

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Hasil

#### 1. Pengamatan Pertumbuhan Jamur

Hasil pengamatan pertumbuhan *T. asperellum* TNC52 dan *T. asperellum* TNJ63 dari proses inokulasi ke media agar miring ditumbuhi spora pada hari kedua. Spora ini kemudian membentuk konidiofora dewasa pada hari kelima. Masing-masing jamur tumbuh dengan koloni yang berbeda. Jamur *T. asperellum* TNC52 koloninya berwarna hijau muda, sedangkan jamur *T. asperellum* TNJ63 koloninya berwarna hijau tua. Setelah lima hari, kedua jamur ini diinokulasikan pada medium cair produksi kitinase.

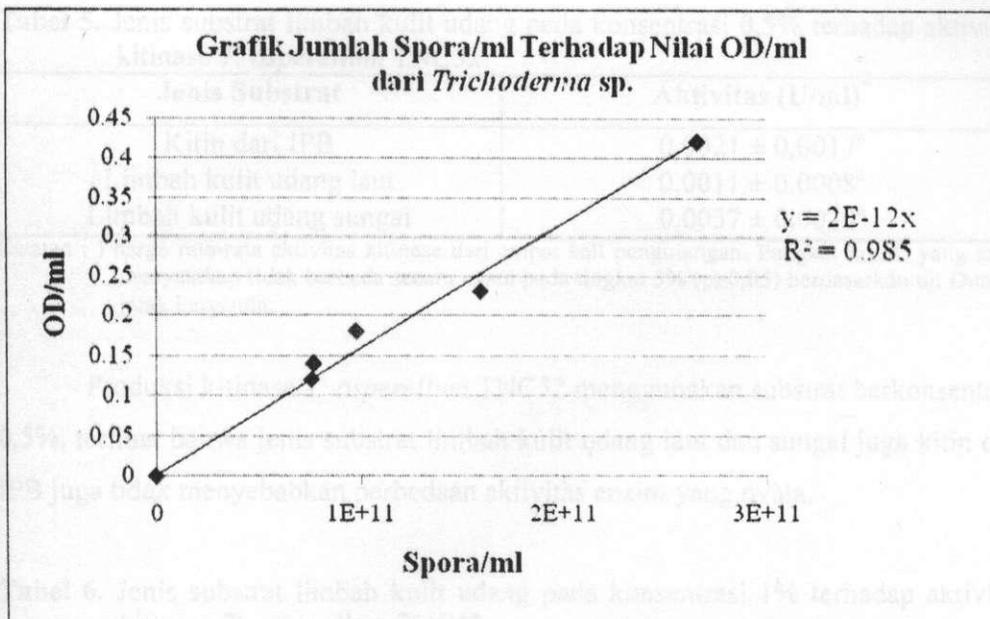
#### 2. Perhitungan Jumlah Spora Jamur *Trichoderma* sp.

Koloni jamur *Trichoderma* sp. yang terpisah dapat dilihat pada pengenceran  $10^9$ ,  $10^{10}$ , dan  $10^{11}$  untuk setiap variasi setelah ditumbuhkan pada media PDA dalam cawan petri selama  $\pm 40$  jam. Pada pengenceran tersebut, jumlah koloni yang terlihat antara 8 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	$26,6 \times 10^{10}$
0,23	$15,9 \times 10^{10}$
0,18	$9,8 \times 10^{10}$
0,14	$7,7 \times 10^{10}$
0,12	$7,6 \times 10^{10}$

Satu tabung agar miring berisi 5 ml media PDA yang berisi jamur *Trichoderma asperellum* TNJ63 memiliki OD  $\sim 0,34$  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  $\sim 7 \times 10^{12}$  spora/ml.



Gambar 3. Grafik hubungan jumlah spora/ml terhadap nilai OD/ml dari *Trichoderma* sp.

### 3. Penentuan Aktivitas Kitinase dengan Substrat Limbah Kulit Udang pada Media Produksi Enzim

Kitinase merupakan enzim yang mampu menghidrolisis kitin. Substrat yang digunakan pada media produksi enzim adalah kitin komersil kasar dari *crab shell* dan limbah kulit udang tanpa perlakuan yang diambil dari udang sungai, udang laut, dan kitin dari IPB sebagai pembanding. Analisa aktivitas enzim digunakan kitin koloidal.

Tabel 4. Jenis substrat limbah kulit udang pada konsentrasi 0,2% terhadap aktivitas kitinase *T. asperellum* TNC52

Jenis Substrat	Aktivitas (U/ml)*
Kitin dari IPB	0,0103 ± 0,0008 <sup>a</sup>
Limbah kulit udang laut	0,0089 ± 0,0007 <sup>a</sup>
Limbah kulit udang sungai	0,0095 ± 0,0010 <sup>a</sup>

Catatan :\*) harga rata-rata aktivitas kitinase dari empat kali pengulangan. Pangkat huruf yang sama menyatakan tidak berbeda secara nyata pada tingkat 5% ( $p \geq 0,05$ ) berdasarkan uji Duncan jarak berganda.

Produksi kitinase *T. asperellum* TNC52 menggunakan substrat berkonsentrasi 0,2%, terlihat bahwa jenis substrat limbah kulit udang laut dan sungai juga kitin dari IPB tidak menyebabkan perbedaan aktivitas enzim yang nyata.

**Tabel 5.** Jenis substrat limbah kulit udang pada konsentrasi 0,5% terhadap aktivitas kitinase *T. asperellum* TNC52

Jenis Substrat	Aktivitas (U/ml)*
Kitin dari IPB	0,0021 ± 0,0017 <sup>a</sup>
Limbah kulit udang laut	0,0011 ± 0,0008 <sup>a</sup>
Limbah kulit udang sungai	0,0037 ± 0,0020 <sup>a</sup>

Catatan : \*) harga rata-rata aktivitas kitinase dari empat kali pengulangan. Pangkat huruf yang sama menyatakan tidak berbeda secara nyata pada tingkat 5% ( $p \geq 0,05$ ) berdasarkan uji Duncan jarak berganda.

