

BAB III

MATERI DAN METODE

Penelitian tentang Sintesis Protein Mikroba dan Aktivitas Selulolitik Akibat Penambahan Berbagai Level Zeolit Sumber Nitrogen *Slow Release* pada Glukosa Murni secara *In Vitro* dilaksanakan pada tanggal 22 Februari - 15 April 2016 di Laboratorium Ilmu Nutrisi dan Pakan Fakultas Peternakan dan Pertanian serta di Laboratorium Biokimia Fakultas Sains dan Matematika Universitas Diponegoro, Semarang.

3.1. Materi Penelitian

Materi yang digunakan dalam penelitian yaitu serbuk zeolit (klinoptilolit) berukuran 40 - 60 *mesh*, urea, glukosa murni, cairan rumen sapi dari RPH Ungaran; bahan yang digunakan yaitu Lowry B dan Lowry A, *carboxy methyl cellulose* (CMC) 1%, larutan bufer asetat dengan pH 5,5, larutan *tri chloroacetic acid* (TCA) 1,5 M, larutan *dinitrosalicylic acid* (DNS), akuades, dan larutan McDougall; sedangkan alat yang digunakan yaitu timbangan analitik, kertas minyak, *crucible porcelain*, tanur, eksikator, oven, tabung fermentor, tutup tabung fermentor, gelas ukur, gelas beker, erlenmeyer, *waterbath*, sentrifus, tabung sentrifus, spatula, tabung reaksi, rak tabung reaksi, *magnetic stirrer*, vortex, pipet ukur, spektrofotometer digital serta spektrofotometer UV-Vis.

3.2. Metode Penelitian

Metode yang digunakan dalam penelitian terdiri dari dua langkah, langkah pertama aktivasi zeolit, langkah kedua yaitu pengukuran sintesis protein mikroba dan pengukuran aktivitas selulolitik.

3.2.1. Aktivasi zeolit

Tahap awal yang dilakukan dalam penelitian yaitu aktivasi zeolit. Aktivasi zeolit dilakukan dengan cara : zeolit berukuran 40 - 60 *mesh* ditanur pada suhu 300°C selama 4 jam kemudian didinginkan di dalam eksikator. Zeolit yang sudah ditanur, dicampur dengan urea dan air dengan perbandingan 2 : 1: 1 (w/w/v) kemudian diinkubasi selama 48 jam. Setelah zeolit diinkubasi, kemudian dicuci dan dikeringkan pada suhu kamar. Zeolit yang sudah diinkubasi (zeolit sumber nitrogen *slow release*) ditambahkan ke dalam glukosa murni pada masing-masing perlakuan sebanyak 2% (T1), 4% (T2), 6% (T3), 8% (T4) dan 10% (T5), kemudian dilakukan pengujian secara *in vitro*.

3.2.2. Sintesis protein mikroba

Pengukuran sintesis protein mikroba dimulai dengan pengujian secara *in vitro* yaitu sampel ditimbang sebanyak 0,55 - 0,56 g kemudian dimasukkan ke dalam tabung fermentor. Tabung fermentor yang telah berisi sampel selanjutnya ditambahkan larutan McDougall 40 ml dan cairan rumen cairan rumen sapi dari RPH Ungaran sebanyak 10 ml. Tabung fermentor dialiri dengan karbondioksida untuk menciptakan kondisi anaerob kemudian tabung ditutup menggunakan

penutup tabung serapat mungkin. Tabung fermentor diletakan pada *waterbath* pada suhu 39°C kemudian diinkubasi selama 3 jam. Proses inkubasi dihentikan setelah 3 jam dengan cara tabung fermentor dimasukan ke dalam air es minimal 15 menit. Sampel di dalam tabung fermentor disentrifus dengan kecepatan 3.000 rpm selama 15 menit untuk mendapatkan supernatan. Supernatan sebanyak 20 ml disentrifus kembali dengan kecepatan 8.000 rpm pada suhu ruang selama 15 menit untuk mendapatkan endapan mikroba (Lai *et al.*, 2011).

Sintesis protein mikroba diukur dengan metode Lowry (Plumer, 1971). Langkah-langkah yang dilakukan yaitu : sampel (endapan) yang berasal dari hasil sentrifus supernatan sebanyak 20 ml disiapkan kemudian ditambahkan 1 ml larutan NaOH 0,1 N, dihomogenkan. Sampel dimasukan kedalam tabung reaksi, dipanaskan pada suhu 90°C selama 15 menit. Setelah dipanaskan, didinginkan pada suhu ruang selama 10 menit. Sampel diambil 1 ml, ditambahkan 5 ml larutan Lowry B kemudian divortex. Sampel didiamkan selama 10 menit pada suhu kamar. Setelah didiamkan 10 menit, ditambahkan larutan Lowry A 0,5 ml, divortex kemudian didiamkan selama 30 menit. Sampel dibaca menggunakan spektrofotometer digital dengan panjang gelombang 700 nm. Hasil absorbansi dihitung menggunakan rumus untuk mengetahui sintesis protein mikroba.

$$\text{Sintesis Protein} = \frac{\text{Konsentrasi} \times \text{pengencer} \times \text{indukan}}{\text{Berat sampel}}$$

Banyaknya sintesis protein mikroba dibagi dengan supernatan yang digunakan yaitu 20 ml, sehingga didapatkan satuan sintesis protein mikroba mg/ml.

