

METODE PENELITIAN

Garis Besar Rancangan Penelitian

Pada penelitian ini akan digunakan kultur *T. asperellum* TNC52 dan TNJ63 koleksi Laboratorium Biokimia FMIPA, Universitas Riau. Penelitian diawali dengan menentukan jumlah spora jamur agar didapatkan nilai OD dari kultur seragam pada setiap media produksi. Optimasi pH dan waktu produksi menggunakan kitin komersil (*crab shells*) untuk mencari kondisi produksi kitinase dengan substrat media limbah kulit udang berdasarkan studi pendahuluan (Sawitri, inpress). Masing-masing *T. asperellum* TNC52 dan TNJ63 yang telah diremajakan dikulturkan dalam berbagai media fermentasi menggunakan kitin dari limbah kulit udang (3 jenis udang) ukuran 100 mesh pada kondisi pH dan waktu produksi optimal. Kitin limbah ini akan dianalisis kemampuannya menjadi media produksi penghasil enzim.

Jumlah kitinase yang terbentuk dalam masing-masing media akan dianalisis berdasarkan aktivitas kitinase per volume ekstrak kasar enzim. Aktivitas kitinase akan diukur berdasarkan jumlah gula pereduksi yang dibebaskan dari substrat kitin per satuan waktu, sedangkan jumlah gula pereduksi sendiri dianalisis dengan metode Nelson-Somogyi. Semua percobaan direplikasi sebanyak 4x pengulangan. Data rata-rata aktivitas enzim per volume ekstrak kasar yang diperoleh sebagai parameter jumlah produksi enzim di berbagai media kitin, akan dibandingkan dan dianalisis statistic sidik ragam dilanjutkan dengan uji Duncan Jarak Berganda. Pilihan penelitian ini serempak dilakukan oleh 2 (dua) orang mahasiswa tugas akhir untuk memenuhi batasan waktu penelitian 8 (delapan) bulan.

