

UJI AKTIVITAS BAKTERI KITINOLITIK DARI TAMBAK UDANG DI LAMONGAN DAN SIDOARJO

ACTIVITY ASSAY of CHITINOLYTIC BACTERIA from SHRIMP PONDS in LAMONGAN and SIDOARJO

Fauziah* dan Nuniek Herdyastuti

Prodi Kimia, Jurusan Kimia, Universitas Negeri Surabaya

Koresponden: *email: zya_fauziah89@yahoo.com

Abstrak. Bakteri kitinolitik telah berhasil diisolasi dari tambak udang di Lamongan dan Sidoarjo dengan menggunakan media yang mengandung 0.3% kitin koloidal. Diperoleh 54 isolat dari Lamongan yang diberi kode LA 1 sampai LA 54 dan 78 isolat dari Sidoarjo yang diberi kode SDA 1 sampai SDA 78. 36 isolat dari Lamongan dan 67 isolat dari Sidoarjo menunjukkan aktivitas kitinase. Uji aktivitas kitinase secara kualitatif ditentukan berdasarkan zona bening yang ditunjukkan disekitar koloni. Uji aktivitas kitinase secara kuantitatif ditentukan berdasarkan N-asetilglukosamin yang dilepaskan menggunakan metode Monreal and Reese. Aktivitas kitinase tertinggi ditunjukkan oleh isolat LA 21 dan LA 41 masing-masing sebesar 0.731 dan 0.615 U/mL.

Kata Kunci: bakteri kitinolitik, kitin koloidal, zona bening.

Abstract. Chitinolytic bacteria had been isolated from shrimp pond in Lamongan and Sidoarjo by using media with containing 0.3% chitin colloidal. Produced 54 isolates from Lamongan labelled LA 1 until LA 54 and 78 isolates from Sidoarjo labelled SDA 1 until SDA 78. 36 isolates from Lamongan and 67 isolates from Sidoarjo showed chitinase activity. Qualitatively assay of chitinase activity determined by clear zone around the colony. By using the method of Monreal and Reese, quantitative assay of chitinase activity can be determined by the release of N-acetylglucosamine. The highest chitinase activity was shown by LA 21 dan LA 41 isolates are 0.731 and 0.615 U/mL respectively.

Keywords: chitinolytic bacteria, colloidal chitin, clear zone.

PENDAHULUAN

Bakteri kitinolitik adalah bakteri yang dapat menghasilkan enzim kitinase yang digunakan untuk mendegradasi senyawa kitin. Bakteri ini dapat diperoleh dari berbagai sumber seperti *rhizosphere*, *phyllosphere*, tanah atau dari lingkungan air seperti laut, danau, kolam atau tambak udang dan sebagainya. Selain lingkungan mesofil, bakteri kitinolitik juga telah berhasil diisolasi dari lingkungan termofilik seperti sumber air panas, daerah geotermal dan lain-lain [1].

Eksplorasi habitat dilakukan untuk mencari biodiversitas bakteri kitinolitik dengan tujuan mendapatkan keragaman bakteri yang mampu menghasilkan aktivitas kitinase terbaik. Salah satu tempat yang berpotensi menghasilkan bakteri kitinolitik yaitu tambak udang. Pemilihan lokasi tambak udang disesuaikan dengan kemudahan jangkauan serta jenis dan usia udang. Lamongan dan Sidoarjo merupakan wilayah yang berada dipesisir pantai sehingga sebagian besar mata pencaharian penduduk adalah sebagai petani tambak. Keberadaan kitin dalam tambak udang

dapat dengan cepat terdegradasi karena adanya bakteri yang mempunyai enzim kitinase yang mampu mendegradasi kitin.

Bakteri kitinolitik sangat menarik diisolasi karena kemampuannya dalam mendegradasi kitin menjadi derivat kitin. Derivat ini banyak dimanfaatkan dalam berbagai bidang. Kitin atau derivatnya digunakan sebagai flokulan dalam pengolahan limbah, agensia antifungi atau arthropoda hama [2] serta dalam bidang biomedis yaitu sebagai antitumor, obat luka dan membran dialisa darah [3].

