

BAB III. METODOLOGI PENELITIAN

3.1. Alat dan Bahan.

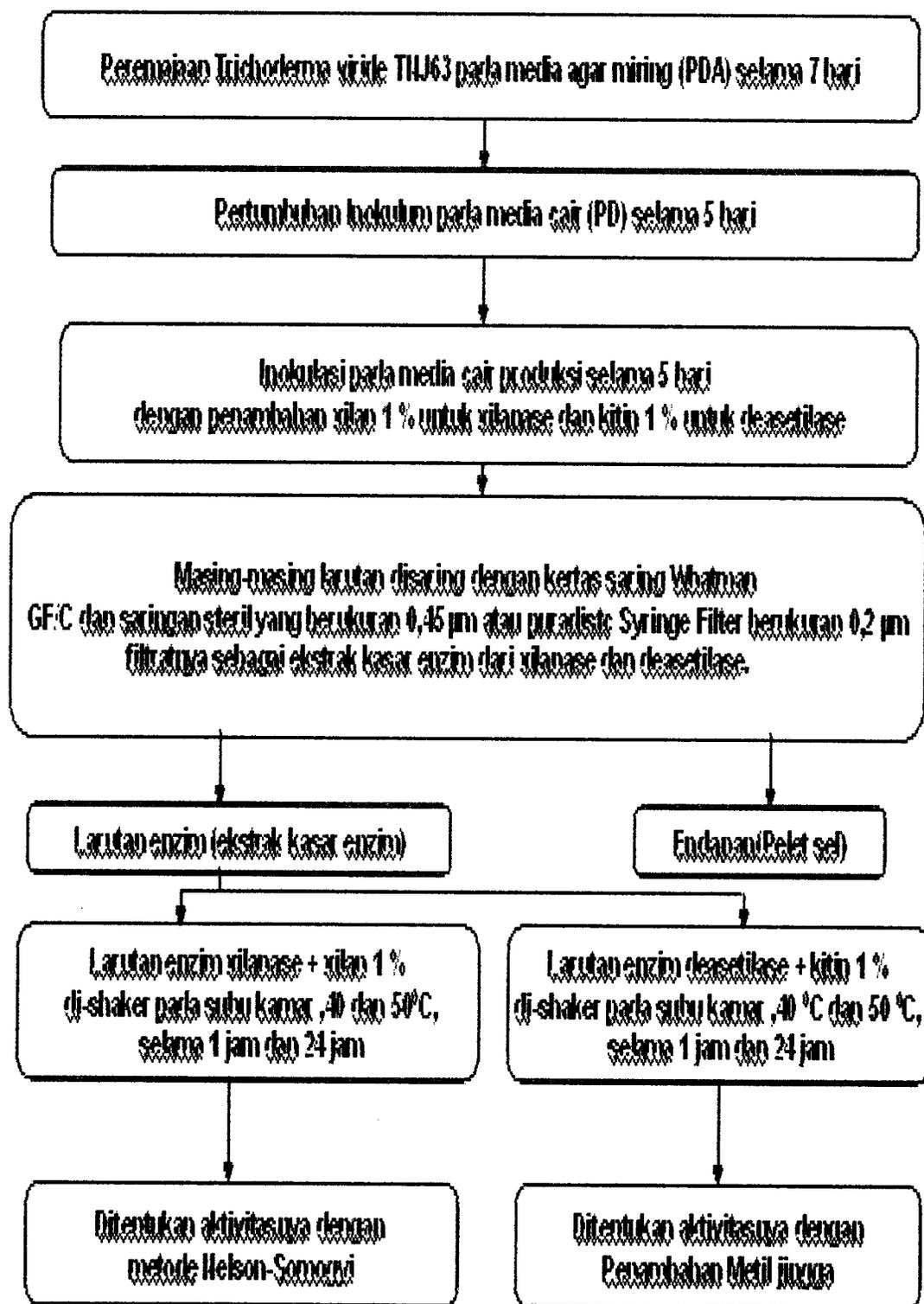
Alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain Spektronik Genesis 20 keluaran Milton Roy Co. USA cat.No.400; Laminar Flow (ESCO Micro PTE LTD HD 3 ; Rotari Shaker ; Hot Plate; Vortex Mixer Genie 2TM Cat.No.12-82 dan alat-alat gelas lainnya yang digunakan dilaboratorium biokimia.

