

PENAPISAN BAKTERI KITINOLITIK DARI LIMBAH PENGOLAHAN UDANG

Ekowati Chasanah¹⁾, Miftahul Ilmi²⁾, dan Wibowo Mangunwardoyo³⁾

ABSTRAK

Limbah pengolahan udang merupakan salah satu sumber enzim pendegradasi kitin (enzim kitinolitik) potensial. Tulisan ini melaporkan sebagian hasil rangkaian riset mengenai pencarian sumber enzim kitinolitik dari lingkungan laut, khususnya dari limbah industri perikanan. Tujuan dari riset ini adalah mengisolasi bakteri kitinolitik dari limbah pengolahan udang, mengetahui kondisi optimum untuk memproduksi enzim tersebut dan mengidentifikasi bakteri terbaik penghasil enzim tersebut. Penapisan dilakukan dengan mengevaluasi indeks kitinolitik pada medium kitin padat (2%) dan mengukur aktivitas kitinolitik pada medium minimal (MSM) cair yang diperkaya koloidal kitin 0,5%. Optimasi produksi enzim dilakukan dengan mengkultur isolat pada berbagai pH, suhu, dan substrat menggunakan penangas air bersuhu 37°C dengan agitasi 100 rpm. Sejumlah 106 isolat berhasil diisolasi, dan di antaranya isolat KPU 218 yang memiliki aktivitas kitinolitik tertinggi ($0,134 \pm 0,004$ U/mg) dalam waktu tercepat (24 jam). Kondisi optimum untuk memproduksi enzim tersebut adalah pH 5, suhu 25°C dengan substrat koloidal kitin dan waktu produksi 30 jam. Hasil identifikasi berdasarkan 16S-rDNA menunjukkan bahwa isolat KPU 218 memiliki kemiripan 87% dengan *Acinetobacter* sp.

ABSTRACT: *Screening of chitinolytic bacteria from shrimp processing waste. By: Ekowati Chasanah, Miftahul Ilmi and Wibowo Mangunwardoyo*

*Shrimp processing waste is one of important sources for chitinolytic enzyme. This paper reported part of the enzyme discovery from marine environment, especially from fisheries processing waste. The purpose of this study was to isolate chitinolytic bacteria from shrimp processing waste and to obtain its optimum condition for chitinolytic enzyme production. Isolation and screening were done by evaluating the Chitinolytic Index (CI) using 2% colloidal chitin solid agar and measuring the specific chitinolytic activity using 0.5% colloidal chitin liquid medium. The isolate was cultured under variation of pH, temperature, and substrates in shaking waterbath at 37°C and 100 rpm to optimize the enzyme production. Of 106 chitinolytic isolates, KPU 218 produced the highest chitinolytic activity (0.134 ± 0.004 U/mg) within 24 h. Optimum production of KPU 218 chitinolytic enzyme was at pH 5 and temperature 25°C for 30 hours using colloidal chitin as substrate. According to 16S-rDNA-based identification, KPU 218 isolate had 87% similarity toward *Acinetobacter* sp.*

KEYWORDS: *chitinolytic bacteria, shrimp processing waste, isolation, production*

PENDAHULUAN

Enzim kitinolitik adalah kelompok enzim yang mampu mendegradasi kitin, biopolimer kedua terbanyak di alam setelah selulosa, menjadi monomernya yang berupa 2-asetamido-2-deoksi- β -D-glukosa (N-asetilglukosamin) (Patil *et al.*, 2000). Aplikasi dari enzim kitinolitik antara lain sebagai agen biokontrol terhadap kapang dan insekta yang merugikan (Chernin *et al.*, 1995; Chien-Jui Huang *et al.*, 2005), serta pembuatan oligomer kitin dari polimer kitin dan protein sel tunggal dari khamir (Patil *et al.*, 2000; Sørbotten *et al.*, 2005).

Bakteri penghasil enzim kitinolitik, atau bakteri kitinolitik, dapat ditemukan pada habitat-habitat yang

mengandung kitin yang tinggi, antara lain limbah yang mengandung kitin (Sakai *et al.*, 1998) seperti kulit (eksoskeleton) krustasea (Johnson, 1931; Vogan *et al.*, 2002), air dan sedimen laut (Donderski & Trzebiatowska 1999), dan tanah (Chernin *et al.*, 1995). Eksplorasi untuk mencari bakteri kitinolitik di Indonesia telah dilakukan oleh beberapa peneliti, antara lain oleh Purwani *et al.* (2002) dan Purwani *et al.* (2004) yang telah mengisolasi bakteri kitinolitik dari sumber air panas di Tompaso, Manado, dan Malik *et al.* (2003) yang telah mengisolasi bakteri kitinolitik dari ladang lada hitam di Pulau Bangka.

Pengolahan udang, baik untuk industri maupun konsumsi, menghasilkan limbah yang mengandung

¹⁾ Peneliti pada Balai Besar Riset Pengolahan Produk dan Bioteknologi Kelautan dan Perikanan, DKP

²⁾ Staf Pengajar pada Fakultas Biologi, Universitas Gadjah Mada

³⁾ Staf Pengajar pada Departemen Biologi, FMIPA, Universitas Indonesia

kitin (Shahidi *et al.*, 1999; Nasution *et al.*, 2004). Limbah tersebut diduga menjadi habitat bagi bakteri-bakteri yang mampu menghasilkan enzim kitinolitik. Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan bakteri kitinolitik dari limbah pengolahan udang dan mencari kondisi optimum untuk memproduksi enzim tersebut. Produksi enzim kitinolitik tersebut diharapkan dapat diaplikasikan dalam berbagai keperluan industri di antaranya sebagai agen biokontrol. Penyakit tanaman yang diakibatkan oleh kapang merupakan problem serius yang dihadapi oleh industri pertanian saat ini. Kapang patogen yang bersumber dari tanah seperti *Pythium*, *Fusarium*, *Rhizoctonia*, and *Phytophthora* merupakan kapang yang menyerang tanaman pertanian yang memiliki nilai ekonomi tinggi. Diharapkan enzim kitinolitik yang dihasilkan mempunyai kontribusi pada industri pertanian tersebut sebagai agen biokontrol (Gohel *et al.*, 2006).