Bakteri kitinolitik dapat dihasilkan dengan cara *screening*, yaitu proses penapisan mikroorganisme yang mampu menghasilkan enzim kitinase dengan menggunakan media yang mengandung kitin. Bakteri kitinolitik dapat ditunjukkan dengan adanya *clear zone* (zona bening) disekitar koloni atau dilakukan uji aktivitas kitinase berdasarkan pelepasan N-asetilglukosamin.

METODE PENELITIAN

Alat:

Peralatan yang digunakan adalah spektrofotometer UV-Vis (Shimadzu, 1800), sentrifuse dingin (5810 R), inkubator (Memmert), *autoclave*, *laminar flow*, *shaker*, mikropipet dan peralatan gelas.

Bahan:

Bahan-bahan yang digunakan adalah kitin, HCl (37%), aquades, *yeast extract* (Difco), NaCl, tripton (Difco), Bacto agar (Difco), KH_2PO_4 , KOH, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, natrium kalium tartarat tetrahidrat, NaOH, asam 3,5- dinitrosalisilat (SIGMA), N-asetil glukosamin (SIGMA) dan air bebas ion.

Prosedur Penelitian

Isolasi Bakteri dari Tambak Udang

Sampel air yang diambil secara acak dari tambak udang Lamongan dan Sidoarjo masing-masing dikulturkan dalam media LB (*Luria Bertany*) cair yang terdiri atas *bacto-triptone*, *yeast extract* dan NaCl, selanjutnya dikocok dengan *shaker* selama 16-18 jam dengan kecepatan 150 rpm.

Persiapan Substrat Kitin Koloidal

Kitin koloidal dibuat berdasarkan metode Hsu and Lockwood dengan penambahan HCl 37% [4].

Seleksi Bakteri Penghasil Kitinase dari Tambak Udang

Masing-masing koloni tunggal diinokulasi kedalam media padat yang mengandung 0.3% kitin koloidal dan diinkubasi selama 2-4 hari [5]. Zona bening (*clear zone*) yang tampak disekitar koloni menunjukkan bahwa bakteri menghasilkan kitinase.

Penentuan Aktivitas Enzim Kitinase

Aktivitas enzim ditentukan berdasarkan jumlah gula reduksi yang dilepaskan dan diukur secara kolorimetri dengan metode Monreal and Reese [6]. Sebanyak 2 mL larutan kitin 1% (b/v) dilarutkan dalam 200 mM buffer kalium fosfat, lalu diaduk dengan *magnetic stirrer* dan

ditambahkan 0.5 mL larutan enzim. Campuran diinkubasi selama 2 jam pada suhu kamar. Setelah 2 jam, tabung ditempatkan kedalam air mendidih selama 5 menit dan didinginkan pada suhu kamar. Suspensi disentrifugasi selama 10 menit pada kecepatan 4000 rpm. Sebanyak 1 mL supernatan pada tabung sampel ditambahkan 2 mL air deionisasi dan 1.5 mL reagen pewarna yang mengandung 5.3 M larutan natrium kalium tartrat dan asam 3,5 dinitrosalisilat 96 mM. Campuran kemudian dipanaskan dalam air mendidih selama 5 menit, lalu setelah dingin diukur serapannya dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 540 nm.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Isolasi Bakteri dari Tambak Udang

Pada penelitian ini, sampel yang digunakan berasal dari tambak udang di Lamongan dan Sidoarjo. Sampel air diambil secara acak lalu dicampur dan dikulturkan dalam media cair selama 16-18 jam. Hasil pengkayaan pada media cair kemudian ditumbuhkan pada media padat dan diinkubasi selama 24 jam. Diperoleh 54 isolat dari Lamongan yang diberi kode LA 1 sampai LA 54 dan 78 isolat dari Sidoarjo yang diberi kode SDA 1 sampai SDA 78.

Seleksi Bakteri Penghasil Kitinase dari Tambak Udang

54 isolat yang diperoleh dari tambak Lamongan dan 78 isolat dari tambak Sidoarjo ditumbuhkan pada media padat yang mengandung 0.3% kitin koloidal dan diinkubasi selama 2-4 hari. Kitin koloidal merupakan penginduksi yang efektif karena kitin koloidal adalah modifikasi kitin yang bersifat amorf dengan kerapatan polimer yang rendah sehingga lebih mudah dihidrolisis oleh enzim [7].

