

BAB III

BAHAN DAN CARA KERJA

A. LOKASI DAN WAKTU PENELITIAN

Penelitian dilakukan di Laboratorium Teknologi Bioindustri, Pusat Teknologi Bioindustri, Badan Pengkajian dan Penerapan Teknologi (LTB-PTB-BPPT)-Serpong. Waktu penelitian dilakukan selama 11 bulan (Februari 2007--Desember 2007).

B. BAHAN

1. Mikroorganisme

Mikroorganisme yang digunakan adalah delapan isolat bakteri kultur koleksi Laboratorium Teknologi Bioindustri, Pusat Teknologi Bioindustri (LTB-PTB-BPPT), berasal dari limbah kulit udang Palembang. Bakteri yang digunakan sebagai kontrol positif adalah *Chromobacterium violaceum* (Chernin *dkk.* 1998) dan bakteri yang digunakan sebagai kontrol negatif adalah *Bacillus licheniformis* F11 (Waldeck *dkk.* 2006).

2. Medium dan Bahan Kimia

Medium Luria Bertani (LB) digunakan sebagai medium pemeliharaan isolat. Komposisi medium tersebut adalah ekstrak khamir [Oxoid] 0,5%, NaCl [Merck] 1%, pepton [Oxoid] 1% dan agar [Fluka] 2%. Medium agar kitin

digunakan untuk penapisan kitinolitik menurut Wang dan Chang (1997) yang dimodifikasi memiliki komposisi koloidal kitin 2%, K_2HPO_4 [Merck] 0,1%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ [Merck] 0,01%, NaCl [Merck] 3%, $(NH_4)_2SO_4$ [Merck] 0,7%, ekstrak khamir [Oxoid] 0,05% dan agar [Fluka] 2%.

Bahan kimia yang digunakan dalam pembuatan koloidal kitin adalah HCl pekat [Merck], NaOH [Merck] 12N. Reagen Schale terdiri dari $K_3[Fe(CN)_6]$ [Merck] dan Na_2CO_3 [Merck]. Bahan kimia lain yang digunakan adalah N-asetil-D-glukosamin [Sigma], *Coomassie Brilliant Blue G-250*, Etanol [Merck], H_3PO_4 [Sigma], bufer fosfat dan *Bovine Serum Albumin (BSA)* [Fluka].

3. Peralatan

Peralatan yang digunakan adalah autoklaf [Iwaki ACV-2450], timbangan analitik [Sartorius], *shaking incubator* [GFL], *static incubator* [Mettler], sentrifugasi [Himac CR 21 G], *magnetic stirrer & hot plate* [Heidolph MR 3001], *laminar air flow* [Babcock-BSH], penangas air [Mettler], spektrofotometer [Pharmacia], vorteks [Sargen welch], mikropipet [Eppendorf], oven [Mettler], pH meter [Knick], jangka sorong, dan *glass wool*. Peralatan gelas yang digunakan adalah erlenmeyer, cawan petri, spatel Drygalski, tabung reaksi, pipet volumetrik, *beaker glass*, dan peralatan gelas lainnya yang umum digunakan di laboratorium mikrobiologi dan biokimia.

C. CARA KERJA

Skema kerja penelitian dapat dilihat pada lampiran 1

1. Pembuatan koloidal kitin

Menurut Arnold dan Solomon pada tahun 1986 (*lihat Nasran dkk.* 2003: 34--35), koloidal kitin dibuat dengan melarutkan 10 g bubuk kitin dalam 200 ml HCl pekat, kemudian didiamkan semalaman dalam keadaan tertutup pada suhu 4° C. Larutan kemudian disaring menggunakan *glass-wool*, lalu filtrat dicampur dengan 100 ml akuades dan dinetralkan dengan NaOH 12 N (± 200 ml). Larutan kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 8000 rpm selama 20 menit pada suhu 4° C. Supernatan dibuang, endapan ditambah akuades dan diaduk untuk melarutkan sisa garam, kemudian disentrifugasi kembali dengan kecepatan 8000 rpm selama 20 menit pada suhu 4° C. Endapan yang terbentuk merupakan koloidal kitin yang siap digunakan (Lampiran 2).

