

## OPTIMASI PERTUMBUHAN ISOLAT KITINOLITIK LA 21 YANG DIISOLASI DARI TAMBAK UDANG DI LAMONGAN

### OPTIMIZATION of GROWTH LA 21 ISOLATES CHITINOLYTIC ISOLATED FROM SHRIMP FARMS IN LAMONGAN

*Hasti Apriliana Wulandari dan Nuniek Herdyastuti*

*Jurusan Kimia FMIPA, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam*

*Universitas Negeri Surabaya, Jl. Ketintang, Surabaya, 60231*

*e-mail: Hasti\_knr08@yahoo.com*

**Abstrak.** *Isolat kitinolitik LA 21 adalah bakteri kitinolitik yang diisolasi dari Tambak Udang di Lamongan. Untuk mendapatkan isolat kitinolitik LA 21 yang menghasilkan enzim kitinase dalam jumlah yang besar, maka harus dilakukan optimasi kondisi kultur, seperti konsentrasi substrat, pH, dan waktu inkubasi. Enzim kitinase dapat dihasilkan dari isolasi isolat kitinolitik LA 21 dengan cara menumbuhkan pada media LB cair yang mengandung kitin sebagai substrat dan penginduksi kitinase, pH, dan diinkubasi pada waktu tertentu. Penelitian ini bertujuan mendapatkan kondisi kultur terbaik bagi isolat kitinolitik LA 21, meliputi konsentrasi kitin koloidal, pH, dan waktu inkubasi. Jumlah mikroorganisme yang terbentuk ditentukan berdasarkan uji Optical Density (OD) dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 660 nm. Berdasarkan variasi konsentrasi kitin koloidal 0,2-1,4 % menunjukkan bahwa konsentrasi kitin koloidal 0,6 % menghasilkan jumlah mikroba terbanyak. Isolat kitinolitik LA 21 mampu tumbuh dengan baik pada pH 7 dengan jumlah OD 0,707 dan pada waktu inkubasi selama 72 jam, isolat kitinolitik LA 21 menghasilkan jumlah sel terbanyak pada waktu inkubasi 48 jam dengan OD 1,748.*

**Kata kunci:** *bakteri kitinolitik, kitin koloidal, kondisi kultur, Optical Density (OD).*

**Abstract.** *LA 21 chitinolytic isolates is chitinolytic bacteria isolated from shrimp farms in Lamongan. To get LA 21 chitinolytic isolates that produce chitinase enzyme in large quantities, it must be optimized culture conditions, such as substrate concentration, pH, and incubation period. Chitinase enzyme can result from isolation LA 21 chitinolytic isolates by growing on medium LB liquid containing chitin as a substrate and inducer of chitinase, pH, and incubated at a particular time. This study aims to get the best culture conditions for LA 21 chitinolytic isolates, include colloidal chitin concentration, pH, and incubation period. Number of microorganisms that from determined by testing the Optical Density (OD) using a UV-Vis spectrophotometer at a wavelength of 660 nm. By varying the colloidal chitin concentration 0,2-1,4 % showed that the colloidal chitin concentration 0,6 % produced the highest number of microbes. LA 21 chitinolytic isolates were able to grow well at pH 7 with 0,707 OD and the amount of time during the 72 hours incubation, LA 21 chitinolytic isolates produced the highest cell number at 48 hours of incubation with 1,748 OD.*

**Keywords:** *chitinolytic bacteria, colloidal chitin, culture conditions, Optical Density (OD).*

#### 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 [1].

Bakteri kitinolitik sangat menarik diisolasi karena kemampuannya mendegradasi kitin menjadi derivat kitin. 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 penapisan mikroorganisme yang mampu menghasilkan

enzim kitinase dengan menggunakan media yang mengandung kitin. Melalui proses *screening*, diharapkan diperoleh bakteri kitinolitik yang dapat menghasilkan enzim kitinase. Salah satu tempat yang berpotensi menghasilkan bakteri kitinolitik yaitu tambak udang. Tambak udang merupakan tempat budidaya udang yang mampu menghasilkan senyawa kitin yang terdapat pada udang tersebut. Keberadaan kitin dalam tambak udang dapat dengan cepat terdegradasi karena diduga adanya mikroorganisme yang mempunyai enzim kitinase yang mampu mendegradasi kitin [4].

