

BAB III METODE PENELITIAN

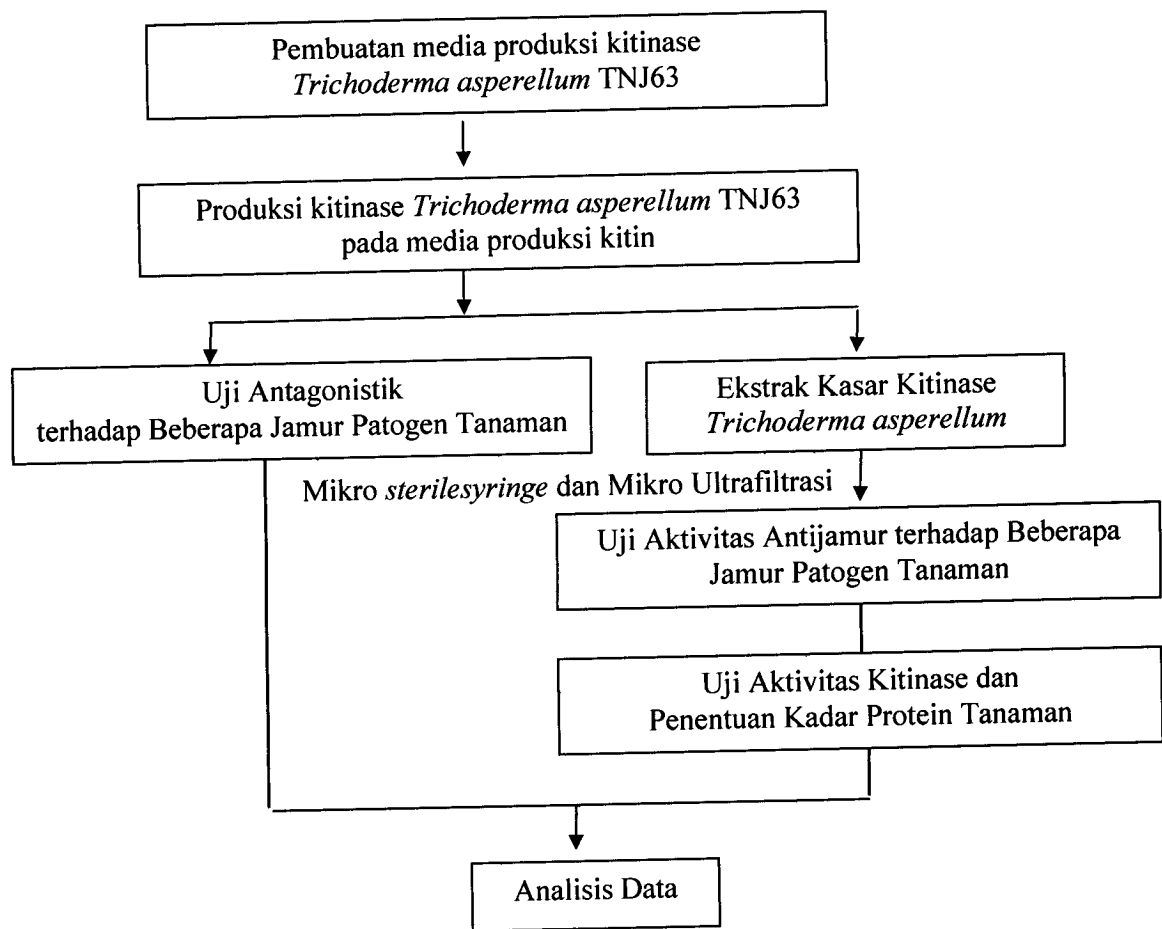
3.1. Alat dan Bahan

Alat: Spektrometri 20 keluaran Milton Roy Co.USA cat.No.400; Laminar Flow (ESCO Micro PTE LTD HD 3 ; Rotari Shaker ; Hot Plate; Vortex Mixer Genie 2 TM Cat.No.12-82, 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, Ultrafiltrasi dan peralatan laboratorium biokimia standar lainnya sesuai dengan prosedur.

