

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental. Rancangan penelitian yang digunakan adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan 4 perlakuan dan 6 ulangan, perlakuan yang digunakan adalah sebagai berikut:

- Perlakuan 1 : *P.pseudomallei* (Pp)
Perlakuan 2 : *K.ozzaena* (Ko)
Perlakuan 3 : *P.pseudomallei* + *K.ozzaena* (Km)
Perlakuan 4 : kontrol (tanpa pemberian enzim kitinase kasar)

3.2 Waktu dan Tempat

Penelitian dilaksanakan pada bulan Maret sampai Juni 2013 di Laboratorium Mikrobiologi, Genetika, dan Optik Jurusan Biologi Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang.

3.3 Alat dan Bahan

3.3.1 Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian adalah mikroskop, Laminar Air Flow (LAF), autoklaf, oven, inkubator, timbangan analitik, hot plate, shaker, sentrifugasi, pH meter, spektrofotometer UV-Vis, cuvet, tabung reaksi, mikropipet, tube, stirer, cawan petri, beaker glass, gelas ukur, erlenmeyer,

pengaduk kaca, jarum ose, bunsen, korek api, penggaris, pipet tetes, objek glass, deck glass, aluminium foil, plastik tahan panas, kapas, plastik wrap, kertas saring whatman no.1, glass-wool, kain kasa, dan alat tulis menulis.

3.3.2 Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian adalah biakan jamur *Fusarium oxysporum*, biakan bakteri *Pseudomonas pseudomallei* dan *Klebsiella ozaenae*, media *Nutrient Agar* (NA), *Potato Dextrose Agar* (PDA), *Potato Dextrose Broth* (PDB), bubuk kitin, HCl pekat, NaOH 12 N, KH_2PO_4 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, *peptone*, reagen DNS (3,5 asam dinitrosalisilat), kentang, dextrosa, aquades, alkohol 70 % dan spirtus.

3.4 Variabel Penelitian

Variabel penelitian terdiri dari variabel bebas dan variabel terikat.

Variabel bebas : enzim kitinase kasar dari bakteri *P.pseudomallei*, *K.ozanae*, dan kombinasi keduanya.

Variabel terikat : pertumbuhan, morfologi, dan kadar N-asetilglukosamin *Fusarium oxysporum*.

3.5 Prosedur Penelitian

3.5.1 Pembuatan Media Biakan (Media Padat)

Media padat digunakan untuk peremajaan biakan murni bakteri kitinolitik dan jamur patogen. Bakteri kitinolitik diremajakan pada media NA, sedangkan jamur patogen diremajakan pada media PDA. Pembuatan media NA

dilakukan dengan cara melarutkan NA dalam aquades sesuai dengan volume yang dibutuhkan (komposisi NA dalam 1000 ml adalah 20 gram). Sedangkan pembuatan media PDA dilakukan dengan cara melarutkan PDA dalam aquades sesuai dengan volume yang dibutuhkan (komposisi PDA dalam 1000 ml adalah 39 gram). Kemudian masing-masing media tersebut dipanaskan hingga homogen, lalu disterilkan dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit.

3.5.2 Pembuatan Koloidal Kitin

Koloidal kitin dibuat berdasarkan metode yang digunakan oleh Arnold dan Solomon (1986) dengan cara melarutkan 10 gram bubuk kitin dalam 200 ml HCl pekat, distirer selama 2 jam, diinkubasi selama 24 jam pada suhu 4°C dalam keadaan tertutup. Selanjutnya disaring menggunakan glass-wool, filtrat hasil penyaringan ditambahkan 100 ml aquades dan dinetralkan dengan menambahkan NaOH 12 N. Lalu disentrifugasi dengan kecepatan 8000 rpm selama 20 menit pada suhu 4°C . Supernatan dibuang, sedangkan pellet ditambah aquades dan diaduk untuk menghilangkan sisa garam. Kemudian disentrifugasi kembali dengan kecepatan 8000 rpm selama 20 menit pada suhu 4°C . Supernatan dibuang, dan pelet merupakan koloidal kitin yang siap digunakan untuk pembuatan media cair kitin (Nasran dkk., 2003).

