

BAB IV

METODOLOGI PENELITIAN

A. TEMPAT DAN WAKTU

Tempat : Laboratorium Mikrobiologi dan Genetika Jurusan Biologi F.

MIPA Universitas Diponegoro

Waktu : Mei - Juli 2000

B. ALAT DAN BAHAN

Alat : tabung reaksi, Erlenmeyer 100 ml, timbangan, spektrofotometer, bunsen, ose, pipet ukur 1 ml, pipet ukur 5 ml, kapas, autoklaf, 'water bath shaker', sentrifuge, gelas ukur 10 ml, hemositometer, inkubator, corong.

Bahan : Biakan murni *A. niger* (koleksi F. Pertanian UGM), onggok, bekatul, medium PDA, reagen DNS, reagen Lowry A, reagen Lowry B, buffer fosfat pH 5, buffer sitrat pH 5, buffer asetat pH 5, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, Bovine Serum Albumin (BSA), aquadest, HCl, NaOH.

C. CARA KERJA

1. Persiapan inokulum

Disiapkan medium PDA, lalu dinokulasi dengan biakan murni *A. niger* dan diinkubasi selama 5 hari pada suhu 30°C. Biakan yang sudah ditumbuhi spora ditambah dengan aquadest steril dan dikorek-korek dengan jarum ose.

Kemudian dihitung dengan menggunakan hemositometer untuk

mendapatkan kerapatan spora $6,23 \times 10^6$ /ml. Suspensi spora ini digunakan sebagai inokulum (Soeka *et al*, 1991).

2. Penyediaan media produksi enzim

Digunakan 25 g media onggok basah dengan kandungan bekatul 0%, 2%, 4%, 6%, 8%, 10% dan kadar air 57,5%, kemudian dimasukkan ke dalam Erlenmeyer 100 ml dan disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121°C tekanan 2 atm selama 15 menit. Setelah dingin diinokulasi dengan spora sebanyak 2,5% (v/w), diinkubasi selama 7 hari pada suhu 30°C , pH dijaga tetap 5 dengan penambahan HCl atau NaOH (Nirwana dan Sukara, 1989).

3. Ekstraksi enzim

Media yang sudah ditumbuhi miselium *A. niger* diambil sebanyak 10 g, kemudian ditambah 50 ml buffer asetat pH 5, lalu dikocok menggunakan 'water bath shaker' yang didinginkan dengan es pada suhu 10°C dengan kecepatan 120 rpm selama 2 jam. Kemudian disentrifugasi 3.000 rpm selama 30 menit, supernatan yang dihasilkan merupakan enzim kasar (Nirwana dan Sukara, 1989).

4. Aktivitas enzim amilase

Campuran 0,5 ml supernatan dan 4,5 ml larutan pati 4% (w/v) dalam buffer sitrat pH 5, diinkubasi selama 1 jam pada suhu 60°C , untuk blangko tanpa diinkubasi. Kemudian ditambahkan 1 ml pereaksi DNS lalu dipanaskan selama 5 menit dalam air mendidih. Selanjutnya diukur OD-nya pada panjang gelombang 568. Kandungan gula reduksi diukur berdasarkan kurva standart glukosa. Kurva standart glukosa dibuat dengan konsentrasi glukosa 0, 0,2, 0,4, 0,6, 0,8 dan 1 $\mu\text{g/ml}$. Satu unit aktivitas enzim

amilase setara dengan 1 μ g gula reduksi per-ml yang terbentuk selama 1 menit pada suhu 60⁰C (Melliawati *dkk*, 1993). Aktivitas enzim dapat dihitung dengan rumus :

$$\text{Aktivitas enzim (unit/ml/menit)} = \frac{\text{mg glukosa} \times 100 \times 2}{\text{BM glukosa (180)} \times 60}$$

Aktivitas enzim amilase = aktivitas enzim imkubasi 1 jam – blangko

5. Pengujian kadar protein enzim.

Protein dalam larutan enzim kasar ini dapat diuji dengan metode Lowry (Spektrofotometri). 10 ml larutan enzim kasar ditambah kristal (NH₄)₂SO₄ secara perlahan pada suhu 20⁰C sambil diaduk terus menerus sampai mendekati jenuh (5 g /10 ml enzim). Kemudian diinkubasi selama 2-6 jam sampai terbentuk endapan. Endapan yang terbentuk dikumpulkan dengan sentrifugasi 3000 rpm selama 30 menit. Kemudian dilarutkan dalam buffer phosphat dengan pH 5 sampai volume 10 ml. Masing-masing larutan sampel ditambah 8 ml reagen Lowry B dan biarkan selama 10 menit. Kemudian ditambahkan reagen Lowry A sebanyak 1 ml, gojog dan biarkan selama 20 menit. Dibaca OD-nya pada panjang gelombang 600 nm. Kadar protein enzim ditentukan dengan kurva standar menggunakan Bovine Serum Albumin (BSA) dari kadar 30 – 300 μ g/ml secara bertingkat (Sudarmaji *dkk*, 1984).

6. Aktivitas spesifik enzim amilase

Aktivitas spesifik diperoleh dengan cara membandingkan antara aktivitas enzim dengan kadar protein enzim.

$$\text{Aktivitas spesifik enzim (unit/mg)} = \frac{\text{Aktivitas enzim}}{\text{Protein enzim}}$$

D. PARAMETER YANG DIAMATI

Parameter yang diamati dalam penelitian ini adalah :

1. Aktivitas enzim amilase
2. Kadar protein enzim
3. Aktivitas spesifik enzim

E. MODEL ANALISIS DATA

Penelitian ini menggunakan rancangan acak lengkap dengan satu faktor yaitu konsentrasi bekatul (0%, 2%, 4%, 6%, 8%, 10%), masing-masing perlakuan dengan empat kali ulangan. Data yang diperoleh diuji normalitas dan homogenitasnya. Bila data tidak normal seluruh data ditransformasi dengan menggunakan akar, arcus sinus atau logaritma, sedangkan uji homogenitas yang menunjukkan data tidak homogen dilakukan koreksi dengan faktor koreksi K menurut Barlet (Sudjana, 1988). Apabila data normal dan homogen dilanjutkan dengan Analisis Sidik Ragam (ANOVA) pada taraf uji 1%. Jika $F_{hitung} > F_{tabel}$ dilanjutkan uji Beda Nyata Terkecil (BNT) pada taraf uji 1% untuk mengetahui pasangan perlakuan yang terbaik (Wonnacott dan Wonnacott, 1985).