BAHAN DAN METODE

Bahan

Sampel limbah pengolahan udang diambil dari pabrik pengolahan udang di Muara Baru, Jakarta, dan rumah makan di wilayah Jakarta. Isolat *Bacillus* sp. K-2914 sebagai kontrol positif merupakan koleksi Laboratorium Mikrobiologi dan Bioteknologi, PAU Institut Pertanian Bogor.

Koloidal kitin dibuat berdasarkan metode yang dilakukan Nasran *et al.* (2003). Semua bahan kimia dan mikrobiologi yang digunakan adalah *grade* analitik.

Isolasi bakteri kitinolitik

Isolasi bakteri kitinolitik dilakukan dengan metode isolasi langsung berdasarkan metode Hunter-Cevera *et al.* (1986). Sebanyak 10 g sampel dicampur dengan 90 mL larutan NaCl 0,9% dalam akuades dengan 3 kali ulangan. Campuran diencerkan hingga 3 kali pengenceran (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3}), kemudian sebanyak 0,1 mL suspensi dari tiap pengenceran tersebut disebar di atas medium kitin agar (K_2HPO_4 0,1%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,01%, NaCl 0,1%, $(NH_4)_2SO_4$ 0,7%, *Yeast Extract* 0,05%, koloidal kitin 2%, dan agar 1%). Medium diinkubasikan selama 48 jam pada suhu 30°C dan setiap koloni tunggal yang membentuk zona bening dipindahkan ke medium padat miring berisi *Nutrient Agar* (NA). Isolat dimurnikan dan disimpan sebagai *stock culture* dan *working culture* pada medium NA.

Skrining bakteri kitinolitik

Skrining dilakukan dalam dua tahap. Tahap pertama (skrining pada medium kitin padat) dilakukan

dengan mengukur Indeks Kitinolitik (IK) isolat-isolat yang didapat dari hasil isolasi pada medium kitin agar berdasarkan metode Cody tahun 1989 (Gohel *et al.*, 2006) dengan kontrol positif *Bacillus* sp. K-2914. Isolat berumur 24 jam dalam medium NA diinokulasikan ke medium kitin agar dengan metode titik (Nasran *et al.*, 2003), kemudian diinkubasikan selama 72 jam pada suhu 30°C. Pengamatan dilakukan tiap 24 jam dengan mengukur diameter koloni (DK) serta zona bening (DZ). Indeks Kitinolitik (IK) dihitung dengan rumus $IK = DZ/DK$ (Gohel *et al.*, 2006).

Tahap kedua (skrining pada medium kitin cair) dilakukan terhadap isolat yang memiliki nilai IK tinggi ($IK > 2$) dengan mengukur aktivitas spesifik enzim pada medium kitin cair. Isolat terpilih berumur 24 jam dalam medium NA miring disuspensikan dengan 5 mL akuades ($A_{600} = 1,138 \pm 0,245$). Kemudian 5 mL suspensi sel tersebut dimasukkan ke dalam 50 mL medium kitin cair dalam labu Erlenmeyer 250 mL, diinkubasikan selama 4 hari pada suhu 30°C dengan agitasi 100 rpm. Sampling dilakukan setiap hari; 1 ml medium diambil dan disentrifugasi dengan kecepatan 6.000 g selama 10 menit pada suhu 4 °C. Supernatan diuji aktivitas relatifnya menggunakan reagen *Schales* serta ditentukan kadar proteinnya menggunakan metode *Lowry* (Bollag & Edelstein, 1991). Aktivitas spesifik enzim adalah perbandingan aktivitas relatif dengan kadar protein yang terdapat dalam sampel dan memiliki satuan Unit/mg. Satu unit aktivitas didefinisikan sebagai jumlah enzim yang menghasilkan 1 μ mol N-asetilglukosamin tiap menit (Nasran *et al.*, 2003). Medium kitin cair tanpa isolat digunakan sebagai kontrol negatif. Isolat dengan aktivitas spesifik terbaik diidentifikasi serta digunakan lebih lanjut dalam penelitian.

Identifikasi isolat bakteri

Identifikasi isolat terpilih dilakukan menggunakan *Microbact Identification System 12E/A* (Oxoid) dan berdasar 16S rDNA. Ekstraksi DNA dilakukan dengan menggunakan *Genomic DNA Purification Kit* (Fermentas), primer yang digunakan berdasarkan Marchesi *et al.* (1998). Reaksi PCR dilakukan dengan *Pure Taq Ready To Go PCR beads* (GE Healthcare). Sekuensing dilakukan di Fakultas Teknobiologi, Universitas Atmajaya. Hasil sekuensing dianalisis menggunakan program *Clustal W* dan pembuatan pohon filogenetik menggunakan program *Treecon 1.3b*.

Optimasi produksi enzim kitinolitik

Optimasi produksi enzim kitinolitik dari isolat terpilih dilakukan dengan kultivasi isolat pada medium dengan berbagai variasi pH, suhu, dan substrat.

