

III. METODOLOGI PENELITIAN

A. Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilaksanakan dari bulan Maret 2011 sampai dengan bulan November 2011 di Laboratorium Mikrobiologi Balai Riset dan Standarisasi Industri Bandar Lampung, Laboratorium Biomasa dan Laboratorium Biokimia Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lampung.

B. Alat dan Bahan

1) Alat- alat yang digunakan

Dalam penelitian ini alat-alat yang digunakan adalah alat gelas, Orbital shaker, magnetic stirrer, pH meter, kertas saring whatman no 42, vakum, mikropipet, PCR, inkubator, laminar air flow, tabung sentrifuga, autoclave, oven, pcr spektrofotometer UV-VIS dan penangas air.

2) Bahan-bahan yang digunakan

Adapun bahan-bahan yang digunakan adalah Potato Dextrose Agar (PDA) Merck, kentang, dextrose Merck, biakan murni *Aspergillus aculeatus* isolat tanah humus, yeast ekstrak, NaCl Merck, HCl Merck, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ Merck, KH_2PO_4 Merck, MgSO_4 Merck, K_2HPO_4 , kitin Biotec Superfindo, NaOH Merck, buffer

phospat, asam asetat Merck, garam Rochelle (KNa-tartarat) Merck, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ Merck, air destilasi, Na_2CO_3 Merck, sodium azida (NaN_3) Merck, NaOH Merck, kantong selofan, etanol, metanol, reagen Folin-Ciocalteu, indol, NaNO_2 Merck, amonium sulfamat, glukosamin, koloidal kitin, asam asetat anhidrida, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ Merck, Bovine Serum Albumin (BSA), Na_2HPO_4 Merck, dan NaH_2PO_4 Merck.

C. Prosedur Penelitian

1. Identifikasi DNA *Aspergillus aculeatus*

1.1 Ekstraksi dan purifikasi DNA

Ekstraksi dan purifikasi DNA dari miselium jamur yang ditumbuhkan pada medium *Potato Dextrose Broth* (PDB) selama 5-7 hari dilakukan dengan *Nucleon™ PhytoPure™ Genomic DNA Extraction Kits* (GE Healthcare) dan dilanjutkan dengan siklus sekuensing. Tahap-tahap yang dilakukan dalam mengisolasi DNA dari filamentous fungi menggunakan *nucleon phytopure™* (GE Healthcare) adalah sebagai berikut:

1. *Breaking of the cell wall* (Memecah dinding sel)

Pemecahan dinding pada tahap ini dilakukan secara kinetik (menggunakan homogenizer)

2. *Lysis sel*

Pada tahap ini pemecahan sel dilakukan secara enzimatik

3. Ekstraksi DNA

Tahap ini terjadinya pengambilan DNA dari dalam sel

4. Purifikasi DNA

Purifikasi DNA menggunakan etanol absolut.

1.2 Amplifikasi PCR dan *Elektroforesis DNA*

Deteksi gen penghasil enzim kitinase pada *Aspergillus niger* L1 dilakukan secara molekuler dengan menggunakan primer spesifik *chit1f* (5'-CTCTGCAGGCCACTCTCGGT-3') dan *chit1r* (5'-AGCCATCTGCTTCCTCATAT-3') (Enkerli et al., 2009). Kondisi reaksi PCR (*Polymerase Chain Reaction*) disamakan untuk semua suhu annealing (50°C, 52°C dan 55°C). Larutan reaksi mengandung 5µl DNA; 2,5µl 10×buffer (mengandung 1,5mM MgCl₂); 2,5µl dNTPs 600µM; 0,25µl dari masing-masing primer konsentrasi 60µM; 0,2µl Taq DNA polymerase (5 U/µl); 0,25µl kontrol internal, dan digenapkan sampai 25µl dengan menambahkan MilliQ. Reaksi PCR dilakukan dengan menggunakan standar sebagai berikut: 1 putaran selama 5 menit pada suhu 94°C diikuti dengan 40 putaran selama 30 detik pada suhu 94°C, 30 detik pada suhu 52°C, dan 30 detik pada suhu 72°C. Satu putaran selama 7 menit pada suhu 72°C dicoba selama reaksi PCR. Setelah amplifikasi, 5µl larutan dimasukkan kedalam sumur agarose gel 1,0% dalam 0,5×TBE buffer, dipisahkan dengan proses elektroforesis, diwarnai dengan ethidium bromide, dan ditampakkan dengan menggunakan cahaya UV. Kontrol negatif (tidak ada target DNA) dimasukkan di setiap percobaan untuk menguji kontaminasi. Uji ini dilakukan dengan tiga kali pengulangan.

