

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Rancangan Penelitian

Rancangan yang digunakan dalam penelitian ini adalah rancangan acak lengkap (RAL) pola faktorial yang terdiri dari 2 faktor. Faktor pertama adalah variasi suhu yang terdiri dari tiga taraf yaitu 30°C, 40°C dan 50°C. Faktor kedua adalah variasi jenis kapang yaitu *Penicillium* sp. dan *Trichoderma* sp. dan campuran keduanya. Masing-masing dilakukan pengulangan sebanyak 3 kali.

3.2 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Februari-Maret 2014, di Laboratorium Mikrobiologi dan Genetika Jurusan Biologi Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.

3.3 Variabel Penelitian

Variabel dalam penelitian ini terdiri dari 2 macam yaitu variable bebas dan variable terikat.

3.3.1 Variabel Bebas

Variable bebas dalam penelitian ini adalah perlakuan suhu (30°C, 40°C, 50°C) dan perlakuan variasi jenis kapang yaitu *Penicillium* sp. dan *Trichoderma* sp. dan campuran keduanya.

3.3.2 Variabel Terikat

Variabel terikat adalah variabel yang diukur berupa nilai aktivitas enzim protease pada media kasein.

3.4 Alat dan Bahan

3.4.1 Alat

Peralatan yang digunakan dalam pengujian aktivitas enzim protease ini adalah: tabung reaksi, rak tabung, mikropipet, pipet, erlenmeyer, gelas ukur, gelas beker, spatula, *centrifuge*, autoklaf, timbangan analitik, vortex, *shaker incubator*, jarum ose, *hot plate*, *stirer*, bunsen, inkubator, spektrofotometer, LAF (*Laminar Air Flow*).

3.4.2 Bahan

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah kapang *Trichoderma sp.* dan *Penicillium sp.* yang didapatkan dari koleksi Laboratorium Mikrobiologi Universitas Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang. Media alternatif : Dedak halus dan limbah cair tahu, aquades, PDA (*Potato Dextrose Agar*), kasein, aquades. Larutan TCA (*Tricloro Acetic Acid*), aluminium foil, HCl 0.1 M, alkohol 70% dan ekstrak enzim protease.

3.5 Prosedur penelitian

3.5.1 Pembuatan Media Potato Dextrose Agar

1. Ditimbang 2,4 gram PDA dan dilarutkan dalam 60 ml aquades
2. Dihomogenkan diatas hotplate.
3. Di tuangkan 5 ml ke dalam tabung reaksi.
4. Disterilkan media PDA dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit.

3.5.2 Pembuatan Media Produksi (Naiola dan Widhyastuti, 2002)

1. Disaring Limbah cair tahu untuk memisahkan kotoran.

2. Dilarutkan sebanyak 12,5 g dedak halus dalam 250 ml limbah cair tahu.
3. Disterilkan pada suhu 121°C selama 15 menit.

3.5.3 Preparasi Inokulum dan Enumerasi Spora Kapang (Yusriah dan Nengah, 2013)

1. Ditambahkan 25 ml larutan tween 0,1% ke dalam kultur kapang pada fase eksponensial.
2. Dilakukan pelepasan spora menggunakan jarum inokulasi.
3. Divortex untuk memisahkan gumpalan spora dan untuk mendapatkan suspensi yang homogen.

3.5.4 Produksi Enzim Protease (Zanphorline, 2011)

1. Diambil sebanyak 25 ml spora dari isolat *Penicillium* sp. dan *Trichoderma* sp.
2. Diinokulasikan ke dalam media produksi enzim protease secara terpisah. Medium yang digunakan untuk memproduksi enzim protease adalah 250 ml media campuran limbah cair tahu dan dedak.
3. Diinkubasi pada suhu ruang selama 6 hari *Trichoderma* (Safiana, 2013) dan 7 hari *Penicillium* (Alfiah dan Kuswytasari, 2012) di *shaker inkubator*.
4. Ditambahkan larutan tween 0,1% sebanyak 100 ml.
5. Dipisahkan antara filtrat dan supernatannya dengan sentrifugasi pada kecepatan 8000 rpm selama 15 menit. Supernatan yang terbentuk merupakan ekstrak enzim kasar yang selanjutnya digunakan dalam uji aktivitas protease.