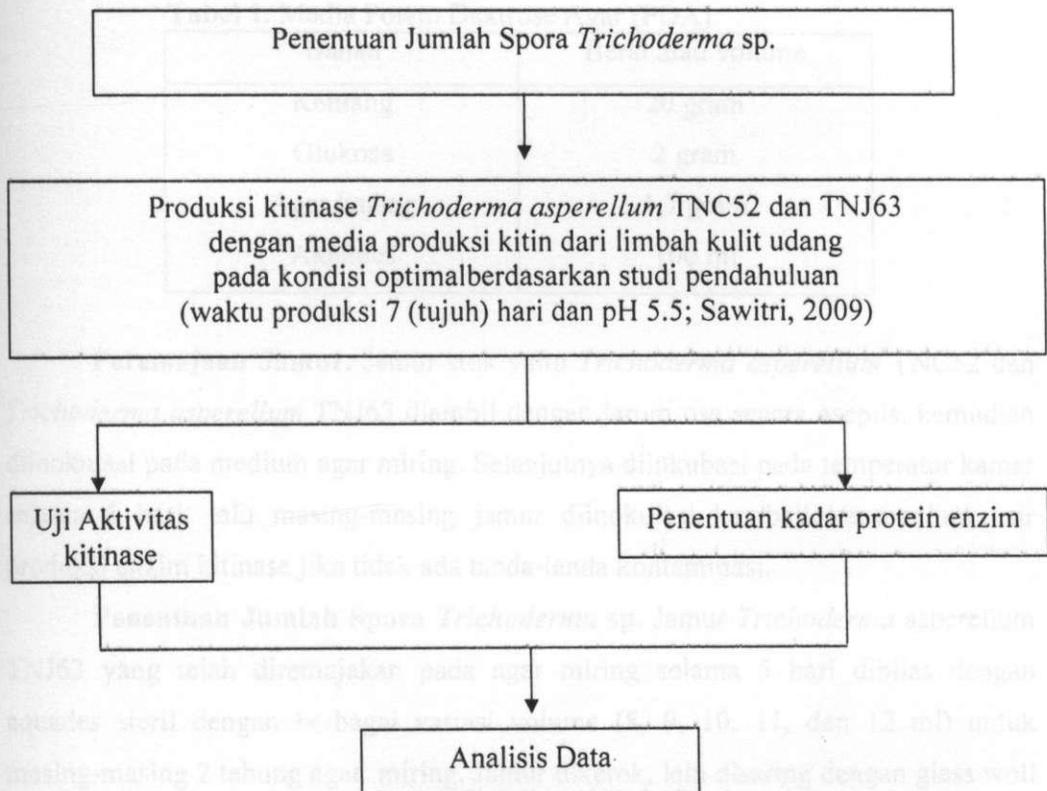
Rincian Tata Kerja Penelitian

Alat : Spektrofotometer Genesis II Keluaran Milton Roy Co., USA (No. Catalog 4001/4); Waterbath thermostat WK-24 (Sibata Scientific Technology Ltd); Kertas saring GF/C Whatman No. catalog 1822055; Corning Sterile Syringe filter 0,45 μm No. Catalog 431220 dan peralatan laboratorium biokimia standar lainnya sesuai dengan prosedur.

Bahan: Kultur *Trichoderma asperellum* TNC52 dan TNJ63 dari perkebunan jeruk dan coklat yang merupakan isolasi dan koleksi laboratorium biokimia FMIPA UNRI (Nugroho dkk., 1999; Nugroho dkk., 2003). Kultur ini dipelihara pada media



Potato Dextroae Agar (PDA) dengan penambahan asam sitrat 0,05 g per 1 media. Kitin dari kulit udang komersil (*crab shells*) SIGMA C7170 dan kitin koloidal SIGMA C9752 sebagai pembanding substrat uji aktivitas enzim. Limbah cangkang kulit udang dari beberapa jenis udang, polivinil polipirilidon adalah keluaran SIGMA-Aldrich Chemical Co.St.Louis, MO (nomor catalog P-6755). Untuk ultrafiltrasi ekstrak kasar enzim digunakan *Corning syringe filters* 0,45 μm selulosa asetat bebas surfaktan (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO USA Cat No. CLS431220-50EA). Bahan-bahan lain yang digunakan adalah bahan tingkat analisis (*analytical grade*) sesuai dengan metoda kerja.



Gambar 3. Bagan Rancangan Penelitian

Pembuatan Media Padat untuk Pemeliharaan Jamur *Trichoderma asperellum* TNC52 dan *Trichoderma asperellum* TNJ63. Berdasarkan zat-zat pada tabel 1 yang menunjukkan bahan pembuatan PDA, maka prosedur kerja adalah sebagai berikut: Kentang diiris-iris dan dimasukkan kedalam 30 ml akuades. Campuran dididihkan selama 20 menit, kemudian disaring dengan kain kasa. Filtrat

yang diperoleh dicampurkan dengan glukosa yang telah ditimbang. Akuades ditambahkan hingga volume 100 ml, lalu ditambahkan agar. Larutan dididihkan untuk melarutkan agar. Untuk pembuatan agar miring, 5 ml cairan media dimasukkan kedalam tabung reaksi bertutup kapas. Tabung-tabung ditutup dan disterilisasi pada tekanan 15 lb, 121°C selama 20 menit dalam autoklaf. Selanjutnya ke dalam tabung-tabung tersebut ditambahkan asam sitrat 0.05% yang disterilisasi terpisah. Kemudian tabung-tabung dimiringkan serta dibiarkan larutan media di dalamnya membeku. Media ini dapat digunakan apabila tidak ada tanda-tanda kontaminasi setelah dibiarkan dua hari sampai pada tabung tidak terdapat uap air.

Tabel 1. Media Potato Dextrose Agar (PDA)

Bahan	Berat atau volume
Kentang	20 gram
Glukosa	2 gram
Agar batang	1,7 gram
Akuades	100 ml

Peremajaan Jamur. Jamur stok yaitu *Trichoderma asperellum* TNC52 dan *Trichoderma asperellum* TNJ63 diambil dengan jarum ose secara aseptis, kemudian diinokulasi pada medium agar miring. Selanjutnya diinkubasi pada temperatur kamar selama 5 hari, lalu masing-masing jamur diinokulasi kembali ke medium cair produksi enzim kitinase jika tidak ada tanda-tanda kontaminasi.

