

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di laboratorium Biokimia FMIPA-UNRI selama kurang lebih enam bulan.

3.2 Alat dan Bahan

3.2.1 Alat-alat yang digunakan

Alat-alat yang digunakan adalah: *Autoclaf* 1925x (Wisconsin Aluminium Foundry Co. Inc., Monitowoc); pH meter 210 Orion (Orion research Inc. USA); *Waterbath thermostat* WK-24 (Shibata Scientific Technology Ltd); *Rotary Shaker* (Stuart scientific Inggris); Spektronic Genesis 20 keluaran Milton Roy Co. USA Cat. No. 400; *Laminar flow* (ESCO Micro PTE LTD HD 3); Pompa vakum β -169 (Fisher General Scientific Private Limited, Singapura); *Vortex mixer* Genie 2TM Cat. No. 12-82; sterilisasi filtrasi dilakukan menggunakan Coming sterile syringe 0,45 μ m (Cat. No. 431220); tabung eppendrof dan peralatan gelas yang biasa digunakan di laboratorium biokimia sesuai dengan prosedur kerja

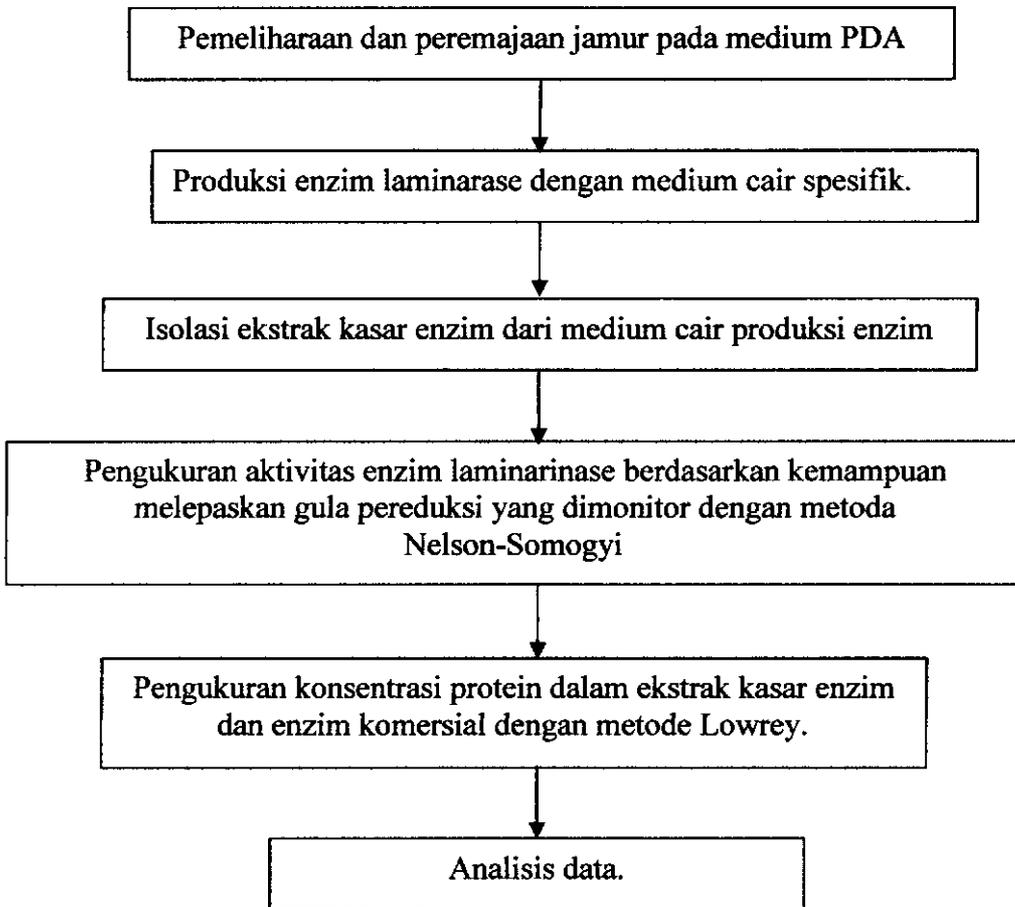
3.2.2 Bahan – bahan yang digunakan

Bahan-bahan yang digunakan adalah: Kultur *Trichoderma asperellum* TNJ63 dan TNC52 koleksi laboratorium Biokimia-FMIPA, Universitas Riau, laminarin dari *Laminaria digitata* (SIGMA-aldrich, Cat. No. L9634), Laminarinase *Trichoderma sp.* Komersial SIGMA-Aldrich Chemical Co. St. Louis (SIGMA-Aldrich, Cat. No. L-5272), polivinil polipirolidon (SIGMA-aldrich Cat. No. P6755), standar protein untuk penentuan konsentrasi protein adalah Albumin bovine serum fraction V (ex. Hopkin & Williams, Cat. No. 114255), bahan kimia lain adalah proanalisis atau bahan preparatif sesuai prosedur kerja.

3.3 Metode Penelitian

Produksi enzim atau uji aktivitas Laminarinase yang dihasilkan *T. asperellum* TNC52 dan TNJ63 adalah berdasarkan peningkatan kemampuan

melepaskan gula pereduksi dari suspensi koloidal Laminarin. Kenaikan konsentrasi gula-gula pereduksi yang terjadi dimonitor dengan metode Nelson-Somogy (Green III dkk., 1989) dan dibandingkan dengan kontrol. Secara garis besar rancangan penelitian dapat digambarkan sebagai berikut:



Gambar 6. Rancangan Penelitian

