

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1. Hasil

4.1.1. Hasil pengamatan peremajaan jamur

Kultur murni hasil isolasi laboratorium Biokimia FMIPA Universitas Riau yaitu jamur *Gliocladium sp.* TNC73 dan *Gliocladium sp.* TNC59. Jamur-jamur diremajakan pada media agar miring PDA yang ditambahkan asam sitrat 0,05% dan klorotetrasiklin 0,025%. Masing-masing jamur kemudian diinkubasi selama 7 hari pada suhu kamar. Pada hari ke-2 jamur ini ditumbuhi spora, spora ini membentuk konidiofora dewasa maksimum pada hari ke-7. Jamur *Gliocladium sp.* TNC73 koloninya berwarna putih dan *Gliocladium sp.* TNC59 koloninya berwarna keabu-abuan. Setelah tujuh hari dari masa peremajaan jamur, kedua jamur ini diinokulasi pada media cair untuk produksi enzim laminarinase.

4.1.2 Penentuan kondisi aktivitas enzim laminarinase

Penentuan kondisi aktivitas enzim laminarinase yang digunakan adalah menurut Vazquez-Garciduenas dkk (1998) yaitu pada suhu 40°C, pH 5,5 selama 1 jam untuk laminarinase atau menurut Nugroho dkk (2003) yaitu suhu 40°C, pH 5,5 selama 24 jam untuk berbagai kitinase produksi *Trichoderma sp.* yang dapat diterapkan pada filtrat ekstrak kasar enzim produksi *Gliocladium sp.* Dari hasil uji-t (Tabel 3) membuktikan adanya perbedaan nyata secara statistik konsentrasi gula pereduksi antara sampel dan kontrol pada kedua kondisi pengukuran. Ternyata apabila dibandingkan dengan uji-t aktivitas enzim hasil inkubasi substrat dengan sampel ekstrak kasar enzim selama 1 (satu) jam dan 24 jam terdapat perbedaan yang nyata (Tabel 4 dan lampiran 3). Dengan demikian dapat disimpulkan bahwa kondisi pengukuran aktivitas enzim baik dilakukan pada suhu 40°C, pH 5,5 buffer Natrium Asetat selama 1 (satu) jam. Selanjutnya pengukuran aktivitas enzim akan dilakukan pada kondisi suhu 40°C, pH 5,5 buffer Na-Asetat selama inkubasi 1 (satu) jam substrat.

Tabel 3. Rata-rata konsentrasi gula pereduksi pada penentuan kondisi aktivitas enzim laminarinase

Waktu	Rata-rata Konsentrasi Gula Pereduksi (µg/ml)*		Uji-t pada P=0,05	Kesimpulan
	Sampel	Kontrol		
1 Jam	38,575 ± 1,931	0	t Hitung > t Tabel 36,921 > 2,447	Ada perbedaan yang signifikan
24 Jam	158,650 ± 7,239	7,611 ± 0,379	t Hitung > t Tabel 41,672 > 2,447	Ada perbedaan yang signifikan

* Rata-rata dari empat kali pengulangan

Tabel 4. Rata-rata aktivitas enzim laminarinase pada penentuan kondisi aktivitas enzim laminarinase

Waktu	Rata-rata aktivitas enzim laminarinase (Unit/ml)*	Uji-t pada P=0,05	Kesimpulan
1 Jam	0,01428 ± 0,00072	t Hitung > t Tabel 32,896 > 2,447	Ada perbedaan yang signifikan
24 Jam	0,00233 ± 0,00011		

* Rata-rata dari empat kali pengulangan

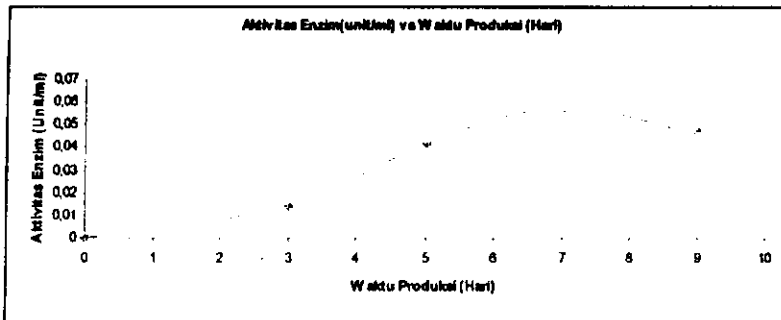
4.1.3 Penentuan aktivitas ekstrak kasar enzim laminarinase

Penentuan aktivitas enzim sampel dan kontrol untuk melepaskan gula pereduksi yang terbentuk ditentukan pada waktu inkubasi suhu 40°C selama 1 jam, pH 5,5 Na-Asetat untuk setiap masing-masing variasi waktu produksi enzim (0,2% laminarin dari *Laminaria digitata*). Besarnya aktivitas enzim laminarinase dari *Gliocladium sp.* TNC73 dan *Gliocladium sp.* TNC59 dapat dilihat pada tabel 5 dan gambar 11.

