

BAB III METODE PENELITIAN

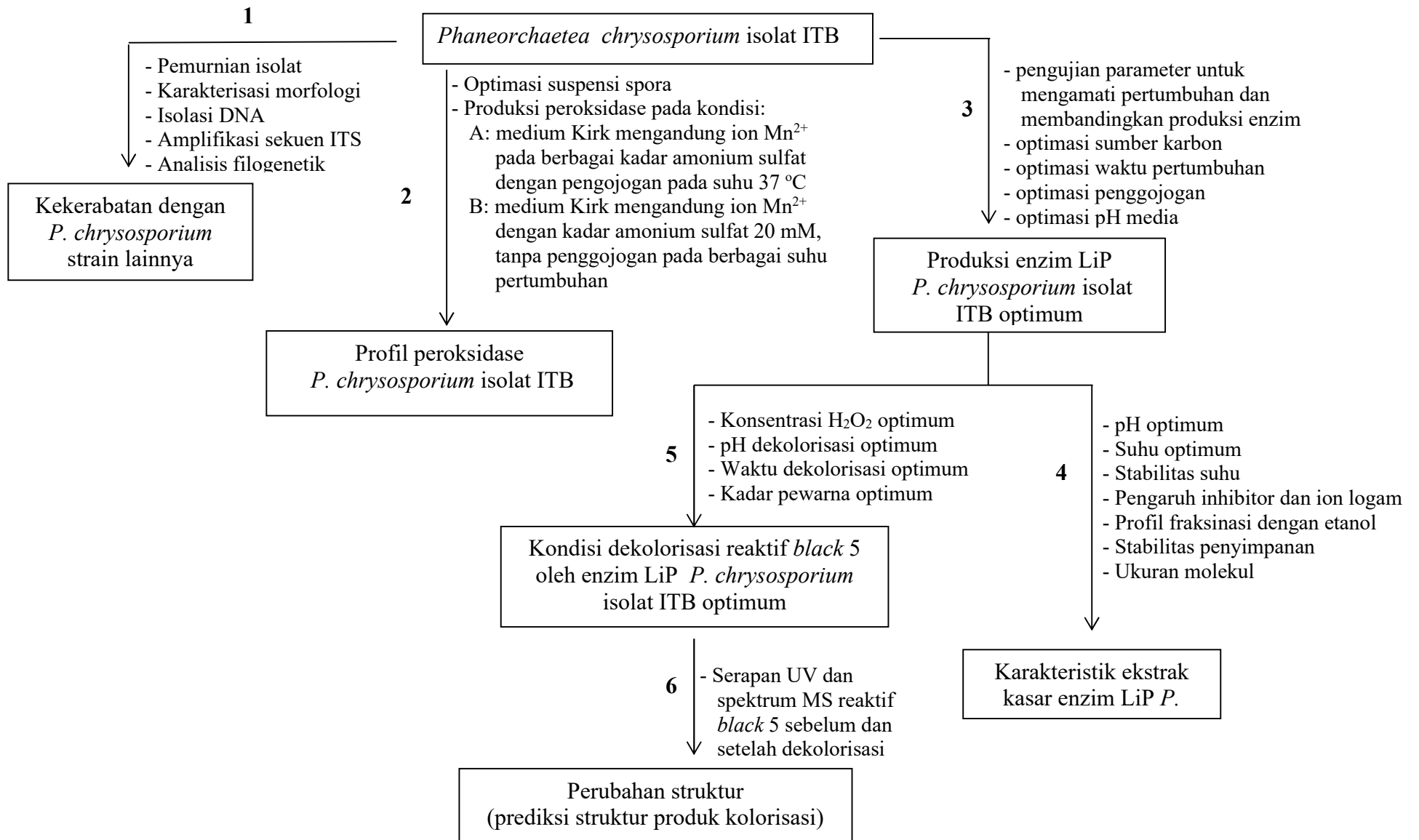
3.1 Rancangan Penelitian

3.1.1 Kerangka operasional penelitian

Tahapan penelitian yang dilakukan untuk menjawab rumusan masalah yang diajukan yaitu: (1) identifikasi *P. chrysosporium* isolat ITB, (2) penentuan profil peroksidase *P. chrysosporium* isolat ITB, (3) optimasi produksi lignin peroksidase (LiP) *P. chrysosporium* isolat ITB, (4) karakterisasi ekstrak kasar enzim LiP *P. chrysosporium* isolat ITB, (5) penentuan kondisi optimum dekolorisasi reaktif *black 5* oleh enzim LiP *P. chrysosporium* isolat ITB, (6) Identifikasi perubahan struktur reaktif *black 5* sebelum dan setelah dekolorisasi oleh enzim LiP *P. chrysosporium* isolat ITB, dan (7) Identifikasi perubahan toksisitas reaktif *black 5* sebelum dan setelah dekolorisasi oleh enzim LiP *P. chrysosporium* isolat ITB. Bagan kerangka operasional disajikan pada Gambar 14. Pembuatan media dan reagen yang digunakan dalam penelitian di Lampiran 1. Langkah kerja dan analisis data masing-masing tahap penelitian dijelaskan terperinci pada subbab 3.2 hingga 3.8

3.1.2 Waktu dan tempat penelitian

Penelitian disertasi ini dilaksanakan mulai Maret 2013 sampai dengan Oktober 2016. Penelitian dilakukan di beberapa Laboratorium. Isolat kapang dikultur di Laboratorium Mikrobiologi Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam (FMIPA) Universitas Brawijaya (UB), Malang. Isolasi genom DNA dan amplifikasi daerah *internal transcribe spacer* (ITS) kapang untuk identifikasi strain kapang dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi dan Laboratorium Biologi Molekuler dan Seluler Jurusan Biologi FMIPA UB. Amplikon DNA daerah ITS disekuensing di Macrogen, Korea. Optimasi produksi, isolasi, pemurnian, karakterisasi Enzim LiP dan optimasi degradasi pewarna tekstil dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Jurusan Biologi FMIPA UB dan Laboratorium Biokimia Jurusan Kimia FMIPA UB. Aktivitas enzim LiP dan aktivitas degradasi secara enzimatis menggunakan spektrofotometer sinar tampak diuji di Laboratorium Mikrobiologi Jurusan Biologi FMIPA UB dan penentuan prediksi struktur kimia produk degradasi reaktif *black 5* menggunakan LC-MS di Laboratorium Teknik Kimia Politeknik Jember.