Produksi kitinase *T. asperellum* TNC52 menggunakan substrat berkonsentrasi 0,5%, terlihat bahwa jenis substrat limbah kulit udang laut dan sungai juga kitin dari IPB juga tidak menyebabkan perbedaan aktivitas enzim yang nyata.

**Tabel 6.** Jenis substrat limbah kulit udang pada konsentrasi 1% terhadap aktivitas kitinase *T. asperellum* TNC52

Jenis Substrat	Aktivitas (U/ml)*
Kitin dari IPB	0,0022 ± 0,0006 <sup>a</sup>
Limbah kulit udang laut	0,0014 ± 0,0010 <sup>a</sup>
Limbah kulit udang sungai	0,0014 ± 0,0009 <sup>a</sup>

Catatan : \*) harga rata-rata aktivitas kitinase dari empat kali pengulangan. Pangkat huruf yang sama menyatakan tidak berbeda secara nyata pada tingkat 5% ( $p \geq 0,05$ ) berdasarkan uji Duncan jarak berganda.

Produksi kitinase *T. asperellum* TNC52 menggunakan substrat berkonsentrasi 1%, terlihat bahwa jenis substrat limbah kulit udang laut dan sungai juga kitin dari IPB tidak menyebabkan perbedaan aktivitas enzim yang nyata. Sama halnya dengan substrat berkonsentrasi 0,2 dan 0,5%

**Tabel 7.** Jenis substrat limbah kulit udang pada konsentrasi 2,5% terhadap aktivitas kitinase *T. asperellum* TNC52

Jenis Substrat	Aktivitas (U/ml)*
Kitin dari IPB	0,0046 ± 0,0004 <sup>a</sup>
Limbah kulit udang laut	0,0004 ± 0,0003 <sup>c</sup>
Limbah kulit udang sungai	0,0028 ± 0,0018 <sup>b</sup>

Catatan : \*) harga rata-rata aktivitas kitinase dari empat kali pengulangan. Pangkat huruf yang sama menyatakan tidak berbeda secara nyata pada tingkat 5% ( $p \geq 0,05$ ) berdasarkan uji Duncan jarak berganda.

Pada produksi kitinase *T. asperellum* TNC52 menggunakan substrat berkonsentrasi 2,5%, terlihat bahwa jenis substrat limbah kulit udang laut dan sungai juga kitin dari IPB menyebabkan perbedaan aktivitas enzim yang nyata. Kitinase dari

limbah kulit udang sungai memiliki aktivitas lebih besar dan berbeda nyata dengan limbah kulit udang laut, tetapi kitinase dari kitin IPB memberikan aktivitas tertinggi.

**Tabel 8.** Jenis substrat limbah kulit udang pada konsentrasi 0,2% terhadap aktivitas kitinase *T. asperellum* TNJ63

Jenis Substrat	Aktivitas (U/ml)*
Kitin dari IPB	0,0049 ± 0,0008 <sup>a</sup>
Limbah kulit udang laut	0,0046 ± 0,0006 <sup>a</sup>
Limbah kulit udang sungai	0,0039 ± 0,00052 <sup>a</sup>

Catatan : \*) harga rata-rata aktivitas kitinase dari empat kali pengulangan. Pangkat huruf yang sama menyatakan tidak berbeda secara nyata pada tingkat 5% ( $p \geq 0,05$ ) berdasarkan uji Duncan jarak berganda.

Produksi kitinase *T. asperellum* TNJ63 menggunakan substrat berkonsentrasi 0,2%, terlihat bahwa jenis substrat limbah kulit udang laut dan sungai juga kitin dari IPB tidak menyebabkan perbedaan aktivitas enzim yang nyata.

**Tabel 9.** Jenis substrat limbah kulit udang pada konsentrasi 0,5% terhadap aktivitas kitinase *T. asperellum* TNJ63

Jenis Substrat	Aktivitas (U/ml)*
Kitin dari IPB	0,0047 ± 0,0008 <sup>b</sup>
Limbah kulit udang laut	0,0098 ± 0,0016 <sup>a</sup>
Limbah kulit udang sungai	0,0020 ± 0,0007 <sup>c</sup>

Catatan : \*) harga rata-rata aktivitas kitinase dari empat kali pengulangan. Pangkat huruf yang sama menyatakan tidak berbeda secara nyata pada tingkat 5% ( $p \geq 0,05$ ) berdasarkan uji Duncan jarak berganda.

Produksi kitinase *T. asperellum* TNJ63 menggunakan substrat berkonsentrasi 0,5%, menunjukkan bahwa jenis substrat limbah kulit udang laut dan sungai juga kitin dari IPB menyebabkan perbedaan aktivitas enzim yang nyata. Kitinase dari limbah kulit udang laut memberikan aktivitas tertinggi dibandingkan kitin IPB dan kitin limbah udang sungai.

**Tabel 10.** Jenis substrat limbah kulit udang pada konsentrasi 1% terhadap aktivitas kitinase *T. asperellum* TNJ63

Jenis Substrat	Aktivitas (U/ml)*
Kitin dari IPB	0,0100 ± 0,0010 <sup>a</sup>
Limbah kulit udang laut	0,0021 ± 0,0019 <sup>b</sup>
Limbah kulit udang sungai	0,0004 ± 0,0002 <sup>b</sup>

Catatan : \*) harga rata-rata aktivitas kitinase dari empat kali pengulangan. Pangkat huruf yang sama menyatakan tidak berbeda secara nyata pada tingkat 5% ( $p \geq 0,05$ ) berdasarkan uji Duncan jarak berganda.

Produksi kitinase *T. asperellum* TNJ63 menggunakan substrat berkonsentrasi 1%, terlihat bahwa jenis substrat limbah kulit udang laut dan sungai juga kitin dari IPB menyebabkan perbedaan aktivitas enzim yang nyata. Kitinase dari kitin IPB memberikan aktivitas tertinggi dibandingkan kitin limbah kulit udang laut dan sungai.