Tabel 5. Aktivitas laminarinase berdasarkan variasi waktu produksi enzim dari *Gliocladium sp.* TNC73

Waktu Produksi Enzim (Hari)	Aktivitas Enzim (Unit/ml)
3	(0,01428 ± 0,00071) ^d
5	(0,04180 ± 0,00074) ^c
7	(0,05775 ± 0,00209) ^a
9	(0,04600 ± 0,00103) ^b

- Harga rata-rata dengan pangkat yang huruf yang sama, tidak berbeda secara nyata pada tingkat 5% ($p \geq 0,05$). Sedangkan, harga rata-rata dengan pangkat huruf berbeda adalah berbeda secara nyata pada tingkat 5% ($p < 0,05$) berdasarkan uji Duncan jarak berganda.

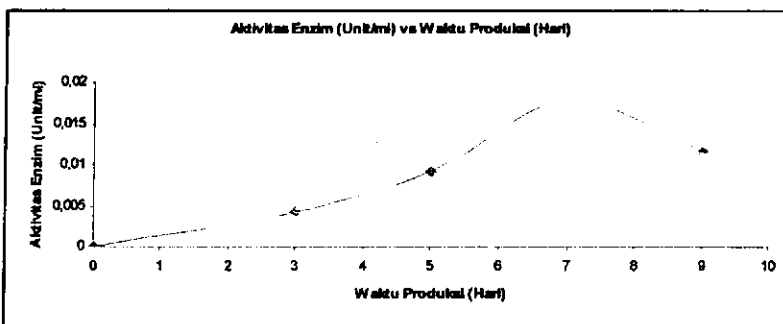


Gambar 10. Aktivitas laminarinase berdasarkan variasi waktu produksi enzim dari *Gliocladium sp.* TNC73

Setelah data rata-rata aktivitas laminarinase diuji secara Duncan jarak berganda, ternyata keempat variasi waktu produksi enzim laminarinase dari *Gliocladium sp.* TNC73 memberikan aktivitas yang berbeda nyata ($p < 0,05$) (lampiran 8). Aktivitas laminarinase tertinggi ekstrak kasar enzim berada pada variasi waktu produksi enzim 7 hari sebesar 0,05775 unit/ml ekstrak kasar enzim.

Tabel 6. Aktivitas laminarinase berdasarkan variasi waktu produksi enzim dari *Gliocladium sp.* TNC59

Waktu Produksi Enzim (Hari)	Aktivitas Enzim (Unit/ml)
3	(0,00428 ± 0,00032) ^a
5	(0,00906 ± 0,00015) ^c
7	(0,01778 ± 0,00011) ^a
9	(0,01156 ± 0,00022) ^b



Gambar 11. Aktivitas laminarinase berdasarkan variasi waktu produksi enzim dari *Gliocladium sp.* TNC59

Hasil uji Duncan jarak berganda aktivitas laminarinase dari *Gliocladium sp.* TNC59 menunjukkan adanya perbedaan nyata antara rata-rata aktivitas enzim laminarinase ($p < 0,05$) (lampiran 13). Aktivitas enzim laminarinase tertinggi dari *Gliocladium sp.* TNC59 juga ditemukan pada waktu produksi enzim 7 hari yaitu 0,01778 unit/ml ekstrak kasar enzim.

4.1.4 Penentuan aktivitas spesifik ekstrak kasar enzim laminarinase

Aktivitas spesifik ditentukan dengan cara membagi data aktivitas enzim dengan kadar proteinnya. Dari perhitungan diperoleh aktivitas spesifik untuk masing-masing jamur adalah seperti yang ditunjukkan pada tabel 7. Rata-rata aktivitas spesifik tertinggi adalah pada laminarinase komersial dari *Trichoderma sp.*, selanjutnya berturut-turut *Gliocladium sp.* TNC73 dan *Gliocladium sp.* TNC59.