Gambar 14. Kerangka operasional penelitian

3.2 Identifikasi *P. chryso sporium* Isolat ITB

Identitas isolat kapang *P. chryso sporium* yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi ITB Bandung perlu diklarifikasi untuk memastikan kejelasan spesies kapang yang digunakan. Spesies kapang tidak dapat hanya diidentifikasi berdasarkan morfologi umum yang dimiliki karena karakter morfologi *P. chryso sporium* hampir sama dengan spesies lain dari Genus *Phanerochaetea* yaitu *Phanerochaetea sordida*. Spesies kapang diidentifikasi dengan akurat menggunakan pendekatan filogenetik berdasarkan urutan basa gen-gen RNA ribosom (rRNA) pada daerah ITS. Daerah ITS merupakan daerah-daerah variabel pada DNA kapang, adanya perubahan atau mutasi di daerah ini dapat berbeda dan bervariasi di antara satu spesies dengan spesies lain. Daerah rDNA tersebut dapat digunakan untuk membedakan spesies serta menyusun filogeni kapang.

3.2.1 Pemurnian dan karakterisasi morfologi *P. chryso sporium* isolat ITB

Biakan *P. chryso sporium* dimurnikan dengan teknik monospora (Suharjono dkk., 2010). Isolat dari biakan awal diinokulasikan ke media *Potato Dextrose Agar* (PDA) dalam Cawan Petri secara goresan, ditumbuhkan pada suhu 30 °C, diamati spora yang berkecambah antara jam ke sepuluh hingga delapan belas menggunakan mikroskop stereo. Satu spora yang tumbuh dicuplik dan diinokulasikan ke dalam media PDA miring dalam tabung reaksi, diinkubasi 30 °C selama tujuh hari, kemudian disimpan sebagai kultur stok (biakan murni).

Biakan murni hasil monospora digunakan untuk pengamatan morfologi makroskopis dan mikroskopis *P. chryso sporium* isolat ITB dan untuk tahap penelitian selanjutnya. Karakter makroskopis kultur *P. chryso sporium* isolat ITB diamati pada media PDA, sedangkan karakter mikroskopis dianalisa dengan pembuatan preparat yang diwarnai dengan *Lactophenol Cotton Blue* (LCB). Karakter kultur *P. chryso sporium* isolat ITB yang diamati meliputi kecepatan pertumbuhan memenuhi Cawan Petri berisi media PDA, bentuk miselium, struktur dan pigmentasi koloni. Karakter struktur mikroskopis *P. chryso sporium* isolat ITB yang diamati meliputi bentuk hifa, sporangium, sporangiofor dan khlamidiosfor.

3.2.2 Isolasi DNA kapang

Biakan murni *P. chryso sporium* disubkultur pada agar miring PDA, diinkubasi 30 °C selama tujuh hari. Isolat kapang dicuplik dan diinokulasikan pada 25 mililiter *Potato Dextrose Broth* (PDB) kemudian diinkubasikan pada suhu 37 °C dengan kecepatan penggojogan 120 rpm. Kromosomal DNA diisolasi dari massa miselium kapang setelah diinkubasi selama tiga hari.

Proses ekstraksi DNA kapang merujuk metode Doyle & Doyle (1990) dengan beberapa modifikasi. Massa miselium dilisis dengan cara digerus menggunakan

polietilenglikol (PEG) 600. Sebanyak dua mililiter bufer ekstraksi dan 20 mikroliter β -merkaptotanol ditambahkan pada sampel. Homogenat yang diperoleh dimasukkan pada *microtube* dan diinkubasi pada *waterbath* dengan suhu 65 °C selama satu jam. Homogenat yang telah diinkubasi langsung ditambah PCI (phenol:kloroform:isoamilalkohol) sebanyak 500 mikroliter. Supernatan dihomogenkan dengan vorteks dan disentrifugasi pada empat derajat Celsius dengan kecepatan 13000 rpm selama lima menit. Supernatan dipindahkan pada *microtube* baru dan ditambah CI (kloroform:isoamil alkohol) sebanyak 500 mikroliter. Supernatan dihomogenkan dengan vorteks dan disentrifugasi pada suhu empat derajat Celsius dengan kecepatan 13000 rpm selama lima menit. Supernatan dipindahkan pada *microtube* baru, ditambah ammonium asetat 7,5 M sebanyak 0,1 kali volume dan etanol absolut sebanyak 2,5 kali volume. Sampel diinkubasikan pada suhu -20 °C selama 12 jam. Sampel disentrifugasi kembali pada suhu empat derajat Celsius dengan kecepatan 13000 rpm selama 15 menit. Pelet yang diperoleh ditambah etanol p.a. 70 % sebanyak 500 mikroliter, dicampur hingga merata, dan disentrifugasi kembali pada suhu empat derajat Celsius dengan kecepatan 13000 rpm selama sepuluh menit. Pelet dikeringkan dalam inkubator pada suhu 55 °C. Pelet yang telah kering ditambahkan bufer TE sebanyak 20 mikroliter dan disimpan pada suhu -20 °C. Sampel DNA yang diperoleh diuji secara kualitatif (elektroforesis) dan kuantitatif (spektrofotometri) sebelum digunakan untuk amplifikasi sekuen ITS.

3.2.3 Amplifikasi sekuen ITS dan konstruksi pohon filogeni

Daerah ITS (*Internal Transcribed Spacer*) diamplifikasi menggunakan primer ITS5 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3') sebagai primer *forward* dan primer ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') sebagai primer *reverse* (Lestari dkk., 2013). Komposisi senyawa yang digunakan untuk amplifikasi terdapat pada Tabel 1. Komposisi senyawa tersebut dihomogenasi dan dimasukkan ke dalam mesin PCR (*Polimerase Chain Reaction*) dengan program yang ditunjukkan pada Tabel 2.

