

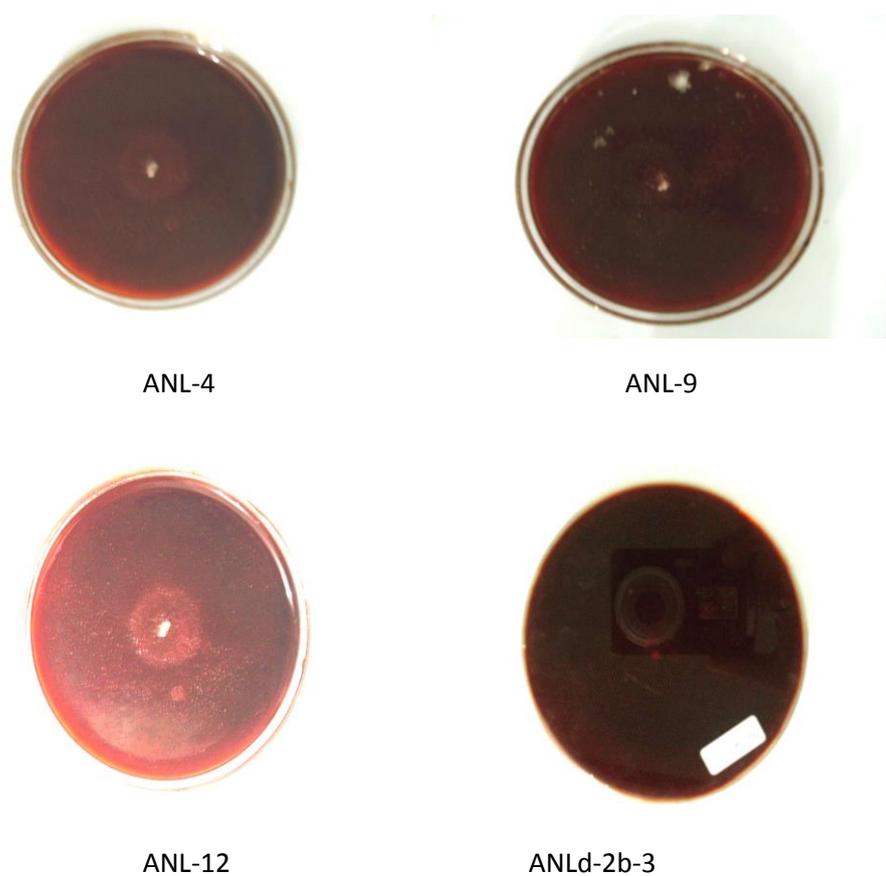
#### IV. HASIL DAN PEMBAHASAN

##### A. Identifikasi *Actinomycetes*

Pada penelitian ini isolat *actinomycetes* yang digunakan adalah ANL-4, isolat ini telah berhasil diisolasi dari sedimen mangrove pantai dengan ciri-ciri strain ini memiliki miselium *aerial* berwarna putih keabuan dan miselium substratnya berwarna krem keabuan. Isolat ANL-4 ini memiliki indeks kitinolitik terbesar dibandingkan dengan ketiga isolat lainnya (Tabel 2), ini ditentukan berdasarkan rasio diameter zona bening yang dihasilkan terhadap diameter koloni. Berikut ini indeks kitinolitik isolat yang mempunyai aktivitas kitinolitik :

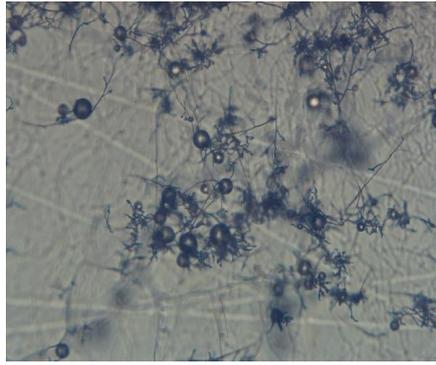
Tabel 2 Indeks kitinolitik *actinomycetes* yang diisolasi dari Lumpur Hutan Bakau asal Pantai Ringgung Perairan Teluk Lampung

Kode Isolat	Diameter Zona Bening (cm)	Diameter Koloni (cm)	Indeks Kitinolitik
ANL - 12	2,3	1,2	1,9
ANL - 9	1,0	0,5	2,0
ANLd - 2b - 3	0,7	0,3	2,3
ANL - 4	0,5	0,1	5,0