Metode optimasi produksi mengikuti metode skrining medium cair, sedangkan waktu pemanenan mengikuti kurva aktivitas spesifik enzim yang didapat dari skrining tersebut.

Optimasi pH produksi ditentukan dengan menguji aktivitas enzim kitinolitik tertinggi pada pH medium produksi 4, 5, 6, 7, 8, dan 9 menggunakan suhu produksi 30°C. Suhu optimum ditentukan dengan menguji aktivitas kitinolitik pada suhu produksi 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, dan 60°C menggunakan pH produksi optimum.

Optimasi medium produksi dilakukan terhadap jenis substrat. Aktivitas kitinolitik tertinggi ditentukan pada produksi menggunakan substrat koloidal kitin (1% b/v), glukosa (1% b/v), kitin bubuk (1% b/v) (Sigma), dan campuran antara kitin bubuk (0,5% b/v)

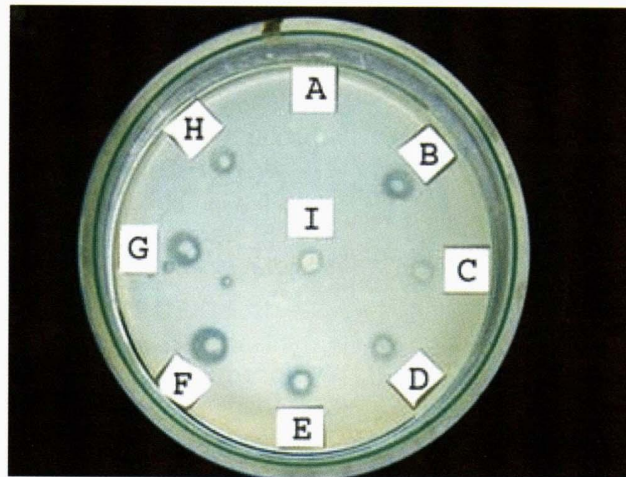
dengan glukosa (0,5% b/v) pada suhu dan pH produksi optimum.

Profil produksi enzim kitinolitik

Profil produksi enzim kitinolitik ditentukan pada kondisi dan medium optimum dengan mengukur aktivitas spesifik enzim pada jam ke-0, 6, 12, 18, 24, 30, 36, 42, 48, 54, dan 72.

HASIL DAN BAHASAN

Sebanyak 106 isolat bakteri kitinolitik berhasil diisolasi dari limbah pengolahan udang. Tujuh isolat dengan IK > 2 dipilih untuk dilanjutkan skrining tahap kedua dengan menggunakan medium cair (Gambar 1 dan Tabel 1).



Gambar 1. Hasil skrining tujuh isolat dengan IK > 2: pada medium kitin padat (A) KLU 111 (kontrol negatif); (B) KLU 2123; (C) KLU 1121; (D) KLU 116; (E) KPU 218; (F) KPU 2124; (G) KLU 115; (H) KLU 1116; (I) *Bacillus* sp. K-2914 (kontrol positif).

Figure 1. Screening of seven isolates with IK > 2 on agar medium: (A) KLU 111 (negative control); (B) KLU 2123; (C) KLU 1121; (D) KLU 116; (E) KPU 218; (F) KPU 2124; (G) KLU 115; (H) KLU 1116; (I) *Bacillus* sp. K-2914 (positive control).

Tabel 1. Isolat-isolat dengan IK > 2 hasil skrining pada medium padat
Table 1. Isolates having IK > 2 on agar medium

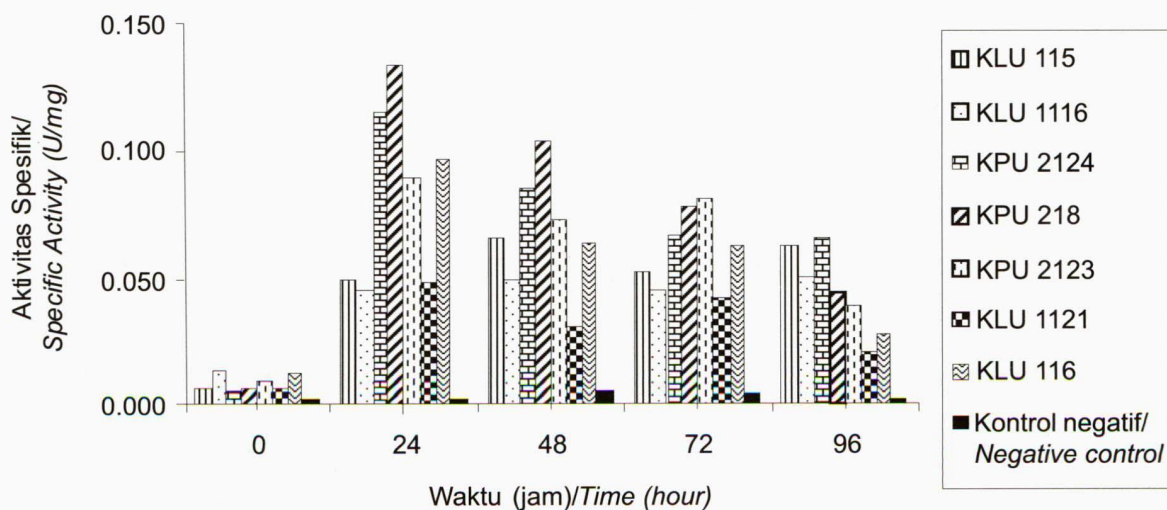
No	Isolat/Isolate	Indeks Kitinolitik/ Chitinolytic Index	Asal/Origin
1	KLU 1116	2.58 ± 0.52	Kulit udang dari pabrik
2	KPU 2124	2.53 ± 0.29	Kepala udang dari rumah makan
3	KLU 115	2.44 ± 0.17	Kulit udang dari pabrik
4	KPU 218	2.39 ± 0.31	Kepala udang dari rumah makan
5	KPU 2123	2.27 ± 0.02	Kepala udang dari rumah makan
6	KLU 116	2.21 ± 0.19	Kulit udang dari pabrik
7	KLU 1121	2.18 ± 0.40	Kulit udang dari pabrik

