

## IV. METODE PENELITIAN

### A. Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Mikrobiogenetika Jurusan Biologi FMIPA Undip dan Laboratorium Mikrobiologi Pusat Penelitian dan Pengembangan Teknologi Isotop dan Radiasi , Badan Tenaga Nuklir Nasional (P3TIR-BATAN). Pasar Jumat Cinere Jakarta. Pelaksanaan penelitian ini dilakukan pada bulan November 1999 sampai dengan bulan Maret 2000.

### B. Alat dan Bahan Penelitian

#### 1. Alat

Tabung reaksi, cawan petri, pipet ukur, ose, autoklaf, oven, inkubator, spektrofotometer, Iradiator panorama serbaguna (Irpasena), gelas ukur, timbangan, erlenmeyer, mikroskop, alat sentrifugasi, kertas saring Whatman No:42, LAF ("Laminar Air Flow"), shaker , pengaduk, lemari pendingin , kompor, blender, vortex, "Coloni counter".

#### 2. Bahan

*Aspergillus* sp. DUCC 001 M diambil dari koleksi kultur Laboratorium Mikrobiogenetika, Jurusan Biologi Fakultas MIPA Universitas Diponegoro Semarang, Bekatul, Jerami , Akuades steril, glukosa, larutan CMC ("Carboxyl

Methyl Cellulose”) 1%, pereduksi DNS ( “Dinitrisalicylic acid” ), asam sitrat 0.1 M , Na.Sitrat 0.1 M , PDA ( “Potato Dextrosa Agar” ), HCl 0,1 N , NaOH , garam Rochele, larutan BSA (“Bovine Serum Albumin”), Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> anhidrat, CuSO<sub>4</sub>. 5 H<sub>2</sub>O , Na-tartrat , Pereduksi Folin Ciocalteu, Amonium Sulfat kristal , Na-Phospat monobasis 0.2 M dan Na-Phospat dibasis 0.2 M.

### C. Cara Kerja

#### 1. Persiapan inokulum dan Penyinaran

Kultur murni *Aspergillus* sp. DUCC 001 M diinokulasikan pada medium agar miring PDA (“Potato Dextro Agar”) dan diinkubasi selama empat hari pada suhu kamar. Konidio spora dipanen dengan menggoreskan ose pada biakan kapang setelah ditambah akuades steril. Kemudian konidio spora di ruspensikan dengan akuades steril sehingga konsentrasinya sesuai dengan standar kekeruhan 10<sup>9</sup> sel/ml, setelah itu diradiasi dengan Iradiator panorama serbaguna (Irpasena). Dosis radiasi yang digunakan ada empat taraf yaitu 0 KGy, 0.25 KGy, 0.5 KGy dan 0.75 KGy (Sjarief dan Roselawati, 1995).

#### 2. Penyediaan Substrat dan Inokulasi

Jerami dipotong-potong 1 cm, lalu dihaluskan dengan blender sebagai media digunakan campuran jerami dan bekatul dengan perbandingan sebanyak 40 % jerami dan 60 % bekatul (Pujianto, 1993). Sebanyak 10 gr media dimasukkan ke dalam erlenmeyer 100 ml. Kemudian ditambahkan dengan bufer sitrat pH 4.8 sebanyak 50 ml. Medium disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121 °C, selama 1.5 jam. Setelah itu ke dalam tiap media diberi inokulum suspensi konidio sebanyak 1 ml, lalu

diinkubasi selama 4 hari pada suhu kamar. Fermentasi dibuat dengan pengulangan 9 kali untuk tiap-tiap perlakuan.

### 3. Pengamatan Viabilitas *Aspergillus* sp. DUCC 001 M

Viabilitas kapang diamati dengan metode TPC ("Total Plate Count") menurut Fardiaz (1992). Suspensi konidio spora yang telah diradiasi, diinokulasikan ke dalam medium PDA ("Potato Detroso Agar") diinokulasi selama 48 jam dengan tahapan sebagai berikut :

- a. diambil 0.5 ml suspensi konidio yang telah diradiasi, kemudian diencerkan dengan 4.5 ml akuades steril dan dikocok dengan vortex sampai homogen, sehingga diperoleh pengenceran  $10^{-1}$
- b. dari pengenceran  $10^{-1}$ , diambil 0.5 ml untuk diencerkan dengan 4.5 ml akuades steril kemudian dikocok hingga homogen, sehingga diperoleh pengenceran  $10^{-2}$
- c. cara yang sama dilakukan sampai tingkat pengenceran  $10^{-7}$
- d. kemudian dari masing-masing pengenceran diambil sebanyak 0.1 ml untuk diinokulasikan pada cawan petri steril, yang selanjutnya dituangi medium PDA. Hal ini dilakukan secara duplo untuk setiap pengencerannya.
- e. biakan kemudian diinkubasi pada suhu kamar selama 48 jam. Perhitungan dilakukan dengan menggunakan koloni counter dengan persyaratan cawan yang dipilih adalah yang berjumlah 30 – 300.

Perhitungan jumlah koloni dilakukan dengan rumus, sebagai berikut :

$$\frac{(Ax10^a) + (Bx10^b) + (Cx 10^c)}{3} = \text{koloni / ml}$$

Keterangan :

- A, B, C : jumlah koloni tiap cawan  
 a, b, c : 1 / faktor pengenceran  
 3 : banyaknya cawan yang terhitung

( Gunawarman, 1993 )

#### 4. Ekstraksi Selulase

Kultur ditambah 50 ml bufer sitrat pH 4.8 , kemudian dikocok dengan shaker pada kecepatan 120 rpm selama 2 jam. Setelah itu disentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm selama 5 menit, lalu disaring dengan kertas saring Whatman No: 42 dan filtrat kemudian dianalisis aktivitas enzim dan kadar proteinnya ( Darwis dan Sukara, 1990) dan (Yani A. dan Djajasukma E. , 1991).