3.4 Prosedur Kerja

3.4.1 Pembuatan media padat untuk pemeliharaan jamur penghasil enzim laminarinase

Tabel 1. Media padat Potato Dextrose Agar (PDA).

| Zat kimia | Berat atau volume |
|--------------------------------------|-------------------|
| Kentang | 200,00 g |
| Glukosa | 20,00 g |
| Agar Batang | 17,00 g |
| CaCO ₃ | 0,20 g |
| MgSO ₄ .7H ₂ O | 0,20 g |
| Akuades | 1000 mL |

Cara membuatnya adalah kentang 200,00 g diiris-iris dan dimasukkan ke dalam 300 ml akuades didihkan selama 20 menit, kemudian disaring dengan kain kasa. Filtrat yang diperoleh dicampur dengan glukosa, CaCO₃ dan MgSO₄.7H₂O yang telah ditimbang. Akuades ditambahkan ke dalam campuran hingga volume 1 L, kemudian ditambahkan agar dan selanjutnya dipanaskan sampai agarnya larut. Agar miring dibuat dengan memasukkan 5 mL cairan media kedalam tabung reaksi tertutup. Tutup tabung-tabung reaksi tersebut dan sterilisasi pada tekanan 15 lb, 121 °C selama 20 menit dalam autoklaf. Media untuk isolat-isolat jamur yang digunakan pada penelitian lebih lanjut, setelah disterilisasi ditambahkan secara aseptis asam sitrat 0,05 g yang telah disterilisasi terpisah. Media yang tidak langsung digunakan disimpan pada lemari es pada temperatur 4⁰C. Media yang akan digunakan dicairkan dan didinginkan pada posisi miring.

3.4.2 Pembuatan media cair untuk produksi enzim laminarinase

Susunan nutrisi dari media cair untuk produksi enzim laminarinase adalah:

Tabel 2. Media cair produksi laminarinase.

| Nama Bahan | Berat dan Volume |
|--------------------------------------|------------------|
| KNO ₃ | 0,25 g |
| KH ₂ PO ₄ | 0,125 g |
| MgSO ₄ .7H ₂ O | 0,0625 g |
| Laminarin | 0,05 g |
| Polivinil polipirolidon | 0,25 g |
| Bufer Na-asetat | 25 mL |

Cara pembuatan media cair adalah masing-masing bahan pada tabel 2 dilarutkan dalam bufer Na-asetat 25 mL dan pH larutan diatur 5,5. Media cair di atas dimasukkan ke dalam erlenmeyer sebanyak 25 mL, disterilisasi dengan autoklaf pada 15 lb, 121⁰C selama 20 menit. Media siap ditanami.