Bahan: Kultur *Trichoderma asperellum* TNJ63 dari perkebunan jeruk dan TNC 52 dari perkebunan coklat yang merupakan isolasi dan koleksi laboratorium biokimia FMIPA UNRI (Nugroho dkk., 1999; Nugroho dkk., 2003). Kultur ini dipelihara pada media *Potato Dextrose Agar* (PDA) dengan penambahan asam sitrat 0,05 g per l media. Kitin dari kulit udang komersil (*crab shells*) SIGMA C7170 sebagai pembanding media produksi dan kitin koloidal SIGMA C9752 sebagai pembanding substrat uji aktivitas enzim. *Fusarium sp.*, *Phytophthora sp.*, *Albugo sp.*, *Sclerotium rolfsii.*, *Ganoderma boninense.*, dan *Rhizoctonia solani*, 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.

3.2. Rancangan Penelitian

Pada penelitian ini akan dilakukan uji antagonistik *T. asperellum* TNC52 dan TNJ63 terhadap 3 jenis jamur patogen tanaman dan uji antijamur patogen terhadap enzim kitinase. Uji kimia juga dilakukan untuk aktifitas enzim dan kadar protein guna mengetahui aktifitas spesifik enzim kitinase, yang bagan rancangannya dapat dilihat pada Gambar 3.



Gambar 3. Bagan Rancangan Penelitian

3.4. Tahapan Penelitian.

3.4.1. Peremajaan Jamur.

Semua jamur yang akan digunakan terlebih dahulu diremajakan. Jamur-jamur ditanam pada medium padat (PDA) agar miring, selama 4-5 hari yang ada kitin 1% sebagai sumber karbon dalam tabung reaksi selama 7 hari sampai tumbuh spora. Spora diambil secara aseptik satu ose dari permukaan plat agar dan disuspensikan dalam media cair yang ada Tween 80 (0,1% v/v) steril, ini sebagai inokulum, diinkubasi selama 5 hari.

3.4.2. Pembuatan media produksi Enzim kitinase.

Cara pembuatan medium cair adalah semua bahan-bahan pada tabel 2 dilarutkan dalam 25 ml dapar fosfat 0,05 M pada pH 5. Media ini dimasukkan ke dalam Erlenmeyer sebanyak 25 ml dan disterilisasikan dengan autoklaf pada tekanan 15 lb, 121°C selama 20 menit lalu dinginkan dan biarkan selama 2 hari. Media siap diinokulasi dengan suspensi spora masing-masing *T. asperellum* TNC52 dan TNJ63 dalam larutan steril sebanyak $\sim 5 \times 10^8$ conidia per ml media (diambil 1 ml suspensi spora pada agar miring diatas). Fermentasi dilakukan secara *batch* dan aerasi dilakukan dengan menggoyang erlenmeyer pada *rotary shaker* dengan kecepatan ~ 150 rpm, suhu kamar, selama 7 hari. Pada hari ke-7 dilakukan isolasi ekstrak kasar enzim

Tabel 1. Bahan dan komposisi medium cair produksi kitinase

Susunan Nutrisi	Berat atau Volume
KNO ₃	0,25 gram
KH ₂ PO ₄	0,125 gram
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,0625 gram
Kitin*	0,05 gram
Polivinil Polipirolidon	0,25 gram
Dapar Fosfat	25 ml

3.4.3. 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 filtrat dengan penyaringan melalui filter gelas fiber Whatman GF/C atau glas wol. 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.

3.4.4. Pemisahan Ekstrak Media Produksi Enzim

Ekstrak kasar kitinase yang dihasilkan dipanen dan kemudian disterilisasi dengan *mikrosterilesyringe*, selanjutnya di pekatkan dengan mikroultrafiltrasi. Kitinase yang telah dipekatkan ini dicampur dengan media PDA dalam cawan petri dengan berbagai konsentrasi (1x ,2x dan 3x media produksi) dan inkubasi selama satu hari. Dengan membuat sumur pada cawan petri potongan dari biakan jamur-jamur patogen diletakan pada media yang telah diberi ekstrak kitinase tadi lalu diamati setiap jam, dengan membandingkan terhadap kontrol (PDA ditambah buffer sebagai pengganti kitinase).