Penentuan Jumlah Spora *Trichoderma* sp. Jamur *Trichoderma asperellum* TNJ63 yang telah diremajakan pada agar miring selama 5 hari dibilas dengan aquades steril dengan berbagai variasi volume (8, 9, 10, 11, dan 12 ml) untuk masing-masing 2 tabung agar miring. Jamur dikerok, lalu disaring dengan glass woll untuk masing-masing variasi. Larutan jamur tersebut divortex lalu diambil 100 µl untuk ditanam didalam cawan petri yang telah berisi PDA. Jamur yang ditanam pada cawan petri dibuat dalam berbagai pengenceran yaitu 10^1 - 10^{15} dengan masing-masing 3 kali pengulangan. Larutan jamur tersebut diratakan pada permukaan PDA dengan stik berbentuk L yang telah disterilkan. Jamur dibiarkan meresap selama 1 jam, lalu cawan petri dibungkus parafilm dan kertas. Setelah itu, cawan petri dibalik dan diinkubasi pada suhu kamar sampai tumbuh koloni jamur yang terpisah dan bisa

dihitung. Sisa larutan jamur yang telah ditaman pada PDA lalu divortex dan diukur OD nya pada panjang gelombang 660 nm.

Pembuatan Media Cair untuk Produksi Enzim Kitinase. Tabel 2 menunjukkan susunan nutrisi dari medium cair untuk produksi enzim kitinase. Semua bahan mineral (KNO_3 , KH_2PO_4 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) dicampurkan dalam 25 ml dapar sitrat-phospat 0,05 M pada pH 6,5. Media ini dimasukkan ke dalam erlenmeyer 100 ml kemudian pH diukur kembali agar tepat pada pH 6,5. Pada media ditambahkan polivinil polipirolidon dan kitin kasar komersil (*crab shell*), kemudian disterilisasi dengan autoklaf pada tekanan 15 lb, 121°C selama 20 menit. Media siap ditanami setelah diinkubasi satu malam pada suhu kamar.

Tabel 2. Medium Cair Produksi Enzim

Susunan Nutrisi	Berat atau Volume
KNO_3	0,25 gram
KH_2PO_4	0,125 gram
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,0625 gram
Kitin kasar komersil (<i>Crab Shells</i>)	0,05 gram
Polivinil polipirolidon	0,25 gram
Dapar sitrat-phosfat	25 ml

Produksi kitinase *Trichoderma asperellum* TNC52 dan TNJ63. Hasil kondisi optimal studi pendahuluan didapatkan bahwa kedua *Trichoderma asperellum* memiliki waktu produksi kitinase optimal selama 168 jam atau 7 hari pada pH 5.5 (Sawitri, inpress). Kondisi optimal ini diujikan pada produksi kitinase masing-masing *Trichoderma*. Koloni *Trichoderma asperellum* TNC52 atau *Trichoderma asperellum* TNJ63 yang tumbuh pada media padat dibilas dengan aquadest steril lalu digerus dengan jarum ose dan disaring dengan *glass woll* yang telah disterilkan, sebagian larutan disimpan di kulkas suhu 4°C dan sebagian lagi diukur OD pada nilai $\sim 0,34$ pada panjang gelombang 660 nm. Jamur yang sebelumnya disimpan di kulkas, diinokulasi kedalam masing-masing media cair produksi enzim. Kultur cair ini diinkubasi pada *rotary shaker* dengan kecepatan 150 rpm pada remperatur kamar dengan waktu 168 jam atau 7 hari pada pH 5,5. Masing-masing kultur yang mengandung enzim dipisahkan dari jamur menggunakan sentrifugasi dalam keadaan dingin dengan kecepatan 9500 rpm selama 10 menit. Sebelum sentrifugasi, media

kultur berisi enzim tersebut didinginkan pada suhu 4 °C selama 1 jam. Supernatan disaring dengan *filter glass fiber* (Whatman GF/C) dan disterilisasi dengan *Corning sterile syringe filter* 0,45 µm, kemudian jika enzim tidak langsung digunakan, ditambahkan NaN₃ hingga konsentrasinya 0,02% ke dalam setiap larutan supernatan. seperti cara di atas kemudian dilakukan isolasi ekstrak kasar enzim dan uji aktifitasnya.

