

BAB III METODE PENELITIAN

3.1. Alat dan Bahan

3.1.1. Alat

Spektrofotometer Genesis II keluaran Milton Roy Co., USA (No. Catalog 4001/4); Waterbath Termostat 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.

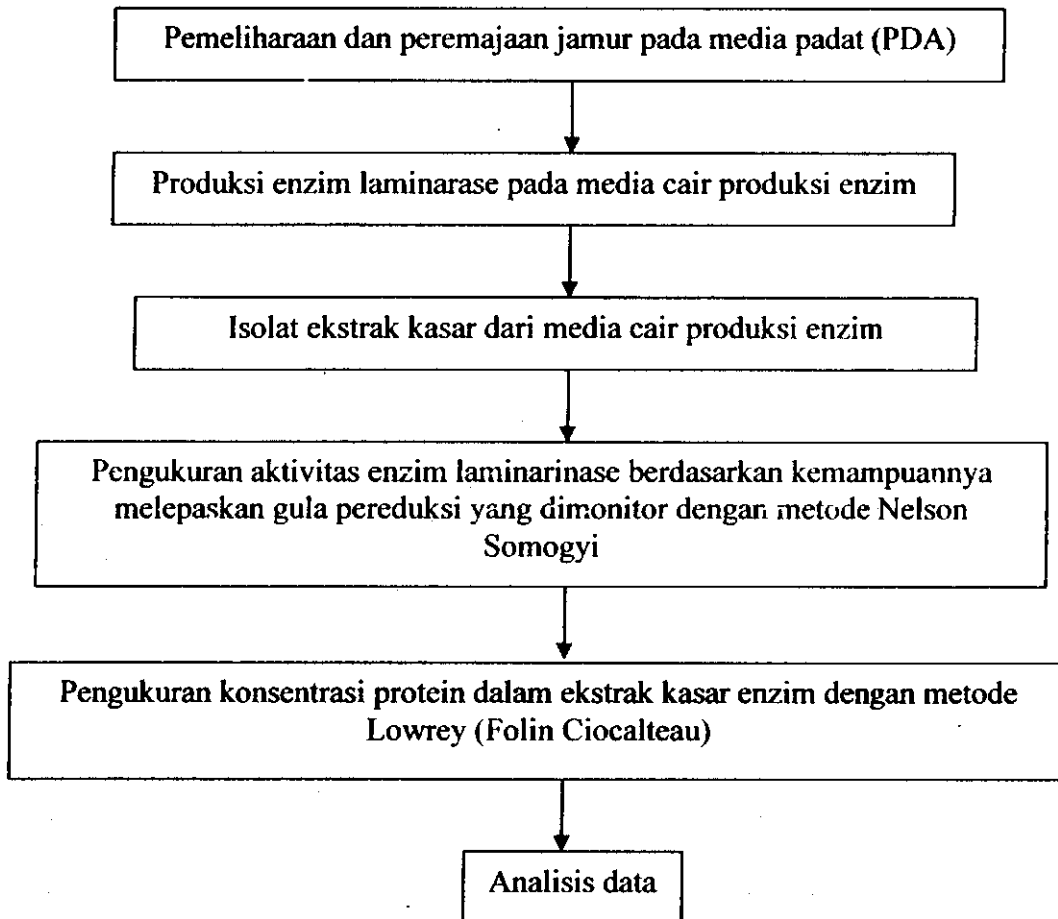
3.1.2. Bahan

Bahan hidup : Isolat *Gliocladium sp* TNC73 dan TNC59, hasil isolasi dari perkebunan coklat Rumbai, Pekanbaru, Riau. Laminarin dari *Laminaria digitata* adalah keluaran SIGMA-Aldrich Chemical Co.St.Louis, MO yang telah dimumikan (nomor catalog L-9634). Laminarinase *Trichoderma sp.* komersial SIGMA-Aldrich Chemical Co.St.Louis, MO (nomor catalog L-5272). Polivinil polipirilidon adalah keluaran SIGMA-Aldrich Chemical Co.St.Louis, MO (nomor catalog P-6755). Bahan-bahan lain yang digunakan adalah bahan tingkat analisis (*analytical grade*), disesuaikan dengan metode kerja.

3.2. Rancangan Penelitian

Produksi enzim dan uji aktivitas spesifik laminarinase adalah berdasarkan peningkatan kemampuan gula pereduksi dari suspensi koloidal laminarin. Konsentrasi gula pereduksi yang terjadi ditentukan dengan metode Nelson-Somogyi. Kadar protein dari larutan enzim ditentukan dengan Metode Lowrey (Folin Ciocalteau) (Vazquez-Garciduenas dkk., 1998) dan akan dibandingkan dengan kontrol.