Hasil amplifikasi divisualisasikan dengan elektroforesis pada gel agarosa 2 %. Prosedur elektroforesis merujuk Lestari (2013), meliputi pembuatan gel agarosa dengan cara memasukkan 0,3 g agarosa ke dalam Erlenmeyer yang berisi 15 mililiter bufer *Tris Boric EDTA* (TBE). Campuran tersebut dilarutkan dalam *microwave* suhu 80 °C kemudian didinginkan sampai dengan suhu 40-50 °C. Pewarna Etidiumbromida sebanyak 0,5 mikroliter ditambahkan ke dalam gel agarosa. Campuran dituang dalam cetakan gel dan dibiarkan hingga beku. Hasil cetakan dimasukkan ke dalam *chamber* elektroforesis dan seluruh bagian gel direndam dengan buffer TBE. Marker DNA *ladder* 100 mikroliter dan sampel DNA yang mengandung *loading dye* sebanyak tiga mikroliter dimasukkan ke

dalam sumur pada gel. Sampel DNA dielektroforesis pada tegangan 100 V selama 30 menit. Hasil elektroforesis didokumentasikan dengan UV transluminator. Hasil amplifikasi dikirim ke Macrogen, Korea untuk proses sekuensing DNA.

Tabel 1. Komposisi senyawa untuk amplifikasi sekuen ITS

No.	Larutan	Volume (µl)	Konsentrasi
1	ddH ₂ O	4	
2	PCR <i>mix</i> (PROMEGA)	10	
3	Primer <i>Forward</i> (ITS5)	2	30 pmol
4	Primer <i>Reverse</i> (ITS4)	2	30 pmol
5	DNA <i>template</i>	2	<1 µg
Total		20	

(Lestari dkk., 2013)

Tabel 2. Kondisi reaksi untuk amplifikasi sekuen ITS

No.	Reaksi	Suhu (°C)	Waktu (menit)
1	Denaturasi awal	95	3
2	30 siklus : <i>Denaturasi</i> <i>Annealing</i> <i>Ekstensi</i>	94	0,5
		55	0,3
		71	1
3	Ekstensi akhir	72	7

(Lestari dkk., 2013)

Pembuatan pohon filogeni merujuk Suharjono dkk. (2010) dan Lestari dkk.(2013). Data sekuen kapang *Phanerocahete chrysosporium* bersama beberapa sekuen spesies acuan yang diperoleh dari bank data atau *Gen Bank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) didownload dalam format FASTA. Sekuen-sekuen dianalisis menggunakan program MEGA 5.03. Sekuen *dialignment* menggunakan program ClustalW. Pohon filogeni dikonstruksi menggunakan *Phylogeny* yang terdapat di MEGA 5.03 dengan *bootstrap* 1000, diinferensi menggunakan metode *Maximum Likelihood* dan jarak evolusi dianalisis menurut model *Tamura-Nei* menggunakan program *Phydit*. Hasil dari analisis keanekaragaman spesies secara filogenetik tersebut adalah pohon filogeni yang menunjukkan hubungan kekerabatan berdasarkan garis keturunan dan jarak evolusi antarspesies, serta matriks similaritas berdasarkan persentase jumlah nukleotida yang sama dan berbeda antarspesies.

3.3 Optimasi Preparasi Inokulum Spora *P. chrysosporium* Isolat ITB

Biakan murni monospora *P. chrysosporium* disubkultur ke agar miring PDA pada suhu 30 °C dengan variasi waktu inkubasi 1, 2, 3 dan 4 minggu. Preparasi inokulum spora merujuk Ntwampe dkk. (2010) dan Li dkk. (2011) dengan beberapa modifikasi. Spora

dalam satu tabung agar miring diekstrak menggunakan empat mililiter larutan Tween-80 0,02 % steril dengan bantuan jarum ose, dibiarkan selama lima menit, ditampung dalam wadah steril, divorteks selama 10 menit, dibiarkan selama 30 menit, kemudian disaring menggunakan *glasswool* steril. Jumlah spora dalam suspensi dihitung dengan hemositometer, dan viabilitasnya ditentukan dengan metode *Total Plate Count* (TPC). Inokulum spora optimum jika jumlah spora dan nilai viabilitasnya tinggi (nilai viabilitas lebih dari 90 %).

3.4 Karakterisasi Profil Peroksidase *P. chrysosporium* Isolat ITB

Inokulum spora ditumbuhkan dalam media produksi untuk menghasilkan mangan peroksidase (MnP) dan lignin peroksidase (LiP) merujuk penelitian Kirk dkk. (1978), Dey dkk. (1991) dan Xiaoyan dkk. (2007) dengan beberapa modifikasi. Komposisi media produksi terdiri dari: medium Basal 1 X; glukosa 10 %; *trace element solution* 1 X; tiamine-HCl 0,01 %; veratril alkohol 0,3 g/L; Mn^{2+} 10 mg/L; bufer asetat pH 4,5 0,2 M dan ammonium sulfat (0, 10, 20, 30, 40 dan 50 mM) sebagai sumber nitrogen. Komposisi medium basal 100 X per Liter mengandung: 20 g KH_2PO_4 ; 5 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ dan 1 g $CaCl_2$. *Trace element solution* 5 X per L mengandung: 15 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; 5 g NaCl; 0,5 g $FeSO_4 \cdot 7H_2O$; 0,5 g $CoCl_2$; 0,5 g $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$; 0,5 g $CuSO_4 \cdot 5H_2O$; 50 mg $AlK(SO_4)_2 \cdot 12H_2O$ dan 5 g nitriloasetat. Formula medium produksi tersebut lebih spesifik untuk memproduksi MnP karena mengandung ion Mn^{2+} .

