

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

3.1. Sampel, Alat dan Bahan

3.1.1. Sampel

Jamur *Aspergillus oryzae* yang digunakan dalam penelitian ini dibiakkan dari isolat murni *Aspergillus oryzae* 6004 yang didapat dari laboratorium Mikrobiologi PAU UGM Yogyakarta.

3.1.2. Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain :

1. Sentrifus (Fisher Scientific 228)
2. Autoclave (Prestige Medical Series 2100)
3. Inkubator (Memmert)
4. Lemari pendingin (Sharp)
5. Shaker (Tungtec TS-330 A)
6. Spektrofotometer (Shimadzu-1201)
7. Timbangan elektrik (Mettler AT200)
8. pH Meter (Orion-420 A)
9. Kompor listrik (Maspion S-300)
10. Peralatan gelas : gelas beker, erlenmeyer, gelas ukur, labu takar, cawan petri tabung reaksi, pengaduk, botol ampul, corong gelas.

3.1.3. Bahan

Bahan-bahan yang digunakan antara lain :

1. Biakan murni jamur *Aspergillus oryzae* 6004
2. Tepung agar
3. Kentang
4. Dextrosa
5. Dedak
6. Tepung kedelai
7. Ammonium sulfat
8. Natrium karbonat
9. Natrium kalium tartrat
10. Tembaga sulfat pentahidrat
11. Folin ciocalteau fenol
12. Natrium dihidrofosfat
13. Dinatrium hidrofosfat
14. Natrium hidroksida
15. Barium klorida
16. Selofan
17. Kasein
18. Asam klorida
19. L-Tyrosin
20. Asam Trikloroasetat



3.2. Variabel Penelitian

3.2.1. Variabel yang diukur

- .. Aktivitas enzim protease dari *Aspergillus oryzae* 6004
- Aktifitas spesifik

3.2.2. Variabel bebas

- Derajat keasaman (pH)
- Suhu
- Waktu inkubasi

3.2.3. Variabel yang dikonstankan

- Konsentrasi substrat
- Volume substrat
- Volume enzim

3.3. Cara Kerja

3.3.1. Preparasi larutan

a. Pembuatan PDA (Potato Dextrose Agar)

Kentang kupas sebanyak 200 g dipotong kecil-kecil dimasukkan dalam akuades 1000 mL, dididihkan selama 1 jam lalu saring dengan kapas. Akuades ditambahkan sampai dengan volume semula (1000 mL). Sebanyak 15 g agar dan 20 g dextrose dimasukkan dan diaduk sampai larut. pH diatur sampai 5. Larutan disterilkan dengan *autoclave* pada suhu 121 °C selama 15 menit.

b. Pembuatan media fermentasi

Dedak sebanyak 7 g dicampur dengan tepung kedelai 3 g, tambahkan akuades sebanyak 20 mL Larutan disterilkan dengan *autoclave* pada suhu 121 °C selama 15 menit.

c. Larutan 0,1% Tween 80

Tween 80 sebanyak 1 mL dilarutkan dalam akuades hingga volumenya menjadi 1 L.

d. Bufer fosfat 0,2 M pH 7,5

Larutan NaH_2PO_4 0,2 M sebanyak 16 mL ditambah 84 mL larutan Na_2HPO_4 0,2 M, dilarutkan dalam akuades hingga volumenya menjadi 200 mL.

e. Bufer fosfat 0,002 pH 7,5

Larutan bufer fosfat 0,2 M pH 7,5 sebanyak 1 mL dilarutkan dalam akuades hingga volumenya menjadi 100 mL.

f. Larutan NaH_2PO_4 0,2 M

Sebanyak 27,8 g NaH_2PO_4 kristal dilarutkan dengan akuades hingga volumenya menjadi 1 L.

g. Larutan Na_2HPO_4 0,2 M

Sebanyak 52,65 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ kristal atau 71,7 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ kristal dilarutkan dalam akuades hingga volumenya menjadi 1 L.

h. BaCl_2

Sebanyak 0,2083 g BaCl_2 dilarutkan dalam akuades hingga 100 mL

i. Larutan TCA 30 %

Sebanyak 30 g TCA dilarutkan dalam akuades hingga 100 mL

j. Reagen Lowry

- Lowry A

Sebanyak 10 g Na_2CO_3 ditambah 2 g NaOH dan 0,2 g Natrium Kalium Tartrat dilarutkan dalam akuades hingga volumenya menjadi 500 mL

- Lowry B

Sebanyak 0,6 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ dilarutkan dalam akuades hingga volumenya menjadi 100 mL

- Lowry C

Lowry A sebanyak 50 bagian ditambah 1 bagian Lowry B

- Lowry D

Folin ciocalteu phenol 1 bagian ditambah akuades 1 bagian

k. Pembuatan substrat kasein

Kasein sebanyak 1,2 g dilarutkan dalam akuades hingga volumenya menjadi 100 mL.

l. Pembuatan standar kasein

Kasein 0,03 g dilarutkan dalam akuades hingga volumenya menjadi 100 mL (konsentrasi 300 $\mu\text{g/mL}$). Untuk membuat variasi konsentrasi dilakukan pengenceran (300, 240, 180, 120, 60 $\mu\text{g/mL}$).

m. Pembuatan standar tirosin

Tirosin sebanyak 0,005 g dilarutkan dalam akuades hingga volumenya menjadi 25 mL. Untuk membuat variasi konsentrasi dilakukan pengenceran (200, 150, 100, 50 $\mu\text{g/mL}$).

