

IV. BAHAN DAN METODE PENELITIAN

4.1. Bahan

Bahan hidup *Aspergillus niger* Gmn 11.1 berasal dari Batu Malang, Jawa Timur, agar-agar strip (Goh Joo Hin Pte Ltd (GJH) Singapura), inulin (umbi dahlia) dan bahan pro analisis.

4.2. Persiapan Substrat

Umbi dahlia dibersihkan dan diiris halus-halus kemudian ditimbang sebanyak 200 gram. Sampel umbi dahlia ini ditambahkan dengan 500 ml air dan dididihkan selama 15 menit. Campuran disaring dengan kain dan endapan yang tersisa dikain dipanaskan kembali dengan 100 ml air. Semua filtrat disentrifuga 5000 rpm selama 10 menit, supernatan yang didapat dari hasil sentrifuga ditambahkan etanol dengan volume yang sama dengan volume supernatan tadi dan disimpan satu malam pada suhu $\pm 4^{\circ}\text{C}$. Endapan yang terbentuk dipisahkan dengan sentrifuga 4000 rpm pada suhu $\pm 4^{\circ}\text{C}$ selama 10 menit. Endapan dicuci dua kali dengan etanol dingin 50% dan disentrifuga kembali. Kemudian endapan yang didapat dipanaskan pada suhu 60°C dalam oven dan hancurkan untuk mendapatkan tepungnya.

4.3. Penentuan Media Terbaik untuk Produksi Inulinase dari *Aspergillus niger* Gmn 11.1

4.3.1. Persiapan Kultur

Kultur *Aspergillus niger* Gmn11.1 yang diisolasi dari umbi dahlia yang berasal dari Batu Malang Jawa Timur, diambil 1 ose secara aseptik, kemudian ditumbuhkan pada



medium agar miring dan diinkubasi pada suhu kamar selama 3 x 24 jam. Kultur ini siap digunakan untuk fermentasi.

4.3.2. Pembuatan Media Cair untuk Inokulum

Komposisi media terdiri dari inulin 1%, yeast ekstrak 0,5%, aquades 25ml. Cara membuatnya adalah semua bahan di atas dilarutkan dalam 25 ml aquades, disterilisasi dalam autoklaf. Media siap ditanami.

4.3.3. Pembuatan inokulum

Koloni yang tumbuh pada media agar miring diambil secara aseptik 2 ose kemudian diinokulasi ke dalam medium cair inokulum 25 ml yang steril. Selanjutnya inokulum ini diinkubasi dengan meletakkan pada *rotary shaker* dengan kecepatan 115 rpm pada temperatur kamar selama tiga hari. Inokulum ini siap digunakan untuk fermentasi.

4.3.4. Produksi Inulinase

Produksi inulinase dilakukan dalam fermentor yaitu 25 ml inokulum ditanamkan pada 250 ml media cair yang steril (ada tujuh komposisi media yang digunakan), difermentasi selama lima hari pada temperatur kamar dan dilakukan panen setiap 12 jam sebanyak 8 ml dalam sebelas tabung reaksi (0 – 5 hari). Medium yang diduga mengandung inulinase ini disaring dengan kertas saring Whatman No. 42 yang telah ditimbang konstan agar terpisah dari jamurnya. Filtrat enzim kasar (hasil penyaringan) digunakan untuk penentuan aktivitas inulinase dan pengukuran konsentrasi gula pereduksi sedangkan jamur (endapan) pada kertas saring digunakan untuk pengukuran biomassa.

Adapun enam komposisi media yang digunakan adalah:

1. Inulin 1%
2. Inulin 1% + $(\text{NH}_4)_2\text{PO}_4$ 0,5%
3. inulin 1% + $(\text{NH}_4)_2\text{PO}_4$ 0,5% + $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,05%
4. Inulin 1% + $(\text{NH}_4)_2\text{PO}_4$ 0,5% + $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,05% + $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,015%
5. Inulin 1% + $(\text{NH}_4)_2\text{PO}_4$ 0,5% + $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,05% + $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,015% + NaCl 0,1%
6. Inulin 1% + $(\text{NH}_4)_2\text{PO}_4$ 0,5% + $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,05% + $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,015% + NaCl 0,1%
+ KCl 0,02%

Media dibuat dengan cara setiap komposisi dilarutkan dalam 250 ml aquades dan disterilisasi dalam autoklaf . Media siap untuk fermentasi.

4.3.5. Penentuan Bobot Biomassa (Gravimetri)

Sebanyak 8 ml sampel dalam sebelas tabung reaksi hasil panen disaring dengan kertas saring yang sudah ditimbang konstan. Tabung dibilas dengan aquades, kemudian dituang pada kertas saring tersebut. Endapan bersama kertas saring dikeringkan dalam oven pada suhu 70 – 80°C sampai kering selama 3 jam, selanjutnya endapan bersama kertas saring tersebut didinginkan dalam desikator selama 30 menit lalu ditimbang. Pekerjaan ini diulang sampai didapatkan berat konstan.

$$\begin{aligned} \text{Berat biomassa} &= \frac{(\text{berat sampel} + \text{kertas saring}) - (\text{berat kertas saring kosong}) \text{ mg}}{8 \text{ ml sampel}} \\ &= \text{mg/ml} \end{aligned}$$

4.3.6. Penentuan Aktivitas Inulinase

Aktivitas inulinase ditentukan dengan mengukur kadar gula pereduksi yang terbentuk dengan metode orto toluidin yaitu filtrat kasar inulinase (hasil penyaringan)

diambil 1 ml ditambah 10 ml substrat (inulin 1%) dan diinkubasi selama 15 jam. Ini juga dilakukan untuk kontrol (1 ml supernatan ditambahkan 10 ml aquades). Hasil inkubasi diukur gula pereduksinya yaitu diambil 1 ml hasil inkubasi ditambahkan 3 ml pereaksi orto toluidin, dipanaskan selama 8 – 10 menit pada temperatur 90°C, didinginkan dan diukur transmittannya dengan Spektrometri Genesis II pada panjang gelombang 630 nm.

Aktivitas inulinase diukur dari konsentrasi gula pereduksi yang dihasilkan setiap mililiter per menit (mmol gula pereduksi/ml/menit).

$$\begin{aligned} \text{Aktivitas inulinase} &= \frac{\text{mmol gula pereduksi produk} - \text{mmol gula pereduksi kontrol}}{\text{Volume sampel} \times 15 \text{ jam} \times 60 \text{ menit}} \\ &= x \text{ mmol gula pereduksi/ml/menit} \end{aligned}$$

4.4. Penentuan Induser

Penentuan induser untuk produksi inulinase dilakukan dengan cara memvariasikan kandungan induser (inulin 1%, pati 1%, sukrosa 1%, selulosa 1%, dan gliserol 1%); pH (4,5; 5,0; 5,5; 6,5), temperatur (30, 40 dan 50°C), dan waktu inkubasi 60 jam. Media uji yang digunakan adalah media terbaik untuk produksi inulinase (dari hasil 4.2.4.) yaitu media III (Inulin 1% + (NH₄)₂PO₄ 0,5% + MgSO₄ 7H₂O 0,05%) Aktivitas inulinase diukur berdasarkan konsentrasi gula pereduksi yang terbentuk (4.3.6.).