BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

3.1. Alat dan Bahan

3.1.1. Alat- alat yang digunakan

Autoklaf 1925x (Wisconsin Alumunium Foundry Co. Inc., Manitowoc); pHmeter 210 A orion (Orion Research Inc., USA); *waterbath thermostat* WK-24 (Shibata Scientific Technology Ltd.); rotary shaker (Stuart Scientific Inggris); alat-alat gelas yang biasa digunakan di laboratorium sesuai dengan prosedur kerja.

3.1.2. Bahan yang digunakan

Bahan hidup : Jamur *T. asperellum* TNJ63 koleksi Laboratorium Biokimia UNRI

Bahan kimia : CMC (karboksi metil selulosa) keluaran BDH Chemical Ltd Poole England (Cat No. 27929); kitin from crab shells (Cat. No. C-7170); agar batang dan bahan-bahan yang lain-lain sesuai dengan prosedur kerja adalah bertingkat preparatif.

3.2. Rancangan Penelitian

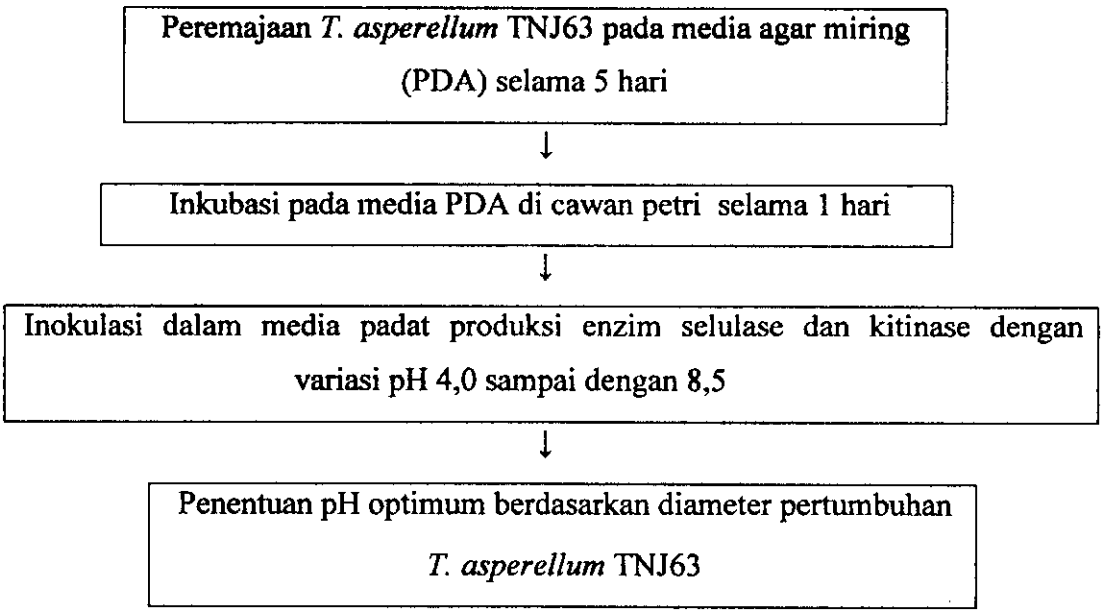
Mula-mula dilakukan peremajan jamur *T. asperellum* TNJ63 pada medium PDA Setelah diremajakan, jamur *T. asperellum TNJ63* ditanam kembali pada media padat produksi enzim selulase dan media padat produksi enzim kitinase dengan variasi pH 4,0 sampai dengan 8,5 untuk mencari pH optimum. Pemilihan batas pH ini merujuk pada penelitian Kredics dkk., (2004).

Jamur diinkubasi kembali pada media padat produksi enzim dengan menggunakan pH optimum sedangkan potensial air divariasikan dari -1,0 MPa sampai dengan -11,0 Mpa melalui penambahan garam, sehingga diperoleh potensial air optimum pada media produksi enzim selulase dan kitinase. Pemilihan batas potensial air ini merujuk pada penelitian Kredics dkk., (2000). Evaluasi pertumbuhan miselium jamur dalam media padat dengan beberapa variasi potensial air diamati dengan menghitung diameter pertumbuhan kemudian diperoleh korelasi antara pH medium dan potensial air pada medium yang menghasilkan pertumbuhan