Bakteri yang memiliki aktivitas kitinase ditunjukkan dengan adanya *clear zone* disekitar koloni. Diperoleh 36 isolat dari Lamongan dan 67 isolat dari Sidoarjo yang menunjukkan *clear zone*. *Clear zone* (Gambar 1 dan 2) terbentuk akibat enzim kitinase yang dibebaskan keluar sel bakteri untuk memecah makromolekul kitin menjadi molekul kitin yang lebih kecil, sehingga bakteri dapat mengambil nutrisi dalam bentuk molekul-molekul kecil.



Gambar 1. Isolat LA 21 pada Media Screening Padat yang Menunjukkan *Clear Zone*

Enzim kitinase yang disekresikan bakteri dalam media agar kitin kemudian diikat oleh partikel kitin sehingga kitin menjadi terdegradasi. Degradasi oligomer kitin dan penggunaan molekul hasil degradasi tersebut oleh bakteri membuat media disekitar koloni tampak jernih.



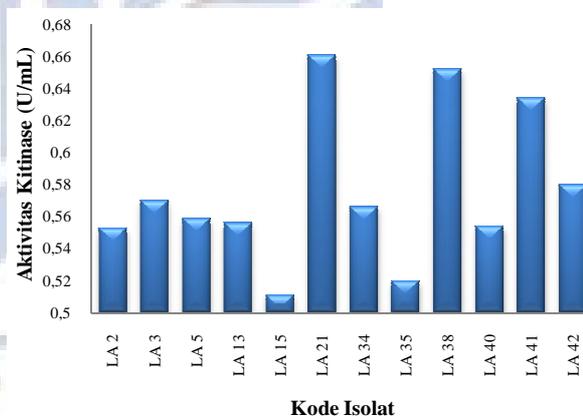
Gambar 2. Isolat SDA 54 pada Media Screening Padat yang Menunjukkan *Clear Zone*

Besarnya *clear zone* yang dihasilkan tergantung pada jumlah monomer N-asetilglukosamin yang dihasilkan dari proses hidrolisis kitin dengan memutus ikatan β -1,4-N-Asetilglukosamin. Semakin besar jumlah monomer N-asetilglukosamin yang dihasilkan maka akan semakin besar zona bening yang terbentuk di sekitar koloni [8].

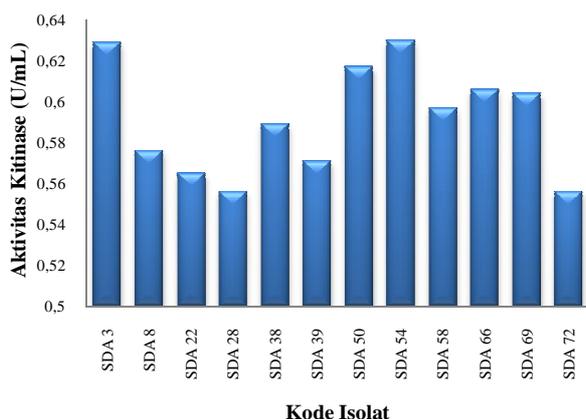
Pengujian aktivitas kitinase secara kualitatif menghasilkan *clear zone* disekitar koloni sangat tipis dan sulit terlihat dengan dokumentasi foto. Pengujian aktivitas kitinase secara kuantitatif ditentukan berdasarkan jumlah gula reduksi yang dilepaskan pada proses degradasi kitin dan diukur secara kolorimetri dengan metode Monreal dan

Reese seperti pada Gambar 3 dan 4. Mekanisme degradasi kitin oleh bakteri kitinolitik di alam berlangsung dalam tiga tahap, yaitu diawali dengan terdeteksinya bakteri pada kitin. Setelah bakteri terdeteksi pada kitin, bakteri akan melekat di permukaan polimer tersebut dengan mediasi *chitin binding protein* (CBP). Selanjutnya, kitin akan menginduksi sistem sensor/kinase dua komponen pada bakteri sehingga enzim kitinase dihasilkan [9].