2. Pembuatan Media inokulum, Media Fermentasi Padat dan Larutan

Buffer Fosfat

2.1 Pembuatan media inokulum (Sugita, 2009)

Media yang dipakai adalah PDB (Potato Dextrose Broth). PDB dibuat secara manual yaitu kentang sebanyak 200 gram dan 10 gram dextrose direbus selama 1 jam dengan 500 mL aquades. Setelah direbus, ditambahkan aquades sampai volume 1 L kemudian disterilkan dengan autoklaf. Sebanyak 10 mL medium PDB (yang sudah diambil sari kentangnya dengan cara diperas) ditambahkan 3,3 mL larutan mineral steril (0,2% K_2HPO_4 + 0,02% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ + 0,2% HCl + 0,4% $(NH_4)_2SO_4$ + 0,1% yeast ekstrak + 100 mL aquades kemudian disteril) dan 1 ose biakan *Aspergillus aculeatus* kemudian dishaker selama 5 hari

2.2 Media fermentasi padat

Sebanyak 10 g substrat kitin dimasukkan dalam Erlenmayer 250 mL. Substrat kemudian ditambahkan dengan 5 mL larutan mineral steril (sama seperti larutan mineral untuk media inokulum). Media disterilisasi pada tekanan 1 atm selama 15 menit. Sebanyak 5 mL kultur awal diinokulasikan dalam medium kitin dan diinkubasi dengan *shaking* 175 rpm selama 5 hari. Setelah dishaker ditambahkan sebanyak 25 mL aquades steril dan dishaker kembali selama 2 jam.

2.3 Larutan buffer fosfat

Sebanyak 27,8 g NaH_2PO_4 (stock A) dan 31,97 g Na_2HPO_4 (stock B) masing-masing dilarutkan dalam 1000 mL aquades. Pada pembuatan buffer pH 6 sebanyak 87,7 mL stok A ditambah dengan 12,3 mL stok B.

3. Pembuatan Substrat Glikol Kitin dan Larutan Pereaksi

3.1 Pembuatan substrat glikol kitin (Truddel dan Asselin, 1989)

Sebanyak 1 gram glikol kitosan dilarutkan dalam 20 mL asam asetat 10% dan dibiarkan dalam suhu ruang selama 24 jam. Kemudian campuran tersebut ditambah 100 mL metanol secara perlahan di dalam ruang asam, lalu disaring vakum dengan kertas saring whatman no 42. Filtrat yang dihasilkan ditampung di dalam gelas piala dan ditambah 15 mL asetat anhidrida sambil distirer pelan. Lalu dibiarkan pada suhu kamar \pm 30 menit, saat terbentuk gel lalu ditambah 150 mL metanol dan dihomogenkan. Kemudian endapan dipisahkan dari filtrat dengan cara disentrifugasi pada 4000 rpm, suhu 4°C selama 30 menit. Pelet ditambahkan 100–150 mL metanol dan dihomogenkan lagi. Kemudian tahap sentrifugasi diulang sekali lagi. Pelet ditambahkan 100 mL 0,02% sodium azida dan dihomogenkan kembali selama 4 menit. Larutan gel yang terbentuk adalah 1% glikol kitin.

3.2 Pereaksi pengukuran kadar protein metode Lowry

Larutan A : 2 gram Na_2CO_3 dalam 100 mL aquades

Larutan B : 5 mL $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 1% + 5 mL NaKtartarat 1%.