2. Pembuatan medium, reagen, dan bufer

a. Pembuatan medium kitin

Medium agar kitin dibuat berdasarkan metode Park *dkk.* (2000: 224) yang dimodifikasi yaitu dengan mencampurkan koloidal kitin 2 g, K₂HPO₄ 0,1 g, MgSO₄.7H₂O 0,01 g, NaCl 3 g, (NH₄)₂SO₄ 0,7 g, ekstrak khamir 0,05 g dan agar 2 g dalam 100 ml akuades, larutan kemudian dihomogenkan dengan

magnetic stirrer dan dipanaskan hingga larut, kemudian disterilkan dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit. Medium yang telah steril tersebut kemudian dituang ke dalam cawan petri (± 15 ml) dan dibiarkan hingga mengeras. Medium kitin cair yang digunakan untuk produksi enzim kitinolitik dengan fermentasi memiliki komposisi yang sama dengan medium agar kitin, namun koloidal kitin yang digunakan sebanyak 0,5 g.

b. Pembuatan medium Luria Bertani (LB)

Medium LB dibuat dengan mencampurkan ekstrak khamir 0,5 g, NaCl 1 g, pepton 1 g dan agar 2 g dalam 100 ml akuades. Larutan kemudian dihomogenkan dengan *magnetic stirrer* dan dipanaskan hingga larut, kemudian disterilkan dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit.

c. Pembuatan reagen Schale dan larutan standar N-asetilglukosamin

Reagen Schale dibuat dengan cara melarutkan 0,125 g $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ dalam 250 ml larutan Na_2CO_3 0,5 M. Larutan standar N-asetilglukosamin dibuat dengan melarutkan 0,01 g N-asetilglukosamin ke dalam 10 ml akuades.

d. Pembuatan reagen Bradford dan larutan standar BSA

Melarutkan 100 g *Coomassie Blue Brilliant G-250* bersama 50 ml etanol 95% dan 100 ml H_3PO_4 85%. Menambahkan akuades pada larutan tersebut hingga volume larutan menjadi 1 liter. Larutan kemudian disaring

dengan kertas saring. Larutan tersebut merupakan stok Bradford, yang diencerkan lima kali sebelum digunakan untuk uji protein. Larutan standar dibuat dengan mencampurkan 10 mg BSA (*Bovine Serum Albumin*), 5 ml akuades dan 0,05 ml NaOH 0,1 M. Larutan dikocok perlahan, setelah larutan homogen, larutan ditambahkan akuades hingga volume larutan menjadi 10 ml. Konsentrasi akhir larutan stok standar adalah 1 mg/ml.

e. Pembuatan larutan bufer

Bufer yang digunakan adalah bufer fosfat (pH 6, 7 dan 8), dan bufer borat-boraks (pH 9) berdasarkan Colowick dan Kaplan (1955). Bufer fosfat dibuat dengan mencampurkan x ml NaH_2PO_4 0,2 M (27,8 g NaH_2PO_4 dalam 1000 ml akuades) dengan y ml $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,2 M (53,65 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ dalam 1000 ml akuades), kemudian diencerkan hingga volume larutan 200 ml. Bufer fosfat pH 6 dibuat dengan mencampurkan 87,7 ml NaH_2PO_4 0,2 M dan 12,3 ml $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,2 M. Bufer fosfat pH 7 dibuat dengan mencampurkan 39,0 ml NaH_2PO_4 0,2 M dan 61,0 ml $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,2 M. Bufer fosfat pH 8 dibuat dengan mencampurkan 5,3 ml NaH_2PO_4 0,2 M dan 94,7 ml $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,2 M. Bufer borat-boraks pH 9 dibuat dengan mencampurkan 50 ml larutan asam borat 0,2 M (12,4 g H_3BO_3 dalam 1000 ml akuades) dengan 59,0 ml larutan boraks 0,05 M (19,5 g boraks dalam 1000 ml akuades), kemudian diencerkan hingga volume larutan 200 ml.

f. Pembuatan substrat kitin 1%

Substrat kitin 1% digunakan dalam penentuan aktivitas kuantitatif enzim kitinolitik. Substrat kitin yang digunakan adalah koloidal kitin. Substrat kitin 1% dibuat dengan melarutkan 1 g koloidal kitin dalam 100 ml akuades.

3. Peremajaan isolat dan pembuatan koloni tunggal

Peremajaan isolat dilakukan dengan menumbuhkan kembali delapan isolat bakteri dari kultur koleksi ke medium agar LB. Peremajaan yang dilakukan, yaitu dengan menggosokkan satu ose dari kultur koleksi ke medium agar LB. Koloni tunggal dibuat dengan metode gores (Black 1999: 155). Sebanyak satu ose dari kultur koleksi diambil secara aseptis, kemudian digosokkan (3--4 goresan) ke medium agar LB pada cawan petri. Cawan petri diputar dan goresan dilakukan kembali ke bagian medium yang masih belum tergosok. Goresan kedua dimulai dari goresan yang dibuat sebelumnya. Goresan secara berulang dilakukan hingga terbentuk empat bagian. Cawan petri kemudian di inkubasi pada suhu 37° C selama 24 jam hingga diperoleh koloni tunggal.