Isolasi ekstrak kasar enzim. Media produksi enzim hasil fermentasi 7 (tujuh) hari didinginkan dalam lemari pendingin bersuhu 5-10 °C selama 1 jam. Media dingin ini kemudian disentrifugasi pada 8000g selama 5 menit untuk mengendapkan biomassa *T. asperellum*. Partikel sisa dipisahkan dari filtrate dengan penyaringan melalui filter gelas fiber Whatman GF/C. Filtrat yang diperoleh didinginkan lagi (5-10 °C) selama 1 jam, sebelum disterilisasi filtrasi menggunakan syringe filters 0,45µm selulosa asetat bebas surfaktan. Filtrat steril berupa ekstrak kasar enzim ditambahkan 0,02% NaN₃ yang dapat disimpan pada lemari pendingin selama 2 minggu. Ekstrak kasar enzim selanjutnya akan ditentukan aktivitas kitinasenya sebagai ukuran produksi kitinase per ml media produksi.

Uji aktivitas kitinase *Trichoderma asperellum* TNC52 dan TNJ63 hasil produksi media kitin dari limbah kulit udang. Aktivitas kitinase ditentukan berdasarkan jumlah produksi gula pereduksi yang dibebaskan per menit per ml ekstrak enzim dengan kitin 1% sebagai substrat. Ependorf untuk sampel diisi dengan 0,25 ml larutan substrat koloidal kitin dari larutan stok koloidal kitin 2% yang dilarutkan pada dapar asetat 0,05 M pH 5,5. Inkubasi selama 5 menit di dalam waterbath bersuhu 40 °C. selanjutnya tabung diisi dengan larutan ekstrak enzim 0,25 ml dan inkubasi dilanjutkan selama 1 jam sambil sekali-kali diaduk pelan. Ependorf untuk control (dari awal 5 menit pertama) diisi dengan 0,25 ml larutan substrat koloidal kitin dari larutan stok koloidal kitin 2% yang dilarutkan pada dapar asetat 0,05 M pH 5,5 dan diinkubasi seperti pada sampel tanpa penambahan enzim selama inkubasi 1 jam. Setelah 1 jam, larutan sampel dan control dipindahkan ke dalam tabung reaksi dimana masing-masing tabung ditambah 0,5 ml reagen Nelson-Somogyi kemudian larutan dihomogenasi. Setelah homogenasi, ke dalam tabung control ditambahkan enzim sebanyak 0,25 ml. Seluruh tabung dipanaskan selama 10 menit dalam air mendidih kemudian didinginkan pada suhu kamar. Larutan ditambahkan 0,5 ml reagen arsenomolibdat dan dihomogenasikan kembali. Larutan

disaring jika terdapat endapan. Sebagai blanko digunakan 0,5 ml dapar asetat pH 5,5 (0,05 M) yang diperlakukan sama dengan sampel tetapi tidak diinkubasi. Sebagai standar dibuat larutan glukosa pada berbagai konsentrasi (antara 0,01-0,05 mg/ml) dengan metode Nelson-Somogyi. Absorbansi masing-masing larutan diukur dengan spektrofotometer pada λ 500 nm. Pengukuran aktifitas masing-masing dilakukan 4 kali pengulangan untuk setiap sampel. Satu unit aktivitas enzim kitinase didefinisikan sebagai banyaknya enzim yang dilepaskan 1 μ mol gula pereduksi permenit.

$$\text{Aktifitas enzim} = \frac{\text{Mol gula pereduksi (sampel-kontrol)}}{\text{Volume sampel} \times \text{Waktu inkub}} \times \text{Pengenceran}$$

$$= X \text{ mol gula pereduksi / ml / menit} = X \text{ unit / ml ekstrak kasar enzim}$$