Skrining tahap kedua dilakukan dengan menggunakan medium kitin cair yang secara spesifik mengukur kadar N-asetilglukosamin sebagai produk degradasi kitin oleh enzim kitinolitik (Gooday, 1990). Skrining dengan menggunakan medium cair menunjukkan isolat KPU 218 memiliki aktivitas spesifik tertinggi ($0,134 \pm 0,004$ U/mg), pada waktu tercepat (24 jam) dibandingkan keenam isolat lain (Gambar 2), meskipun nilai IK hanya $2,39 \pm 0,31$. Sebaliknya isolat KLU 1.1.16 yang memiliki IK terbesar ($2,58 \pm 0,52$) pada medium cair tidak menunjukkan aktivitas yang tinggi ($0,051 \pm 0,017$ U/mg) setelah 96 jam. Kemampuan isolat KLU 1.1.16 dalam membentuk IK terbesar diduga karena isolat tersebut melakukan proses *quorum sensing* dalam mendegradasi substrat koloidal kitin. *Quorum sensing* adalah proses beberapa bakteri menginduksi bakteri lain di sekitarnya, baik dari spesies yang sama maupun berbeda, untuk mengekspresikan suatu protein (Moat *et al.*, 2002). Fenomena tersebut telah dilaporkan oleh Chernin *et al.* (1998) yang meneliti *quorum sensing* pada degradasi kitin oleh bakteri *Chromobacterium violaceum*. Skrining menggunakan medium padat memungkinkan sel bakteri tumbuh berdekatan atau bahkan saling menumpuk dalam kepadatan yang tinggi, sehingga proses *quorum sensing* lebih mudah terjadi (Moat *et al.*, 2002). Mekanisme tersebut akan mempercepat proses degradasi koloidal kitin yang ada di substrat (Chernin *et al.*, 1998). Kemungkinan lain penyebab isolat KLU 1116 memiliki IK terbesar adalah adanya enzim pendegradasi kitin selain enzim kitinolitik yang dihasilkan oleh bakteri tersebut saat skrining dilakukan. Produk dari enzim tersebut tidak dapat terdeteksi saat dilakukan skrining medium cair, sehingga aktivitas kitinolitik isolat KLU 1116 rendah.

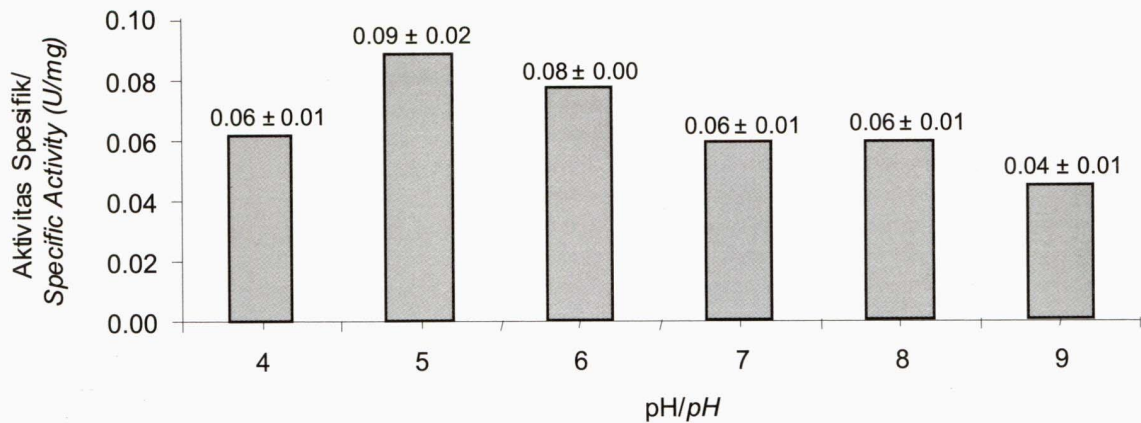
Isolat KPU 218 menunjukkan aktivitas kitinolitik tertinggi ($0,134 \pm 0,004$ U/mg) dalam waktu tercepat (24 jam) pada skrining medium cair. Diduga sel bakteri KPU 218 mampu melekat lebih baik ke partikel kitin dibandingkan isolat lainnya pada medium cair. Pelekatan sel ke partikel kitin merupakan tahap kedua dalam degradasi kitin dan dibantu oleh suatu protein yang disebut *chitin-binding protein* (CBP). Ekspresi protein tersebut berbeda antar spesies bakteri (Yu *et al.*, 1991). Menurut Montgomery & Kirchman (1994), CBP bertindak sebagai jangkar bagi bakteri dalam proses degradasi kitin di lingkungan perairan. Hal tersebut menyebabkan bakteri lebih melekat pada kitin sehingga akan menginduksi ekspresi enzim kitinolitik dan dapat menggunakan N-asetilglukosamin lebih mudah dibandingkan bakteri yang tidak mampu atau kurang mampu melekat pada kitin. Agitasi pada skrining medium cair menyebabkan medium teraduk sehingga tanpa bantuan CBP bakteri tidak akan dapat melekat pada substrat dengan baik.