**Tabel 11.** Jenis substrat limbah kulit udang pada konsentrasi 2,5% terhadap aktivitas kitinase *T. asperellum* TNJ63

Jenis Substrat	Aktivitas (U/ml)*
Kitin dari IPB	0,0110 ± 0,0013 <sup>a</sup>
Limbah kulit udang laut	0,0020 ± 0,0009 <sup>b</sup>
Limbah kulit udang sungai	0,0005 ± 0,0001 <sup>b</sup>

Catatan : \*) harga rata-rata aktivitas kitinase dari empat kali pengulangan. Pangkat huruf yang sama menyatakan tidak berbeda secara nyata pada tingkat 5% ( $p \geq 0,05$ ) berdasarkan uji Duncan jarak berganda.

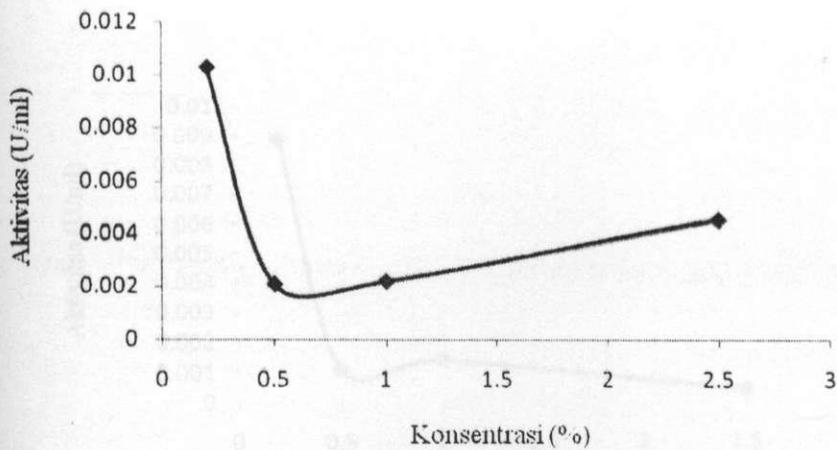
Produksi kitinase *T. asperellum* TNJ63 menggunakan substrat berkonsentrasi 2,5%, terlihat bahwa jenis substrat limbah kulit udang laut dan sungai tidak memberikan perbedaan yang nyata, tetapi kitin dari IPB memberikan aktivitas kitinase yang berbeda secara nyata dan paling tinggi.

**Tabel 12.** Pengaruh konsentrasi substrat kitin IPB terhadap aktivitas kitinase *T. asperellum* TNC52

Konsentrasi Substrat (%)	Aktivitas (U/ml)*
0,2	0,0103 ± 0,0008 <sup>a</sup>
0,5	0,0021 ± 0,0017 <sup>c</sup>
1	0,0022 ± 0,0006 <sup>c</sup>
2,5	0,0046 ± 0,0004 <sup>b</sup>

Catatan : \*) harga rata-rata aktivitas kitinase dari empat kali pengulangan. Pangkat huruf yang sama menyatakan tidak berbeda secara nyata pada tingkat 5% ( $p \geq 0,05$ ) berdasarkan uji Duncan jarak berganda.

Untuk membandingkan pengaruh konsentrasi substrat pada produksi kitinase *T. asperellum* TNC52 pada kitin IPB terlihat bahwa substrat berkonsentrasi 0,2% memberikan aktivitas tertinggi dan berbeda nyata dibandingkan substrat berkonsentrasi 0,5; 1; dan 2,5%.



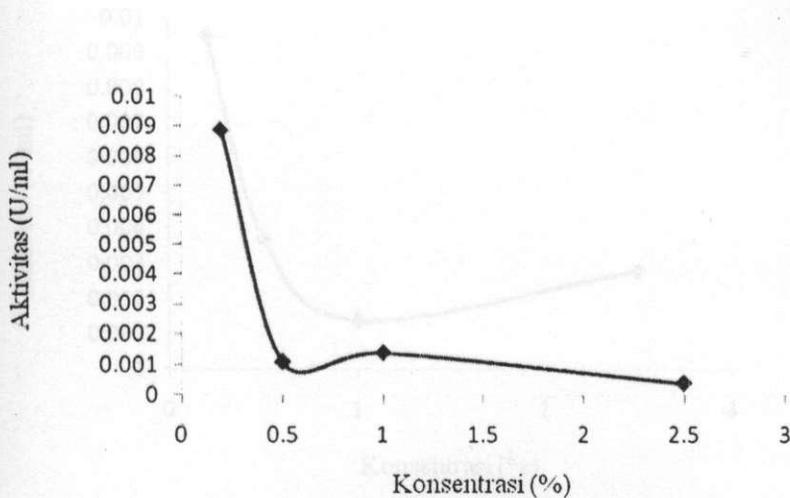
**Gambar 4.** Grafik hubungan konsentrasi substrat kitin IPB terhadap aktivitas kitinase *Trichoderma asperellum* TNC52.

**Tabel 13.** Pengaruh konsentrasi substrat limbah kulit udang laut terhadap aktivitas kitinase *T. asperellum* TNC52

Konsentrasi Substrat (%)	Aktivitas (U/ml)*
0,2	0,0089 ± 0,0007 <sup>a</sup>
0,5	0,0011 ± 0,0008 <sup>b</sup>
1	0,0014 ± 0,0010 <sup>b</sup>
2,5	0,0004 ± 0,0003 <sup>b</sup>

Catatan : \*) harga rata-rata aktivitas kitinase dari empat kali pengulangan. Pangkat huruf yang sama menyatakan tidak berbeda secara nyata pada tingkat 5% ( $p \geq 0,05$ ) berdasarkan uji Duncan jarak berganda.

Untuk membandingkan pengaruh konsentrasi substrat pada produksi kitinase *T. asperellum* TNC52 pada kitin limbah kulit udang laut terlihat bahwa substrat berkonsentrasi 0,2% memberikan aktivitas tertinggi dan berbeda nyata dibandingkan substrat berkonsentrasi 0,5; 1; dan 2,5%.



