menit. Sebanyak 2 mL reagen DNS ditambahkan ke tabung reaksi, lalu tabung reaksi dimasukkan ke dalam penangas air mendidih selama 5 menit. Selanjutnya, larutan didinginkan, lalu dimasukkan ke dalam labu takar 25 mL. Aquades ditambahkan sampai tanda batas dan dikocok hingga homogen. Selanjutnya, absorbansi diukur pada panjang gelombang maksimum gula pereduksi dengan menggunakan *Spectronic Genesys*.

Aktivitas xilanase dinyatakan dalam satuan $\mu\text{g/mL}$ menit. Satu unit aktivitas enzim bebas dinyatakan sebagai 1 μg xilosa yang dihasilkan dalam 1 menit dan 1 mL enzim. Pengukuran aktivitas enzim dilakukan dengan analisis kadar gula pereduksi, yaitu dengan cara mengonversikan nilai absorbansi yang hasil pengamatan pada persamaan kurva baku sehingga dapat diketahui konsentrasi gula pereduksi yang diperoleh dari hasil hidrolisis xilan yang dikatalis dengan xilanase. Besarnya satu unit aktivitas enzim tersebut dapat dihitung dengan rumus pada **Persamaan (3.1)**:

$$AE = \frac{x \cdot V \cdot f_p}{p \cdot q} \times \frac{Mr. \text{ Xilosa}}{Mr. \text{ Glukosa}} \quad (3.1)$$

Keterangan:

- AE = aktivitas enzim ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ menit $^{-1}$)
- x = konsentrasi gula pereduksi ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)
- V = volume total sampel percobaan pada tiap tabung (mL)

p	= volume ekstrak xilanase (mL)/ jumlah enzim amobilisasi (g)/ kadar protein (mg/mL)
q	= waktu reaksi (menit)
fp	= faktor pengencer
Mr glukosa	= 180,16 g/mol
Mr xilosa	= 150,13 g/mol

3.4.10 Penentuan Kadar Protein Awal

3.4.10.1 Penentuan Panjang Gelombang Maksimum dan Kurva Baku Larutan Kasein

Sebanyak 1 gram kasein dilarutkan dengan 50 mL aquades di dalam gelas kimia 250 mL. Larutan diaduk dengan *magnetic stirrer*, lalu ditambahkan beberapa tetes larutan NaOH 0,1 M hingga larut. Larutan kasein diencerkan ke dalam labu takar 100 mL sehingga diperoleh larutan stok kasein 10000 ppm. Masing-masing (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, dan 9) mL larutan stok kasein 10000 ppm dipipet, lalu dimasukkan ke dalam 9 labu takar 10 mL berbeda. Selanjutnya, larutan diencerkan kembali sehingga diperoleh larutan kasein dengan konsentrasi (1000, 2000, 3000, 4000, 5000, 6000, 7000, 8000, dan 9000) ppm.

Sebanyak 2 mL larutan kasein dari masing-masing konsentrasi (1000, 2000, 3000, 4000, 5000, 6000, 7000, 8000, dan 9000) ppm dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang berbeda. Sebanyak 8 mL reagen Biuret dan 2 mL buffer asetat pH 5 ditambahkan ke dalam masing-masing tabung reaksi. Larutan campuran tersebut dikocok dan diinkubasi selama 30 menit pada temperatur 50°C. Panjang gelombang maksimum ditentukan terlebih dahulu pada konsentrasi larutan kasein 5000 ppm dengan menggunakan *Spectronic Geneys* dengan rentang panjang gelombang 460-640 nm. Berdasarkan panjang gelombang maksimum, dapat dilakukan pengukuran absorbansi pada larutan standar. Hasil pengukuran absorbansi larutan standar dengan variasi konsentrasi tersebut dapat dibuat persamaan regresi linear yang menghasilkan kurva baku kasein. Larutan blanko dibuat dengan memipet 2 mL aquades dan selanjutnya diperlakukan sama seperti perlakuan sebelumnya.