3.4.3 Produksi enzim Laminarinase

Koloni *T. asperellum* TNC52 dan TNJ63 yang diperoleh pada media padat hasil isolasi diambil sebanyak $\sim 2,5 \cdot 10^8$ konidia/mL (Wahyuningsih, 1998), kemudian dimasukkan ke dalam media cair (25 mL dalam erlenmeyer) dan diinkubasi dengan meletakkan dalam *rotary shaker* dengan kecepatan 150 rpm selama 3 hari, 5 hari dan 7 hari untuk *T. asperellum* TNJ63 sedangkan untuk *T. asperellum* TNC52 diinkubasi selama 2, 3, 5 dan 7 hari pada temperatur kamar. Penentuan kondisi optimum produksi enzim dilakukan dengan cara sebagai berikut: Media 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 didinginkan terlebih dahulu pada suhu 4⁰C selama 1 jam. Supernatan disaring dengan *filter glass fiber* (Whatman GF/C No. Katalog 1822 055) dan disterilisasi dengan *Corning sterile syringe filter* 0,45 μ m (No. Katalog 431220). Supernatan yang didapat ditambahkan dengan NaN₃ dengan konsentrasi 0,02% dalam larutan supernatan.

3.4.4 Pengukuran aktivitas Laminarinase pada *T. asperellum* TNJ63 dan TNC52.

Mula-mula dilakukan penentuan kondisi pengukuran aktivitas laminarinase pada dua kondisi, untuk mendapatkan kondisi pengukuran yang baik. Kondisi pengukuran aktifitas enzim yang baik adalah apabila ada perbedaan nyata secara statistik antara konsentrasi gula pereduksi yang dihasilkan sebagai kerja enzim pada sampel, dengan konsentrasi gula pereduksi pada kontrol. Vazquez-Garciduenas dkk. (1998) melakukan pengukuran aktivitas laminarinase pada suhu 40⁰C, pH 5,5 selama 1 jam, sedangkan Green III dkk. (1989) melakukan pengukuran aktivitas berbagai karbohidrase pada suhu 40⁰C, pH 5,5 selama 24 jam. Oleh karena itu, pada penelitian ini dilakukan perbandingan aktivitas enzim laminarinase yang diperoleh dengan kedua waktu inkubasi tersebut. Secara garis besar metode yang digunakan adalah sebagai berikut:

1. Sampel

Larutan sampel terdiri dari 250 μ L larutan substrat 0,2%, kemudian diinkubasi dalam penangas air pada temperatur 40⁰C selama 5 menit. Setelah 5 menit, ke dalam tabung sampel ditambahkan ekstrak kasar enzim sebanyak 250 μ L. Tabung sampel kemudian diinkubasi selama 1 jam atau 24 jam pada temperatur 40⁰C.

2. Kontrol

Tabung kontrol berisi 250 μ L larutan substrat 0,2% diinkubasi selama 5 menit bersamaan dengan tabung sampel. Inkubasi dilanjutkan tanpa penambahan enzim selama 1 jam, atau 24 jam pada temperatur 40⁰C.

3. Blanko

Larutan yang digunakan sebagai blanko 250 μ L buffer natrium asetat 0,05 M pH 5,5, diinkubasi selama 1 jam, atau 24 jam pada temperatur 40⁰C. Blanko ini perlakuannya sama dengan sampel.