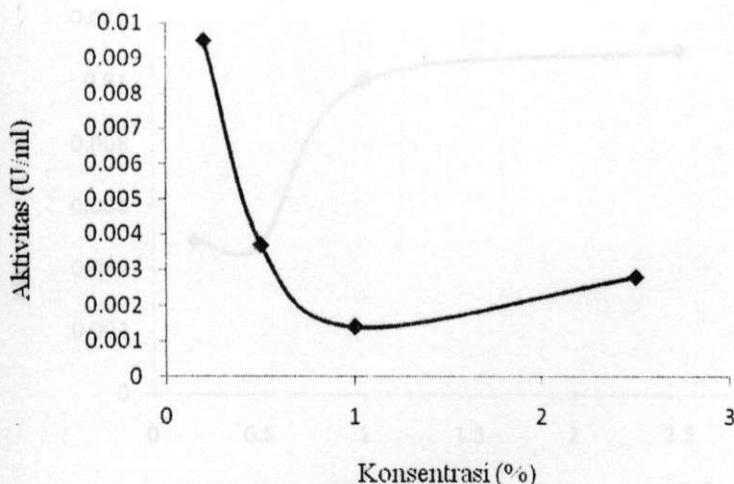
**Gambar 5.** Grafik hubungan konsentrasi substrat kitin limbah kulit udang laut terhadap aktivitas kitinase *Trichoderma asperellum* TNC52.

**Tabel 14.** Pengaruh konsentrasi substrat limbah kulit udang sungai terhadap aktivitas kitinase *T. asperellum* TNC52

Konsentrasi Substrat (%)	Aktivitas (U/ml)*
0,2	0,0095 ± 0,0010 <sup>a</sup>
0,5	0,0037 ± 0,0020 <sup>b</sup>
1	0,0014 ± 0,0009 <sup>b</sup>
2,5	0,0028 ± 0,0018 <sup>b</sup>

Catatan : \*) harga rata-rata aktivitas kitinase dari empat kali pengulangan. Pangkat huruf yang sama menyatakan tidak berbeda secara nyata pada tingkat 5% ( $p \geq 0,05$ ) berdasarkan uji Duncan jarak berganda.

Untuk membandingkan pengaruh konsentrasi substrat pada produksi kitinase *T. asperellum* TNC52 pada kitin limbah kulit udang sungai terlihat bahwa substrat berkonsentrasi 0,2% memberikan aktivitas tertinggi dan berbeda nyata dibandingkan substrat berkonsentrasi 0,5; 1; dan 2,5%. Sama halnya dengan kitin limbah kulit udang laut.



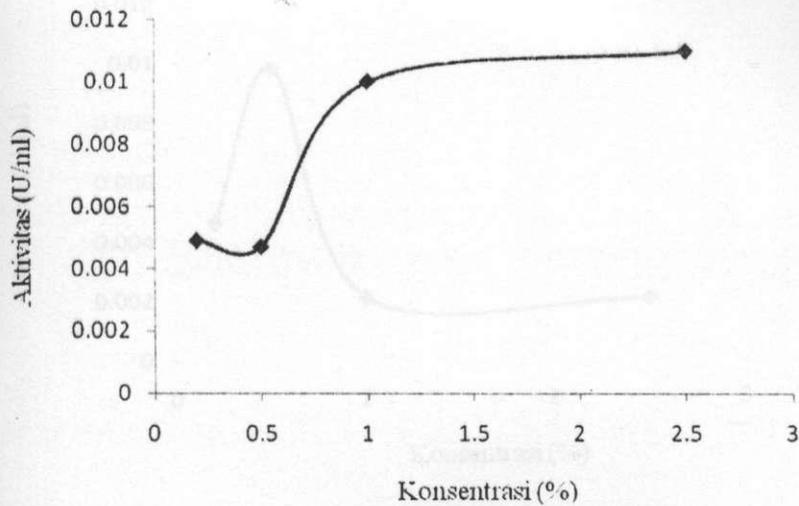
**Gambar 6.** Grafik hubungan konsentrasi substrat kitin limbah kulit udang sungai terhadap aktivitas kitinase *Trichoderma asperellum* TNC52.

**Tabel 15.** Pengaruh konsentrasi substrat kitin IPB terhadap aktivitas kitinase *T. asperellum* TNJ63

Konsentrasi Substrat (%)	Aktivitas (U/ml)*
0,2	0,0049 ± 0,0008 <sup>b</sup>
0,5	0,0047 ± 0,0008 <sup>b</sup>
1	0,0100 ± 0,0010 <sup>a</sup>
2,5	0,0110 ± 0,0013 <sup>a</sup>

Catatan : \*) harga rata-rata aktivitas kitinase dari empat kali pengulangan. Pangkat huruf yang sama menyatakan tidak berbeda secara nyata pada tingkat 5% ( $p \geq 0,05$ ) berdasarkan uji Duncan jarak berganda.

Untuk membandingkan pengaruh konsentrasi substrat pada produksi kitinase *T. asperellum* TNC52 pada kitin IPB terlihat bahwa substrat berkonsentrasi 2,5% memberikan aktivitas tertinggi dan tidak berbeda nyata dengan 1%, tetapi berbeda nyata dibandingkan substrat berkonsentrasi 0,2 dan 2,5%.



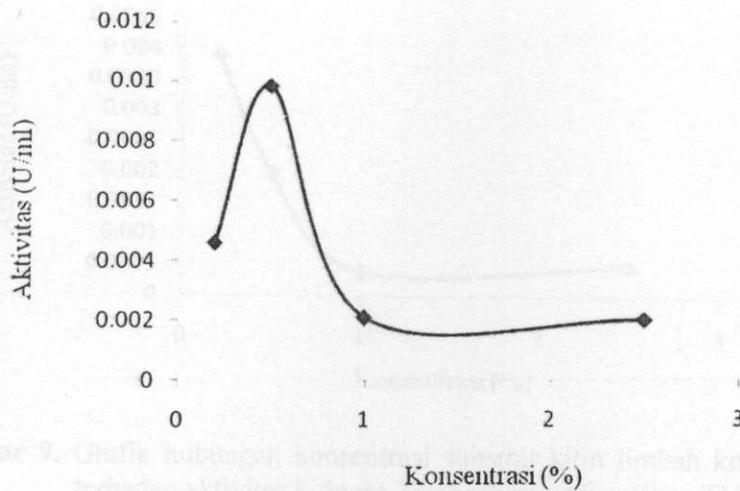
**Gambar 7.** Grafik hubungan konsentrasi substrat kitin IPB terhadap aktivitas kitinase *Trichoderma asperellum* TNJ63.