Adapun secara keseluruhan rancangan metode penelitian dapat dirangkum sebagaimana yang terlihat pada skema gambar 9 :



Gambar 9. Bagan Rancangan Penelitian

3.3. Prosedur Penelitian

3.3.1. Pembuatan media padat untuk pemeliharaan jamur

Tabel 1. Media Potato Dextrose Agar (PDA)

Zat Kimia	Berat atau Volume
Kentang	20 gr
Glukosa	2 gr
Agar (Difco Bacto)	1,7 gr
CaCO ₃	0,02 gr
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,02 gr
Akuades	100 ml

Berdasarkan zat-zat pada tabel 1, maka pembuatan media padat jamur adalah sebagai berikut: kentang 20 gram diiris-iris dan dimasukkan ke dalam 30 ml akuades. Campuran dididihkan selama 20 menit, kemudian disaring dengan kain kasa. Filtrat yang diperoleh dicampurkan dengan glukosa, CaCO₃ dan MgSO₄. 7H₂O yang telah ditimbang. Diatur pH sekitar 7,15-7,25. Akuades ditambahkan hingga volume 100 ml, dan ditambahkan agar. Larutan dididihkan untuk melarutkan agar. Untuk pembuatan agar miring, 5 ml cairan media dimasukkan ke dalam tabung reaksi bertutup kapas atau tutup khusus tabung mikroba. Tutup tabung-tabung dan sterilisasi pada tekanan 15 lb, 121°C selama 20 menit di dalam autoklaf. Tabung-tabung reaksi ini kemudian didinginkan dalam waterbath termostat pada suhu 45°C selama 30 menit. Kemudian ditambahkan asam sitrat hingga konsentrasi 0,05% gram yang disterilisasi uap terpisah dan klortetrasiklin 0,025% gram yang disterilisasi filtrasi atau menggunakan klortetrasiklin suntik yang telah steril dan dilarutkan dalam akudes steril. Selanjutnya tabung-tabung tersebut dimiringkan dan dibiarkan larutan media di dalamnya membeku. Media ini dapat digunakan apabila tidak ada tanda-tanda kontaminasi setelah dibiarkan dua hari dan apabila tidak langsung digunakan disimpan di lemari es pada suhu 4°C.

3.3.2. Peremajaan jamur

Jamur hasil isolasi yaitu *Gliocladium sp.* TNC73 dan TNC59, diambil dengan jarum ose secara aseptis, kemudian diinokulasi pada media agar miring. Selanjutnya diinkubasi pada temperatur kamar selama 7 hari. Setelah 7 hari, masing-masing jamur diinokulasi kembali ke media cair produksi enzim laminarinase.

3.3.3. Pembuatan media cair untuk produksi enzim laminarinase

Tabel 2. Media Cair Produksi Enzim (Supiandi, 1998)

Susunan Nutrisi	Berat atau Volume
KNO ₃	0,25 gr
KH ₂ PO ₄	0,125 gr
MgSO ₄ . 7H ₂ O	0.0625 gr
Laminarin (95% murni)	0,05 gr
Polivinil Polipirolidon	0,25 gr
Buffer Na. Asetat	25 ml

Susunan nutrisi dari media cair untuk produksi enzim laminarinase ditunjukkan pada Tabel 2. Cara membuat media cair adalah semua bahan di atas dilarutkan dalam 25 ml buffer natrium asetat 0,05 M dan pH larutan diatur 5,5. Media ini dimasukkan ke dalam Erlenmeyer sebanyak 25 ml dan disterilisasikan dengan autoklaf pada tekanan 15 lb, 121°C selama 20 menit. Media siap ditanami.

3.3.4. Produksi enzim laminarinase

Koloni *Gliocladium sp.* TNC73 atau TNC59 yang tumbuh pada media padat, diambil sebanyak $\approx 2,5 \times 10^8$ konidia dan diinokulasi ke dalam media cair produksi enzim. Kultur cair ini diinkubasi pada *rotary shaker* dengan kecepatan 150 rpm pada temperatur kamar selama beberapa hari. Pada interval waktu tertentu (3 s/d 9 hari), 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

dinginkan terlebih dahulu pada suhu 8-10⁰C selama 1 (satu) jam, untuk mensentrifuga pada sentrifuga tanpa pendinginan (*non-refrigerated centrifuge*). Apabila digunakan sentrifuga dengan pendinginan, tahap proses pendinginan ini tidak diperlukan. Supernatan disaring dengan filter glass fiber (Whatman GF/C) dan disterilisasi dengan Corning sterile syringe filter 0,45 µm, kemudian ditambahkan NaN₃ hingga konsentrasinya 0,02% ke dalam setiap larutan supernatan.