#### 5. Penentuan Aktivitas Selulase dengan Metode DNS (“Dinitrosalicylic Acid”)

Produksi selulase ditentukan berdasarkan aktivitasnya. Penentuan aktivitas selulase dilakukan dengan mengukur jumlah gula tereduksi dengan menggunakan larutan CMC (“Carboxyl Methyl Cellulosa”) 1 %, sebagai substrat dalam buffer sitrat 0.5 M pH 4.8. Penentuan gula pereduksi dihitung sebagai glukosa dengan menggunakan metode DNS (“Dinitrosalicylic Acid”). Ke dalam 0.5 ml larutan enzim

ditambahkan 0.5 ml larutan CMC, kemudian diinkubasi selama 30 menit pada suhu 50°C. Ke dalam campuran tersebut kemudian ditambahkan 1 ml pereaksi DNS dan dipanaskan selama 5 menit dalam air mendidih dan segera didinginkan. Selanjutnya ditambah 8 ml buffer sitrat 0.5 M pH 4.8 dan diukur absorbansinya pada panjang gelombang 540 nm. Sedangkan kandungan gula pereduksi ditentukan berdasarkan kurva standar glukosa. Kurva standar glukosa dibuat dengan 0.2 ; 0.4 ; 0.6 ; 0.8 dan 1.0 mg/ml (Pujianto, 1993).

Satu unit aktivitas selulase setara dengan jumlah selulase yang dapat menghasilkan 1 mikro mol glukosa dari larutan CMC selama 1 menit. Adapun rumus yang digunakan dalam mengukur aktivitas selulase adalah sebagai berikut :

$$\text{Aktivitas Selulase} = \frac{\text{mg gula reduksi} \times 1000 \times 2}{\text{BM glukosa} \times 30} \text{ Unit/ml/menit}$$

#### 6. Penentuan Kadar Protein Selulase Ekstrak Kasar dengan Metode Lowry

Sampel protein yang terlarut diendapkan terlebih dahulu dengan amonium sulfat kristal (dalam jumlah yang mendekati jenuh  $\pm 5$  gram / 10 ml larutan protein) selama 24 jam pada suhu rendah (Gunawarman, 1993).

Protein yang mengendap kemudian dipisahkan dengan sentrifugasi 10.000 rpm selama 5 menit , kemudian cairan tersebut dipisahkan dari endapan protein.

Endapan protein yang merupakan enzim, kemudian dilarutkan kembali dengan bufer fosfat pH 6.5 sebanyak 10 ml. Setelah itu diambil 1 ml larutan protein filtrat enzim dan ditambahkan dengan 8 ml pereaksi B, dan dibiarkan selama 10 menit. Kemudian 1ml pereaksi A ditambahkan, setelah itu digojok dan dibiarkan selama 20 menit.

Penambahan bufer fosfat diperlukan apabila terjadi warna biru yang terlalu pekat untuk pengenceran. Setelah itu dihitung absorbansinya pada panjang gelombang 600 nm dengan alat spektrofotometer.

Pengukuran larutan protein filtrat enzim ditentukan berdasarkan kurva standar larutan protein ("Bovine Serum Albumin"). Kurva ini dibuat dengan kadar yang bertingkat dengan urutan 0, 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240, dan 300 µg protein / ml (Sudarmadji *et al.*, 1984).

## 7. Aktivitas Spesifik Selulase

Pemurnian enzim sangat penting diukur untuk mendapatkan jumlah aktivitas enzim dari kadar protein yang diperoleh. Jumlah aktivitas enzim spesifik yang diperoleh menunjukkan kemurnian enzim dari isolasi enzim tersebut.

Aktivitas spesifik selulase diperoleh dengan membandingkan unit aktivitas selulase per menit dengan kadar protein per mg, dengan rumus sebagai berikut :

$$\text{Aktivitas spesifik selulase} = \frac{\text{aktivitas selulase ( unit/ml/menit)}}{\text{kadar protein (mg/ml)}} \\ \text{( Clark dan Switzer, 1976 )}$$

#### D. Parameter

Parameter yang diamati adalah aktivitas selulase yang dihitung dalam unit/ml filtrat /menit dari masing-masing perlakuan yang diukur dengan metode DNS, dan viabilitas kapang dengan perhitungan jumlah koloni per mililiter dari kapang yang tumbuh pada medium PDA.

#### E. Rancangan Percobaan

Penelitian dilakukan secara eksperimental dengan menggunakan *Aspergillus* sp. DUCC 001 M dalam Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan perlakuan tunggal yaitu : Dosis radiasi sinar gamma (R) dengan empat taraf, sebagai berikut :

- R<sub>1</sub> : 0 K Gy
- R<sub>2</sub> : 0.25 K Gy
- R<sub>3</sub> : 0.50 K Gy
- R<sub>4</sub> : 0.75 K Gy



#### F. Macam Variabel

Pada penelitian ini variabel-variabel yang diteliti dan dianalisis adalah sebagai berikut :

Variabel bebas :

Dosis radiasi sinar gamma; artinya rata-rata yang diserap bahan persatuan massa bahan.

Variabel tergantung :

1. aktivitas selulase ; artinya jumlah selulase yang dapat dihasilkan 1 mikro mol glukosa dari larutan CMC selama satu menit.
2. viabilitas; jumlah kapang yang hidup pada permukaan media, dihitung berdasarkan jumlah koloni yang hidup per mililiter.

Data yang akan diperoleh diuji dahulu dengan uji homogenitas, uji normalitas selanjutnya dianalisis dengan analisa sidik ragam (Anova), kemudian dilanjutkan dengan uji BNT.