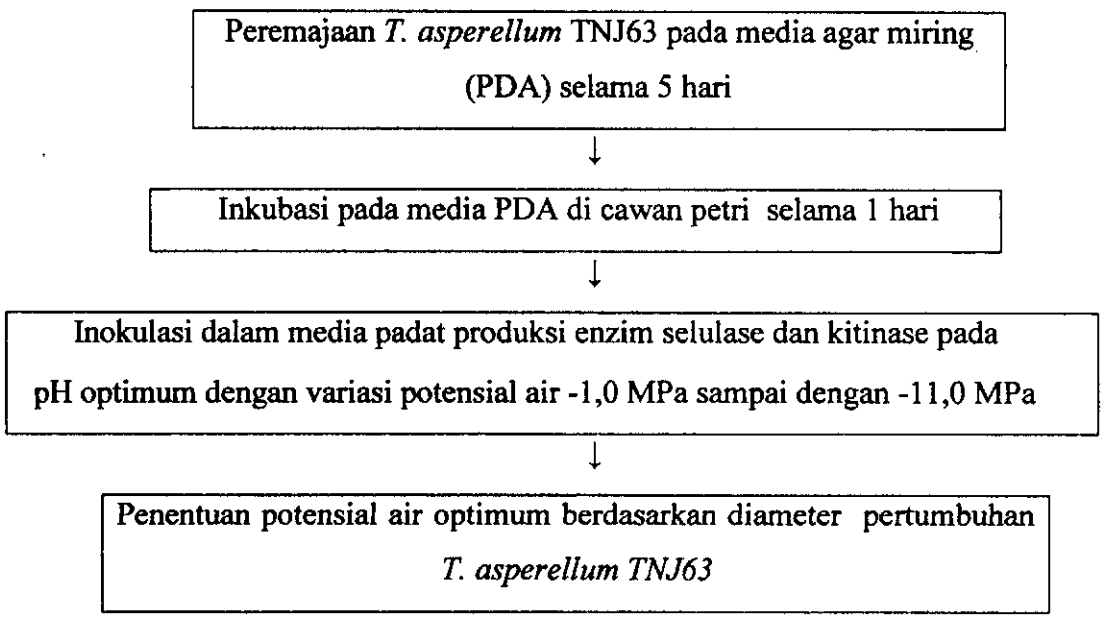
Repository University Of Riau
PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS RIAU
http://repository.unri.ac.id/

miselium paling baik. Secara garis besar rancangan penelitian diilustrasikan pada gambar 2.

A. Optimalisasi pH terhadap pertumbuhan miselium *T. asperellum* TNJ63



B. Optimalisasi potensial air terhadap pertumbuhan miselium *T. asperellum* TNJ63.



Gambar 4. Rancangan Penelitian

Repository University Of Riau
PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS RIAU
http://repository.unri.ac.id/

3.3. Pelaksanaan Penelitian

3.3.1. Pembuatan medium padat untuk peremajaan jamur

Pembuatan medium padat Potato Dextrose Agar (PDA) adalah sesuai bahan-bahan yang ditunjukkan tabel 1.

Tabel 1. Media PDA

Bahan	Jumlah
Air	1000 ml
Kentang	200 gr
Glukosa	20 gr
Agar Bacto	17 gr
$MgSO_4.7H_2O$	0,20 gr
$CaCO_3$	0,20 gr

Kentang 200 gr diiris-iris dan dimasukkan kedalam 500 ml air dan dididihkan selama 20 menit, kemudian campuran disaring dengan kain kasa. Filtrat dicampur dengan glukosa, $CaCO_3$ dan $MgSO_4.7H_2O$. pH larutan diatur sekitar 7,15-7,25 dan ditambahkan air hingga volume 1000 ml, kemudian ditambahkan agar bacto, dan larutan dipanaskan sampai agarnya larut. Agar miring dibuat dengan cara 5 ml cairan medium dimasukkan ke dalam tabung reaksi tertutup dan disterilisasi pada tekanan 15 lb, 121°C, selama 20 menit di dalam autoklaf. Tabung-tabung reaksi tersebut dipindahkan ke dalam waterbath termostat suhu 45°C selama 20 menit, kemudian ditambahkan asam sitrat 0,05 gram yang telah disterilisasi secara terpisah. Selanjutnya tabung-tabung tersebut dimiringkan dan dibiarkan larutan media didalamnya membeku selama dua hari. Media ini dapat langsung digunakan apabila tidak ada tanda-tanda kontaminasi, apabila media ini tidak langsung digunakan dapat disimpan dalam lemari es pada suhu 4^0C.

3.3.2. Peremajaan *T. asperellum* TNJ63 dalam media PDA.

Kedalam tabung media agar miring yang berisi stok *T. aspreellum* TNJ63 dimasukkan 1 ml air steril. Selanjutnya spora dilepaskan ke air dengan menggunakan jarum ose steril. Secara aseptis sebanyak 100 µl air dipindahkan ke atas media PDA dalam cawan petri. Sebarkan air tersebut dengan batang kaca L atau ujung pipet steril. Media PDA yang telah diinokulasi diinkubasi selama sehari.