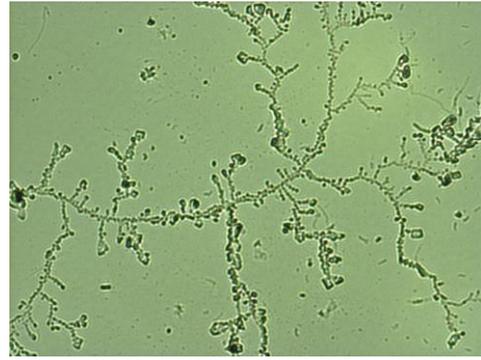


Gambar 3. Actinomycetes yang mempunyai kemampuan dalam mendegradasi kitin pada media *mineral-salt agar plate* dengan Kitin 1% dengan pewarnaan Congo Red 1 %

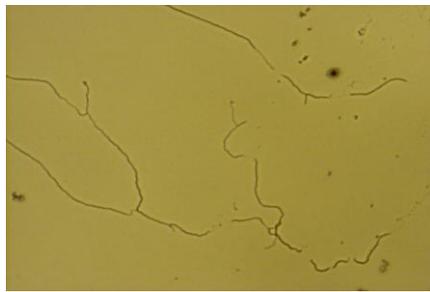
Strain *actinomycetes* ini ditumbuhkan dalam media ISP-2. Isolat ANL-4 yang diperoleh memiliki kemiripan dengan Gambar mikroskopis dari *streptomyces sp* yang telah berhasil diisolasi dari tanah oleh Nikolova, *et al.* pada 2006-2007, sehingga dapat dikatakan bahwa isolat ANL-4 termasuk kedalam genus *streptomyces*.



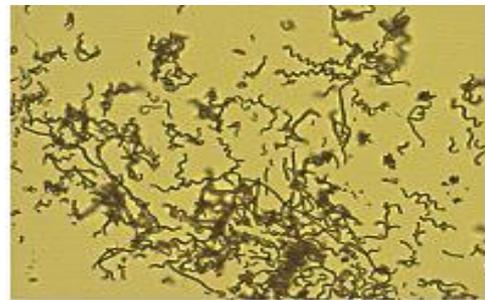
ANL-12



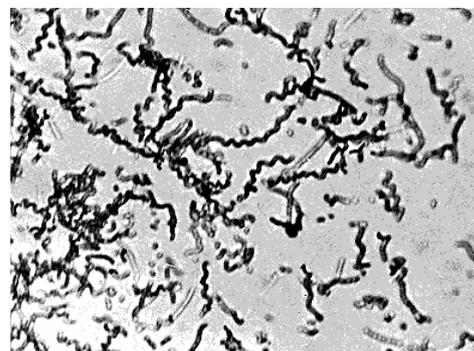
ANL-9



ANL-4



ANLd-2b-3



Nikolova, *et al.* pada 2006-2007

Gambar 4. Isolat actinomycetes secara mikroskopik

## B. Solid State Fermentation, SSF (Fermentasi Keadaan Padat)

Pada tahap ini, isolat *actinomycetes* yang akan diisolasi enzimnya, ditumbuhkan pada media *mineralsalt* sebanyak 100 mL kemudian media tersebut ditambahkan dengan 5 mL media *mineralsalt* yang didalamnya terdapat isolat *actinomycetes* (ANL-4), selanjutnya dikultivasi pada *orbital shaker* dengan kecepatan 175 rpm selama 5 hari. Hasil kultivasi yang didapat berwarna kuning kekeruhan, warna tersebut menunjukkan adanya pertumbuhan *actinomycetes*. Setiap isolat *actinomycetes* mempunyai warna yang berbeda-beda, jika dikultivasi dalam media *mineralsalt*. Setelah dikultivasi selama 5 hari, isolat *actinomycetes* (ANL-4) yang ada pada media *mineralsalt* dipisahkan antara biomasa dengan filtratnya. Kemudian filtrat yang diperoleh di sentrifius, dan hasil dari sentrifius tersebut merupakan ekstrak kasar enzim kitinase.