3.5.3 Pembuatan Media Cair Kitin

Media cair kitin digunakan untuk pembuatan larutan inokulum dan produksi enzim. Pembuatan media dilakukan berdasarkan metode yang digunakan

oleh Soeka (2011), yaitu terdiri dari 1% koloidal kitin; 0,1% pepton; 0,1% KH_2PO_4 ; 0,05% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ dengan pH 7. Bahan-bahan tersebut dicampur kemudian dipanaskan serta dihomogenkan dengan magnetic stirer hingga larut dan homogen. Lalu disterilkan dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit.

3.5.4 Peremajaan Bakteri *P.pseudomallei* dan *K.ozaenae* serta Jamur *F.oxysporum*

Bakteri kitinolitik yang akan digunakan sebagai perlakuan diremajakan terlebih dahulu pada media NA miring. Caranya adalah mengambil 1 ose biakan bakteri kemudian diinokulasikan atau digoreskan pada media NA miring. Selanjutnya diinkubasi selama 24 jam pada suhu ruang (Fatichah, 2011) dan siap digunakan untuk pembuatan larutan inokulum dan produksi enzim. Sedangkan jamur *F.oxysporum* diremajakan pada media PDA miring dengan cara mengambil 1 ose biakan kemudian digoreskan pada media PDA miring, diinkubasi selama 5-7 hari pada suhu ruang (Trisianti, 2013; Wijayanti, 2003).

3.5.5 Pembuatan Kurva Pertumbuhan Bakteri

Metode ini dilakukan dengan cara mengambil 2 ose biakan murni bakteri kitinolitik umur 24 jam dan diinokulasikan dalam 200 ml media cair kitin (sebagai larutan inokulum), kemudian diinkubasi pada suhu 37°C dalam shaker dengan kecepatan 150 rpm selama 24 jam. Sebanyak 25 ml larutan inokulum tersebut ditambahkan ke dalam 250 ml media yang sama dan diinkubasi dalam shaker pada suhu 37°C dengan kecepatan 150 rpm, kemudian diambil sebanyak 1 ml tiap

4 jam sekali untuk diukur densitas optik (OD) bakteri sampai fase awal kematian. Pengukuran OD bakteri dilakukan dengan menggunakan spektrofotometer dan dibaca serapannya pada panjang gelombang 660 nm. Kurva pertumbuhan ditentukan dengan membuat plot antara waktu inkubasi dan densitas optiknya (Nasran, 2003; Apriani, 2008; Syam, 2008; Natsir, 2012; Saropah, 2012).

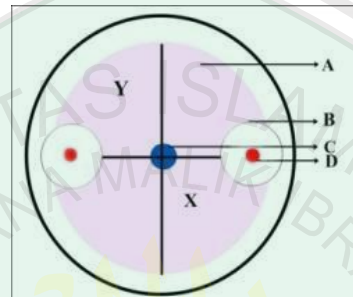
3.5.6 Produksi Enzim Kitinase Kasar dari *P.pseudomallei* dan *K.ozanae*

Bakteri kitinolitik umur 24 jam diambil sebanyak 2 ose dan diinokulasikan dalam 200 ml media cair kitin (sebagai larutan inokulum), kemudian diinkubasi pada suhu 37⁰C dalam shaker dengan kecepatan 150 rpm selama 24 jam. Sebanyak 25 ml larutan inokulum tersebut ditambahkan ke dalam 250 ml media yang sama dan diinkubasi dalam shaker pada suhu 37⁰C dengan kecepatan 150 rpm hingga fase eksponensial (Prosedur 3.5.5). Kemudian larutan kultur disentrifugasi dengan kecepatan 6000 rpm selama 10 menit pada suhu 4⁰C. Supernatan hasil sentrifugasi merupakan enzim kasar yang siap digunakan untuk pengujian antijamur enzim kitinase terhadap jamur *F.oxysporum*, morfologi miselium *F.oxysporum*, dan pengukuran kadar N-asetilglukosamin dinding sel *F.oxysporum* (Saropah, 2012; Manggadani, 2012).

