

















#### 4.6.7.1 Pengukuran Aktivitas $\beta$ -glukosidase

Dua gram sampel tanah yang telah diayak dilarutkan dalam bufer asetat 0,05 M (pH 5, disesuaikan dengan pH sampel tanah) hingga volume 5 ml ( $V_1$ ) dan diaduk dengan menggunakan bar magnetik selama 1 menit. Reaksi enzimatik diawali dengan penambahan 5 ml substrat analog 5 mM (*p*-nitrophenol- $\beta$ -D-glukopiranoside) ( $V_2$ ). Larutan diinkubasi dalam shaker inkubator selama 3 jam pada suhu 30°C. Larutan kontrol juga diinkubasi secara bersamaan yaitu (1) 5 ml larutan tanah ditambahkan 5 ml buffer asetat sebagai kontrol sampel, dan (2) 5 ml buffer asetat ditambahkan 5 ml substrat analog 5 mM (*p*-nitrophenol- $\beta$ -D-glukopiranoside) sebagai kontrol substrat. Setelah inkubasi larutan disentrifus pada kecepatan 8.000 rpm selama 5 menit dan 1 ml supernatan dimasukkan ke dalam tabung yang berisi 1 ml 1 N NaOH untuk menghentikan reaksi enzimatik dan yang menyebabkan terjadinya perubahan warna larutan. Dicukupkan volume larutan hingga mencapai 3 ml dengan menambahkan aquadest dan di vorteks. Absorbansi diukur menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 410 nm. Aktivitas enzim diekspresikan sebagai  $\mu\text{mol/jam/g}$  berat kering tanah dan dihitung menggunakan rumus:

$$\text{Aktivitas Enzim} = \frac{\text{OD}}{(\text{EC})/(\text{V}_1) (\text{T}) (\text{B}_k) (\text{V}_2)}$$

Keterangan: OD = Absorbansi sampel setelah dikurangi absorbansi ke 2 kontrol  
EC = Koefesien *p*-nitrophenol [3,4  $\mu\text{mol/ml}$ ]  
 $V_1$  = Volume larutan tanah + Buffer asetat (5 ml)  
 $V_2$  =  $V_1$  + Substrat analog (10 ml)  
T = Waktu inkubasi (jam)  
 $B_k$  = Berat kering tanah (g)

Kurva standar dibuat dengan pengenceran larutan *p*-nitrophenol 1  $\mu\text{mol/ml}$ . Larutan standar (*p*-nitrophenol) 1 ml ditambahkan 1 ml NaOH 1.0 N dan kemudian 3 ml aquadest, kemudian dibaca nilai absorbansinya.

#### 4.6.7.2 Pengukuran Aktivitas Selobiohidrolase

Aktivitas selobiohidrolase ditentukan dengan cara yang sama dengan penentuan aktivitas  $\beta$ -glukosidase, hanya saja reaksi enzimatik berlangsung dengan inkubasi selama 4 jam dengan konsentrasi substrat analog adalah 2 mM.