3.4.4. Uji aktivitas kitinase *Trichoderma asperellum* TNJ63

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 kolidal 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 kolidal 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 kontrol dipindahkan ke dalam tabung reaksi dimana masing-masing tabung ditambah 0,5 ml reagen Nelson-Somogyi kemudian larutan

dihomogenasi. Setelah homogenasi, ke dalam tabung kontrol 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 (antar 0,01-0,05 mg/ml) dengan metode Nelson-Somogyi. Absorbansi masing-masing larutan diukur dengan spektrofotometer pada λ 500 nm. Pengukuran aktivitas masing-masing dilakukan 4 kali pengulangan untuk setiap sampel.

$$\begin{aligned} \text{Aktivitas enzim} &= \frac{\text{Mol gula pereduksi (sampel-kontrol)}}{\text{Volume sampel} \times \text{Waktu inkubasi}} \times \text{Pengenceran} \\ &= X \text{ mol gula pereduksi /ml/menit} \\ &= X \text{ unit/ml ekstrak kasar enzim} \end{aligned}$$

Satu unit aktivitas enzim kitinase didefinisikan sebagai banyaknya enzim yang dilepaskan 1 μ mol gula pereduksi permenit.

3.4.5. 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% (4⁰C), dihomogenkan dan disimpan dalam freezer dengan temperatur -20⁰C selama 30 menit. Setelah itu disentrifugasi dengan mikrosentrifuga pada kecepatan 13000 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 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 kedalam 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 (0,05M) 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:

$$\begin{aligned}\text{Aktivitas spesifik enzim} &= \frac{\text{Aktivitas enzim}}{\mu\text{g protein}} \\ &= Y \text{ mol gula pereduksi/ml/menit} / \mu\text{g protein} \\ &= Y \text{ unit} / \mu\text{g protein}\end{aligned}$$

3.4.6. Uji antagonistik.

Uji antagonistik dilakukan juga dengan metode bilayer, dimana *T. asperellum* TNJ63 yang telah diremajakan dikulturkan di media produksi kitinase selama 3-5 hari (dibuat 2 lapisan), lapisan pertama PDA tanpa jamur, sedangkan lapisan kedua ditambah jamur. Kemudian dibuat sumur-sumur tempat jamur-jamur patogen. Jamur-jamur patogen diremajakan dikulturkan di media PDA, selanjutnya diambil dengan alat diletakan pada sumur-sumur yang telah disediakan. Pengamatan dilakukan setiap hari dengan pertumbuhan jamur.

3.4.7. Uji aktivitas antijamur

Uji aktivitas antijamur kitinase akan diuji terhadap beberapa jamur patogen penyakit tanaman hortikultura yaitu *Sclerotium rolfsii*, *Ganoderma boninense*, dan *Rhizoctonia solani* pada media agar (Lorito, dkk., 1992). Masing-masing dilakukan tirplo. Sampel dimasukkan ke dalam sumur yang telah mengandung biakan jamur dalam cawan petri steril. Kemudian cawan petri diinkubasi pada suhu 27°C. Adanya hambatan terhadap pertumbuhan jamur terlihat sebagai daerah atau zona kosong di sekeliling sumur. Zona hambatan yang terbentuk diukur dengan jangka sorong. Perubahan yang diamati ialah diameter zona hambatan yang terbentuk di sekeliling koloni jamur dan dinyatakan dalam 3 kategori yaitu:

- Zona hambatan total, apabila zona hambatan yang terbentuk di sekeliling sumur terlihat jernih dan luas
- Zona hambatan parsial, apabila pada zona hambatan yang terbentuk masih memperlihatkan adanya koloni jamur yang tipis
- Zona hambatan nol, apabila tidak ada zona hambatan yang terbentuk di sekeliling sumur.

Pembagian tugas antara mahasiswa yang dilibatkan: Penelitian ini melibatkan 3 (tiga) orang mahasiswa sebagai bagian dari skripsi tugas akhirnya, dengan pembagian kerja sebagai berikut:

1. Mahasiswa I (Yulian Astuti, NIM 0603120153), dengan judul skripsi "Uji Antagonistik, Antijamur, dan Aktivitas Kitinase *Trichoderma asperellum* TNC52 dan TNJ63 pada Jamur Patogen *Ganoderma bodinense*"
2. Mahasiswa II (Hartini H, NIM 0603113175), dengan judul skripsi "Uji Antagonistik, Antijamur, dan Aktivitas Kitinase *Trichoderma asperellum* TNC52 dan TNJ63 pada Jamur Patogen *Rhizoctonia solani*"
3. Mahasiswa III (Daifillah Karima, NIM 0603120844), dengan judul skripsi "Uji Antagonistik, Antijamur, dan Aktivitas Kitinase *Trichoderma asperellum* TNC52 dan TNJ63 pada Jamur Patogen *Fusarium* sp."