Dalam proses fermentasi keadaan padat (SSF) ini menggunakan dua substrat yaitu kitin dicuci dengan NaOH dan kitin tanpa dicuci NaOH. NaOH ini berperan sebagai pencuci untuk menghilangkan zat pengotor yang ada didalam kitin, dan dapat memutus gugus asetamida, sehingga pada penelitian ini tujuan menggunakan dua substrat tersebut adalah untuk membandingkan hasil antara kitin dicuci dengan NaOH dan kitin tanpa dicuci NaOH.

### C. Uji Aktivitas Enzim

Enzim kitinase merupakan suatu enzim ekstraseluler, oleh karena itu pengambilan ekstrak kasar enzim dilakukan dengan sentrifugasi pada kecepatan 10.000 rpm selama 20 menit pada suhu 4°C (M.Al-Tai *et al.*, 1989). Filtrat hasil sentrifugasi diuji berdasarkan variasi pH, suhu, dan waktu inkubasi dengan menggunakan metode Somolgi–Nelson, kemudian diukur absorbansinya pada panjang gelombang 630 nm dengan menggunakan *microplate reader*. *Microplate reader* memiliki keuntungan utama adalah sampel dan reagen yang lebih sedikit, dan menghilangkan proses pemanasan serta dapat dilakukan secara banyak.

Total protein ditentukan dengan menggunakan metode Lowry (1951) dengan pengulangan sebanyak 3 kali untuk setiap sampel dan standar. Pengulangan ini dilakukan untuk memperkecil kesalahan pada pembacaan absorbansi dalam *microplate*. Total protein ekstrak kasar enzim kitinase dapat dilihat pada Tabel 3, dengan memplotkan serapan standar *Bovine Serum Albumin* konsentrasi 100 sampai 2000 µL/mL.

Aktivitas enzim kitinase ditentukan berdasarkan jumlah dari glukosa yang dilepaskan dalam µg/mL enzim kasar/jam (U/mL) enzim oleh reaksi substrat dengan kondisi tertentu (Mathivanan *et al.*, 1995).

Aktivitas unit terbesar dimiliki oleh *colloidal* kitin (kitin dicuci dengan NaOH) dibandingkan dengan *colloidal* kitin (kitin tanpa dicuci NaOH) (Tabel 3). Substrat *colloidal* kitin (kitin tanpa dicuci NaOH) sedikit menunjukkan adanya aktivitas kitinolitik pada media *mineralsalt*. Hal ini dimungkinkan aktivitasnya telah hilang setelah masa inkubasi 7 hari. Kemampuan suatu mikroorganisme dalam mensekresikan enzim adalah berbeda-beda. Tergantung pada jenis mikroba itu sendiri maupun media yang digunakan.

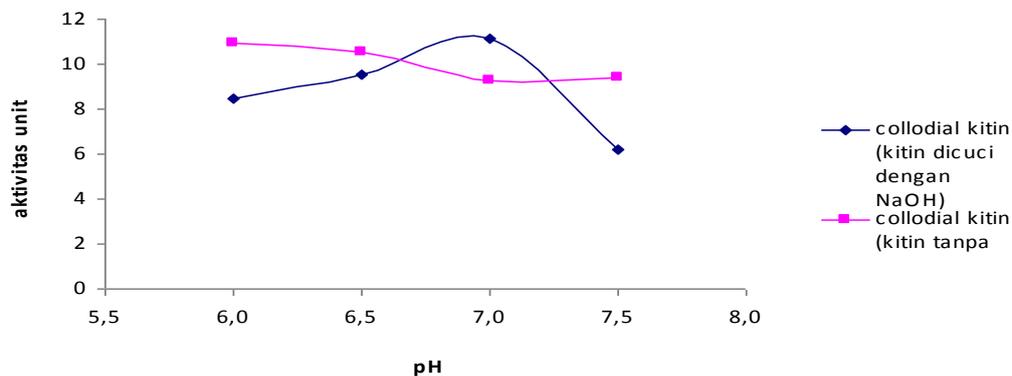
Tabel 3. Aktivitas unit enzim kitinase, kadar protein, dan aktivitas spesifik dari isolat *Actinomycetes* (ANL-4)

No.	substrat	Aktivitas Unit (U/mL)	Kadar protein (mg/mL)	Aktivitas spesifik (U/mg)
1.	<i>Colloidal</i> kitin (Kitin tanpa dicuci NaOH)	$4,1399 \times 10^{-5}$	4,58708	$9,04 \times 10^{-6}$
2.	<i>Colloidal</i> kitin (Kitin dicuci dengan NaOH)	$4,3157 \times 10^{-5}$	6,05631	$7,12 \times 10^{-6}$