4. Pembuatan *working culture* dan *stock culture*

Koloni tunggal yang diperoleh dari tiap isolat bakteri diinokulasi pada medium agar miring LB, kemudian diinkubasi pada suhu 37° C selama 24 jam. Bakteri yang tumbuh setelah 24 jam pada medium agar LB tersebut

dapat digunakan untuk pengujian selanjutnya. Kultur bakteri tersebut sebagai *working culture*. *Stock culture* dibuat dengan menyimpan bakteri yang tumbuh setelah 24 jam tersebut pada suhu 4° C. Penyimpanan dilakukan maksimal hingga 6 bulan. *Working culture* juga dapat dibuat dengan memindahkan sel bakteri dari *stock culture* ke medium agar LB, kemudian diinkubasi pada suhu 37° C selama 24 jam untuk pengujian selanjutnya.

5. Penentuan aktivitas kualitatif enzim kitinolitik

Penentuan aktivitas kualitatif enzim kitinolitik dilakukan berdasarkan metode Park *dkk.* (2000: 224) yang dimodifikasi. Penentuan aktivitas kitinolitik kedelapan isolat bakteri dilakukan dengan melihat zona bening yang dihasilkan oleh bakteri. Penentuan aktivitas tersebut dilakukan dengan menginokulasi sel bakteri berumur 24 jam pada medium agar kitin dengan pH 7. Inokulasi dilakukan menggunakan tusuk gigi steril, kemudian diinkubasi pada suhu 37° C selama 6 hari. Suhu selama inkubasi yang digunakan untuk kedua kontrol berbeda dengan kedelapan isolat yang diuji, yaitu *Chromobacterium violaceum* (kontrol positif) diinkubasi pada suhu 30° C, sedangkan *Bacillus licheniformis* F11 (kontrol negatif) diinkubasi pada suhu 55° C, namun lama waktu inkubasi yang digunakan sama, yaitu 6 hari. Aktivitas enzim kitinolitik ditentukan dengan menghitung nilai indeks kitinolitik, yaitu nisbah antara diameter zona bening dengan diameter koloni bakteri. Pengamatan terhadap zona bening dilakukan setiap hari. (Lampiran 3)

6. Seleksi bakteri kitinolitik

Seleksi dilakukan untuk menentukan satu isolat yang paling potensial menghasilkan enzim kitinolitik. Seleksi dilakukan dengan melihat kemampuan isolat bakteri memproduksi enzim kitinolitik dalam medium cair kitin (medium produksi), serta melihat hubungannya dengan jumlah sel dan kadar protein yang dihasilkan. Produksi enzim kitinolitik dengan fermentasi ditentukan berdasarkan besarnya aktivitas enzim kitinolitik. Setiap perlakuan dibuat sebanyak tiga kali ulangan.

a. Produksi enzim kitinolitik

Produksi enzim kitinolitik dengan fermentasi yaitu sebanyak 2 ose isolat bakteri berusia 24 jam diinokulasi ke dalam 10 ml medium produksi (sebagai starter), kemudian diinkubasi dalam *shaking incubator* pada suhu 37° C dengan kecepatan 150 rpm selama 24 jam. Sebanyak 5 ml starter tersebut ditambahkan ke dalam 45 ml medium produksi, kemudian diinkubasi dalam *shaking incubator* pada suhu 37° C dengan kecepatan 150 rpm selama 60 jam. Enzim kasar dan sel dipisahkan dengan sentrifugasi pada kecepatan 8000 rpm pada suhu 4° C selama 10 menit. Supernatan hasil sentrifugasi adalah enzim kasar yang digunakan selanjutnya untuk penentuan kemampuan isolat dalam memproduksi enzim dengan cara mengukur aktivitas kuantitatif enzim kitinolitik dan penentuan kadar protein (Nasran *dkk.* 2003: 34--35).

b. Penentuan aktivitas kuantitatif enzim kitinolitik

Penentuan aktivitas kuantitatif enzim kitinolitik dilakukan berdasarkan modifikasi metode Wang dan Chang (1997). Penentuan aktivitas enzim kitinolitik dilakukan setiap 12 jam selama 60 jam. Penentuan aktivitas enzim tersebut dilakukan dengan melihat produk akhir yaitu N-asetilglukosamin (GlcNAc) yang dihasilkan. Penentuan aktivitas enzim kitinolitik yaitu, sebanyak 0,15 ml enzim kasar (supernatan bebas sel) ditambahkan ke dalam campuran 0,15 ml substrat kitin 1% dan 0,3 ml larutan bufer pH 7. Campuran tersebut dihomogenisasi dan diinkubasi pada suhu 37° C selama 60 menit, kemudian dipanaskan pada suhu 100° C selama 3 menit.