Tabel 7. Aktivitas spesifik ekstrak kasar enzim laminarinase dari *Gliocladium sp.* TNC73 dan TNC59 dan laminarinase komersial dari *Trichoderma sp.*

Sampel Jamur	Aktivitas Spesifik Enzim (Unit/ μ g protein)
<i>Gliocladium sp.</i> TNC73	(0,01014 \pm 0,00078) ^b
<i>Gliocladium sp.</i> TNC59	(0,00192 \pm 0,00003) ^b
Laminarinase Komersial	(0,07574 \pm 0,01228) ^a

Data aktivitas spesifik dari masing-masing sampel jamur penghasil enzim laminarinase dianalisis dengan metode Duncan jarak berganda (lampiran 21). Hasil analisis dari ketiga jamur tersebut diperoleh aktivitas yang berbeda nyata ($p < 0,05$). Tabel 7 menunjukkan bahwa dari analisis Duncan jarak berganda ternyata aktivitas spesifik pada laminarinase komersial dari *Trichoderma sp.* berbeda nyata ($p < 0,05$) dengan aktivitas spesifik *Gliocladium sp.* TNC73 dan *Gliocladium sp.* TNC59. Sedangkan pada ekstrak kasar enzim produksi *Gliocladium sp.* TNC73 dan *Gliocladium sp.* TNC59, dimana satu dengan yang lainnya tidak berbeda nyata ($p \geq 0,05$).

4.2. Pembahasan

4.2.1. Peremajaan jamur

Peremajaan masing-masing jamur yaitu *Gliocladium sp.* TNC73 dan *Gliocladium sp.* TNC59 dilakukan pada media agar miring PDA. Media agar miring PDA tersebut ditambahkan asam sitrat 0,05% dan klorotetrasiklin 0,025% yang berfungsi untuk menghambat pertumbuhan bakteri. Penambahan asam sitrat dapat menurunkan pH supaya bakteri tidak dapat tumbuh sehingga kemungkinan terjadinya kontaminasi dapat dihindari. Penurunan pH akibat penambahan asam sitrat tidak akan mempengaruhi pertumbuhan jamur karena jamur biasanya tumbuh optimum pada pH 4,5-5,5 sedangkan mikroba atau bakteri tidak dapat hidup pada pH tersebut (Sutedjo, 1991).

4.2.2 Penentuan kondisi aktivitas enzim laminarinase

Penentuan kondisi aktivitas enzim laminarinase bertujuan agar ditemukannya kondisi terbaik untuk dapat dihasilkannya aktivitas enzim tertinggi. Dari hasil penelitian, aktivitas enzim inkubasi 1 jam lebih baik dari pada 24 jam pada suhu 40°C pH 5,5 buffer Na-asetat 0,05 M. Terjadinya perbedaan yang signifikan antara inkubasi sampel substrat selama 1 (satu) jam dan 24 jam hal ini disebabkan karena terjadinya kerusakan enzim oleh karena waktu inkubasi yang terlalu lama, yaitu selama 24 jam dengan suhu 40°C, mungkin menyebabkan sebagian enzim mengalami denaturasi. Pemilihan kondisi inkubasi pada suhu 40°C dan pH 5,5 Na-Asetat berdasarkan penelitian Oktavianis (2007) untuk xilanase dan deasetilase pada *Trichoderma sp.*

4.2.3 Aktivitas ekstrak kasar enzim laminarinase

Enzim laminarinase dari *Gliocladium sp.* TNC73 dan TNC59 dapat terdeteksi sebagai enzim yang diproduksi secara ekstraselular. Produksi dan isolasi enzim ekstraselular mempunyai keuntungan yang lebih besar karena tidak memerlukan teknik penghancuran sel yang mahal. Isolasi enzim ekstraselular ini dilakukan dengan cara sentrifugasi dingin untuk memisahkan sel jamur dari media pertumbuhan atau produksi enzim, sehingga diperoleh ekstrak kasar enzim

ekstrakselular (Darwis dan Sukara, 1990). Apabila ekstrak kasar enzim tersebut akan disimpan, maka ke dalam larutan enzim ini ditambahkan larutan NaN_3 untuk menghambat pertumbuhan bakteri. Selain itu, ekstrak kasar enzim yang diperoleh disterilisasi filtrasi dengan *Corning Sterile Syringe Filter* $0,45 \mu\text{m}$ agar pada filtrat ekstrak kasar enzim tidak terdapat lagi jamur. Apabila masih terdapat sel jamur maka sel jamur tersebut dapat mengganggu pada penggunaan ekstrak kasar enzim itu lebih lanjut karena proses metabolisme selnya. Untuk penstabil enzim dan mencegah berkurangnya aktivitas enzim, maka pada media cair produksi enzim ditambahkan 1% polivinil polipirrolidon.

Isolat jamur *Gliocladium sp.* TNC73 dan *Gliocladium sp.* TNC59 akan terinduksi memproduksi enzim sesuai dengan sumber karbon yang diberikan. Untuk menginduksi isolat jamur *Gliocladium sp.* TNC73 dan TNC59 memproduksi laminarinase, maka pada media cair untuk produksi enzim ditambahkan laminarin sebagai substrat. Laminarin adalah sumber karbon utama untuk jamur penghasil enzim laminarinase dan juga menginduksi produksi laminarinase pada jamur. Hal ini disesuaikan dengan teori Jacob-Monod tentang induksi enzim. Adanya gen laminarinase dengan induser laminarin, karena induser ini mampu mengikat protein represor, sehingga mengakibatkan protein represor menjadi tidak aktif berikatan dengan gen operator. Akibatnya RNA polimerase dapat berikatan dengan gen promotor dan proses transkripsi serta translasi dapat berlangsung untuk menghasilkan enzim laminarinase.