Optimasi medium produksi menunjukkan bahwa isolat KPU 218 memproduksi enzim kitinolitik pada kisaran pH 4 hingga 9, dengan aktivitas tertinggi pada pH 5 (Gambar 3). Ini menunjukkan bahwa isolat KPU 218 dapat tumbuh dan melakukan proses metabolisme pada rentang pH tersebut.

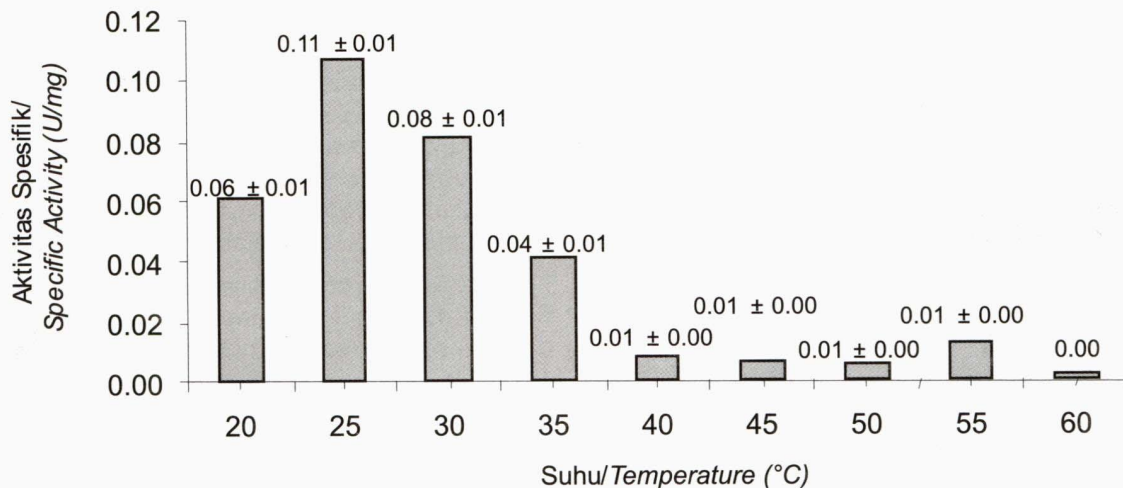
Isolat KPU 218 memproduksi enzim kitinolitik pada rentang suhu 20–35°C dengan aktivitas enzim tertinggi diproduksi pada suhu 25°C. Hasil tersebut menunjukkan bahwa isolat KPU 218 dapat tumbuh pada rentang suhu 20–35°C dan memiliki suhu pertumbuhan optimum pada 25°C. Menurut Madigan *et al.* (1997), kisaran suhu tersebut masuk ke dalam kisaran suhu pertumbuhan bagi bakteri mesofilik (20–40°C) yang salah satu anggotanya adalah *E. coli*.



Gambar 2. Aktivitas spesifik tujuh isolat dengan IK >2 pada skrining medium cair.
 Figure 2. Specific activity of seven isolates having IK > 2 at liquid medium.



Gambar 3. Aktivitas spesifik enzim kitinolitik KPU 218 pada berbagai variasi pH selama produksi pada 30°C menggunakan substrat MSM yang diperkaya koloidal kitin 0,5%.
 Figure 3. Specific activity of KPU 218 chitinolytic enzyme at various pH during production at 30°C using MSM medium enriched with 0.5% colloidal chitin.

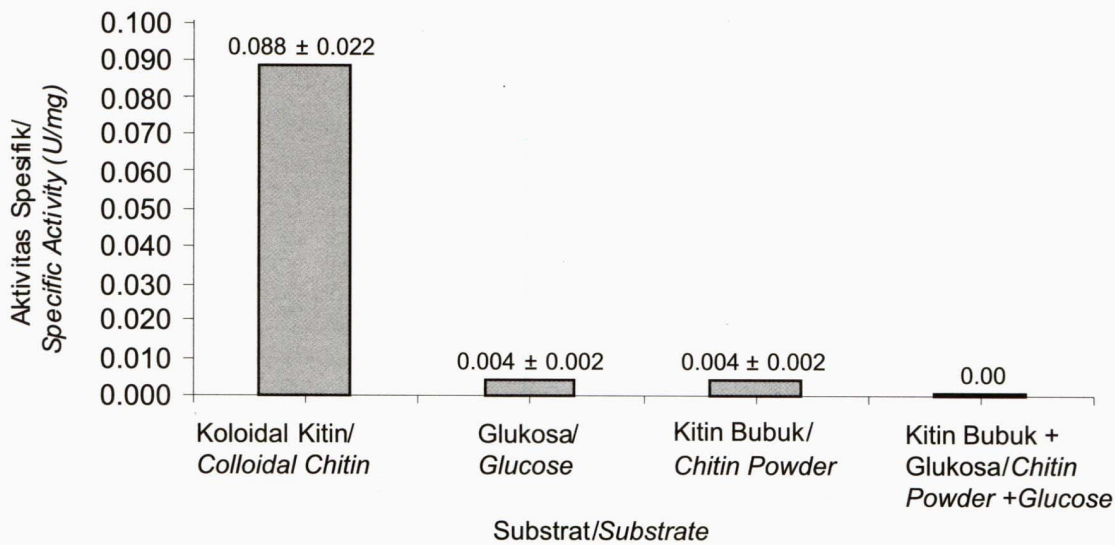


Gambar 4. Aktivitas spesifik enzim kitinolitik KPU 218 pada berbagai suhu selama produksi pada pH 5 menggunakan medium MSM yang diperkaya koloidal kitin 0,5%.
 Figure 4. Specific activity of KPU 218 chitinolytic enzyme at various temperature during production at pH 5 using MSM medium enriched with 0.5% colloidal chitin.