**Tabel 16.** Pengaruh konsentrasi substrat limbah kulit udang laut terhadap aktivitas kitinase *T. asperellum* TNJ63

Konsentrasi Substrat (%)	Aktivitas (U/ml)*
0,2	0,0046 ± 0,0006 <sup>b</sup>
0,5	0,0098 ± 0,0016 <sup>a</sup>
1	0,0021 ± 0,0019 <sup>c</sup>
2,5	0,0020 ± 0,0009 <sup>c</sup>

Catatan : \*) harga rata-rata aktivitas kitinase dari empat kali pengulangan. Pangkat huruf yang sama menyatakan tidak berbeda secara nyata pada tingkat 5% ( $p \geq 0,05$ ) berdasarkan uji Duncan jarak berganda.

Untuk membandingkan pengaruh konsentrasi substrat pada produksi kitinase *T. asperellum* TNJ63 pada kitin limbah kulit udang laut terlihat bahwa substrat berkonsentrasi 0,5% memberikan aktivitas tertinggi dan berbeda nyata dibandingkan substrat berkonsentrasi 0,2; 1; dan 2,5%.



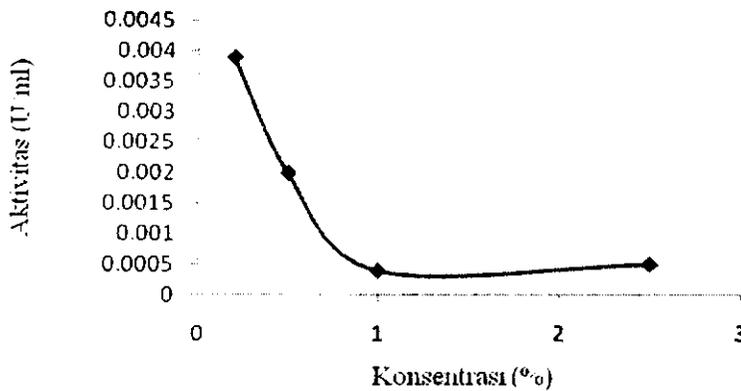
**Gambar 8.** Grafik hubungan konsentrasi substrat kitin limbah kulit udang laut terhadap aktivitas kitinase *Trichoderma asperellum* TNJ63.

**Tabel 17.** Pengaruh konsentrasi substrat limbah kulit udang sungai terhadap aktivitas kitinase *T. asperellum* TNJ63

Konsentrasi Substrat (%)	Aktivitas (U/ml) <sup>*</sup>
0,2	0,0039 ± 0,00052 <sup>a</sup>
0,5	0,0020 ± 0,0007 <sup>b</sup>
1	0,0004 ± 0,0002 <sup>c</sup>
2,5	0,0005 ± 0,0001 <sup>c</sup>

Catatan : \*) harga rata-rata aktivitas kitinase dari empat kali pengulangan. Pangkat huruf yang sama menyatakan tidak berbeda secara nyata pada tingkat 5% ( $p \geq 0,05$ ) berdasarkan uji Duncan jarak berganda.

Pengaruh konsentrasi substrat pada produksi kitinase *T. asperellum* TNJ63 pada kitin limbah kulit udang sungai terlihat bahwa substrat berkonsentrasi 0,2% memberikan aktivitas tertinggi dan berbeda nyata dibandingkan substrat berkonsentrasi 0,5; 1; dan 2,5%.



**Gambar 9.** Grafik hubungan konsentrasi substrat kitin limbah kulit udang sungai terhadap aktivitas kitinase *Trichoderma asperellum* TNJ63.

### 5. Penentuan Aktivitas Spesifik Kitinase

Kadar protein ekstrak kasar enzim ditentukan dengan metode Lowrey pada panjang gelombang 750 nm. Ekstrak kasar enzim yang di ukur adalah ekstrak kasar yang didapat menggunakan limbah kulit udang laut dan sungai pada konsentrasi 0,2% untuk kedua jamur. Kadar protein yang didapat ditunjukkan pada Tabel 18 dan Tabel 19.

**Tabel 18.** Kadar protein ekstrak kasar kitinase *T. asperellum* TNC52 dengan variasi jenis substrat pada media produksi enzim (Konsentrasi substrat 0,2%)

Jenis Substrat	Rata-rata kadar protein (mg/ml)*
Kitin kasar komersil ( <i>crab shell</i> )	(0,0023 ± 0,00062) <sup>a</sup>
Kitin dari IPB	(0,0024 ± 0,00069) <sup>a</sup>
Limbah kulit udang laut	(0,0011 ± 0,00057) <sup>b</sup>
Limbah kulit udang sungai	(0,0033 ± 0,00094) <sup>a</sup>

Catatan :) harga rata-rata aktivitas kitinase dari empat kali pengulangan. Pangkat huruf yang sama menyatakan tidak berbeda secara nyata pada tingkat 5% ( $p \geq 0,05$ ) berdasarkan uji Duncan jarak berganda.

Aktivitas spesifik kitinase diperoleh dengan membandingkan hasil aktivitas enzim dengan kadar proteinnya. Hasil aktivitas spesifik ekstrak kasar kitinase dilihat pada Tabel 19 dan 20 untuk kedua jenis jamur. Aktivitas spesifik kitinase tertinggi pada jamur *T. asperellum* TNC52 adalah  $9,91 \pm 3,56$  unit/mg protein yang menggunakan substrat limbah kulit udang laut pada media produksi enzim. Hasil ini tidak berbeda nyata dengan substrat kitin kasar komersil (*crab shell*) berdasarkan uji Duncan jarak berganda. Sedangkan aktivitas spesifik kitinase tertinggi untuk jamur *T. asperellum* TNJ63 adalah  $12,53 \pm 5,00$  unit/mg protein yang menggunakan

substrat kitin kasar komersil (*crab shell*), berbeda nyata dengan jenis substrat lainnya.