Profil peroksidase *P. chrysosporium* Isolat ITB dilakukan melalui dua percobaan. Pada percobaan pertama, enzim peroksidase diproduksi dengan menginokulasikan suspensi spora masing-masing dalam Erlenmeyer 100 mililiter yang berisi 20 mililiter media produksi (medium Kirk yang mengandung ion Mn^{2+}) dengan berbagai kadar amonium sulfat (0, 10, 20, 30 dan 40 mM) hingga mencapai densitas spora awal sekitar 1×10^6 spora per mililiter, diinkubasi pada 30 °C dan kecepatan pengojogan 100 rpm. Ekstrak kasar enzim diisolasi pada hari ke-2, 4, 6, 8 dan 10, dengan cara media pertumbuhan disentrifugasi 10.000 rpm pada suhu 4 °C selama 10 menit. Filtrat yang diperoleh merupakan ekstrak kasar enzim diukur aktivitas Enzim MnP dan Enzim LiP. Pada percobaan kedua, enzim peroksidase diproduksi dengan beberapa modifikasi dari percobaan pertama yaitu: diproduksi dalam medium produksi (medium Kirk yang mengandung ion Mn^{2+}) dengan amonium sulfat sebesar 20 mM, tanpa pengojogan selama empat hari pada berbagai variasi suhu. Percobaan kedua dilakukan tiga kali pengulangan.

Aktivitas enzim MnP ditentukan merujuk Bholay dkk. (2012) berdasarkan kemampuannya mengoksidasi fenol *red* secara tidak langsung. Reduksi fenol *red* diamati pada panjang gelombang 610 nm. Campuran reaksi dibuat dengan komposisi 250

mikroliter Na-suksinat 200 mM, 250 mikroliter asam laktat 200 mM, 100 mikroliter MnSO₄ 1 mM, 100 mikroliter fenol *red* 1 mM, 100 mikroliter albumin 1 % dan 50 mililiter aquaDM (Campuran A), ditambah 100 mikroliter ekstrak kasar enzim dan 50 mikroliter H₂O₂ 5 mM. Masing-masing diinkubasi selama 0 dan 5 menit. Reaksi dihentikan dengan penambahan 50 mikroliter NaOH 4 M. Absorbansi larutan pada 610 nm diukur pada menit ke-0 dan ke-5. Campuran B sebagai kontrol mengandung komposisi yang sama tetapi tidak ditambahkan H₂O₂ 5 mM, melainkan 100 mikroliter akuades. Aktivitas Enzim MnP dihitung berdasarkan selisih aktivitas A dan B. Satu unit Enzim MnP sebanding dengan 1 μmol produk yang terbentuk per menit pada kondisi percobaan. Aktivitas enzim MnP pada percobaan ini dihitung menggunakan rumus 8.

$$\text{Aktivitas Enzim MnP (U/mL)} = \frac{(A_0 - A_t) \times V_{\text{total}}(\text{mL}) \cdot 10^6}{\epsilon_{\text{maks}} \times d \times V_{\text{enzim}}(\text{mL}) \times t} \dots\dots\dots(8)$$

- ϵ_{maks} = koefisien ekstensi molar fenol *red* (22.000 M⁻¹cm⁻¹)
- d = tebal kuvet (cm)
- V_{total} = 1 mL
- V_{enzim} = 0,1 mL
- t = 5 menit

Aktivitas enzim LiP ditentukan berdasarkan kemampuan enzim LiP mengoksidasi veratril alkohol menjadi veratril aldehid merujuk Tien & Kirk (1988). Veratril alkohol tidak menyerap pada 310 nm sedangkan veratril aldehida menyerap dengan nilai koefisien ekstensi molar sebesar 9300 M⁻¹ cm⁻¹. Veratril alkohol 10 mM sebanyak 800 mikroliter, 1000 μL asam tatarat 0,2 M dan 1780 μL aquaDM dalam tabung reaksi, ditambah 100 μL larutan enzim. Absorbansi diukur pada panjang gelombang 310 nm pada menit ke-0 dan ke-5 (X), kemudian ditambah 320 μL H₂O₂ 5 mM, diukur pada panjang gelombang 310 nm pada menit ke-0 dan ke-5 (Y). Aktivitas Enzim LiP dihitung berdasarkan selisih aktivitas Y terhadap X. Satu unit aktivitas Enzim LiP sebanding dengan 1 μmol produk yang dihasilkan per menit pada kondisi percobaan. Aktivitas enzim LiP pada percobaan ini dihitung menggunakan rumus 9.

$$\text{Aktivitas enzim Enzim LiP (U/mL)} = \frac{(A_t - A_0) \times V_{\text{total}}(\text{mL}) \cdot 10^6}{\epsilon_{\text{maks}} \times d \times V_{\text{enzim}}(\text{mL}) \times t} \dots\dots\dots(9)$$

- ϵ_{maks} = koefisien ekstensi molar veratril aldehida (9300 M⁻¹cm⁻¹)
- d = tebal kuvet (cm)
- V_{total} = 4 mL
- V_{enzim} = 0,1 mL
- t = 5 menit

3.5 Optimasi Produksi Enzim Lignin Peroksidase (LiP) *P. chrysosporium* Isolat ITB

3.5.1 Penentuan parameter pertumbuhan dan parameter untuk menentukan kondisi optimum produksi LiP.

Tujuan percobaan ini menentukan parameter pertumbuhan dan parameter untuk menentukan kondisi optimum produksi enzim LiP dengan cara mengamati kurva pertumbuhan *P. chrysosporium* isolat ITB dalam sumber karbon glukosa berdasarkan berat kering, kadar protein ekstraselular, aktivitas LiP dan aktivitas spesifik LiP. Percobaan merujuk subbab 3.5 yaitu inokulum spora ditambahkan masing-masing dalam Erlenmeyer 100 mililiter yang berisi 20 mililiter media produksi (medium Kirk) hingga mencapai densitas spora awal sekitar 1×10^6 spora per mililiter, diinkubasi pada 30 °C dan kecepatan pengojogan 100 rpm. Pada hari ke-0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 dan 9 dilakukan pengukuran berat kering miselium kapang, kadar protein ekstraselular, aktivitas enzim LiP dan aktivitas spesifik LiP. Penentuan berat kering miselium kapang dijelaskan di subbab 3.5.2. Penentuan aktivitas LiP dijelaskan di subbab 3.5.3. Penentuan kadar protein dijelaskan di subbab 3.5.4. Penentuan aktivitas spesifik LiP dijelaskan di subbab 3.5.5. Keseluruhan percobaan dilakukan pengulangan tiga kali.