Kontrol dibuat dengan menambahkan 0,15 ml enzim kasar setelah dipanaskan pada suhu 100° C selama 3 menit. Larutan kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 8000 rpm pada suhu 4° C selama 10 menit. Jumlah N-asetilglukosamin ditentukan dengan mencampurkan 0,5 ml supernatan dengan 0,5 ml akuades dan 1 ml pereaksi Schale. Campuran kemudian diukur absorbansinya pada panjang gelombang 420 nm. Konsentrasi N-asetilglukosamin dihitung berdasarkan kurva standar N-asetilglukosamin. Kurva standar merupakan hubungan antara absorbansi dan konsentrasi larutan N-asetilglukosamin standar (Gambar 6; Tabel 1). Skema penentuan aktivitas kuantitatif enzim kitinolitik dapat dilihat pada lampiran 4.

Nilai aktivitas enzim kitinolitik diperoleh dengan rumus:

$$\text{Aktivitas enzim (U/ml)} = \frac{1000 \times ([S]-[K]) \times fp}{BM \times t \times Ve}$$

Keterangan:

fp = Faktor pengenceran

Ve = Volume enzim kasar yang digunakan (ml)

1000 = Faktor konversi dalam μmol

t = Waktu inkubasi pada suhu optimum (menit)

BM = Berat molekul N-asetilglukosamin (221,2)

[S] = [GlnNAc] pada substrat $\mu\text{g/ml}$

[K] = [GlcNAc] pada kontrol $\mu\text{g/ml}$

(Harini & Septariningrum 2006: 559)

7. Penentuan jumlah sel bakteri

Penentuan jumlah sel bakteri dilakukan dengan metode *Total Plate Count* (TPC) menurut Black (1999: 141--142). Sebanyak 0,1 ml suspensi sel diencerkan ke dalam larutan NaCl 0,85% steril hingga diperoleh faktor pengenceran tertentu. Suspensi sel sebanyak 0,1 ml dari setiap pengenceran kemudian disebar dengan spatel Drygalski di atas medium agar LB. Suspensi yang telah disebar tersebut kemudian diinkubasi pada suhu 37° C selama 6 jam. Setelah 6 jam, kemudian dilakukan perhitungan koloni yang terbentuk.

8. Penentuan konsentrasi protein enzim kitinolitik

Konsentrasi protein enzim ditentukan berdasarkan metode Bradford (1976), yaitu dengan cara mencampurkan 40 µl enzim kasar yang dihasilkan oleh masing-masing isolat dengan 2 ml pereaksi Bradford. Campuran kemudian divorteks dan diinkubasi pada suhu kamar selama 15 menit. Absorbansi larutan dibaca pada λ 595 nm. Kadar protein dihitung berdasarkan kurva standar BSA. Kurva standar BSA merupakan hubungan antara absorbansi dan konsentrasi larutan BSA standar (Gambar 7; Tabel 2). Konsentrasi protein yang diperoleh digunakan untuk menentukan aktivitas spesifik enzim kitinolitik. Aktivitas spesifik enzim tersebut menurut Lehninger (1982: 249) dapat ditentukan menggunakan rumus berikut:

$$\text{Aktivitas spesifik} = \frac{\text{Aktivitas enzim (U/ml)}}{\text{Konsentrasi protein (mg/ml)}}$$

9. Pengujian variasi suhu dan pH untuk produksi enzim kitinolitik

Pengujian variasi suhu dan pH untuk produksi enzim kitinolitik dilakukan terhadap satu isolat terpilih. Pengujian tersebut bertujuan untuk mengetahui suhu dan pH yang sesuai dalam produksi enzim kitinolitik dari beberapa variasi suhu dan pH yang diberikan. Pengujian tersebut memiliki cara yang sama dengan seleksi bakteri pada medium fermentasi, hanya suhu inkubasi dan pH medium disesuaikan dengan variasi suhu dan pH yang digunakan dalam pengujian (cara kerja sama seperti langkah 6). Pengujian

dilakukan dengan mengukur aktivitas kuantitatif enzim kitinolitik dan konsentrasi protein. Pengukuran aktivitas kuantitatif enzim dan konsentrasi protein dari isolat terpilih dalam pengujian tersebut dilakukan sebanyak satu kali yaitu pada produksi enzim kitinolitik tertinggi saat seleksi.

Variasi suhu yang diberikan dalam pengujian yaitu 30°, 37°, 45°, dan 55° C. Penentuan suhu yang sesuai dalam produksi enzim dilakukan pada pH 7. Variasi pH yang diberikan dalam pengujian yaitu 6, 7, 8, dan 9. Penentuan pH yang sesuai dalam produksi enzim dilakukan pada suhu sesuai pula yang diperoleh dari pengujian sebelumnya. Suhu dan pH yang sesuai dalam produksi enzim kitinolitik oleh bakteri ditentukan berdasarkan nilai aktivitas spesifik enzim kitinolitik tertinggi.