Untuk mendapatkan isolat yang menghasilkan enzim kitinase dalam jumlah yang besar, maka harus dilakukan optimasi kondisi kultur, seperti konsentrasi substrat, pH, suhu, dan waktu inkubasi. Enzim kitinase dapat dihasilkan dari mikroorganisme dengan cara menumbuhkan pada media yang mengandung kitin sebagai substrat dan diinkubasi pada waktu dan suhu tertentu [5].

## METODE PENELITIAN

### Alat

*Centrifuge* 5810 R, tabung reaksi, tabung sentrifus, pengaduk magnet, *rotary shaker*, penangas air, spektrofotometer SHIMADZU UV-1800, *autoclave*, mikropipet, Erlenmeyer, pembakar spiritus, dan peralatan gelas yang umum digunakan.

### Bahan

HCl 37 % (Sigma-Aldrich), aquades, *yeast extract* (Difco), NaCl (Difco), tripton (Difco), isolat kitinolitik LA 21, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, asam sitrat, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O, air bebas ion, Natrium tartarat tetrahidrat, NaOH, dan asam 3,5-dinitrosalisilat (Sigma), N-Asetilglukosamin (Sigma).

## PROSEDUR PENELITIAN

### Pembuatan Kitin Koloidal

Kitin koloidal dibuat dengan melarutkan 10 gr kitin dalam 100 mL HCl 37 %, dan diendapkan sebagai suspensi koloid dengan penambahan air dingin. Kemudian suspensi disaring dan residu dicuci dengan aquades dingin sampai pH netral. Setelah itu dikeringkan dengan oven.

### Pembuatan Media LB Cair

Media LB cair dibuat dengan melarutkan 0,5 gram *yeast extract*, 0,1 gram NaCl, dan 0,1 gram tripton ke dalam 85 mL aquades

sampai pH netral. Kemudian ditambah aquades lagi hingga 100 mL. Setelah itu diaduk dan disterilisasi.

## Penentuan Kondisi Optimum Untuk Pertumbuhan Isolat Kitinolitik LA 21. Konsentrasi Kitin Koloidal

Isolat kitinolitik LA 21 ditumbuhkan pada media LB cair dengan waktu inkubasi 16-18 jam. Setelah bakteri tumbuh, dimasukkan ke dalam media LB cair dengan ditambah kitin koloidal dengan berbagai konsentrasi yang berbeda (0,2-1,4 %). Diinkubasi selama 2 hari, kemudian suspensi bakteri dari masing-masing berbagai konsentrasi kitin koloidal di uji nilai *Optical Density* (OD) pada spektrofotometer UV-Vis dengan panjang gelombang 660 nm untuk menghitung jumlah bakteri yang tumbuh.

### pH

Isolat kitinolitik LA 21 ditumbuhkan pada media LB cair dengan waktu inkubasi 16-18 jam. Setelah bakteri tumbuh, dimasukkan ke dalam media LB cair dengan ditambah kitin koloidal yang maksimal dan pH yang berbeda (3-9). Diinkubasi selama 2 hari, kemudian suspensi bakteri dari masing-masing berbagai pH di uji nilai *Optical Density* (OD) pada spektrofotometer UV-Vis dengan panjang gelombang 660 nm untuk menghitung jumlah bakteri yang tumbuh.