Sedangkan bahan yang digunakan adalah *Trichoderma viride* TNJ63 Diperole dari koleksi laboratorium biokimia Jurusan kimia FMIPA UNRI; Xilan *From oat Spelts* (Cat.No.C-9752) keluaran Sigma *Biochemicals* ;Serum Bovin Albumin (Cat No.8655); Kitin *From Crab Shells* (Cat No.9752) dan bahan-bahan kimia lainnya sesuai prosedur kerja.

3.2. Rancangan Penelitian.

Penelitian ini diawali dengan peremajaan kultur *Trichoderma viride* TNJ63 dalam media mirin PDA selama 7 hari. Kemudian dibiakan dalam media cair PD untuk pembuatan inokulum selama 5 hari sebagai starter produksi dan selanjutnya dimasukan kedalam media produksi yang bahannya sama dengan media inokulum dengan penambahan xilan 1% untuk xilanase dan kitin 1% untuk deasetilase. Masing-masing media produksi produksi enzim diinkubasi selama 5 hari.

Pengukuran aktivitas dimulai dengan larutan enzim ekstra seluler ditambah xilan atau kitin dengan masing-masing konsentrasi 1% dan variasi waktu inkubasi 1 jam dan 24 jam pada suhu kamar 40⁰C dan 50⁰C. Hasil aktivitas enzim xilanase berupa gula perduksi yang dimonitor dengan metode Nelson Somogyi, sedangkan aktivitas deasetilase berupa asam asetat yang dimonitor dengan penambahan metil jingga menggunakan spektrofotometer sinar tampak.yang gambar skema rancangan penelitian dapat dilihat pada gambar 1 berikut.



Gambar 3. Skema rancangan penelitian

3.2.1. Peremajaan jamur dan pembuatan inokulum.

Peremajaan Jamur *Trichoderma* dimulai dengan pembuatan media padat PDA (Patato Dextrose Agar) dengan komposisi sebagai berikut: kentang 200 gram, glukosa 200 gram, agar bacto 17 gram dalam air 1000 mL. Cara membuatnya adalah kentang sebanyak 200 gram diiris tipis-tipis dimasukan kedalam 500 mL air, dididihkan selama 20 menit, kemudian disaring dengan kain kasa. Filtrat yang diperoleh dicampur dengan glukosa dan agar, selanjutnya ditambahkan air sampai volume 1000 mL. Campuran semuanya dipanaskan sampai agarnya larut. Untuk pembuatan agar miring masukan 5 mL kedalam tabung reaksi, tabung ditutup dengan kapas dan disterilasi pada tekanan 15 lb, 121°C selama 20 menit di dalam autoklaf. Setelah disterilisasi media yang tidak langsung dipergunakan disimpan di lemari es pada suhu 4°C. Media yang akan dipergunakan didinginkan dalam posisi miring untuk media agar miring. Selanjutnya media siap diremajakan. Diambil sebanyak 1 ose jamur *Trichoderma* TNJ63 secara aseptis, kemudian ditanam pada agar miring selanjutnya diinkubasi selama 7 hari pada suhu kamar.

Spora dan miselium dari koloni yang tumbuh pada media agar miring diatas, di lepas dari medianya dengan cara memesukan 2 mL air suling steril ke dalam media agar miring tersebut dan menggesek-gesekan jarum ose pada agar miring supaya semua spora terlepas dari media, selanjutnya dituang kedalam media cair yang sudah dipersiapkan untuk inokulum (media cair 20 mL) dan di inkubasi selama 5 hari pada *rotary shaker* ,suhu kamar.

3.2.2. Pembuatan media cair produksi enzim.

Sebanyak 200 gram kentang diiris-iris, dimasukan ke dalam 500mL air suling kemudian di rebus selama 20 menit, selanjutnya di saring dengan kain kasa. Filtrat diperoleh dicampur dengan glukosa 20 gram, lalu dijadikan volumenya 1000 mL dengan air suling. Media selanjutnya dibagi-bagi kedalam erlemeyer 50 mL lalu ditambah kitin atau xilan 1% kemudian disterilisasi pada 15 lb,121°C selama 20 menit dalam autoclaf. Setelah dingin media siap digunakan. Inokulum yang sudah berumur 5 hari di atas ditumbuhkan dalam media produksi (media cair 50 mL), kemudian di inkubasi pada *rotary shaker* selama 7 hari, suhu kamar.