3.5.2 Penentuan berat kering miselium kapang

Ekstrak kasar enzim diisolasi dengan cara media pertumbuhan disentrifugasi 10.000 rpm selama 10 menit pada suhu 4 derajat Celcius. Filtrat yang diperoleh merupakan ekstrak kasar enzim. Pelet merupakan miselium kapang. Berat kering miselium kapang ditentukan dengan cara dikeringkan dalam oven pada suhu 105 °C hingga berat konstan.

3.5.3 Penentuan aktivitas Enzim LiP

Aktivitas enzim LiP pada percobaan ini dilakukan dengan metode yang dimodifikasi merujuk Tien & Kirk (1988) dan Coconi-Linares dkk. (2014) sebagai berikut: sebanyak 800 µL veratril alkohol 10 mM, 1000 µL asam ttrat 0,2 M dan 1680 µL aquaDM dalam tabung reaksi, ditambah 200 µL larutan enzim. Campuran diinkubasi selama dua menit, kemudian reaksi diinisiasi dengan penambahan 320 µL H₂O₂ 5 mM. Absorbansi diukur pada panjang gelombang 310 nm pada menit ke-0 dan ke-1. Aktivitas enzim LiP pada percobaan ini dihitung menggunakan rumus 10.

$$\text{Aktivitas enzim LiP (U/mL)} = \frac{(A_t - A_0) \times V_{\text{total}}(\text{mL}) \cdot 10^6}{\epsilon_{\text{maks}} \times d \times V_{\text{enzim}}(\text{mL}) \times t} \dots\dots\dots(10)$$

- ϵ_{maks} = koefisien ekstensi molar veratril aldehida ($9300 \text{ M}^{-1} \text{cm}^{-1}$)
- d = tebal kuvet (1 cm)
- V_{total} = 4 mL
- V_{enzim} = 0,2 mL
- t = 1 menit

3.5.4 Penentuan kadar protein

Kadar protein ditentukan merujuk Bolag (1996), sebanyak 0,5 mL sampel dan masing-masing 0,5 mL larutan protein standar yang mengandung 0 (blanko), 25, 50, 75, dan 100 µg/mL protein *bovine* serum albumin, ditambahkan 2,5 mL Reagen Biuret (C), diaduk homogen. Campuran diinkubasi pada suhu ruang selama 10 menit. Selanjutnya ditambahkan 0,25 mL Reagen Folin Ciocalteu (D) dan diinkubasi pada suhu ruang selama 20 menit. Nilai absorbansi larutan diukur pada panjang gelombang 750 nm.

Kadar protein dalam larutan sampel ditentukan dengan cara menginterpolasikan nilai absorbansi yang diperoleh ke kurva standar protein. Kurva standar protein adalah kurva hubungan antara absorbansi dengan konsentrasi protein.

3.5.5 Penentuan aktivitas spesifik enzim LiP

Aktivitas spesifik enzim LiP adalah total aktivitas enzim LiP per miligram protein (U/mg), ditentukan menurut rumus 11 dan 12.

$$\text{Aktivitas spesifik Enzim LiP} = \frac{\text{Total aktivitas enzim(U)}}{\text{Total protein(mg)}} \dots\dots\dots(11)$$

$$= \frac{\text{Aktivitas enzim} \left(\frac{\text{U}}{\text{mL}}\right) \times \text{volume (mL)}}{\text{Kadar protein} \left(\frac{\text{ug}}{\text{mL}}\right) \times \text{volume(mL)} \times 10^{-3} \left(\frac{\text{mg}}{\text{ug}}\right)} \dots\dots\dots(12)$$

3.5.6 Optimasi sumber karbon

Percobaan dilakukan dengan desain percobaan optimasi satu variabel bebas menggunakan rancangan acak lengkap untuk mengetahui pengaruh variabel bebas terhadap aktivitas Enzim LiP yang dihasilkan. Cara kerja merujuk subbab 3.6.1 tetapi densitas suspensi spora yang digunakan sebesar 5.10^5 spora/mL. Variasi sumber karbon yaitu glukosa, serbuk kayu, ampas tebu dan sekam. Kadar protein dan aktivitas spesifik LiP masing-masing sumber karbon ditentukan pada hari ke-4, 5 dan 6. Masing-masing dilakukan tiga kali pengulangan. Hasil dianalisis dengan uji ANOVA menggunakan program *Windows SPSS v. 16.0*.

Pertumbuhan hifa pada media pertumbuhan hari ke-5 dengan sumber karbon glukosa dan serbuk kayu diamati secara mikroskopis dengan mikroskop cahaya dan mikroskop elektron (*Scanning Electronic Microscopy*, SEM). Profil proteinnya juga diamati dengan menggunakan SDS-PAGE seperti yang dijelaskan pada subbab 3.6.7.

3.5.7 Optimasi waktu pertumbuhan

Optimasi waktu pertumbuhan bertujuan mengetahui waktu produksi LiP optimum. Cara kerja merujuk 3.5.6, menggunakan media produksi dengan sumber karbon optimum. Kadar protein dan aktivitas spesifik LiP diamati pada hari ke-0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, dan 8. Hasil dianalisis dengan uji ANOVA menggunakan program *Windows SPSS v. 16.0*.

3.5.8 Optimasi suhu pertumbuhan

Optimasi suhu dilakukan untuk mengetahui suhu optimum dalam menghasilkan LiP, cara kerja merujuk kondisi pada subbab 3.5.6, menggunakan kondisi optimum yang dihasilkan subbab 3.5.7. Variasi suhu pertumbuhan yang diamati adalah 30, 37, 45, 50 dan 60 derajat Celcius. Hasil dianalisis dengan uji ANOVA menggunakan program *Windows SPSS v. 16.0*.