Isolat KPU 218 berasal dari sefalotoraks udang hasil limbah pengolahan udang di rumah makan. Limbah tersebut memiliki suhu 21°C, namun diduga pemrosesan udang tidak dilakukan pada suhu konstan dan umumnya pada suhu kamar. Hal tersebut menjelaskan rentang suhu pertumbuhan isolat KPU 218 antara 20–35°C yang sesuai dengan suhu lingkungannya.

Hasil optimasi substrat produksi (Gambar 5) menunjukkan bahwa isolat KPU 218 yang ditumbuhkan pada medium yang mengandung koloidal kitin mampu memproduksi enzim kitinolitik dengan aktivitas tertinggi (0,088 ± 0,022 U/mg). Isolat KPU 218 yang ditumbuhkan pada medium yang

mengandung glukosa tidak menghasilkan enzim kitinolitik, hal tersebut ditunjukkan oleh rendahnya aktivitas enzim kitinolitik pada produksi yang menggunakan substrat tersebut (0,004 ± 0,002 U/mg). Menurut Moat *et al.* (2002), glukosa merupakan sumber karbon yang paling efisien bagi bakteri sehingga isolat KPU 218 saat ditumbuhkan pada medium yang mengandung substrat tersebut akan langsung menggunakan glukosa untuk pertumbuhan dan metabolisme. Hal tersebut menyebabkan produksi enzim-enzim pendegradasi karbohidrat lainnya, antara lain enzim kitinolitik, tidak terinduksi. Moat *et al.* (2002) menyebut fenomena tersebut sebagai *catabolite repression*.



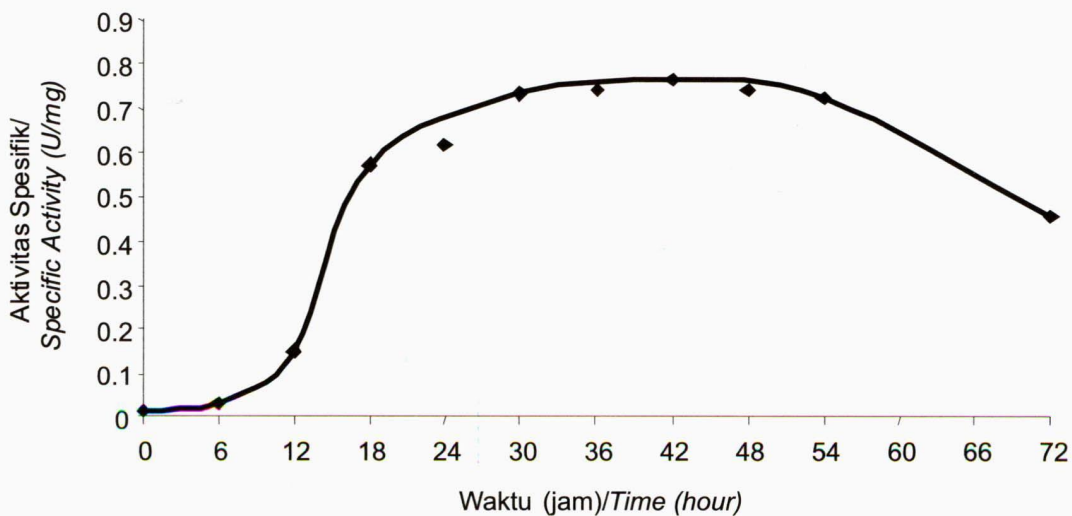
Gambar 5. Aktivitas spesifik enzim kitinolitik KPU 218 pada berbagai substrat produksi pada suhu 30°C, pH 5.

Figure 5. Specific activity of KPU 218 chitinolytic enzyme at various production substrate at pH 5, 30°C.

Aktivitas enzim kitinolitik hasil produksi isolat KPU 218 pada medium yang menggunakan substrat kitin bubuk sangat rendah ($0,004 \pm 0,0022$ U/mg). Kitin bubuk dan koloidal kitin memiliki monomer yang sama, yaitu N-asetilglukosamin, namun ketersediaan kitin dalam kitin bubuk masih berupa polimer kitin, berbentuk padat dan tidak larut dalam air sehingga enzim tidak mampu mengakses dan mendegradasi kitin tersebut. Pada koloidal kitin, kitin tersedia dalam bentuk potongan-potongan (oligomer kitin) akibat proses pemotongan terbatas oleh perlakuan kimia dalam proses pembuatan koloidal kitin sehingga enzim kitinolitik lebih mampu mengakses dan

menggunakan kitin tersebut. Aktivitas enzim kitinolitik juga tidak terdeteksi pada medium campuran kitin bubuk dengan glukosa. Ketidakterdapatannya oligomer kitin sebagai inducer pada medium tersebut merupakan penyebab ketidakmampuan isolat KPU 218 dalam mengekspresikan enzim kitinolitik.

Profil produksi enzim kitinolitik KPU 218 ditentukan dengan mengukur aktivitas enzim kitinolitik yang diproduksi pada kondisi optimum selama 72 jam. Optimasi menunjukkan aktivitas enzim mulai meningkat pada jam ke-12 dan mulai stabil pada jam ke-18 (Gambar 6). Bentuk kurva aktivitas enzim kitinolitik pada produksi selama 72 jam menyerupai



Gambar 6. Kurva aktivitas enzim kitinolitik KPU 218 selama produksi 72 jam.