Aktivitas enzim laminarinase diukur berdasarkan kemampuannya melepaskan gula pereduksi dari laminarin. Laminarin dihidrolisis menjadi unit monomer gula pereduksi. Konsentrasi gula pereduksi yang dilepaskan, dimonitor dengan metode Nelson-Somogyi (Green III dkk., 1989).

Laminarinase dari *Gliocladium sp.* TNC73 dan TNC59, terdeteksi dalam ekstrak kasar enzim dari keempat variasi waktu produksi enzim. Aktivitas tertinggi *Gliocladium sp.* TNC73 dan TNC59 didapat pada produksi enzim hari ke-7 dengan masing-masing aktivitasnya adalah 0,05775 unit/ml dan 0,01778 unit/ml ekstrak kasar enzim. Hal ini sangat jauh berbeda dengan *Trichoderma harzianum* IMI206040 galur asal Meksiko dan *Trichoderma viride* U-1 galur asal

Jepang yang menghasilkan laminarinase pada hari ke-2 produksi enzim (Vasquez dkk, 1998 dan Nobe dkk, 2003). Kemungkinan *Trichoderma sp.* ini memiliki kemampuan respon yang lebih cepat terhadap adanya substrat laminarin di lingkungannya. Produksi laminarinase *Gliocladium sp.* TNC73 dan TNC59 setelah hari ke-7 mengalami penurunan. Sesuai teori Jacob-Monod, glukosa adalah represor dari gen penghasil karbohidrase. Dalam hal ini glukosa akan merepresi gen laminarinase. Apabila jumlah laminarinase dalam media sudah cukup banyak untuk mendegradasi laminarin menghasilkan glukosa dan konsentrasi glukosanya juga sudah melebihi kebutuhan, maka glukosa berlebih akan merepresi gen laminarinase secara tak langsung. Glukosa dapat merepresi gen laminarinase, misalnya dengan menginduksi gen represor untuk menghasilkan lebih banyak represor dari gen laminarinase. Akibatnya, produksi laminarinase akan berkurang. Jadi di atas hari ke-7 belum tentu mulai terjadi kematian dan pengurangan sel jamur, tetapi yang jelas jumlah laminarinase berkurang, kemungkinan karena sudah terdapat cukup glukosa dalam media pertumbuhan jamur tersebut.

4.2.4 Perbandingan aktivitas spesifik enzim laminarinase

Aktivitas spesifik enzim menunjukkan suatu ukuran kemurnian enzim. Semakin tinggi aktivitas spesifik enzim maka semakin tinggi pula tingkat kemurnian enzim tersebut. Aktivitas spesifik diperoleh dari aktivitas enzim dibagi dengan kadar protein yang dikandungnya. Data aktivitas spesifik dari ekstrak kasar enzim tidak dapat dijadikan tolak ukur dari kemurnian enzim tersebut, karena belum dilakukan proses pemurnian enzim. Namun untuk laminarinase komersial sudah dapat dipastikan bahwa enzim tersebut dalam keadaan lebih murni karena sudah melalui proses pemurnian, meskipun mungkin masih pemurnian parsial. Kandungan protein dari larutan enzim sangat mempengaruhi aktivitas spesifik enzim. Hal ini disebabkan semakin tinggi aktivitas spesifik enzim maka kandungan protein semakin kecil karena protein yang terukur hanya protein enzim tersebut.

Jumlah unit yang diambil untuk masing-masing sampel jamur adalah sama yaitu sekitar 0,02 unit. Pengambilan unit yang sama pada aktivitas enzim tertinggi bertujuan untuk membandingkan aktivitas spesifik dari masing-masing sampel jamur. Hasil penelitian aktivitas spesifik pada laminarinase komersial dari *Trichoderma sp.* berbeda nyata ($p < 0,05$) dengan aktivitas spesifik *Gliocladium sp.* TNC73 dan *Gliocladium sp.* TNC59. Hal ini karena laminarinase komersial dari *Trichoderma sp.* lebih murni dari pada *Gliocladium sp.* TNC73 dan *Gliocladium sp.* TNC59 yang belum dilakukan proses pemurnian. Sedangkan aktivitas spesifik terendah terdapat pada ekstrak kasar enzim produksi *Gliocladium sp.* TNC73 dan *Gliocladium sp.* TNC59 yang satu dengan yang lainnya tidak berbeda nyata ($p \geq 0,05$).