3.3.5. Penentuan aktivitas enzim laminarinase

Untuk langkah awal diteliti kondisi pengukuran aktivitas enzim terbaik, apakah kondisi penentuan aktivitas enzim laminarinase yang digunakan oleh Vazquez-Garciduenas dkk (1998) untuk laminarinase selama 1 (satu) jam pH 5,5 atau selama 24 jam pH 5,5 yang digunakan oleh Nugroho dkk (2003) untuk berbagai kitinase produksi *Trichoderma sp.* yang dapat diterapkan pada filtrat ekstrak kasar enzim produksi *Gliocladium sp.* Apabila ada perbedaan nyata secara statistik antara kedua kondisi pengukuran dan antara aktivitas enzim dengan kontrol, maka kondisi penentuan tersebut adalah baik. Secara garis besar metode yang digunakan adalah sebagai berikut :

- Tabung sampel diisi dengan 0,25 ml larutan substrat laminarin dari *Laminaria digitata* yang dilarutkan pada buffer Na-asetat 0,05 M pH 5,5. Kemudian diinkubasi selama 5 menit di dalam waterbath suhu 40⁰C. Selanjutnya tabung uji diisi dengan larutan enzim 0,25 ml dan inkubasi dilanjutkan selama 1 (satu) jam atau 24 jam.
- Tabung kontrol (dari awal 5 menit pertama) diisi dengan 0,25 ml substrat laminarin dari *Laminaria digitata* yang dilarutkan pada buffer Na-asetat 0,05 M pH 5,5 dan diinkubasi seperti sampel tanpa penambahan enzim selama inkubasi 1 (satu) jam atau 24 jam.
- Tabung blanko diisi dengan media produksi enzim pH 5,5 Na-asetat sebanyak 0,25 ml, kemudian diinkubasi pada waterbath suhu 40⁰C seperti tabung sampel dan kontrol selama 1 (satu) jam atau 24 jam.



Setelah 1 (satu) jam atau 24 jam, ke dalam masing-masing tabung ditambahkan 0,5 ml reagen Nelson-Somogyi kemudian larutan dihomogenasi. Setelah homogenasi, ke dalam tabung kontrol ditambahkan larutan enzim masing-masing sebanyak 0,25 ml. Panaskan selama 10 menit dalam air mendidih kemudian didinginkan pada suhu kamar. Ke dalam larutan ditambahkan 0,5 ml reagen arsenomolibdat, dan dihomogenasikan kembali, lalu didiamkan selama 5 menit. Sebanyak 3,5 ml akuades ditambahkan ke dalam masing-masing tabung. Larutan dihomogenasikan kembali, dan disaring jika terdapat endapan. Sebagai standar dibuat larutan glukosa pada berbagai konsentrasi (antara 0,01 s/d 0,05 mg/ml). Absorbansi masing-masing larutan diukur dengan spektrofotometer Genesis II sinar tampak pada panjang gelombang 500 nm (Green III dkk., 1989). Untuk membandingkan aktivitas enzim sample dengan kontrol digunakan uji t (Rosner, 1995). Jika diperlukan, larutan enzim diukur aktivitasnya pada berbagai konsentrasi pengenceran.

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

Satu unit aktivitas enzim laminarinase didefinisikan sebagai banyaknya enzim yang melepaskan 1 μmol gula pereduksi permenit.

3.3.6. Penentuan kadar protein metode Lowrey

Larutan enzim (larutan sampel) masing-masing dipipet 0,25 ml dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Kemudian ditambahkan masing-masing 0,5 ml aseton dingin 80% (4°C), dihomogenkan dan disimpan dalam freezer bertemperatur 4°C selama 30 menit. Setelah itu disentrifugasi dengan mikrosentrifuga pada kecepatan 27000 rpm selama 15 menit. Setelah itu tabung yang berisi endapan protein dilarutkan dengan 0,5 ml buffer Na-Asetat pH 5,5, lalu larutan dihomogenasikan hingga endapan protein tersebut larut semua.

Larutan dianalisis dengan metode Lowrey, yaitu larutan sampel protein dipipet 0,5 ml, dimasukkan dalam tabung reaksi dan ditambahkan ke dalam tabung tersebut 2,5 ml reagen C, homogenkan dan dibiarkan pada suhu kamar selama 10 menit. Setelah 10 menit ditambahkan 0,25 ml reagen folin ciocalteau kedalam tabung tersebut kemudian divortex. Diinkubasi tabung tersebut selama 30 menit pada suhu kamar. Serapan masing-masing larutan sample diukur dengan spektrofotometer dengan panjang gelombang 750 nm. Dilakukan perlakuan yang sama terhadap blanko yaitu buffer Na-Asetat. Dari data absorban 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. Analisis Data

Data yang diperoleh dianalisis secara statistik. Untuk membandingkan pengukuran aktivitas enzim dan kontrol pada berbagai kondisi, digunakan uji t (Rosner, 1995). Perbandingan aktivitas spesifik enzim *Gliocladium sp.* TNC73 dan TNC59 dengan laminarinase komersial digunakan uji Duncan jarak berganda menurut Bender dkk (1982). Data juga dianalisis secara grafik untuk menggambarkan aktivitas enzim dalam larutan produksi enzim sebagai fungsi dari waktu produksi.