

III. METODE PENELITIAN

A. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi Jurusan Biologi FMIPA Universitas Lampung dari bulan Juni 2011 sampai dengan Januari 2012

B. Alat dan Bahan

1. Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini yaitu *laminar air flow cabinet*, *autoclave*, neraca analitik, inkubator, jarum ose, erlenmeyer, kompor listrik, *vortex mixer*, mikropipet, pipet tips, spektrofotometer, botol selai, kapas, tabung reaksi, aluminium foil, batang pengaduk, botol aquades, lampu spiritus, orbital shaker, centrifuge, mikrotube, water bath shaker, gelas ukur, pinset, dan water bath.

2. Bahan

Bahan yang digunakan adalah bagas dari PT. GMP Gunung Sugih Lampung Tengah, PDA (*Potato Dextrose Agar*), CMC (*Carboxymethyl Cellulose*), aquades, garam fisiologis, KH_2PO_4 , FeSO_4 , buffer sitrat, pospat buffer, tris buffer, DNS (*3,5-dinitrosalicylic acid*), urea ($\text{CO}(\text{NH}_2)_2$), alkohol 70%, dan spiritus.

C. Metode Penelitian

Uji pengaruh penambahan urea terhadap produksi dan karakterisasi enzim selulase pada media bagas menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) 3 ulangan. Kadar konsentrasi urea yang digunakan yaitu 0% (w/v); 0,03% (w/v); 0,06% (w/v); 0,09% (w/v); dan 0,12% (w/v). Parameter yang diamati yaitu aktivitas enzim selulase dari masing-masing konsentrasi yang ditentukan berdasarkan kadar glukosa yang terbentuk dari reaksi enzimatik antara ekstrak enzim selulase dengan CMC (*Carboxymethylcellulose*) sebagai substrat.

D. Analisis Data

Data yang diperoleh dilakukan analisis ragam, dan apabila di antara perlakuan terdapat perbedaan nyata pada taraf kepercayaan 5%, analisis dilanjutkan dengan menggunakan polinomial orthogonal.

E. Produksi Enzim Selulase

1. Penyiapan Suspensi spora

Isolat fungi yang telah diremajakan pada PDA miring diinkubasi selama 3 hari. Pada masing-masing isolat tersebut dimasukkan larutan NaCl steril dan dilakukan pemisahan antara spora dengan media menggunakan *vortex mixer*. Kemudian dilakukan pemisahan antara suspensi dengan medianya (PDA) sehingga diperoleh suspensi spora.

2. Penyiapan Media Fermentasi

Media fermentasi didasarkan pada media yang digunakan oleh Ahamed dan Vermette (2008). Kedalam 1 liter aquades dilarutkan 2,0 g KH_2PO_4 ; 0,005 g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. Kemudian dari larutan tersebut diambil sebanyak 200 ml lalu ditambahkan urea sesuai konsentrasi yang di tentukan. Sebanyak 1,35 g bagas dimasukkan ke dalam botol selai kemudian ditambahkan 45 mL larutan urea. Campuran tersebut disterilisasi pada temperatur 121°C selama 15 menit.

3. Produksi Enzim Selulase

Suspensi spora diambil sebanyak 1,8 ml lalu diinokulasikan pada media fermentasi dan diinkubasi pada orbital shaker selama 4 hari (Purwadaria, 2003). Produksi enzim selulase ditentukan berdasarkan aktivitas enzim. Aktivitas enzim tersebut dapat diketahui dari besarnya kadar glukosa dengan menggunakan spektrofotometer (Mursyid dkk, 2007) .

4. Penentuan Aktivitas Enzim Selulase

Uji aktivitas enzim selulase dilakukan berdasarkan kadar glukosa. Kadar glukosa diukur dengan menggunakan metode DNS (Miller, 1959). Isolat fungi yang telah diinkubasi kemudian dipanen. Sebanyak 1 ml ekstrak enzim diambil dan dicentrifuge selama 2 menit. Kemudian diambil sebanyak 0,5 mL dan dicampurkan dengan CMC 0,5% sebanyak 0,5 mL dan diinkubasi selama 30 menit pada *water bath* pada suhu 40⁰ C. Reaksi terakhir dilakukan dengan menambahkan 1 mL 3,5-dinitrosaliclic acid. Dihomogenkan dan dipanaskan kedalam air mendidih selama 15 menit. Kemudian didinginkan ke dalam air dingin selama 20 menit selanjutnya diukur absorbansinya dengan menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 540 nm. Absorbansi yang diperoleh digunakan untuk menentukan kadar gula dengan rumus persamaan regresi linear $Y = a + bx$. a dan b diperoleh dari perhitungan gula standar, Y adalah nilai absorbansi pada panjang gelombang 540 nm, x adalah kadar glukosa yang dihasilkan. Satu unit dari aktivitas selulase didefinisikan sebagai jumlah dari enzim yang melepaskan μmol glukosa dalam satu menit pada kondisi pengujian.

Penentuan aktivitas enzim selulase per unit dapat di tentukan dengan rumus:

$$\text{Aktivitas enzim} = \frac{\text{kadar glukosa} \times \text{faktor pengenceran}}$$

$$\text{Berat Molekul Glukosa} \times \text{waktu inkubasi}$$

Keterangan :

Faktor pengenceran : x kali

Berat Molekul glukosa : 180

Waktu Inkubasi : 30 menit

F. Karakterisasi Enzim

Setelah diperoleh konsentrasi optimum, maka dilakukan karakterisasi yang meliputi:

1. Karakterisasi Suhu

Pengujian suhu optimum selulase dilakukan dengan mereaksikan enzim selulase dengan substrat CMC 0,5% selama 30 menit pada suhu 30⁰C - 70⁰C dengan selang suhu 10⁰C. Pengujian dilakukan dengan cara menginkubasi reaksi enzim-substrat pada suhu 30⁰C, 40⁰C, 50⁰C, 60⁰C dan 70⁰C di waterbathshaker selama 30 menit.

2. Karakterisasi pH

Pengujian pH optimum selulase dilakukan dengan mereaksikan enzim selulase dengan substrat CMC 0,5% selama 30 menit pada suhu 40⁰C pada berbagai kondisi pH larutan buffer dengan selang pH 1 unit, yaitu menggunakan buffer sitrat untuk pH 4 dan 5, buffer fosfat untuk pH 6 dan 7, buffer tris untuk pH 8 dan 9.

3. Karakterisasi Termostabilitas Enzim

Supernatan enzim diinkubasi pada suhu 40⁰C, 50⁰C, 60⁰C, dan 70⁰C dengan waktu sampling setiap 30 menit selama 3 jam kemudian direaksikan seperti biasa.

G. Pembuatan Kurva Standar Glukosa

Larutan gula reduksi glukosa merupakan larutan gula standar yang digunakan pada interval 0-300 μg yaitu 0 μg , 50 μg , 100 μg , 150 μg , 200 μg , 250 μg , 250 μg , dan 300 μg , masing-masing larutan diambil sebanyak 0,5 ml, ditambahkan 0,5 ml larutan CMC sebagai substrat dan pereaksi DNS. Divortex hingga homogen, kemudian dipanaskan dalam air mendidih selama 15 menit. Selanjutnya didinginkan dengan merendamnya kedalam air dingin selama 20 menit. Pengukuran absorbansi dilakukan dengan menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 540 nm (Miller, 1959).

H. Prosedur Kerja