Larutan C : 2 mL pereaksi B + 100 mL pereaksi A.

Larutan D : Reagen Folin – Ciocalteu diencerkan dengan aquades 1:1

Larutan standar : Larutan BSA konsentrasi 0, 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160, dan 180 ppm.

4. Isolasi Enzim Kitin Deasetilase dan Pengukuran Kadar Protein

4.1 Isolasi enzim kitin deasetilase

Media fermentasi yang berisi *Aspergillus aculeatus* isolat tanah humus dikocok menggunakan shaker inkubator pada suhu ruang selama 5 hari. Kemudian dilakukan pemisahan enzim dari komponen sel lainnya dengan sentrifugasi pada 5000 rpm dan suhu 4°C selama 30 menit. Filtrat yang diperoleh merupakan ekstrak kasar enzim yang selanjutnya diukur kadar protein dengan metode *Lowry*.

4.2 Penentuan kadar protein metode *Lowry*

Kadar protein enzim ditentukan dengan metode *Lowry et al* (1951). Sebanyak 0,1 mL enzim yang akan diukur kadar proteinnya ditambahkan 0,9 mL akuades lalu direaksikan dengan 5 mL pereaksi C dan campuran diaduk rata kemudian dibiarkan selama 10 menit pada suhu ruang. Setelah itu ditambahkan dengan cepat 0,5 mL pereaksi D dan diaduk dengan sempurna, didiamkan selama 30 menit pada suhu kamar. Untuk kontrol 0,1 mL enzim diganti dengan 0,1 mL akuades, selanjutnya perlakuannya sama seperti sampel. Serapannya diukur

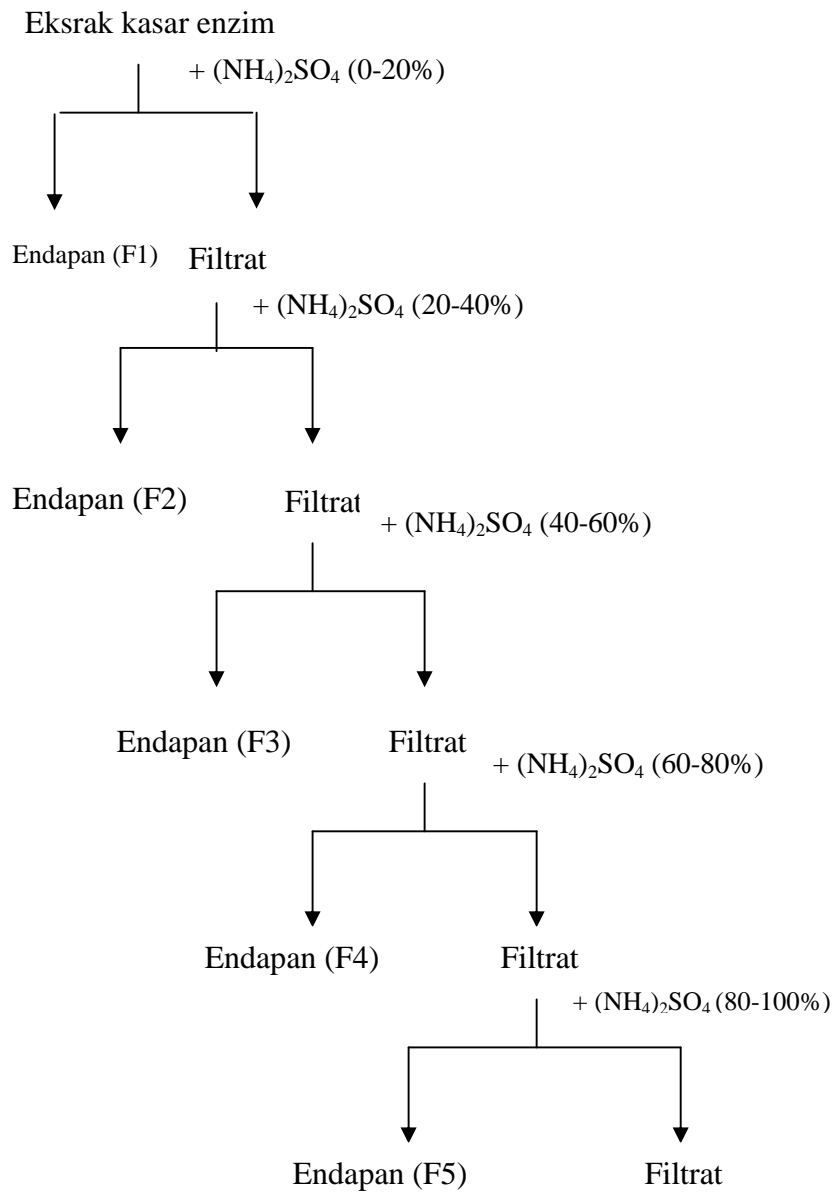
menggunakan spektrofotometer UV-VIS pada panjang gelombang 750 nm. Untuk menentukan konsentrasi protein enzim yang digunakan kurva standar BSA (Bovine Serum Albumin).