### 1. Pengaruh pH Selama Reaksi Enzim Substrat

Ekstrak kasar enzim yang dihasilkan selanjutnya digunakan sebagai sampel utama untuk mengetahui pengaruh pH terhadap substrat selama reaksi. Penentuan pH optimum dilakukan dengan cara mereaksikan substrat dengan enzim dengan variasi pH yaitu 6,0; 6,5; 7,0; dan 7,5 dimana substrat yang digunakan adalah kitin yang telah dicuci dengan menggunakan NaOH dan

tanpa dicuci dengan NaOH. Berikut ini hasil dari penentuan pH optimum enzim kitinase dengan substrat yang telah dicuci dengan NaOH dan tanpa dicuci dengan NaOH yang diperlihatkan pada Gambar 5.



Gambar 5. Kurva pH optimum untuk enzim kitinase

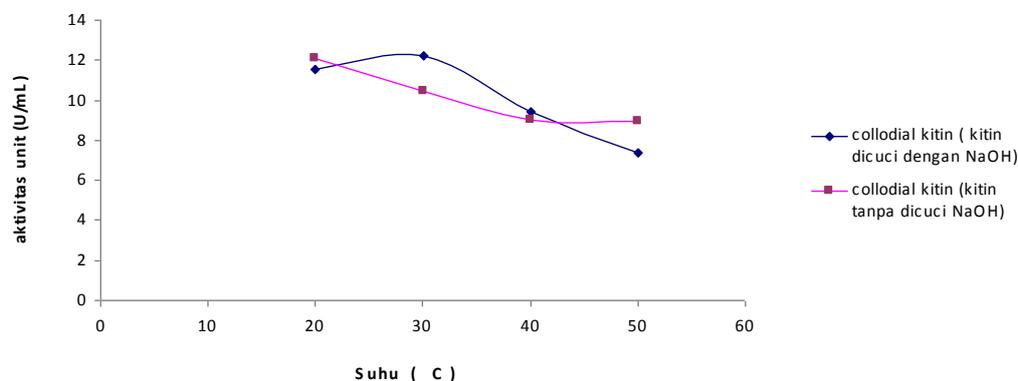
Pada Gambar 5 dapat dilihat bahwa enzim kitinase dengan substrat yaitu kitin yang telah dicuci dengan NaOH menghasilkan aktivitas optimum pada pH 7,0 dengan aktivitas unit sebesar 11,166 U/mL, sedangkan pada substrat kitin tanpa dicuci dengan NaOH menghasilkan aktivitas optimum pada pH 6 dengan aktivitas unit sebesar 10,929 U/mL.

Berdasarkan uraian di atas, terjadi peningkatan pH optimum dari enzim kitinase dengan substrat yang telah dicuci dengan NaOH dibandingkan enzim kitinase dengan substrat tanpa dicuci dengan NaOH. Hal ini diperkirakan karena NaOH dapat bersifat sebagai pencuci untuk menghilangkan zat pengotor dan dapat memutus gugus asetamida. Hal ini juga disebabkan adanya pengaruh terhadap struktur ion pada enzim sehingga perubahan pH lingkungan akan berpengaruh terhadap efektifitas bagian aktif enzim dalam membentuk ion kompleks enzim substrat.

Aktivitas maksimum dicapai pada suatu pH tertentu, dan penyimpangan-penyimpangan dari pH tersebut menyebabkan berkurangnya aktivitas. Hal ini disebabkan adanya pertumbuhan mikroorganisme dipengaruhi oleh berbagai keadaan fisik dan kimiawi, karena enzimlah yang mengkatalisis reaksi-reaksi yang berhubungan dengan proses kehidupan. Maka keadaan-keadaan tersebut sebenarnya mempengaruhi enzim dan juga mempengaruhi pertumbuhan.