### Waktu Inkubasi

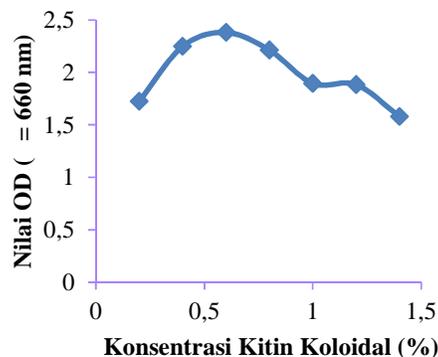
Isolat kitinolitik LA 21 ditumbuhkan pada media LB cair dengan waktu inkubasi 16-18 jam. Setelah bakteri tumbuh, dimasukkan ke dalam media LB cair dengan ditambah kitin koloidal yang maksimal, pH yang maksimal, dan waktu inkubasi yang berbeda (0-72 jam). Diinkubasi selama selang 12 jam, kemudian suspensi bakteri dari masing-masing berbagai waktu inkubasi di uji nilai *Optical Density* (OD) pada spektrofotometer UV-Vis dengan panjang gelombang 660 nm untuk menghitung jumlah bakteri yang tumbuh.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Penentuan Kondisi Optimum Untuk Pertumbuhan Isolat Kitinolitik LA 21. Konsentrasi Kitin Koloidal

Hasil dari pengaruh variasi konsentrasi kitin koloidal terhadap pertumbuhan isolat kitinolitik LA 21 disajikan pada Gambar 1. Pada Gambar 1 menunjukkan hasil *Optical*

*Density* (OD) yang memperlihatkan jumlah bakteri yang tumbuh terhadap perubahan konsentrasi kitin koloidal. Jumlah isolat kitinolitik LA 21 paling banyak ditunjukkan pada konsentrasi kitin koloidal sebesar 0,6 %, yaitu mencapai nilai 2,380. Pada konsentrasi kitin koloidal 0,2 % menunjukkan pertumbuhan isolat kitinolitik LA 21 yang rendah, yaitu sebesar 1,724. Hal ini disebabkan karena substrat yang terlalu sedikit, sehingga tidak dapat mencukupi nutrisi bagi isolat kitinolitik LA 21 untuk tumbuh dengan optimal. Konsentrasi kitin koloidal dari 0,2 % sampai 0,6%, menunjukkan pertumbuhan isolat kitinolitik LA 21 yang semakin bertambah. Hal ini menunjukkan bahwa dengan bertambahnya konsentrasi substrat, memungkinkan nutrisi bagi isolat kitinolitik LA 21 untuk hidup dengan optimal masih tercukupi. Pertumbuhan isolat kitinolitik LA 21 mulai menurun setelah melewati konsentrasi kitin koloidal 0,8 %. Konsentrasi substrat yang terlalu tinggi, diduga dapat menghambat pertumbuhan isolat kitinolitik LA 21 dan menyebabkan racun, sehingga dapat menghambat pertumbuhan isolat kitinolitik LA 21. Seperti yang dikatakan oleh Mariska (2012) bahwa konsentrasi substrat dapat mempengaruhi pertumbuhan dan perkembangan bakteri. Semakin rendah konsentrasi substratnya, maka jumlah bakteri yang tumbuh masih sangat rendah. Hal ini disebabkan karena substrat yang terlalu sedikit, sehingga tidak dapat mencukupi nutrisi bagi bakteri untuk hidup dengan optimal. Tetapi konsentrasi substrat yang terlalu besar juga dapat menghambat pertumbuhan bakteri dan menyebabkan racun bagi bakteri, sehingga pertumbuhan bakteri terhambat dan terjadi substrat inhibisi yang akan menjadi racun bagi pertumbuhan bakteri [6].

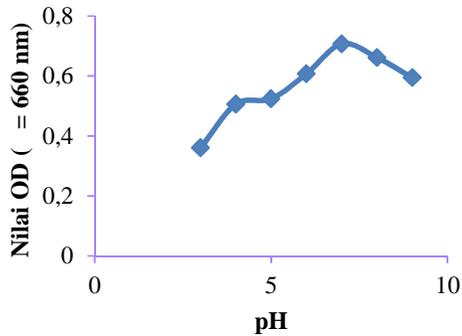


Gambar 1. Nilai OD Pada Berbagai Konsentrasi Kitin Koloidal.