5. Pemurnian enzim kitin deasetilase

5.1 Fraksinasi Dengan Amonium Sulfat

Ekstrak kasar enzim yang diperoleh diendapkan dengan garam ammonium sulfat pada berbagai derajat kejenuhan yaitu (0-20%); (20-40%); (40-60%); (60-80%); dan (80-100%) hal ini dilakukan untuk mengetahui pada fraksi mana enzim kitin deasetilase mempunyai aktivitas tertinggi. Jumlah (gram) amonium sulfat pada tiap fraksi dapat dilihat pada tabel Skema proses pengendapan protein enzim dengan penambahan amonium sulfat ditunjukkan pada Tabel 3 Lampiran 1.

Endapan protein enzim yang didapatkan pada tiap fraksi kejenuhan amonium sulfat, dipisahkan dari filtratnya dengan sentrifugasi pada kecepatan 10000 rpm selama 20 menit. Kemudian endapan yang diperoleh dilarutkan dengan buffer phospat 0,2 M pH 6 dan diuji kadar proteinnya dengan metode *Lowry*.



Gambar 4. Skema proses pengendapan protein enzim dengan pengendapan amonium sulfat

5.2 Dialisis

Endapan enzim yang telah dilarutkan dari tiap fraksi amonium sulfat dengan aktivitas spesifik yang tinggi, dimasukkan ke dalam kantong selofan dan didialisis dengan 0,1 M buffer fosfat pH 6 selama \pm 24 jam pada suhu dingin. Selama dialisis, dilakukan pergantian buffer selama 4-6 jam agar konsentrasi ion-ion di dalam kantong dialisis dapat dihilangkan. Untuk mengetahui bahwa sudah tidak ada lagi ion-ion garam dalam kantong, maka diuji dengan menambahkan larutan $\text{Ba}(\text{OH})_2$ atau BaCl_2 . Bila masih ada ion sulfat dalam kantong, maka akan terbentuk endapan putih BaSO_4 . Semakin banyak endapan yang terbentuk, maka semakin banyak ion sulfat yang ada dalam kantong. Selanjutnya dilakukan uji aktivitas dengan metode *Tokuyasu* dan diukur kadar proteinnya dengan metode *Lowry*.

6. Analisis Mutu Kitosan (Derajat Deasetilase)

Untuk sampel ambil 300 μL glikol kitin 1% ditambahkan 0,2 M buffer fosfat pH 6 sebanyak 200 μL dan 100 μL enzim kitin deasetilase. Larutan sampel tersebut kemudian diinkubasi pada suhu 50°C selama 30 menit. Untuk kontrol digunakan glikol kitin tanpa perlakuan. Sampel dan kontrol kemudian dianalisis dengan spektrofotometer IR.

Gambar.5 Bagan alir penelitian