3.5.7 Uji Kemampuan Antijamur Enzim Kitinase terhadap *F.oxysporum*

Pengujian dilakukan dengan cara biakan jamur yang telah diremajakan pada media PDA diambil satu ose untuk ditumbuhkan di tengah cawan petri yang telah berisi media PDA. Pada tepi kanan dan kiri cawan petri dengan jarak 3,5 cm

diletakkan kertas cakram yang telah direndam ekstrak kasar enzim kitinase selama 30 menit. Kontrol digunakan kertas cakram yang telah direndam aquades steril. Selanjutnya diinkubasi selama 6 hari pada suhu 28-30⁰C (Suryanto dkk., 2011 dalam Malinda, 2011; Yurnaliza, 2011; Diniyah, 2010).



Gambar 3.1. Metode pengukuran zona hambat enzim kitinase terhadap jamur *F.oxysporum*. (A) Koloni jamur *F.oxysporum*; (B) Zona hambat enzim kitinase terhadap jamur *F.oxysporum*; (C) Titik tengah jamur *F.oxysporum* diinokulasikan; (D) Kertas cakram yang telah direndam dengan enzim kitinase; (X) Diameter koloni jamur *F.oxysporum* yang terhambat pertumbuhannya; (Y) Diameter koloni jamur *F.oxysporum* yang normal.

Hambatan yang terjadi pada jamur *F.oxysporum* diamati mulai hari ke-2, ke-4, dan ke-6 setelah inokulasi. Zona hambat yang terbentuk diukur menggunakan penggaris dengan cara mengukur batas akhir pertumbuhan jamur patogen pada sumbu X dan batas akhir pertumbuhan jamur patogen pada sumbu Y. Hasil pengukuran dihitung menggunakan rumus (Suryanto dkk., 2011 dalam

Malinda, 2011): Zona hambat = $\frac{Y-X}{2}$

3.5.8 Pengamatan Morfologi Miselium *F.oxysporum*

Mula-mula jamur ditumbuhkan terlebih dahulu pada media PDB, 1 ose biakan jamur *F.oxysporum* dari media PDA baru, diinokulasikan ke dalam 50 ml

media PDB, kemudian diinkubasi selama 5 hari pada suhu 30⁰C. Miselium jamur disaring menggunakan kertas saring Whatman No. 1 lalu dicuci dengan aquades steril beberapa kali. Miselium dipotong menggunakan *Waring Blander* selama 15 detik pada kecepatan lambat. Setelah itu disentrifugasi pada kecepatan 4000 rpm selama 10 menit. Pelet hasil sentrifugasi dicuci kembali dengan aquades, kemudian disuspensikan dalam bufer fosfat pH 7. Suspensi miselium tersebut siap digunakan untuk pengamatan morfologi dan juga digunakan sebagai substrat untuk pengujian kadar N-asetilglukosamin (Trisianti, 2013; Mulyani, 2009; Yurnaliza, 2011; Septariningrum, 2006).

Pengamatan morfologi miselium *F.oxysporum* dilakukan dengan cara mencampur suspensi miselium dengan enzim kitinase kasar (Prosedur 3.5.6) dengan perbandingan 1:1. Kemudian campuran suspensi tersebut diinkubasi selama 2, 4, dan 6 jam pada suhu 37⁰C. Perlakuan kontrol merupakan miselium tanpa pemberian enzim. Masing-masing perlakuan pada waktu unkuasi tersebut diambil 1 tetes dan diletakkan di atas gelas objek, ditutup dan diamati di bawah mikroskop dengan perbesaran 400x (Yurnaliza, 2011).