**Tabel 19.** Kadar protein ekstrak kasar kitinase *T. asperellum* TNJ63 dengan variasi substrat pada media produksi enzim

Jenis Substrat	Rata-rata kadar protein (mg/ml)*
Kitin kasar komersil ( <i>crab shell</i> )	(0,0016 ± 0,00080) <sup>b</sup>
Kitin dari IPB	(0,0034 ± 0,0018) <sup>a</sup>
Limbah kulit udang laut	(0,0026 ± 0,00060) <sup>ab</sup>
Limbah kulit udang sungai	(0,0031 ± 0,00033) <sup>ab</sup>

Catatan : \*) harga rata-rata aktivitas kitinase dari empat kali pengulangan. Pangkat huruf yang sama menyatakan tidak berbeda secara nyata pada tingkat 5% ( $p \geq 0,05$ ) berdasarkan uji Duncan jarak berganda.

**Tabel 20.** Aktivitas spesifik ekstrak kasar kitinase *T. asperellum* TNC52 dengan variasi substrat pada media produksi enzim

Jenis Substrat	Aktivitas (U/ml)*
Kitin kasar komersil ( <i>crab shell</i> )	(6,97 ± 2,47) <sup>ab</sup>
Kitin dari IPB	(4,72 ± 1,79) <sup>b</sup>
Limbah kulit udang laut	(9,91 ± 3,56) <sup>a</sup>
Limbah kulit udang sungai	(3,08 ± 0,82) <sup>b</sup>

Catatan : \*) harga rata-rata aktivitas kitinase dari empat kali pengulangan. Pangkat huruf yang sama menyatakan tidak berbeda secara nyata pada tingkat 5% ( $p \geq 0,05$ ) berdasarkan uji Duncan jarak berganda.

**Tabel 21.** Aktivitas spesifik ekstrak kasar kitinase *T. asperellum* TNJ63 dengan variasi substrat pada media produksi enzim

Jenis Substrat	Aktivitas (U/ml)*
Kitin kasar komersil ( <i>crab shell</i> )	(12,53 ± 5,00) <sup>a</sup>
Kitin dari IPB	(1,90 ± 1,17) <sup>b</sup>
Limbah kulit udang laut	(1,90 ± 0,55) <sup>b</sup>
Limbah kulit udang sungai	(1,27 ± 0,14) <sup>b</sup>

Catatan : \*) harga rata-rata aktivitas kitinase dari empat kali pengulangan. Pangkat huruf yang sama menyatakan tidak berbeda secara nyata pada tingkat 5% ( $p \geq 0,05$ ) berdasarkan uji Duncan jarak berganda.

## Pembahasan

### 1. Penentuan Jumlah Spora *Trichoderma* sp. untuk Produksi Enzim

Jumlah sel dihitung dengan cara mengetahui kekeruhan atau OD (turbiditas) kultur. Semakin keruh suatu kultur, semakin banyak jumlah selnya. Prinsip dasar metode ini adalah jika cahaya mengenai sel, maka sebahagian cahaya diserap dan sebahagian cahaya diteruskan. Jumlah cahaya yang diserap proporsional atau berbanding lurus dengan jumlah sel, atau jumlah cahaya yang diteruskan berbanding terbalik dengan jumlah sel. Semakin banyak jumlah sel, semakin sedikit cahaya yang

diteruskan. Selain metode ini, jumlah sel juga dapat dihitung dengan metoda *total count* dan metode berat kering (Purwako, 2007). Nilai OD disetarakan dengan jumlah spora yang dihitung melalui pengenceran sampai batas yang memperlihatkan koloni yang terpisah yaitu pada pengenceran  $10^9$ ,  $10^{10}$ , dan  $10^{11}$ .

Dari hasil penelitian ini, diukur nilai OD dari satu tabung media agar miring berisi 5 ml PDA yang ditumbuhi jamur *T. asperellum* TNJ63 dengan nilai OD ~0,34 yang setara dengan  $\sim 7 \times 10^{12}$  spora/ml. Hasil ini digunakan sebagai acuan untuk menentukan jumlah spora jamur yang diinokulasi ke media produksi enzim. Hal ini dilakukan agar jumlah spora jamur yang dinokulasi pada setiap media produksi enzim mendekati jumlah yang sama.

## **2. Produksi Kitinase dengan Substrat Limbah Kulit Udang pada Media Produksi Enzim dan Uji Aktivitasnya**

Kitinase termasuk enzim ekstraseluler, yaitu enzim yang dihasilkan di dalam sel, tetapi dikeluarkan ke medium tumbuhnya. Mikroba akan terinduksi untuk memproduksi enzim yang sesuai dengan sumber karbon yang diberikan. Oleh karena itu, untuk menginduksi *T. asperellum* TNC52 dan TNJ63 memproduksi enzim kitinase, maka diberikan substrat kitin sebagai sumber karbon. Kitin digunakan sebagai inducer pada produksi kitinase. Menurut teori Jacob-Monod, inducer mampu mengikat protein represor, sehingga protein represor menjadi tidak aktif untuk berikatan dengan gen operator. Akibatnya RNA polimerase dapat berikatan dengan gen promotor, karena letak gen promotor dengan gen operator berurutan dan akhirnya proses transkripsi dan translasi dapat berlangsung untuk menghasilkan enzim. Apabila ada represor aktif, maka represor aktif mengikat operator sedemikian rupa, sehingga RNA polimerase tidak akan dapat mengikat promotor, selanjutnya enzim atau protein yang diinginkan tidak akan terbentuk.