Repository University Of Riau
PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS RIAU
http://repository.unri.ac.id/

3.3.3. Optimalisasi pH pada medium produksi enzim selulase dan kitinase

A. Pembuatan medium produksi enzim selulase.

Bahan untuk media produksi enzim selulase berdasarkan media Nugroho dkk. (1999) ditunjukkan tabel 2.

Tabel 2. Media produksi enzim selulase.

Bahan	Jumlah
$Ca(NO_3)_2$	0,1 gr
KNO_3	0,026 gr
$MgSO_4.\ 7H_2O$	0,026 gr
KH_2PO_4	0,012 gr
$CaCl_2.\ 2H_2O$	0,1 gr
Agar batang	2 gr
CMC	0,05 gr
Buffer sesuai pH	100 ml

Semua bahan diatas dilarutkan dalam buffer sitrat-posfat dengan variasi pH dari 4,0; 4,5; 5,0; 5,5; 6,0; 6,5; 7,0; dan dengan buffer Tris (hidroksimetil) aminometan dan pH divariasikan dari 7,5; 8,0; dan 8,5 hingga volume 50 ml, kemudian volume dijadikan 100 ml dan ditambahkan agar 2 gr. Campuran ini disterilisasi dengan autoklaf pada tekanan 15 lb, 121^{0}C selama 20 menit dengan pengecualian untuk media dengan pH dibawah 6. Media dengan pH di bawah 6, sterilisasi agar dan buffer dilakukan terpisah, yaitu 50 ml media berisi agar dan 50 ml buffer. Setelah steril, kedua media terpisah itu diinkubasi pada suhu 50^{0}C selama 15-30 menit, baru keduanya dicampur dan dituang ke cawan petri.

B. Pembuatan medium produksi enzim kitinase.

Bahan untuk media produksi enzim kitinase berdasarkan media Nugroho dkk. (1999) ditunjukkan tabel 3.

Repository University Of Riau
PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS RIAU
http://repository.unri.ac.id/

Tabel 3. Media produksi enzim kitinase.

Bahan	Jumlah
$Ca(NO_3)_2$	0,1 gr
KNO_3	0,026 gr
$MgSO_4.\ 7H_2O$	0,026 gr
KH_2PO_4	0,012 gr
$CaCl_2.\ 2H_2O$	0,1 gr
Agar batang	2 gr
Crab Shell Chitin	0,05 gr
Buffer sesuai pH	100 ml

Semua bahan diatas dilarutkan dalam buffer sitrat-posfat dengan variasi pH dari 4,0; 4,5; 5,0; 5,5; 6,0; 6,5; 7,0; dan dengan buffer Tris (hidroksimetil) aminometan dan pH divariasikan dari 7,5; 8,0; dan 8,5 hingga volume 50 ml, kemudian volume dijadikan 100 ml dan ditambahkan agar 2 gr. Campuran ini disterilisasi dengan autoklaf pada tekanan 15 lb, 121^{0}C selama 20 menit dengan pengecualian untuk media dengan pH dibawah 6. Media dengan pH di bawah 6, sterilisasi agar dan buffer dilakukan terpisah, yaitu 50 ml media berisi agar dan 50 ml buffer. Setelah steril, kedua media terpisah itu diinkubasi pada suhu 50^{0}C selama 15-30 menit, baru keduanya dicampur dan dituang ke cawan petri.

C. Optimalisasi pH terhadap pertumbuhan miselium *T. asperellum* TNJ63

Medium produksi enzim selulase dan kitinase dengan pH berbeda (4,0; 4,5; 5,0; 5,5; 6,0; 6,5; 7,0; 7,5; 8,0; dan 8,5) sebanyak 30 ml dituang ke dalam cawan petri dengan diameter 9 cm. Larutan ini dibiarkan mengeras selama 1 malam dengan posisi terbalik. Selanjutnya, inokulum dalam medium PDA dipotong menggunakan pelubang khusus sehingga memiliki diameter 0,5 cm dan diletakkan pada media produksi enzim selulase dan kitinase tersebut. Pertumbuhan miselium diamati setiap hari dengan cara mengukur diameter pertumbuhan miselium *T. asperellum TNJ63* selama 5 hari disesuaikan dengan ukuran cawan petri sebesar 9,0 cm. Pengulangan dilakukan sebanyak 3 kali untuk tiap-tiap variabel pH.