Penentuan kadar protein metoda Lowrey. Larutan enzim (larutan sampel) masing-masing dipipet 1 ml dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Kemudian ditambahkan masing-masing 1 ml aseton dingin 80% (4°C), dihomogenkan dan disimpan dalam freezer dengan temperatur -20°C selama 30 menit. Setelah itu disentrifugasi dengan mikrosentrifuga pada kecepatan 130000 rpm selama 10 menit. Setelah itu, tabung yang berisi endapan protein dilarutkan dengan 0,5 ml dapar Fosfat pH optimum lalu larutan dihomogenasikan hingga endapan protein tersebut larut. Larutan dianalisis dengan metode Lowrey dengan prosedur dimana larutan sampel protein dipipet 5 ml, dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan ditambahkan ke dalam tabung tersebut 2,5 ml reagen C lalu dihomogenkan dan dibiarkan pada suhu kamar selama 10 menit. Setelah itu, pada larutan ditambahkan 0,5 ml reagen Folin-Ciocalteau ke dalam tabung tersebut, kemudian divortex. Tabung diinkubasi selama 30 menit pada suhu kamar. Serapan masing-masing larutan sampel diukur dengan spektrofotometer dengan panjang gelombang 750 nm. Perlakuan yang sama dilakukan terhadap blanko yaitu dapar fosfat (0,05 M) pada pH 5,5 serta larutan standar protein yang dibuat pada berbagai konsentrasi (0,2-1 mg/ml). Dari masing-masing absorbansi yang diperoleh, kemudian ditentukan aktivitas spesifik masing-masing enzim dengan rumus sebagai berikut:

$$\text{Aktivitas spesifik enzim} = \frac{\text{Aktivitas enzim}}{\mu\text{g protein}}$$

$H = Y$ mol gula pereduksi /ml / menit / μ g protein

= Y unit / μ g protein

Analisis Data: Data yang diperoleh dari 3(tiga) kitin dari 3 jenis udang yang digunakan untuk media produksi kitinase dan menggunakan 2 (dua) isolat jamur *Trichoderma asperellum* TNC52 dan TNJ63 masing-masing dianalisis secara statistik. Perbandingan aktivitas spesifik enzim kitinase *Trichoderma asperellum* digunakan uji Duncan jarak berganda menurut Bender dkk (1982). Untuk membandingkan pengukuran aktivitas enzim dan control pada berbagai kondisi, digunakan uji t.

2. Perhitungan Jumlah Spora Jamur *Trichoderma* sp.

Koloni jamur *Trichoderma* sp. yang terpuah dapat dilihat pada pengenceran 10^2 , 10^3 , dan 10^4 untuk setiap variasi setelah ditumbuhkan pada media PDA dalam waktu penerapan ≈ 40 jam. Pada pengenceran tersebut jumlah koloni yang terlihat antara 6 sampai 12 koloni. Masing-masing larutan tersebut diukur OD dan terbaca pada pengenceran 16 sampai 32 kali. Dari hasil tersebut dibuat grafik hubungan antara jumlah spora/ml terhadap nilai OD/ml untuk menentukan jumlah spora dari *Trichoderma* sp.

Tabel 3. Nilai OD/ml terhadap jumlah spora/ml

OD/ml	Spora/ml
0,42	$26,6 \times 10^6$
0,23	$15,9 \times 10^6$
0,18	$9,8 \times 10^6$
0,14	$7,7 \times 10^6$
0,12	$7,6 \times 10^6$

Sebagai contoh, agar rering berisi 5 ml media PDA yang berisi jamur *Trichoderma asperellum* TNJ63 memiliki OD -0,14 setelah diencerkan 32 kali. Hasil ini dikorelasikan dengan grafik OD/ml terhadap jumlah spora/ml yang telah diperoleh, sehingga didapatkan jumlah spora/ml jamur *Trichoderma asperellum* TNJ63 tersebut setara dengan $\sim 7 \times 10^6$ spora/ml.