3.3.2. Pembiakan *Aspergillus oryzae* 6004

Biakan murni *Aspergillus oryzae* 6004 ditumbuhkan pada media PDA steril dengan menggunakan jarum ose^[5]. Diinkubasi pada suhu kamar selama 72 jam^[7]. Hasil pembiakan dipindahkan ke media fermentasi, diinkubasi pada suhu kamar dengan variasi waktu 0, 24, 48, 72, 96, dan 120 jam, untuk menentukan waktu fermentasi enzim optimum.

3.3.3. Isolasi enzim protease

3.3.3.1. Ekstraksi^[7]

Enzim diekstraksi dari media fermentasi dengan larutan 0,1 % Tween 80 sebanyak 20 mL, shaker selama 1 jam kemudian disentrifus dengan kecepatan 3400 rpm selama 3,5 menit. Supernatannya merupakan enzim kasar.

3.3.3.2. Presipitasi^[5]

Pemisahan protein enzim dari hasil ekstraksi dilakukan dengan penambahan ammonium sulfat secara bertingkat. Ammonium sulfat yang telah ditimbang sesuai dengan fraksi yang dikehendaki (0-10 %) –dari tabel (lampiran 6)– dimasukkan ke dalam enzim kasar sedikit demi sedikit sambil diaduk dalam penangas es. Campuran didiamkan semalam dalam keadaan dingin, kemudian disentrifus dengan kecepatan 3500 rpm selama 42 menit. Endapan dipisahkan dan disuspensikan dengan bufer fosfat 0,2 M pH 7,5. Endapan tersebut merupakan fraksi 0-10 %. Supernatan diperlakukan sama dengan di atas hingga didapatkan fraksi dengan tingkat kejenuhan 10-30 %, 30-50 %, 50-70 %, 70-100 %.

3.3.3.3. Dialisis^[5]

Dialisis dilakukan dengan menggunakan selofan yang telah direbus dalam akuades selama 30 menit. Selofan yang berisi enzim direndam dalam bufer fosfat 0,002 M pH 7,5 dalam keadaan dingin, dan tiap 2 jam diuji kandungan ammonium sulfat-nya dengan BaCl_2 . Dialisis dihentikan jika hasil pengujian tidak lagi terdapat endapan putih.

3.3.4. Penentuan λ optimum tirosin

Tirosin 100 $\mu\text{g/mL}$ dibaca serapannya pada berbagai panjang gelombang dengan alat spektrofotometer UV-Vis Shimadzu.

3.3.5. Penentuan kurva standar tirosin

Tirosin dalam berbagai konsentrasi dibaca serapannya pada panjang gelombang optimum tirosin dengan alat spektrofotometer UV-Vis Shimadzu.

3.3.6. Penentuan λ optimum kasein

Kasein 180 $\mu\text{g/mL}$ dibaca serapannya pada berbagai panjang gelombang dengan alat spektrofotometer UV-Vis Shimadzu.

3.3.7. Penentuan kurva standar kasein

Kasein dalam berbagai konsentrasi dibaca serapannya pada panjang gelombang optimum kasein dengan alat spektrofotometer UV-Vis Shimadzu.

3.3.8. Uji Aktivitas Enzim

Larutan substrat kasein sebanyak 1 mL ditambah larutan enzim sebanyak 0,3 mL, diinkubasi pada suhu 35 °C selama 15 menit. Kemudian ditambah larutan

TCA 30 % sebanyak 3 mL, dikocok dan dibiarkan 30 menit dalam inkubator pada suhu 35 °C. Untuk memisahkan endapan, campuran disentrifus pada 5000 rpm selama 30 menit. Supernatan dibaca serapannya dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang optimum dari tirosin. Sebagai kontrol adalah campuran substrat, TCA, dan enzim yang telah dimatikan (tidak memiliki aktivitas). Aktivitas enzim dicari secara regresi linier terhadap kurva standar tirosin.

3.3.9. Penentuan kadar protein enzim (metode Lowry)

Larutan enzim sebanyak 0,6 mL ditambah 3 mL larutan Lowry C, dibiarkan selama 20 menit dalam suhu kamar. Tambahkan 0,3 mL larutan folin dengan cepat dan dibiarkan kembali selama 45 menit pada suhu kamar sambil sesekali dikocok. Larutan dibaca serapannya pada panjang gelombang optimum dari kasein dengan spektrofotometer. Kadar protein enzim ditentukan secara regresi linier terhadap kurva standar kasein.

3.3.10. Penentuan suhu optimum enzim

Enzim protease diuji aktivitasnya pada pH 7,5 dengan temperatur yang bervariasi (31, 33, 35, 37, 39, 41, 43 °C)

3.3.11. Penentuan pH optimum enzim

Enzim protease diuji aktivitasnya pada suhu optimum dengan pH yang bervariasi (6,0; 6,5; 7,0; 7,5; 8,0)

3.3.12. Penentuan waktu inkubasi optimum

Enzim protease diuji aktivitasnya pada suhu optimum dan pH optimum dengan waktu inkubasi yang bervariasi (5, 10, 15, 20, 25 menit)

3.3.13. Penentuan aktivitas unit dan aktivitas spesifik enzim protease

- Satuan unit aktivitas enzim (Unit) didefinisikan sebagai :

Jumlah mikromol produk yang terbentuk tiap satuan waktu inkubasi

$$1 \text{ Unit aktivitas enzim protease} = \frac{1 \mu\text{mol tirosin}}{\text{satuan waktu inkubasi}}$$

- Aktivitas spesifik enzim didefinisikan sebagai :

Jumlah unit aktivitas enzim tiap miligram protein yang dikandung

$$\text{Aktivitas spesifik enzim protease} = \frac{\text{Unit aktivitas enzim protease}}{\text{mg protein}}$$