Repository University Of Riau
PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS RIAU
http://repository.unri.ac.id/

D. Analisis pH optimum media produksi enzim terhadap pertumbuhan miselium yang diamati

Koloni *T. asperellum* TNJ63 dalam media produksi enzim diamati selama 5 hari pada suhu kamar. Pertumbuhan rata-rata diambil dari 3 kali pengulangan. Diameter koloni terbesar merupakan pH optimumnya. Kemudian percobaan selanjutnya dilakukan pada nilai pH optimum.

3.3.4. Penentuan potensial air optimum untuk pertumbuhan miselium *T. asperellum TNJ63* dalam media produksi enzim selulase dan kitinase.

Penentuan potensial air dilakukan pada pH optimum dengan memvariasikan potensial air pada -1,0 Mpa; -2,0 MPa; -3,0 MPa; -4,0 MPa; -5,0 MPa; -6,0 Mpa; -7,0 MPa; -8,0 MPa; -9,0 MPa; -10,0 Mpa; -11,0 MPa. Variasi nilai potensial air dapat diperoleh melalui penambahan NaCl berdasarkan tabel Chirife dan Resnik, 1994 dan persamaan 8 (lampiran 8), dengan asumsi potensial air yang disumbang oleh garam matriks media dianggap mendekati nol. Contoh perhitungan sebagai berikut:

- Potensial air -1,0 MPa

$$Potensial\ \ air = \left(\frac{RT \ln a_w}{V_w}\right)$$

$$-1\,MPa = \frac{(8.31 x10^{-5}\ m^3\ bar/mol\ K)(310\ K)(\ln\ a_w)}{18 x10^{-6}\ m^3/mol}$$

$$a_w = 0.9993$$

- Potensial air -2,0 MPa

$$Potensial\ \ air = \left(\frac{RT \ln a_w}{V_w}\right)$$

$$-2\,MPa = \frac{(8.31 x10^{-5}\ m^3\ bar/mol\ K)(310\ K)(\ln\ a_w)}{18 x10^{-6}\ m^3/mol}$$

$$a_w = 0.9985$$

- Potensial air -3,0 MPa

$$Potensial\ \ air = \left(\frac{RT \ln a_w}{V_w}\right)$$

$$-3\,MPa = \frac{(8.31 x10^{-5}\ m^3\ bar/mol\ K)(310\ K)(\ln\ a_w)}{18 x10^{-6}\ m^3/mol}$$

$a_w = 0.9979$

Repository University Of Riau
PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS RIAU
http://repository.unri.ac.id/

Tabel 4. Nilai potensial air dan a_w pada berbagai variasi konsentrasi NaCl(m) berdasarkan tabel Chirife dan Resnik (lampiran 10) dan grafik molalitas NaCl Vs Aktivitas air (lampiran 11).

Potensial air (MPa)	a_w	NaCl (m)
-1,0	0,9993	0,0241
-2,0	0,9985	0,0482
-3,0	0,9978	0,0693
-4,0	0,9971	0,0904
-5,0	0,9964	0,1114
-6,0	0,9956	0,1355
-7,0	0,9949	0,1566
-8,0	0,9942	0,1777
-9,0	0,9935	0,1987
-10,0	0,9928	0,2199
-11,0	0,9920	0,2439

Setelah memvariasikan potensial air dengan penambahan NaCl pada media produksi enzim, pengamatan pertumbuhan miselium sama dengan perlakuan terhadap pH. Pertumbuhan optimum miselium diamati berdasarkan besarnya diameter koloni *T. asperellum* TNJ63.

3.3.5. Analisis data

Dari data ukuran diameter pertumbuhan koloni dari tiap-tiap sampel pada pH 4,0 sampai dengan 8,5, maka dibuat tabel dan grafik hubungan ukuran koloni sebagai fungsi pH. Pengamatan juga dianalisis berdasarkan data ukuran diameter koloni dari tiap-tiap sampel dengan variasi potensial air dari -1,0 MPa sampai dengan -11,0 MPa pada pH optimum yang dilakukan dengan tiga kali pengulangan. Kemudian dibuat tabel dan grafik hubungan nilai rata-rata ukuran diameter koloni sebagai fungsi potensial air pada pH optimum.

3.3.6. Dokumentasi

Untuk dokumentasi penelitian, pada setiap hari ke-2 dari pertumbuhan koloni pada berbagai media produksi enzim dengan berbagai pH atau potensial air, dilakukan pemotretan (fotografi), dengan foto digital.

Repository University Of Riau
PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS RIAU
http://repository.unri.ac.id/