3.5.9 Optimasi kecepatan penggojogan

Optimasi kecepatan penggojogan dilakukan untuk mengetahui kecepatan penggojogan optimum dalam menghasilkan LiP, cara kerja merujuk kondisi pada subbab 3.5.6, menggunakan kondisi optimum yang dihasilkan subbab 3.5.8. Variasi kecepatan penggojogan yang diamati adalah 0, 50 dan 100 rpm. Hasil dianalisis dengan uji ANOVA menggunakan program *Windows SPSS v. 16.0*.

3.5.10 Optimasi pH medium produksi

Optimasi pH medium produksi dilakukan untuk mengetahui pH medium optimum dalam menghasilkan LiP, cara kerja merujuk kondisi pada subbab 3.5.6, menggunakan kondisi optimum yang dihasilkan subbab 3.5.9. Percobaan diamati pada medium dengan tanpa pengaturan pH, diatur pH 3,3; 4,5 dan 5,5. Pengaturan pH menggunakan bufer asetat 0,2 M. Hasil dianalisis dengan uji ANOVA menggunakan program *Windows SPSS v. 16.0*.

3.5.11 Optimasi konsentrasi Tween-80

Optimasi konsentrasi Tween-80 dilakukan untuk mengetahui konsentrasi Tween-80 optimum dalam menghasilkan LiP, cara kerja merujuk kondisi pada subbab 3.5.6, menggunakan kondisi optimum yang dihasilkan subbab 3.5.10. Variasi konsentrasi Tween-80 adalah 0, 0,025, 0,05 dan 0,1 %. Hasil dianalisis dengan uji ANOVA menggunakan program *Windows SPSS v. 16.0*.

3.5.12 Optimasi konsentrasi veratril alkohol

Optimasi konsentrasi veratril alkohol dilakukan untuk mengetahui konsentrasi veratril alkohol optimum dalam menghasilkan LiP, cara kerja merujuk kondisi pada subbab 3.5.6, menggunakan kondisi optimum yang dihasilkan subbab 3.5.11. Variasi konsentrasi veratril alkohol adalah 0, 100, 300, 500, 700, 1000 ppm. Hasil dianalisis dengan uji ANOVA menggunakan program *Windows SPSS v. 16.0*.

3.6 Karakterisasi Ekstrak Kasar Enzim LiP dari *P. chrysosporium* isolat ITB

Ekstrak kasar enzim diisolasi dengan cara inokulum spora diinokulasi dalam medium produksi dengan formula optimum dan ditumbuhkan pada kondisi optimum merujuk hasil percobaan pada subbab 3.5, disentrifugasi 10.000 rpm selama 10 menit pada suhu 4

derajat Celcius. Filtrat yang diperoleh merupakan ekstrak kasar enzim LiP. Ekstrak kasar enzim LiP yang diperoleh ditentukan pH dan suhu optimum untuk aktivitas katalitiknya, stabilitas suhu dan pengaruh ion logam dan beberapa inhibitor terhadap aktivitas katalitiknya, juga diamati karakternya pada fraksinasi menggunakan metode pengendapan etanol, stabilitas penyimpanan pada suhu 0 °C serta ukuran molekul LiP. Keseluruhan percobaan kecuali penentuan ukuran molekul LiP dilakukan pengulangan tiga kali.

3.6.1 Penentuan pH optimum aktivitas katalitik enzim LiP

Aktivitas enzim LiP ditentukan dengan cara seperti dijelaskan pada subbab 3.5.3, tetapi asam tartarat pada campuran reaksi tersebut diganti dengan bufer pH 1, 2, 3, 4, 5, 6 dan 7. Bufer untuk pH = 1 dan 2 menggunakan bufer HCl-KCl 0,2 M, untuk pH = 3 menggunakan bufer sitrat 0,2 M, untuk pH = 4 dan 5 menggunakan bufer asetat 0,2 M dan untuk pH = 6 dan 7 menggunakan bufer fosfat 0,2 M. Hasil dianalisis dengan uji ANOVA menggunakan program *Windows SPSS v. 16.0*.

3.6.2 Penentuan suhu optimum aktivitas katalitik enzim LiP

Aktivitas ekstrak kasar enzim LiP diuji pada berbagai suhu yaitu suhu ruang, 32, 38, 50 dan 58 derajat Celcius seperti yang dijelaskan pada subbab 3.5.3 pada pH optimum merujuk subbab 3.6.1. Hasil dianalisis menggunakan ANOVA satu arah dengan program SPSS 16.0. Hasil dianalisis dengan uji ANOVA menggunakan program *Windows SPSS v. 16.0*.

3.6.3 Stabilitas termal enzim LiP

Ekstrak kasar enzim LiP diinkubasi selama 0, 20, 24 dan 30 jam pada berbagai suhu yaitu suhu ruang, 32, 38, 50 dan 58 °C, kemudian diuji aktivitas enzim LiP seperti dijelaskan pada subbab 3.6.3, menggunakan pH dan suhu optimum aktivitas katalitik merujuk subbab 3.6.2. Masing-masing percobaan dilakukan tiga kali pengulangan. Stabilitas termal enzim LiP dinyatakan sebagai aktivitas relatif LiP atau aktivitas yang tersisa setelah inkubasi jam ke-n sesuai persamaan 13.

$$\text{Aktivitas relatif LiP (\%)} = \frac{\text{Aktivitas enzim LiP jam ke-n}}{\text{Aktivitas enzim LiP jam ke-0}} \times 100 \% \dots\dots\dots(13)$$