6. Supernatan hasil sentrifugasi dapat disimpan dalam lemari pendingin pada suhu 4°C (Anggrawati, 2012).

3.5.5 Pembuatan Kurva Standart Tirosin (Kosim dan Putra, 2010)

Kurva standar tirosin dibuat dengan pengenceran larutan tirosin.

1. Diambil larutan tirosin 3 mg/ml dan dijadikan beberapa konsentrasi yaitu 0.15 mg/ml, 0.3 mg/ml, 0.45 mg/ml, 0.6 mg/ml, 0.9 mg/ml dan 1.2 mg/ml.
2. Diambil larutan tirosin sebanyak 0,5; 1; 1,5; 2; 3 dan 4 ml.
3. Diencerkan dengan HCl 0.1 M hingga volume 10 ml.
4. Diukur absorbansi masing-masing larutan tersebut pada panjang gelombang 275 nm dengan spektrofotometer.
5. Diinterpolasikan hasil absorbansi yang diperoleh dengan konsentrasi yang diukur dengan dibuat persamaan linearnya.

3.5.6 Uji Penentuan Aktivitas Protease (Yusriah dan Nengah, 2013)

Metode ini menggunakan kasein sebagai substrat.

1. Diambil sebanyak 3 ml kasein ditambahkan dengan 0,5 ml ekstrak enzim kasar *Penicillium* sp. dan *Trichoderma* sp.
2. Dicampur ekstrak enzim kasar *Penicillium* sp. dan *Trichoderma* sp. sebagai isolat campuran.
3. Diinkubasi sesuai dengan variasi suhu yang telah ditetapkan (30°C, 40°C, dan 50°C) selama 10 menit.
4. Dihentikan reaksi dengan penambahan larutan TCA sebanyak 3 ml.

5. Kontrol yang digunakan adalah 3,5 ml kasein tanpa penambahan isolat dan diinkubasi selama 45 menit kemudian ditambahkan larutan TCA sebanyak 3 ml.
6. Disentrifugasi dengan kecepatan 5000 rpm selama 20 menit
7. Dilakukan pengukuran absorbansi pada panjang gelombang 275 nm.
8. Setiap sampel yang akan dihitung aktivitasnya memiliki nilai absorbansi. Dengan menggunakan rumus dibawah ini dapat dihitung unit aktivitas enzim. Perhitungan aktifitas enzim protease dapat dihitung dengan rumus:

$$A_e = \frac{x.V}{a.b}$$

Di mana:

A_e : Aktivitas enzim (U/ml)

x : Konsentrasi tirosin (mg/ml)

V : Volume total sampel tiap tabung

a : Volume enzim

b : Waktu reaksi

Aktivitas protease dihitung dalam satuan U (unit) per ml ekstrak enzim.

Satuan unit protease (U) didefinisikan sebagai banyaknya ml enzim yang dibutuhkan untuk menghasilkan 1 μ mol tirosin tiap menit dengan kasein sebagai substrat (Yusriah dan Nengah, 2013).

3.6 Analisa Data

Untuk mengetahui pengaruh suhu terhadap besarnya nilai aktivitas protease isolat kapang, digunakan rancangan penelitian berupa rancangan acak

lengkap (RAL) pola faktorial. Data pengaruh suhu terhadap aktivitas protease dianalisis dengan menggunakan Analysis Of Variance (ANOVA). Apabila perlakuan berbeda nyata maka dilanjutkan dengan *Uji Duncan Multiple Range Test* (DMRT).