Isolasi enzim kitinase dilakukan dengan cara sentrifuga dalam keadaan dingin untuk memisahkan ekstrak enzim dengan sel jamur dalam media produksinya. Ekstrak enzim sebelumnya dimasukkan ke dalam lemari pendingin selama 30 menit, hal ini dilakukan karena tidak adanya sentrifuga dingin, apabila ada sentrifuga dingin, maka hal ini tidak perlu dilakukan. Hal ini dilakukan agar enzim yang dihasilkan selama waktu inkubasi tidak terdenaturasi, karena karena struktur kwarterner, tersier, dan sekunder dari enzim dapat rusak atau terdenaturasi sehingga

enzim akan kehilangan fungsi biologisnya. Setelah didapat filtrat ekstrak kasar enzim, maka ekstrak kasar enzim tersebut disaring dengan menggunakan *Corning Sterile Syringe filter* 0,45  $\mu\text{m}$  agar tidak ada lagi spora dan miselia jamur di dalam ekstrak kasar enzim. Miselia dari jamur dapat mengganggu aktivitas dari enzim. Selanjutnya ditambahkan 0,02%  $\text{NaN}_3$  apabila enzim tidak langsung digunakan, hal ini dilakukan untuk menghambat pertumbuhan bakteri penyebab kontaminasi.

Kitinase merupakan enzim yang mampu menghidrolisis kitin. Substrat yang digunakan pada media produksi enzim adalah kitin limbah kulit udang tanpa perlakuan yang diambil dari udang sungai, udang laut, dan kitin dari IPB sebagai pembanding. Kitin IPB telah diberikan perlakuan tertentu seperti demineralisasi dan deproteinase. Kitin limbah tidak dilakukan perlakuan pemurnian dan isolasi, hanya pencucian dengan aquades mengalir, pengeringan, dan dihaluskan hingga berukuran sesuai yang diinginkan. Pada penelitian ini baru menguji 1 ukuran kitin limbah kulit udang yaitu berukuran 100 mesh.

Parameter yang menunjukkan terbentuknya kitinase dalam media produksi dianalisa melalui uji aktivitas enzim. menggunakan kitin koloidal-SIGMA dengan metoda Nelson-Somogyi. Analisis aktivitas kitinase digunakan substrat kitin koloidal 2%. Aktivitas kitinase diukur berdasarkan kemampuannya melepaskan gula pereduksi dari kitin. Data kadar gula pereduksi hasil hidrolisis kitinase antara uji dengan kontrol dibandingkan dengan uji. Kadar gula pereduksi antara tabung substrat kitin yang dihidrolisis dengan sampel produksi enzim berbeda nyata ( $P < 0,05$ ) dengan kadar gula pereduksi tabung kontrol. Hal ini menunjukkan bahwa ada aktivitas enzim dalam ekstrak media produksi.

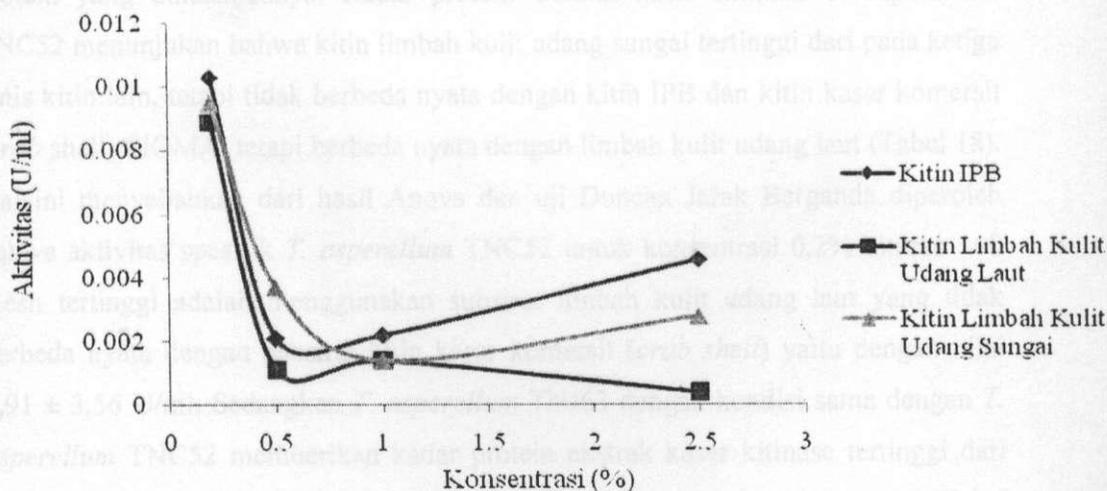
Ketiga jenis limbah udang yang dipakai menunjukkan nilai aktivitas enzim yang beragam. Untuk jamur *T. asperellum* TNC52 pada konsentrasi 0,2; 0,5; dan 1% tidak menunjukkan aktivitas yang berbeda antara ketiga jenis kitin. Tetapi pada konsentrasi 2,5%, aktivitas kitinase berbeda secara signifikan antara ketiga kitin tersebut, di mana kitin IPB memberikan aktivitas terbesar dengan nilai  $(0,0046 \pm 0,0004)$  unit/ml. Limbah kulit udang sungai memberikan aktivitas kitinase  $(0,0028 \pm 0,0018)$  unit/ml yang lebih besar dari pada kulit udang laut  $(0,0004 \pm 0,0003)$  unit/ml yang berbeda secara nyata. Untuk *T. asperellum* TNJ63 pada konsentrasi 0,2% belum memberikan nilai yang berbeda nyata untuk ketiga sumber kitin. Sedangkan pada konsentrasi substrat produksi 0,5%, limbah kitin kulit udang laut memberikan



nilai tertinggi dan berbeda nyata dibandingkan yang lain. Kitin limbah kulit udang laut pada konsentrasi 1 dan 2,5% tidak berbeda nyata dengan limbah kulit udang sungai, dan memberikan nilai aktivitas di bawah kitin IPB. Hal ini dapat terjadi karena beberapa parameter optimasi belum dilakukan, seperti suhu dan kecepatan agitasi/aerasi, sehingga parameter waktu produksi dan pH saja belum cukup untuk dapat memaksimalkan produksi.

