

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi Biokimia dan Genetika Jurusan Biologi F. MIPA Universitas Diponegoro Semarang dari bulan Oktober 2004 sampai Februari 2005.

3.2 Alat dan Bahan

3.2.1 Alat

Sentrifus, spektrofotometer “spectronic-20”, vortex, tabung reaksi, pipet tetes, pipet ukur 1 ml dan 10 ml, lampu spirtus, korek api, botol sampel, erlenmeyer, pH stick, batang pengaduk, timbangan analitik Sartorius, “hot plate” dan “magnetic stirrer”, autoklaf, “waterbath shaker”, inkubator.

3.2.2 Bahan

Sampel berupa : tanah pertanian jagung Tembalang, tanah Bledug Kuwu, sumber air panas Cipanas Bumiayu, limbah kulit udang dari pasar Yogyakarta, air rendaman proses pembuatan ikan asin di Tegal dan air tanaman mangrove dari Pantura Tegal. Media yang digunakan meliputi media agar kitin (0,1% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,02% K_2HPO_4 , 0,1 % ekstrak yeast, 1,5% agar, 0,3% koloidal kitin (Lampiran 1), media produksi (0,3% koloidal kitin , 1% pepton, 0,5% ekstrak yeast, 0,1% NaCl, 0,1% K_2HPO_4 , 0,05% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,001% $FeSO_4 \cdot 7H_2O$,

0,001% $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ dan masing-masing 0,0001% $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $\text{MnSO}_4 \cdot n\text{H}_2\text{O}$ dan $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ pH 7), buffer sitrat untuk pH 4 dan 5, buffer fosfat untuk pH 6, 7, 8, buffer asam borat-borax untuk pH 9 (Lampiran 4).

3.3 Cara Kerja

3.3.1 Isolasi Bakteri Kitinolitik

Sumber isolat diambil dari tanah dan air secara aseptis. Satu gram tanah disuspensikan dalam larutan garam fisiologis steril sehingga homogen kemudian dilakukan pengenceran sampai 10^{-4} lalu ditanam dengan metode tuang ("pour plate") pada media agar kitin dan diinkubasikan selama 48 – 72 jam pada suhu 45°C . Sumber isolat yang diambil dari air, langsung dilakukan pengenceran sampai 10^{-4} dan ditanam seperti sampel yang berupa tanah. Koloni-koloni yang tumbuh dan membentuk daerah halo di sekitarnya merupakan isolat kitinolitik.

3.3.2 Seleksi Isolat Kitinolitik

Isolat-isolat yang diperoleh pada tahap isolasi ditumbuhkan secara serentak dengan cara ditumbuhkan pada media agar kitin. Setelah diinkubasi selama 48 jam pada suhu 45°C , diamati terdapatnya daerah halo dan di subkultur sebanyak tiga kali untuk mendapatkan isolat dengan aktivitas kitinase terbaik. Isolat terpilih dikarakterisasi lebih lanjut produksi dan aktivitas enzim kitinasenya.

3.3.3 Pengamatan Morfologi Bakteri

Pengamatan morfologi bakteri dilakukan dengan pengecatan Gram. Gelas benda dibersihkan dengan alkohol 70 % dan dipanaskan di atas lampu spiritus kemudian diberi satu tetes akuades steril. Satu ose isolat bakteri umur 24 jam disuspensikan, kemudian difiksasi di atas lampu spiritus. Gram A sebanyak 2 – 3 tetes ditetaskan pada isolat bakteri yang telah berupa preparat ulas tersebut dan didiamkan selama 1 menit, lalu dicuci dengan air mengalir dan dikeringanginkan. Gram B (larutan Mordan) ditetaskan pada preparat ulas selanjutnya didiamkan selama 1 menit, dicuci dengan air mengalir dan dikeringanginkan. Preparat dicuci dengan Gram C (larutan peluntur) selama 30 detik, dicuci dengan air mengalir dan dikeringanginkan, setelah itu diberi Gram D (larutan cat penutup), didiamkan selama 2 menit, dicuci dengan air mengalir dan dikeringanginkan. Preparat diamati dengan mikroskop perbesaran kuat. Bakteri gram positif berwarna ungu/violet, gram negatif berwarna merah, dan gram variabel berwarna merah/ungu (Salle, 1993).

3.3.4 Pembuatan Starter

Isolat terpilih ditumbuhkan pada media produksi pada suhu 45⁰C untuk digunakan sebagai starter. Starter yang digunakan mempunyai kepadatan 10⁶ – 10⁷ sel/ml pada umur inkubasi 18 jam. Jumlah sel dihitung dengan menggunakan metode TPC dan OD 0,5 pada λ 620 nm (Brock dan Madigan, 1994).

3.3.5 Kurva Pertumbuhan Isolat dan Produksi Enzim

Isolat terpilih ditumbuhkan pada media produksi pada suhu 45°C. Setiap 6 jam sekali dilakukan pengambilan kultur sebanyak 4 ml untuk pengukuran kurva pertumbuhan dengan metode spektrofotometri pada λ 620. Uji aktivitas enzim dilakukan sentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm selama 10 menit, supernatan yang dihasilkan digunakan untuk uji aktivitas enzim kitinase (Ueda dan Arai, 1992).

3.3.6 Pengujian Aktivitas enzim

Aktivitas kitinase diuji menurut metode Ueda dan Arai (1992) dengan substrat koloidal kitin. Sebanyak 1,0 ml 0,3 % koloidal kitin, 2,0 ml buffer dan 1,0 ml filtrat enzim dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan diinkubasi pada suhu 45°C selama 1 jam. Aktivitas enzim dalam campuran tersebut ditentukan secara turbidimetri pada λ 660 nm. Satu unit aktivitas enzim didefinisikan sebagai jumlah enzim yang menyebabkan pengurangan absorbansi sebesar 0,001 campuran reaksi per menit.

$$\text{Unit Aktivitas} = \frac{x - y}{0,001} \times \frac{1}{60}$$

Keterangan : x = Absorbansi kontrol
y = Absorbansi sampel

3.3.7 Penentuan Suhu dan pH Optimum Enzim

Penentuan suhu dan pH optimum dilakukan melalui optimasi bertingkat. Suhu optimum aktivitas kitinase didapat dengan cara menginkubasikan reaksi

enzim pada suhu 45, 50, 55, 60, 70, 75 dan 80°C dengan komposisi seperti di atas. Hasil penentuan suhu optimum digunakan untuk penentuan pH optimum, dilakukan dengan mengukur aktivitas enzim pada pH 4, 5, 6, 7, 8 dan 9.

3.3.8 Penentuan Termostabilitas

Penentuan termostabilitas dilakukan dengan menginkubasikan reaksi enzim pada suhu dan pH optimum selama 5 jam. Setiap jamnya dilakukan pengukuran aktivitas enzim untuk mengetahui sampai berapa lama enzim tersebut dapat stabil.

3.4 Parameter yang Diamati

Parameter yang diamati dalam penelitian ini meliputi

1. Morfologi bakteri.
2. Pertumbuhan dan produksi enzim.
3. Suhu optimum aktivitas kitinase.
4. pH optimum aktivitas kitinase.
5. Termostabilitas enzim.

3.5 Metode Analisis Data

Hasil penelitian ini dianalisis menggunakan analisis deskriptif.