Gula pereduksi hasil reaksi diukur dengan metode Nelson-Somogyi dengan cara sebagai berikut: Setelah 1 jam, atau 24 jam ke dalam masing-masing tabung ditambahkan 0,5 mL reagen Nelson-Somogyi kemudian di vortex. Masing-masing larutan dipindahkan ke dalam tabung reaksi yang bersih, kemudian ke dalam tabung kontrol dan blanko ditambahkan larutan enzim masing-masing 250 μ L dan dipanaskan selama 10 menit. Setelah 10 menit, larutan

didinginkan pada suhu kamar. Masing-masing tabung ditambahkan 0,5 mL arsenomolibdat, agar larutan tercampur dengan baik kemudian larutan divortex, selanjutnya didiamkan selama 5 menit. Masing-masing tabung yang telah didiamkan 5 menit, dimasukkan 3,5 mL akuades. Larutan divortex kembali. Absorbansi masing-masing larutan tersebut diukur dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 500 nm (Green III dkk., 1989). Kurva standard dibuat dengan mengukur glukosa yang dilarutkan pada bufer Na-asetat 0,05 M pH 5,5 pada berbagai konsentrasi dengan metode Nelson-Somogyi. Semua pekerjaan diulang empat kali.

3.4.4.1 Perhitungan aktivitas enzim

Aktivitas enzim laminarinase non spesifik diketahui dari gula pereduksi yang dihasilkan setiap permiliter sampel persatuan waktu inkubasi ($\mu\text{mol gula pereduksi} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{menit}^{-1}$).

$$\begin{aligned} \text{Aktivitas enzim} &= \frac{\mu \text{ mol gula pereduksi sampel} - \mu \text{ mol gula reduksi kontrol}}{\text{Volume sampel} \times \text{Waktu inkubasi}} \\ &= X \mu \text{ mol gula pereduksi} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{menit}^{-1} \end{aligned}$$

3.5 Penentuan kadar protein dalam larutan enzim dengan cara Lowrey

Untuk menghilangkan zat lain yang dapat mengganggu proses pengukuran kadar protein di dalam larutan ekstrak kasar enzim, maka perlu dilakukan pengendapan dengan aseton dingin (-20°C), sebagai berikut: Larutan enzim (larutan sampel) dipipet 0,5 mL dan dimasukkan ke dalam eppendrof. Kemudian ditambahkan 0,5 mL aseton dingin (-20°C). Larutan ini divortex, kemudian didinginkan dalam freezer suhu -20°C selama 30 menit. Setelah pendinginan, larutan disentrifuga dengan sentrifuga mikro pada kecepatan 13.000xg selama 10 menit. Filtrat dituang, dan endapan dikeringkan dalam udara pada suhu kamar selama 30 menit untuk menghilangkan aseton tersisa. Endapan dilarutkan kembali dalam 0,5 mL buffer Na-asetat 0,05 M pH 5,5 dan di vortex. Larutan protein dianalisis dengan metode Lowrey, sebagai berikut: Larutan sampel (larutan enzim), dipindahkan ke dalam tabung reaksi. Ke dalam tabung reaksi tersebut, ditambahkan 2,5 mL reagen C, kemudian divortex dan dibiarkan pada suhu kamar

selama 10 menit. Setelah 10 menit ditambahkan 0,5 mL reagen Folin-ciocalteau dan dikocok dengan vortex. Tabung reaksi tersebut didinginkan selama 30 menit pada suhu kamar. Serapan masing-masing larutan diukur dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 750 nm. Dilakukanlah hal yang sama pada blanko yaitu 0,5 mL bufer natrium asetat 0,05 M pH 5,5. Kadar protein ditentukan dengan menggunakan kurva standard protein berupa albumin bovine serum fraction V yang dilarutkan dalam bufer Na-asetat 0,05 M pH 5,5 pada berbagai konsentrasi. Aktivitas spesifik masing-masing enzim ditentukan dengan rumus:

$$\begin{aligned} \text{Aktivitas spesifik enzim} &= \frac{\text{aktivitas enzim}}{\text{mg protein}} \\ &= y \mu \text{ mol gula pereduksi / menit / mg protein} \end{aligned}$$

3.6 Analisis data

Data yang diperoleh dianalisis secara statistik. Untuk membandingkan nilai konsentrasi gula pereduksi sampel dengan kontrol pada berbagai waktu inkubasi, sehingga diperoleh nilai waktu inkubasi terbaik, digunakan uji Student-t (Rosner, 1995). Perbandingan aktivitas spesifik enzim sampel dengan enzim laminarinase komersial dilakukan menggunakan 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.