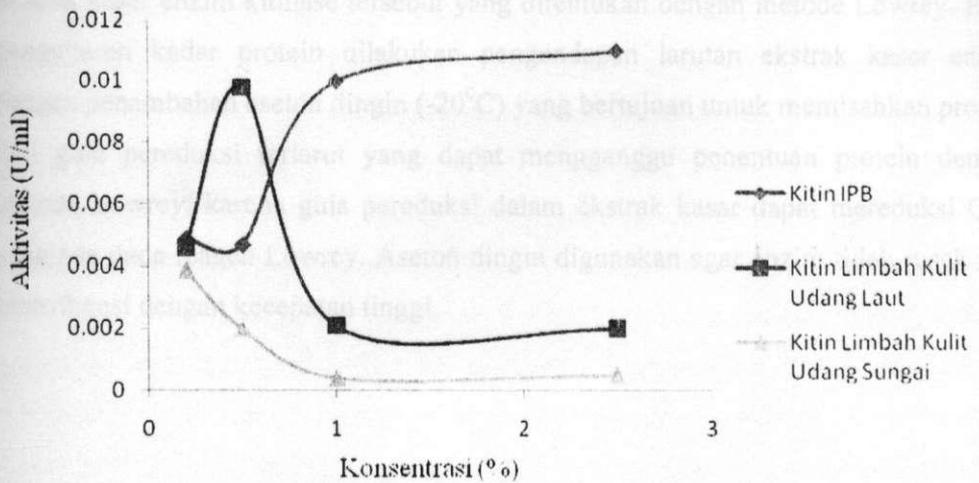
Adanya aktivitas kitinase limbah kulit udang yang bernilai sama dan tidak berbeda nyata dengan kitin IPB menunjukkan bahwa jamur *T. asperellum* TNC52 dan TNJ63 mampu menghasilkan kitinase yang baik, walaupun menggunakan substrat dari limbah kulit udang tanpa perlakuan dengan jenis yang berbeda. Hal ini dapat menunjukkan bahwa kitinase *T. asperellum* TNC52 dan TNJ63 dapat dihasilkan dengan biaya produksi yang lebih murah dan sekaligus membantu pemanfaatan limbah kulit udang.

Untuk melihat produksi kitinase pada keempat nilai konsentrasi yang diuji dan menggunakan 3 (tiga) jenis kitin pada *T. asperellum* TNC52 memberikan pola aktivitas kitinase yang sama yaitu pada konsentrasi 0,2% merupakan aktivitas tertinggi lalu menurun tajam dan meningkat kembali (Gambar 10). Pola kurva ini menunjukkan bahwa semakin besar konsentrasi substrat kitin limbah kulit udang menyebabkan semakin menurun aktivitas kitinasenya. Hal ini menunjukkan bahwa kemungkinan terdapat inhibitor ataupun repressor pada substrat limbah kulit udang.



**Gambar 10.** Grafik hubungan konsentrasi substrat kitin limbah kulit udang terhadap aktivitas kitinase *Trichoderma asperellum* TNC52.

Untuk media pada jamur *T. asperellum* TNJ63 memberikan pola yang tidak seragam (Gambar 11). Hal ini dapat saja terjadi karena belum semua aspek optimasi dilakukan, seperti kecepatan agitasi dan aerasi juga temperatur.



**Gambar 11.** Grafik hubungan konsentrasi substrat kitin limbah kulit udang terhadap aktivitas kitinase *Trichoderma asperellum* TNJ63.

### 3. Penentuan Aktivitas Spesifik Kitinase

Aktivitas spesifik enzim menunjukkan suatu ukuran kemurnian enzim. Semakin tinggi aktivitas spesifik enzim maka semakin tinggi juga tingkat kemurnian enzim tersebut. Aktivitas spesifik diperoleh dari aktivitas enzim dibagi dengan kadar protein yang dihasilkannya. Kadar protein ekstrak kasar kitinase *T. asperellum* TNC52 menunjukkan bahwa kitin limbah kulit udang sungai tertinggi dari pada ketiga jenis kitin lain, tetapi tidak berbeda nyata dengan kitin IPB dan kitin kasar komersil (*crab shell*) SIGMA, tetapi berbeda nyata dengan limbah kulit udang laut (Tabel 18). Hal ini menyebabkan dari hasil Anova dan uji Duncan Jarak Berganda diperoleh bahwa aktivitas spesifik *T. asperellum* TNC52 untuk konsentrasi 0,2% ukuran 100 mesh tertinggi adalah menggunakan substrat limbah kulit udang laut yang tidak berbeda nyata dengan substrat kitin kasar komersil (*crab shell*) yaitu dengan nilai  $9,91 \pm 3,56$  U/ml. Sedangkan *T. asperellum* TNJ63 dengan kondisi sama dengan *T. asperellum* TNC52 memberikan kadar protein ekstrak kasar kitinase tertinggi dari Kitin IPB tapi tidak berbeda nyata dengan limbah kulit udang laut dan sungai (Tabel 20). Aktivitas spesifik tertinggi kitinase dari *T. asperellum* TNJ63 adalah dengan menggunakan substrat kitin kasar komersil (*crab shell*) SIGMA (Tabel 21). Hal ini

disebabkan kitin tersebut telah diberi perlakuan sehingga menghasilkan kitinase yang lebih murni.

Penentuan aktivitas spesifik dilakukan dengan mengetahui kadar protein dari ekstrak kasar enzim kitinase tersebut yang ditentukan dengan metode Lowrey. Pada pengukuran kadar protein dilakukan pengendapan larutan ekstrak kasar enzim dengan penambahan aseton dingin ( $-20^{\circ}\text{C}$ ) yang bertujuan untuk memisahkan protein dari gula pereduksi terlarut yang dapat mengganggu penentuan protein dengan metoda Lowrey, karena gula pereduksi dalam ekstrak kasar dapat mereduksi  $\text{Cu}^{+2}$  yang ada pada reagen Lowrey. Aseton dingin digunakan agar enzim tidak rusak saat sentrifugasi dengan kecepatan tinggi.