3.6.4 Pengaruh ion logam atau inhibitor

Aktivitas ekstrak kasar enzim LiP pada campuran reaksi yang telah ditambahkan ion logam atau inhibitor diuji seperti dijelaskan pada subbab 3.5.3. Ion logam atau inhibitor yang diuji ditambahkan pada campuran reaksi hingga konsentrasi 10 mM. Campuran diinkubasi selama 30 menit, kemudian reaksi diinisiasi dengan penambahan H₂O₂ dan diukur perubahan absorbansinya pada 310 nm. Ion logam dan inhibitor yang diuji yaitu: K⁺, Na⁺, Mn²⁺, Pb²⁺, Zn²⁺, Mg²⁺, Cd²⁺, Ca²⁺, Hg²⁺, Co²⁺, Cu²⁺, Fe²⁺, Cr³⁺, EDTA dan NaN₃. Enzim yang tidak diberi penambahan ion logam dan inhibitor digunakan sebagai

kontrol. Masing-masing percobaan dilakukan tiga kali pengulangan. Pengaruh ion logam dan inhibitor pada aktivitas enzim LiP dinyatakan sebagai aktivitas relatif LiP yang ditentukan mengikuti persamaan 14. Hasil dianalisis dengan uji dengan program *Windows SPSS v. 16.0*.

$$\text{Aktivitas relatif LiP (\%)} = \frac{\text{Aktivitas enzim dengan penambahan senyawa}}{\text{Aktivitas enzim LiP kontrol}} \times 100 \% \dots\dots\dots(14)$$

3.6.5 Profil fraksinasi ekstrak kasar dengan pengendapan etanol

Fraksinasi ekstrak kasar LiP dilakukan pada suhu 4 °C dengan menggunakan *icebath* merujuk Gemili dkk. (2007) dan Burgess & Deutscher (2009). Sebanyak lima mililiter ekstrak kasar dingin ditambahkan etanol absolut dingin secara perlahan dengan berbagai variasi kejenuhan etanol yaitu 33, 50, 55, 60, 64 dan 67 %. Campuran disimpan dalam refrigerator (4 °C) selama semalam. Campuran disentrifugasi pada suhu 0 °C dengan kecepatan 10.000 rpm selama 30 menit. Pelet yang diperoleh dikeringanginkan pada suhu kamar selama 2 jam, diresuspensi dalam 1,5 mL bufer asetat pH 4,5 kira-kira selama 3 jam. Masing-masing diukur kadar protein dan aktivitas spesifik LiP merujuk subbab 3.5.3 hingga 3.5.5. Hasil dianalisis dengan uji ANOVA menggunakan program *Windows SPSS v. 16.0*.

3.6.6 Stabilitas ekstrak kasar enzim, pelet hasil pengendapan dan resuspensi pelet hasil pengendapan etanol yang disimpan pada suhu 0 °C

Sampel disiapkan dengan membuat alikuat ekstrak kasar, pelet hasil pengendapan dan resuspensi pelet hasil pengendapan etanol dalam bufer asetat 0,2 M pH 5, masing-masing dalam *microtube* 1,5 mL. Masing-masing alikuat disimpan pada suhu 0 °C. Setelah penyimpanan hari ke 0, 2, 9, 16 dan 23, masing-masing alikuat dibiarkan pada suhu kamar hingga cair. Selanjutnya ditentukan aktivitas enzim LiP dengan cara kerja merujuk subbab 3.6.3. Masing-masing percobaan dilakukan pengulangan tiga kali

3.6.7 Penentuan berat molekul enzim LiP

Berat molekul protein ditentukan menggunakan SDS-PAGE merujuk Aulani'am (2004). Preparasi ekstrak kasar LiP sebagai sampel untuk elektroforesis SDS-PAGE dilakukan dengan dua cara. Pertama, sebanyak lima mililiter ekstrak kasar enzim LiP diendapkan dengan etanol absolut hingga kejenuhan etanol 60 %. Endapan yang diperoleh dilarutkan dengan satu mililiter bufer asetat pH 5,5 sehingga diperoleh sampel protein dikode sebagai P. Kedua, sebanyak dua mililiter ekstrak kasar enzim LiP dipekatkan dengan ultrafiltrasi Amicon menjadi 200 mikroliter atau mengalami pemekatan 10 kali dikode sebagai F. Lima belas mililiter sampel protein ditambah lima mililiter *loading*

buffer, dipanaskan pada suhu 100 °C selama lima menit. Setelah dingin bila sampel tidak langsung dipakai disimpan pada suhu – 20°C.

Plate pembentuk gel disusun dan dipersiapkan dengan cara merangkai dua *plate* kaca dengan jarak antar *plate* sekitar 1 mm. Gel terdiri dari dua lapis yaitu gel sebagai tempat sampel (*stacking gel*) dan gel sebagai media untuk pemisahan protein (*separating gel*). Konsentrasi gel pemisah 12,5 %. *Plate* yang sudah berisi gel dimasukkan dalam *chamber* elektroforesis. *Running buffer* dituangkan ke dalam *chamber* elektroforesis hingga bagian atas dan bawah gel terendam, dan dihindarkan adanya gelembung udara pada dasar gel atau di antara sumur sampel. Sampel sebanyak 20 µL dimasukkan hati-hati ke dalam dasar sumur gel. Perangkat elektroforesis dihubungkan dengan *power supply* dan dioperasikan dengan arus 20 mA selama ± 40 – 50 menit atau sampai *tracking dye* mencapai jarak 0,5 cm dari dasar gel. Gel diambil dari *plate*, direndam dalam 20 mL larutan *staining* sambil digoyang ±15 menit, selanjutnya dicuci dengan air, kemudian direndam dalam larutan *destaining*. Metode pewarnaan yang digunakan adalah *silver staining*. Berat molekul protein ditentukan melalui perbandingan nilai Rf sampel protein dengan nilai Rf protein standar. Nilai Rf adalah jarak relatif pergerakan pita terhadap pergerakan warna. Nilai Rf ditentukan berdasarkan rumus 15.

$$Rf = \frac{\text{Jarak pergerakan pita dari tempat awal}}{\text{Jarak pergerakan warna dari tempat awal}} \dots\dots\dots(15)$$

Kurva standar protein dibuat dengan nilai Rf sebagai sumbu X dan nilai logaritma berat molekul sebagai sumbu Y. Berat molekul ditentukan dengan menginterpolasikan nilai Rf pada kurva standar protein.