Sistem enzim kitinolitik akan menghidrolisis substrat kitin secara sempurna menjadi N-asetilglukosamin (GlcNAc) yang terjadi secara sinergi dan berurutan. Terdapat dua jalur degradasi kitin dalam [10]. Jalur degradasi kitin yang pertama diawali dengan hidrolisis ikatan β -1,4 glikosida. Ikatan β -1,4 glikosida diputus oleh enzim endokitinase sehingga terbentuk oligomer kitin. Selanjutnya oligomer kitin dipecah menjadi dimer N-asetilglukosamin oleh kitobiosidase hingga dihasilkan monomer N-asetilglukosamin oleh N-asetilglukosaminidase.



Gambar 3. Aktivitas kitinase dari isolat Lamongan



Gambar 4. Aktivitas kitinase dari isolat Sidoarjo

Berdasarkan Gambar 3, aktivitas kitinase yang dihasilkan dari isolat Lamongan adalah antara 0.511 sampai 0.661 U/mL, sedangkan berdasarkan Gambar 4, aktivitas kitinase yang dihasilkan dari isolat Sidoarjo adalah antara 0.556 sampai 0.630 U/mL. Tiga isolat yang memiliki aktivitas tertinggi dari kedua tambak selanjutnya diuji kembali aktivitasnya. Aktivitas tertinggi ditunjukkan oleh isolat LA 21 dan LA 41 dengan aktivitas kitinase masing-masing sebesar 0.731 dan 0.615 U/mL.

PENUTUP

Simpulan

Bakteri dari tambak udang Lamongan menghasilkan 54 isolat dan 78 isolat dari tambak udang Sidoarjo. 36 isolat dari Lamongan dan 67 isolat dari Sidoarjo menunjukkan aktivitas kitinase. Aktivitas tertinggi dari kedua tambak ditunjukkan oleh isolat LA 21 dan LA 41 dengan aktivitas kitinase masing-masing sebesar 0.731 dan 0.615 U/mL.

DAFTAR PUSTAKA

- Herdyastuti N, Raharjo TJ, Mudasir, and Matsjeh, S, 2009, Chitinase and Chitinolytic Microorganism: Isolation, Characterization and Potential, *Indo.J Chem*, Vol 9, No. 1. hal 37-47.
- Suryanto D, Munir E, and Yurnaliza, 2005, *Eksplorasi Bakteri Kitinolitik: Keragaman Gen Kitinase pada Berbagai Jenis Bakteri dan Pemanfaatannya*, Medan: Universitas Sumatera Utara.
- Toharisman A, 2007, *Peluang Pemanfaatan Enzim Kitinase di Industri Gula*, <http://www.p3gi.kitinase-toharisman>.
- Hsu SC dan Lockwood JL, 1975, Powdreed Chitin Agar As a Selective Medium for Enumeration of Actinomycetes in Water and Soil, *Appl. Microbiol*, Vol 29, hal 422-6.
- Shanmugaiah V, Mathivanan N, Balasubramanian N, and Manoharan PT, 2008 Optimization of Cultural Conditions for Production of Chitinase by *Bacillus laterosporus* MML2270 Isolated from Rice Rhizosphere Soil, *African Journal of Biotechnology*, Vol 7, No. 15. hal 2562-2568.
- Monreal, J., and Reese, E.T. 1969. The Chitinase of *Serratia marcescens*. *Canadian Journal of Microbiolog*, Vol 15, hal 689-696.
- Tsujibo H, Kondo N, Tanaka K, Miyamoto K, Bao N, and Imamori Y, 1999, Molecular Analysis of The Gene Encoding a Novel Transglycosylative Enzyme from *Alteromonas* sp. Strain 0-7 & Its Physiological Role in The Chitinolytic System, *J. Bacteriol*, Vol 81, hal 5461-5466.
- Patil RS, Ghormade V, and Deshpande, 1999, Chitinolytic Enzymes: An Exploration, *Enzyme and Microbial Technology*, Vol 26, No. 2000. hal 473-483.
- Susi, 2002, Isolasi Kitinase dari *Scleroderma columnare* dan *Trichoderma harzianum*. *Jurnal Ilmu Dasar*, Vol 3, No. 1. hal 30-35.
- Li X, and Roseman S, 2003, The Chitinolytic Cascade in *Vibrios* is Regulated by Chitin Oligosaccharides and a Two-Component Chitin Catabolic Sensor/Kinase, *Proceeding of the National Academy of Science*, Vol 101, No. 2. hal 627-631.