Figure 6. Activity curve of KPU 2.1.8 chitinolytic enzyme during 72 hours production time.

kurva sigmoid pertumbuhan bakteri, sehingga diduga enzim kitinolitik tersebut berperan penting bagi isolat KPU 218 dalam mendapatkan nutrisi. Selama 12 jam pertama aktivitas enzim belum menunjukkan peningkatan yang tajam, sehingga diasumsikan sel-sel dalam koloni berada dalam fase lag. Pada fase tersebut, sel-sel bakteri mulai mengenali dan melakukan pelekatan pada partikel oligomer kitin di dalam medium (Xibing Li & Roseman, 2004). Pada bakteri *Vibrio harveyi*, setelah pelekatan sel yang dilakukan oleh suatu CBP dengan berat 53 kDa, kitin akan menginduksi sekresi CBP lainnya (Montgomery & Kirchman, 1994). Proses tersebut diduga juga terjadi pada strain KPU 218 dan menyebabkan sedikitnya jumlah enzim kitinolitik yang dihasilkan oleh sel bakteri pada awal produksi.

Hasil identifikasi isolat KPU 218

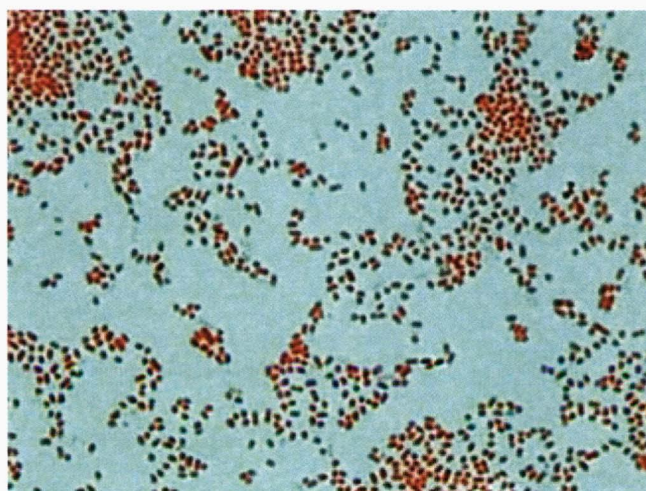
Isolat KPU 218 adalah gram negatif berbentuk batang pendek (Gambar 7). Identifikasi dengan menggunakan *Microbact Identification System 12E/A* menunjukkan bahwa isolat tersebut 77% identik dengan isolat *Escherichia coli-inactive*, yang merupakan *biogroup* dari species *E. coli*, famili *Enterobacteriaceae*. Karakteristik biokimiawi isolat KPU 218 di antaranya adalah memiliki kemampuan memfermentasi glukosa dan manitol dengan menghasilkan asam, tidak mampu menggunakan sitrat, silosa (*xylose*) dan urea, tidak menghasilkan H₂S, tidak memiliki triptofan deaminase dan lisin dekarboksilase, memberikan reaksi positif terhadap pereaksi indol tapi negatif terhadap pereaksi Voges Proskauer.

Dari hasil perbandingan (*blast*) terhadap urutan nukleotida (500 pasangan basa) hasil PCR 16S rDNA,

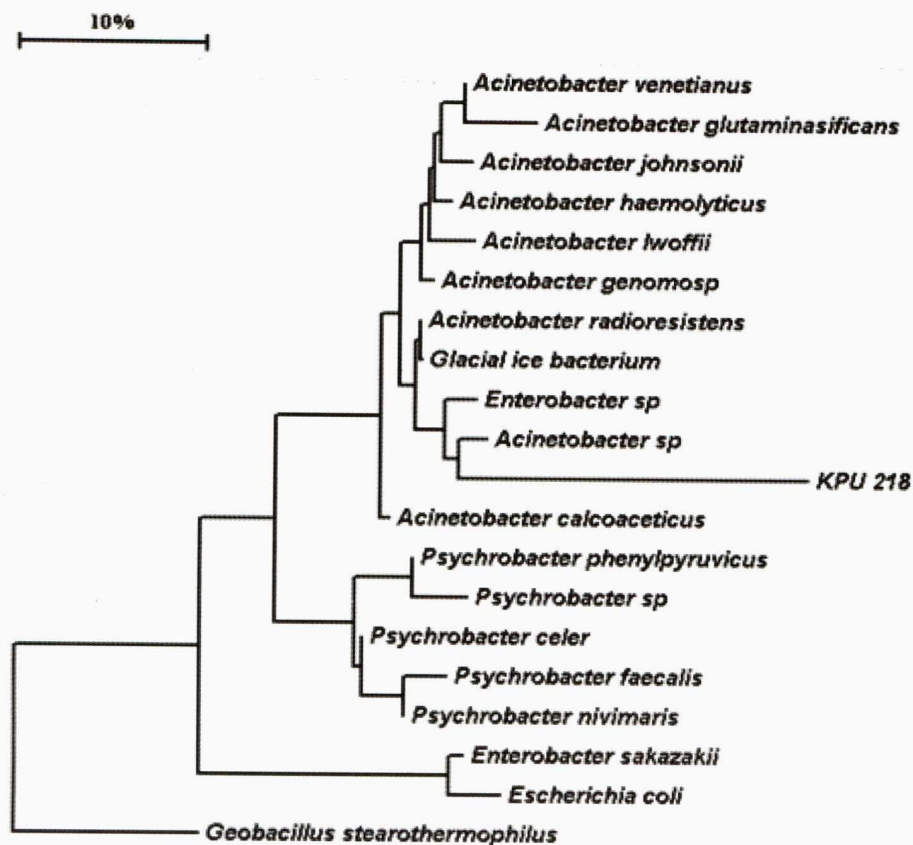
isolat tersebut memiliki kemiripan terdekat (87%) dengan *Acinetobacter sp.* Hasil tersebut kemungkinan akan berubah apabila sekuensing dilakukan terhadap keseluruhan urutan nukleotida pada 16S rDNA tersebut.