Penelitian mengenai optimasi pertumbuhan bakteri juga telah dilakukan oleh Merina *et al.*, (2012) yang mendapatkan isolat *Bacillus amyloliquefaciens* SM3 dari air pantai Tamil Nadu, India . Dalam penelitian ini, kondisi optimum untuk pertumbuhan adalah pada konsentrasi kitin koloidal 0,5 % dengan jumlah koloni 5,77 [7].

#### pH

Hasil dari pengaruh pH yang berbeda terhadap pertumbuhan isolat kitinolitik LA 21 disajikan pada Gambar 2. Pada Gambar 2 menunjukkan hasil *Optical Density* (OD) yang memperlihatkan jumlah bakteri yang tumbuh terhadap perubahan pH. Pada pH 7 menunjukkan pertumbuhan isolat kitinolitik LA 21 yang tertinggi, yaitu sebesar 0,707. Pada pH tersebut, mempunyai kondisi yang sesuai bagi pertumbuhan isolat kitinolitik LA 21. Pada pH 3 menunjukkan pertumbuhan isolat kitinolitik LA 21 yang terendah, yaitu sebesar 0,360. Hal ini menunjukkan bahwa isolat kitinolitik LA 21 tidak dapat tumbuh dalam suasana asam, sehingga pertumbuhan isolat kitinolitik LA 21 tidak optimal. Pada pH 3 sampai 7, menunjukkan pertumbuhan isolat kitinolitik LA 21 yang semakin bertambah, dan mencapai pertumbuhan optimal pada pH 7. Setelah melewati pH 7 menunjukkan pertumbuhan isolat kitinolitik LA 21 yang semakin menurun. Hal ini menunjukkan bahwa isolat kitinolitik LA 21 tidak dapat tumbuh dalam suasana basa, sehingga pertumbuhan isolat kitinolitik LA 21 tidak optimal.



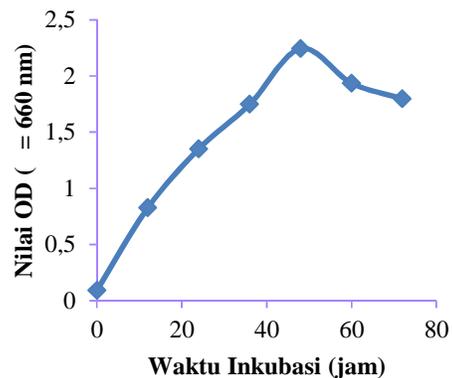
Gambar 2. Nilai OD Pada Berbagai pH

Penelitian mengenai optimasi pertumbuhan bakteri juga telah dilakukan oleh Mike *et al.*, (2009) yang mendapatkan bakteri penghasil kitinase dari sumber air panas Rimbo Panti Pasaman. Dalam penelitian ini, kondisi optimum untuk pertumbuhan bakteri isolat no.4 pada pH 6,5 dengan jumlah koloni 5,75 [8].

#### Waktu Inkubasi

Hasil dari pengaruh waktu inkubasi yang berbeda terhadap pertumbuhan isolat kitinolitik LA 21 disajikan pada Gambar 3. Pada waktu inkubasi 48 jam menunjukkan pertumbuhan isolat kitinolitik LA 21 yang tertinggi, yaitu sebesar 2,243. Pada waktu inkubasi tersebut, mempunyai kondisi terbaik bagi pertumbuhan bakteri isolat kitinolitik LA 21, karena nutrisi pada media untuk isolat kitinolitik LA 21 masih tercukupi, sehingga dapat tumbuh dengan optimal. Pada waktu inkubasi 12 jam menunjukkan pertumbuhan isolat kitinolitik LA 21 yang terendah, yaitu sebesar 0,827. Hal ini disebabkan karena nutrisi pada media untuk isolat kitinolitik LA 21 kurang mencukupi, sehingga tidak dapat tumbuh dengan optimal. Kondisi ini menunjukkan pertumbuhan isolat kitinolitik LA 21 masuk pada fase lag (fase lamban atau *lag phase*). Pada waktu inkubasi 0 jam sampai 48 jam, menunjukkan pertumbuhan isolat kitinolitik LA 21 yang semakin bertambah. Hal ini disebabkan karena nutrisi pada media untuk isolat kitinolitik LA 21 tercukupi, sehingga dapat tumbuh dengan optimal. Kondisi ini menunjukkan pertumbuhan isolat kitinolitik LA 21 masuk pada fase log (fase pertumbuhan cepat atau *log phase*), dimana selama fase ini massa dan volume sel meningkat karena isolat kitinolitik LA 21