## 2. Pengaruh Suhu Selama Reaksi Enzim Substrat

Setelah mengetahui pH optimumnya, maka selanjutnya dilakukan penentuan suhu selama reaksi enzim dengan substrat, yaitu dengan cara mereaksikan substrat dengan enzim, dengan variasi suhu 20, 30, 40, dan 50<sup>0</sup>C. Berikut ini hasil dari penentuan pH optimum enzim kitinase dengan substrat yang telah dicuci dengan NaOH dan tanpa dicuci dengan NaOH yang diperlihatkan pada Gambar 6.



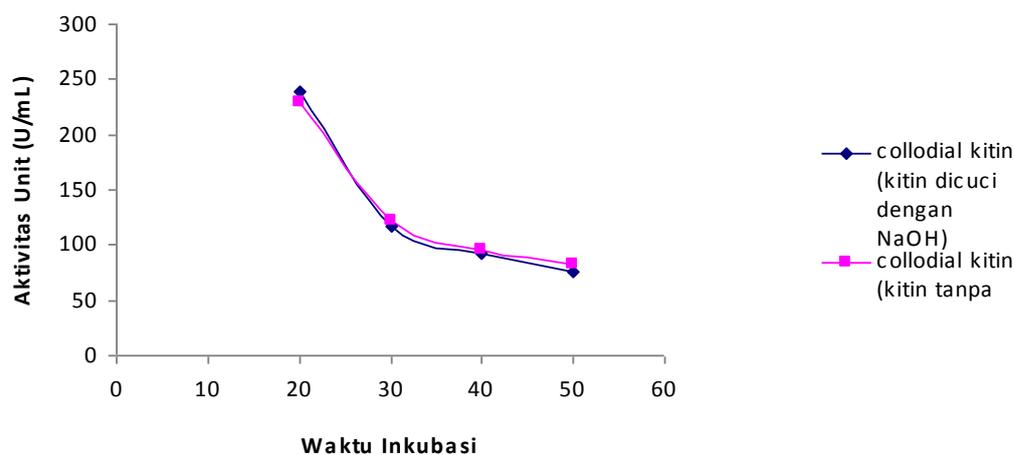
Gambar 6. Kurva suhu optimum untuk enzim kitinase

Berdasarkan gambar di atas, menunjukkan bahwa enzim dengan substrat yang telah dicuci dengan NaOH menghasilkan aktivitas optimum pada suhu 30°C dengan aktivitas unit sebesar 12,225 U/mL, sedangkan enzim dengan substrat tanpa dicuci NaOH aktivitas optimumnya pada suhu 20°C dengan aktivitas unit sebesar 12,096 U/mL. Di atas 40°C, aktivitas menurun dan hilang sepenuhnya pada 60°C. Bila enzim itu disimpan di berbagai temperatur selama 30 menit dalam suatu buffer phospat (pH 7.0), itu signifikan tidak aktif di atas 50°C dan 65°C sepenuhnya (Gambar 6).

Kurva di atas memiliki perbedaan bentuk kurva, ini dikarenakan pada suhu rendah aktivitas enzim bertambah dengan naiknya suhu sampai aktivitas optimumnya dicapai. Kenaikkan suhu lebih lanjut berakibat dengan berkurangnya aktivitas dan pada akhirnya merusak enzim (mengalami denaturasi). Apabila terjadi denaturasi, bagian aktif enzim akan terganggu dan dengan demikian konsentrasi efektif enzim menjadi berkurang dan kecepatan reaksinya akan menurun.

### **3. Pengaruh Waktu Selama Reaksi Enzim Substrat**

Untuk penentuan waktu selama reaksi enzim substrat dapat dilakukan setelah mengetahui pH optimum dan suhu optimum yaitu mereaksikan enzim dengan substrat, dengan variasi waktu 20, 30, 40, dan 50 menit. Hasil penentuan waktu selama reaksi enzim substrat dapat dilihat pada Gambar 7.



Gambar 7. Kurva waktu inkubasi optimum untuk enzim kitinase

Dari Gambar 7 tersebut, dapat dilihat bahwa enzim dengan substrat yang telah dicuci dengan NaOH memiliki aktivitas optimumnya yaitu 20 menit dengan aktivitas unit sebesar 238,672 U/mL. Sedangkan enzim dengan substrat tanpa dicuci NaOH, aktivitas optimumnya yaitu 20 menit dengan aktivitas unit sebesar 228,857 U/mL. Aktivitas enzim mengalami penurunan dengan bertambahnya waktu inkubasi, hal ini tergantung pada mikroorganisme yang digunakan.