3.7 Optimasi Dekolorisasi Reaktif *black 5* oleh Enzim Lignin Peroksidase dari *P. chrysosporium* isolat ITB

Proses dekolourisasi secara enzimatis dilakukan merujuk Alam dkk. (2009), campuran reaksi dekolourisasi disebut sampel, secara umum terdiri dari satu mililiter ekstrak kasar enzim, pewarna, H₂O₂ dan bufer hingga volume total sebanyak empat mililiter. Reaksi dimulai pada saat penambahan enzim dan H₂O₂. Setelah waktu inkubasi tertentu, dilakukan pengukuran absorbansi hasil dekolourisasi pada panjang gelombang maksimum reaktif *black 5* (600 nm). Absorbansi larutan kontrol negatif (campuran pewarna, bufer dan aqua demineral) dinyatakan sebagai 0 % dekolourisasi. Enzim dan H₂O₂ masing-masing dalam campuran reaksi juga diamati pengaruhnya pada proses dekolourisasi. Campuran yang berisi pewarna, bufer dan H₂O₂ disebut kontrol tanpa enzim dan campuran yang berisi pewarna, bufer dan enzim disebut kontrol tanpa H₂O₂. Setiap perlakuan diulang sebanyak tiga kali.

3.7.1 Perbandingan kemampuan dekolorisasi ekstrak kasar enzim LiP yang dihasilkan dalam medium glukosa dengan medium serbuk kayu

Campuran reaksi seperti dijelaskan sebelumnya terdiri dari 400 mikroliter reaktif *black 5* 100 ppm, satu mililiter ekstrak kasar enzim, H₂O₂ dan aquademin dalam volume total reaksi 4 mL. Pada percobaan ini digunakan ekstrak kasar enzim LiP yang dihasilkan dari medium produksi dengan sumber karbon glukosa dan serbuk kayu. Masing-masing diukur kemampuan degradasinya pada 0, 1, 5, 10, 15, 20 dan 25 mM H₂O₂. Waktu inkubasi selama 20 jam pada suhu ruang. Masing-masing dilakukan tiga kali pengulangan. Hasil dianalisis dengan uji ANOVA dan uji regresi linier menggunakan program *Windows SPSS v. 16.0*.

3.7.2 Optimasi konsentrasi H₂O₂

Optimasi H₂O₂ dilakukan dua tahap yaitu: pertama dengan variasi 0, 1, 5, 10, 15, 20 dan 25 mM, dan kedua dengan variasi 0, 20, 30, 40 dan 50 mM. Ekstrak kasar LiP yang digunakan adalah enzim LiP yang dihasilkan dalam medium serbuk kayu. Hasil dianalisis dengan uji ANOVA menggunakan program *Windows SPSS v. 16.0*.

3.7.3 Optimasi pH dekolorisasi

Optimasi pH dilakukan seperti dijelaskan pada subbab 3.7.2 menggunakan konsentrasi H₂O₂ sebesar 20 mM. Pengamatan dilakukan pada pH 1, 3, 5, 7 dan tidak menggunakan bufer (aqua demineral). Bufer HCl-KCl 0,2 M digunakan untuk mengatur pH = 1, bufer sitrat 0,1 M untuk pH = 3, bufer asetat 0,2 M untuk pH = 5, dan bufer fosfat 0,2 M untuk pH = 7. Hasil dianalisis dengan uji ANOVA menggunakan program *Windows SPSS v. 16.0*.

3.7.4 Optimasi suhu dekolorisasi

Optimasi suhu waktu dekolorisasi dilakukan seperti dijelaskan pada subbab 3.7.2 dengan variasi suhu ruang, 32, 38, 50 dan 58 °C. Hasil dianalisis dengan uji ANOVA menggunakan program *Windows SPSS v. 16.0*.

3.7.5 Optimasi waktu dekolorisasi

Optimasi waktu dekolorisasi dilakukan seperti dijelaskan pada subbab 3.7.2 dengan variasi waktu 0, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 150, 180, 210 dan 240 menit.

3.8 Prediksi Struktur Hasil Dekolorisasi Reaktif *black 5* oleh Enzim Lignin Peroksidase dari *P. chrysosporium* Isolat ITB

Pada tahap ini dilakukan pengukuran spektrum UV dan penentuan *liquid chromatography-mass spectroscopy* (LC-MS) dari 20 ppm reaktif *black 5* sebelum dan setelah dekolorisasi secara enzimatik oleh enzim LiP dari *P. chrysosporium* isolat ITB

merujuk Enayatizamir dkk. (2011) dan Usha dkk. (2011). Spektrum UV diukur untuk mengamati terjadinya perubahan kromofor pada struktur reaktif *black 5* sebelum dan setelah dekolorisasi. Kromatogram LC-MS ditentukan untuk memprediksi struktur hasil degradasi. Kondisi operasional alat LC-MS untuk menentukan kromatogram reaktif *black 5* standar seperti ditunjukkan pada Tabel 3, sedangkan kondisi operasional LC-MS untuk hasil dekolorisasi pada Tabel 4.

Tabel 3. Kondisi operasional LC-MS reaktif *black 5*

Instrumen	Shimadzu LC-MS 2020
MS detektor	Single quodrupole
Kolom	Injeksi langsung tanpa kolom
Fase gerak	Metanol 50 % dan akuades 50 %
Laju alir	0,2 mL/min
Suhu kolom	40 °C
Volume injeksi	5 µL
Interface	DUIS (ESI-APCI)
Waktu pengerjaan	10 min

Tabel 4. Kondisi operasional LC-MS hasil degradasi reaktif *black 5*

Instrumen	Shimadzu LC-MS 2020
MS detektor	Single quodrupole
Kolom	C 18 Waters (4,6 mm x 150 mm)
Fase gerak	Metanol 50 % dan akuades 50 %
Laju alir	0,6 mL/min
Suhu kolom	40 °C
Volume injeksi	5 µL
Interface	DUIS (ESI-APCI)
Waktu pengerjaan	20 min