3.4.10.2 Uji Kadar Protein Awal

Uji kadar protein awal dilakukan dengan menggunakan reagen Biuret. Sebanyak 2 mL larutan xilanase dimasukkan ke dalam tabung reaksi, lalu ditambahkan 8 mL reagen Biuret dan 2 mL larutan kasein 5000 ppm. Campuran larutan dikocok dan diinkubasi selama 30 menit di dalam penangas air pada temperatur 50°C. Selanjutnya, absorbansi diukur pada panjang gelombang maksimum kasein. Kadar protein dapat diperoleh dengan memplotkan nilai absorbansi pada persamaan regresi kurva baku kasein. Larutan blanko dibuat dengan memipet 2 mL aquades dan selanjutnya diperlakukan sama seperti perlakuan sebelumnya.

3.4.11 Amobilisasi Xilanase

Sebanyak 4,5 mL xilanase dimasukkan ke dalam erlenmeyer 25 mL. Ditambahkan buffer asetat pH 5 sampai volume menjadi 5 mL dan zeolit sebanyak 0,1 gram. Selanjutnya, campuran dikocok menggunakan shaker selama 3 jam dengan kecepatan 100 rpm. Selanjutnya, campuran disaring menggunakan kertas Whatman No. 40. Dilakukan uji kadar protein sisa pada filtrat dan diuji aktivitas pada endapan. Perlakuan ini dilakukan masing-masing pada zeolit teraktivasi dan non-aktivasi.

3.4.12 Uji Aktivitas Xilanase Hasil Amobilisasi

Penentuan aktivitas xilanase amobil dilakukan dengan memasukkan 0,2 mL substrat xilan 1%; 0,2 mL larutan buffer asetat 0,2 M pH 5; 0,1 g xilanase amobil, dan 0,2 mL air bebas reduktor ke dalam tabung reaksi sehingga bercampur. Selanjutnya proses dilakukan seperti pada **Prosedur 3.4.9.3**

3.4.13 Uji Kadar Protein Sisa

Sebanyak 2 mL filtrat hasil penyaringan dari proses amobilisasi dimasukkan dalam tabung reaksi, kemudian dilanjutkan seperti proses pada **Prosedur 3.4.10.2**.

3.4.14 Penentuan Efisiensi Penggunaan Ulang Xilanase Amobil

Penentuan efisiensi penggunaan xilanase amobil dilakukan sesuai kondisi optimumnya. Xilanase hasil amobilisasi dimasukkan ke dalam larutan uji yang berisi substrat xilan 0,2 mL yang dipanaskan pada temperatur 60°C, larutan buffer asetat 0,2 M pH 5 0,2 mL, dan

air bebas reduktor 0,2 mL. Endapan dan filtrat dipisahkan dengan cara penyaringan, lalu dicuci dengan larutan buffer asetat pH 5 sebanyak 1,5 mL. Selanjutnya, endapan dimasukkan ke dalam larutan uji berikutnya pada kondisi yang sama. Perlakuan ini diulang sebanyak 5 kali. Filtrat yang diperoleh pada setiap uji dididihkan dalam penangas air selama 15 menit, lalu ditambahkan 0,4 mL reagen DNS. Dididihkan kembali selama 5 menit. Selanjutnya larutan didinginkan pada temperatur ruang.. Aktivitas enzim ditentukan pada setiap pengujian dengan mengukur nilai absorbansinya pada panjang gelombang maksimum gula pereduksi. Xilanase amobil masih efisien digunakan jika memiliki aktivitas diatas 50 %.

3.4.15 Analisa Data

Analisa data hasil penelitian dirangkum dalam **Tabel 3.1**.

Tabel 3.1 Analisis Data

No	Metode	Data yang didapat	Analisis
1.	Pengujian Aktivitas Amobil	Absorbansi	Aktivitas (Uji <i>t two-tail</i>)
2.	Pengujian Efisiensi Pemakaian Ulang	Absorbansi	Aktivitas dan % efisiensi (Uji <i>t two-tail</i>)
3.	Karakterisasi	XRF % komponen	% komponen
		XRD Difraktogram	Spektra Difraktogram