3.5.9 Pengukuran Kadar N-asetilglukosamin *F.oxysporum* dengan Metode Miller (1959)

3.5.9.1 Penentuan Panjang Gelombang Optimum pada Glukosa

Penentuan panjang gelombang optimum dalam penelitian ini menggunakan konsentrasi glukosa 1000 ppm. Sebanyak 1 ml glukosa konsentrasi 1000 ppm diambil dan dimasukkan dalam tabung reaksi. Kemudian ditambah 2

ml reagen DNS, setelah terbentuk kompleks warna antara DNS dan gula pereduksi hasil hidrolisis, ditambah 1 ml K-Na-tartrat 4%, dihomogenkan. Setelah homogen mulut tabung ditutup dengan aluminium foil dan dipanaskan dalam air mendidih selama 15 menit. Lalu didinginkan pada air mengalir dan diencerkan dengan 20 ml aquades. Blangko diperlakukan sama seperti sampel, namun glukosa diganti dengan aquades. Larutan tersebut diukur absorbansinya pada panjang gelombang 520-550 nm (Rahmansyah, 2003).

3.5.9.2 Pembuatan Kurva Standar Glukosa

Pembuatan kurva standar glukosa dibuat dengan menggunakan larutan glukosa konsentrasi 200, 400, 600, 800, dan 1000 ppm (Lampiran 2). Dari masing-masing konsentrasi tersebut diambil 1 ml, dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Kemudian ditambah 2 ml reagen DNS, setelah terbentuk kompleks warna antara DNS dan gula pereduksi hasil hidrolisis, ditambah 1 ml K-Na-tartrat 4%, dihomogenkan. Setelah homogen mulut tabung ditutup dengan aluminium foil dan dipanaskan dalam air mendidih selama 15 menit. Lalu didinginkan pada air mengalir dan diencerkan dengan 20 ml aquades. Blangko diperlakukan sama seperti sampel, namun glukosa diganti dengan aquades. Kemudian larutan tersebut diukur absorbansinya pada panjang gelombang 540 nm (Rahmansyah, 2003).

3.5.9.3 Pengukuran Kadar N-asetilglukosamin *F.oxysporum*

Pengukuran kadar N-asetilglukosamin dinding sel jamur *F.oxysporum* dilakukan dengan cara mencampur sebanyak 1 ml suspensi miselium 1% (Prosedur 3.5.8) dengan 2 ml ekstrak kasar enzim kitinase yang telah diperoleh sebelumnya (Prosedur 3.5.6), diinkubasi pada suhu 37°C selama 30 menit. Sebanyak 1 ml larutan dari reaksi tersebut diambil kemudian ditambahkan 2 ml reagen DNS. Setelah terbentuk kompleks warna antara DNS dan gula pereduksi hasil hidrolisis, ditambahkan 1 ml K-Na-tartrat 4%. Kemudian dipanaskan dalam air mendidih selama 15 menit. Lalu didinginkan pada air mengalir dan diencerkan dengan 20 ml aquades. Larutan tersebut diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 540 nm. Kontrol diperlakukan sama seperti sampel, namun tanpa penambahan enzim. Jumlah gula reduksi dibaca dengan mengacu pada kurva standar glukosa (Rahmansyah, 2003; Manggadani, 2012).

3.6 Analisis Data

Data yang diperoleh diuji dengan menggunakan Analisis Varian (ANOVA) Oneway dengan uji F ($\alpha=5\%$) untuk mengetahui ada dan tidaknya pengaruh pemberian ekstrak kasar enzim kitinase terhadap pertumbuhan dan kadar N-asetilglukosamin jamur *F.oxysporum*. Apabila ada pengaruh, maka dilanjutkan dengan uji Duncan ($\alpha=5\%$) untuk mengetahui perbedaan yang nyata diantara perlakuan yang lain.