3.2.3. Aktivitas selulolitik

Pengukuran aktivitas selulolitik dimulai dengan pengujian secara *in vitro* yaitu sampel ditimbang sebanyak 0,55 - 0,56 g, dimasukkan ke dalam tabung fermentor. Tabung fermentor yang telah berisi sampel ditambahkan larutan McDougall 40 ml dan cairan rumen cairan rumen sapi dari RPH Ungaran sebanyak 10 ml. Tabung fermentor dialiri dengan karbondioksida untuk menciptakan kondisi anaerob kemudian ditutup menggunakan penutup tabung serapat mungkin. Tabung fermentor diletakan pada *waterbath* pada suhu 39°C kemudian diinkubasi selama 3 jam. Proses inkubasi dihentikan setelah 3 jam dengan cara dimasukkan ke dalam air es selama 15 menit. Sampel di dalam tabung fermentor disentrifus dengan kecepatan 3.000 rpm selama 15 menit untuk mendapatkan supernatan. Supernatan disentrifus kembali dengan kecepatan 8.000 rpm selama 15 menit untuk mendapatkan filtrat enzim (Lai *et al.*, 2011).

Pengujian aktivitas selulolitik dilakukan dengan metode Patra (2006). Sebanyak 0,1 g CMC 1% ditimbang, dimasukkan kedalam gelas beker kemudian dilarutkan kedalam 10 ml bufer asetat pH 5,5. Sampel diambil sebanyak 1 ml dari pelarutan CMC, dimasukkan ke dalam tabung reaksi kemudian ditambahkan 0,5 ml larutan enzim (filtrat hasil sentrifus) dan 0,5 ml bufer asetat 0,05 M pH 5,5. Sampel diinkubasi pada suhu 40° C selama 60 menit. Setelah proses inkubasi, kemudian dilakukan pengukuran gula pereduksi dengan metode DNS yaitu hasil inkubasi ditambahkan 0,5 ml TCA 1,5 M dan 1 ml larutan DNS, dilakukan penggojogan. Sampel dipanaskan di dalam air mendidih selama 10 menit, kemudian didinginkan. Sampel ditambahkan dengan akuades hingga volume 10

ml. Pengukuran absorbansi pada sampel menggunakan spektrofotometer UV-Vis dengan panjang gelombang maksimum 470 nm. Hasil absorbansi kemudian dihitung menggunakan rumus untuk mengetahui unit aktivitas selulolitik.

$$\text{Unit Aktivitas} = \frac{y - b}{a} \times \frac{V_{\text{total}}}{V_{\text{enzim}}} \times \frac{1}{\text{BM glukosa}} \times \frac{1}{T_{\text{inkubasi}}} \times 1000$$

Keterangan :

y	= absorbansi dari sampel enzim
a, b	= nilai yang diperoleh dari persamaan linier kurva standar
V _{total}	= volume enzim + substrat (CMC) + bufer asetat (0,5 ml + 1 ml + 0,5 ml = 2 ml)
V _{enzim}	= volume enzim/ekstrak kasar yang dianalisis (0,5 ml)
T _{inkubasi}	= waktu inkubasi (60 menit)
BM glukosa	= berat molekul glukosa (180,1559)

3.3. Rancangan Percobaan dan Analisis Data

Rancangan penelitian yang digunakan yaitu rancangan acak lengkap dengan 5 perlakuan penambahan berbagai level zeolit dan 4 ulangan. Peubah yang diamati yaitu produksi sintesis protein mikroba dan aktivitas selulolitik.

Perlakuan yang diberikan yaitu :

- T1 : Glukosa murni + level zeolit sumber nitrogen *slow release* 2%
- T2 : Glukosa murni + level zeolit sumber nitrogen *slow release* 4%
- T3 : Glukosa murni + level zeolit sumber nitrogen *slow release* 6%
- T4 : Glukosa murni + level zeolit sumber nitrogen *slow release* 8%
- T5 : Glukosa murni + level zeolit sumber nitrogen *slow release* 10%

Pemberian glukosa murni (lampiran 2) menyesuaikan pemberian level zeolit untuk menentukan sinkronisasi antara sumber amonia dan sumber energi.

3.4. Model Linier Aditif

Model linier untuk penelitian yaitu dengan model rancangan acak lengkap (Toutenburg, 1995) sebagai berikut :

$$Y_{ij} = \mu + \tau_i + \varepsilon_{ij}$$

Keterangan :

i = 1, 2, 3, 4, 5..., (perlakuan)

j = 1, 2, 3, 4..., (ulangan)

i, j = 1, 2, ..., n

Y_{ij} = Hasil pengamatan sintesis protein mikroba dan aktivitas selulolitik dari perlakuan penambahan level zeolit sumber nitrogen ke- i , dan ulangan ke- j .

μ = Rataan umum

τ_i = Pengaruh perlakuan ke- i

ε_{ij} = Galat percobaan perlakuan penambahan level zeolit sumber nitrogen ke- i , ulangan ke- j

Data yang terkumpul dianalisis ragam (Anova) dan dilanjutkan dengan uji wilayah ganda Duncan (*Duncan's Multiple Range Test*) (Gazpers, 1995) pada taraf uji signifikansi 5%.

Hipotesis statistika dari penelitian :

H_0 : $\tau_i = 0$, Perlakuan penambahan level zeolit pada glukosa murni tidak berpengaruh nyata ($P > 0,05$) terhadap sintesis protein mikrobia dan aktivitas selulolitik.

H_1 : $\tau_i \neq 0$, Minimal ada satu perlakuan penambahan level zeolit pada glukosa murni berpengaruh nyata ($P < 0,05$) terhadap sintesis protein mikrobia dan aktivitas selulolitik.

Kaidah penarikan simpulan : H_1 diterima, apabila F hitung $\geq F$ tabel pada taraf 5%.