sudah mampu beradaptasi terhadap substratnya. Pertumbuhan isolat kitinolitik LA 21 mulai menurun setelah melewati waktu inkubasi 48 jam. Hal ini disebabkan karena nutrisi pada media sudah habis, sehingga banyak isolat kitinolitik LA 21 yang mati. Kondisi ini menunjukkan, pertumbuhan isolat kitinolitik LA 21 masuk pada fase kematian (penurunan populasi atau *decline*), dimana selama fase ini media kehabisan nutrisi, sehingga populasi isolat kitinolitik LA 21 akan menurun jumlahnya dan pada saat ini jumlah sel yang mati lebih banyak daripada sel yang hidup.



Gambar 3. Nilai OD Pada Berbagai Waktu Inkubasi

Penelitian mengenai optimasi pertumbuhan bakteri juga telah dilakukan oleh Mike *et al.*, (2009) yang mendapatkan bakteri penghasil kitinase dari sumber air panas Rimbo Panti Pasaman. Dalam penelitian ini, kondisi optimum untuk pertumbuhan bakteri isolat no.4 pada waktu inkubasi 96 jam dengan jumlah koloni 5,77 [8].

#### PENUTUP

##### Simpulan

1. Konsentrasi kitin koloidal yang diperlukan untuk menghasilkan enzim kitinase adalah sebesar 0,6 % dengan menghasilkan nilai OD sebesar 2,380.
2. pH yang optimum untuk pertumbuhan bakteri kitinolitik dari tambak udang di Lamongan adalah pH 7 dengan menghasilkan nilai OD sebesar 0,707.
3. Waktu inkubasi yang optimum untuk pertumbuhan bakteri kitinolitik dari tambak udang di Lamongan adalah 48 jam dengan menghasilkan nilai OD sebesar 1,748.

## DAFTAR PUSTAKA

1. 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.
2. Suryanto D, Munir E, and Yurnaliza, 2005, *Eksplorasi Bakteri Kitinolitik: Keragaman Gen Kitinase pada Berbagai Jenis Bakteri dan Pemanfaatannya*, Medan: Universitas Sumatera Utara.
3. Toharisman A, 2007, *Peluang Pemanfaatan Enzim Kitinase di Industri Gula*, <http://www.p3gi.kitinase.toharisman>.
4. Keruvo and Laureus, M. 1998. *Isolation, Characterization, Molecular Gene Cloning and Sequencing a Novel Phytase From Bacillus subtilis*. Finland: University of Helsinki.
5. Gao, X. D., Katsumoto, T., and Onodera, K. 1995. Purification and Characterization of Chitin Deacetylase From *Absidia coerulea*. *Journal Biochemistry*, Vol. 117 (2): 257-263.
6. Mariska, S. 2012. *Media Pertumbuhan Mikroorganisme*. Makasar: Aka demi Farmasi Kebangsaan Makasar.
7. Meirina, P. D., Jeyanthi, R.L., Shaimila, S., Anu, Ankita, B., and Dhiraj, K. 2012. Identification and Optimization of Cultural Conditions for Chitinase Production by *Bacillus amyloliquefaciens* SM3. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*. Vol. 4 (12), 4969-49774.
8. Mike, T. 2009. Penentuan Kondisi Optimum Pertumbuhan (Lama Inkubasi, Suhu, pH) Bakteri Penghasil Kitinase Asal Sumber Air Panas Rimbo Panti Pasaman. Padang: Universitas Andalas.