3.2.3. Produksi dan isolasi enzim xilanase dan deasetilase.

Hasil fermentasi pada media produksi di atas yang diduga mengandung enzim xilanase atau deasetilase dipisahkan dari pellet selnya dengan cara penyaringan, menggunakan kertas saring whatman GF/C dan saringan steril yang berukuran 0,45 μm atau puradistic Syringe Filter berukuran 0,2 μm filtratnya sebagai ekstrak kasar enzim dari xilanase dan deasetilase.

3. 3. Penentuan Aktivitas Xylanase dan Deasetilase

Aktivitas xylanase diukur dengan menghitung banyaknya gula reduksi yang dilepaskan oleh xylan dengan metoda Nelson Somogyi. Aktivitas xylanase di defenisikan sebagai jumlah mikro mol gula reduksi yang terbentuk permenit pada kondisi operasional.

Sampel sebanyak 1 mL ekstrak kasar enzim di tambah substrat xilan 1 %, inkubasi dengan *rotary shaker* waktu inkubasi 1 jam dan 24 jam pada suhu kamar, 40⁰C dan 50⁰C. Hasil aktivitas enzim xilanase berupa gula pereduksi yang dimonitor dengan metode Nelson Somogyi, sedangkan aktivitas deasetilase berupa asam asetat yang dimonitor dengan penambahan metil jingga menggunakan spektrofotometer sinar tampak. Untuk kontrol perlakuan sama seperti pada sampel ekstrak kasar enzim, hanya saja tanpa substrat xilan atau kitin, sedangkan untuk blanko digunakan air suling.

Gula pereduksi hasil dari aktivitas xilanase diukur dengan metoda Nelson Somogyi dengan cara sebagai berikut: sebanyak masing-masing 0,5 mL larutan sampel, blanko dan kontrol dimasukkan kedalam masing-masing tabung reaksi lalu ditambah 0,5 mL reagen Nelson Somogyi selanjutnya tabung reaksi diletakan kedalam penangas air mendidih selama 20 menit dengan menutup mulut tabung pakai kelereng. Tabung kemudian didinginkan dalam penangas yang berisi air es sampai suhunya sama dengan suhu kamar, kemudian masing-masing tabung ditambah 0,5 mL larutan arsenomolibdat dan 3,5 mL air suling lalu diaduk dengan *vortex*. Serapan ketiga larutan diukur dengan spektrofotometer pada $\lambda=660$ nm. Dari data absorbansi yang diperoleh dapat ditentukan konsentrasi gula pereduksi yang dihasilkan dengan membuat kurva standar glukosa yang konsentrasinya divariasikan. Aktivitas enzim dihitung dengan rumas sebagai berikut:

$$\text{Aktivitas enzim} = \frac{\mu \text{ g gula pereduksi sampel} - \mu \text{ g gula pereduksi kontrol}}{\text{volume sampel} \times \text{jam} \times \text{menit}}$$

Untuk enzim deasetilase pengukurannya sebagai berikut senyawa asetat hasil dari aktivitas deasetilase diukur dengan cara , sebanyak masing-masing 1mL larutan sample (*Crude* enzim), blanko dan kontrol dimasukkan kedalam masing-masing tabung reaksi lalu ditambah 0,01 mL metil jingga. lalu diaduk dengan *vortex*. Serapan ketiga larutan diukur dengan spektrofotometer pada $\lambda=507$ nm. Dari data absorban yang diperoleh dapat ditentukan konsentrasi senyawa asetat yang dilepaskan dengan membuat kurva standar asam asetat yang konsentrasinya divariasikan. Aktivitas enzim dihitung dengan rumas sebagai berikut:

$$\text{Aktivitas enzim} = \frac{[\text{konsentrasi asam pada sampel}] - [\text{konsentrasi asam pada kontrol}]}{\text{volume sampel} \times \text{jam} \times \text{menit}}$$