Gen 16S rRNA suatu mikroba bersel tunggal (*prokaryote*) memiliki urutan nukleotida (sekuen) yang terkonservasi sehingga dapat digunakan untuk menduga hubungan kekerabatan antara spesies. Urutan kemiripan gen 16S rRNA dengan gen 16S rRNA spesies lain dari bank data dapat digambarkan dengan pohon filogenetik seperti pada Gambar 8.

Keberadaan bakteri kitinolitik dari famili *Enterobacteriaceae* umum ditemukan di perairan dengan sumber kitin berasal dari eksoskeleton arthropoda. Donderski & Trzebiatowska (1999) telah melakukan perhitungan jumlah sel bakteri kitinolitik dari Danau Jeziorak (Polandia) dan mendapatkan 3,01 x 10⁶ sel bakteri kitinolitik tiap gram sampel. Sebanyak 21% dari jumlah sel tersebut diidentifikasi sebagai *Enterobacter aerogenes* dan 7,5% diidentifikasi sebagai *Serratia sp.* Penelitian yang serupa dilakukan oleh Donderski & Brzezinska (2001) di distrik Danau Ilawskie, Polandia. Penelitian tersebut menghasilkan 1,10 x 10⁵ sel bakteri kitinolitik tiap cm³ sampel dan 48% dari sel tersebut diidentifikasi sebagai famili *Enterobacteriaceae*. Bakteri kitinolitik yang telah diisolasi dari famili *Vibrionaceae* antara lain *Vibrio charcariae* (Suginta *et al.*, 2000), *Vibrio furnisii* (Yu *et al.*, 1991), *Vibrio harveyi* (Svitil *et al.*, 1997; Svitil & Kirchman 1998; Nasran *et al.*, 2003), dan *Aeromonas* (Brzezinska & Donderski 2001; Malik *et al.*, 2003; Ueda *et al.*, 2003). Adapun bakteri kitinolitik dari famili *Enterobacteriaceae*, antara lain *Serratia marcescens* (Suzuki *et al.*, 1999; Suzuki *et al.*, 2002; Sørbotten *et al.*, 2005),



Gambar 7. Pengecatan gram isolat KPU 218 (1000x).
Figure 7. Gram staining of KPU 218 isolate (1000x).



Gambar 8. Pohon filogenetik isolat KPU 218.
Figure 8. Phylogenetic tree of KPU 218 isolate.

Enterobacter sp. (Dahiya *et al.*, 2005), dan *E. aerogenes* (Donderski & Trzebiatowska, 1999), serta satu genus dari *Chromobacterium* (Chernin *et al.*, 1998; Donderski & Brzezińska, 2001).

Enzim kitosanase, salah satu enzim dari group enzim kitinolitik, dilaporkan telah diisolasi dari *Acinetobacter* sp. C-17 yang diisolasi dari sampel tanah Kota Haiyan, China (Zhu *et al.*, 2003). Isolasi bakteri penghasil enzim kitinolitik dari tanah yang kaya akan kulit udang telah dilaporkan oleh Zhu, *et al.* (2007), dan bakteri tersebut diidentifikasi sebagai *Sphingomonas* sp. C7-5. Vogan *et al.* (2002) telah melaporkan 22 isolat *Vibrio* dari kulit krustase *Cancer pagurus*. Isolasi bakteri penghasil enzim kitinolitik dari lingkungan laut Indonesia telah dilakukan di antaranya dari beberapa spons laut (Uria *et al.*, 2005; Chasanah *et al.*, 2007), dan dari terasi (Noviendri *et al.*, 2006; Zilda *et al.*, 2006).

KESIMPULAN

1. Isolat KPU 218 terpilih sebagai isolat penghasil enzim kitinolitik yang berpotensi dengan menunjukkan aktivitas tertinggi ($0,134 \pm 0,004$ U/mg) dan waktu produksi tercepat (24 jam).

2. Isolat tersebut diidentifikasi sebagai strain *Escherichia coli*-inactive menggunakan *Microbact Identification System 12E/A*, sedangkan berdasarkan analisis 16S rDNA isolat KPU 218 memiliki kemiripan 87% dengan *Acinetobacter* sp.
3. Strain KPU 218 memproduksi enzim kitinolitik pada kondisi optimum pH 5 dan suhu fermentasi 25°C, dengan waktu pemanenan terbaik jam ke-30. Produksi enzim kitinolitik dari isolat KPU 218 hanya dapat diinduksi oleh substrat koloidal kitin.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih disampaikan pada Gintung Pantastis yang telah membantu melakukan identifikasi secara molekuler. Terima kasih juga disampaikan kepada lab Mikrobiologi dan Bioteknologi PAU IPB atas diijinkannya penggunaan isolat *Bacillus* sp. K-2914.

DAFTAR PUSTAKA

- Bollag, D.M. and Edelman, S.J. 1991. *Protein Methods*. John Wiley & Sons Inc., New York. 230 pp.

- Brzezinska, M.S. and Donderski, W. 2001. Occurrence and activity of the chitinolytic bacteria of *Aeromonas* genus. *Polish Journal of Environmental Studies* 10(1): 27–31.
- Chasanah E., Fawzya, Y.N., Pratitis, A., dan Nurhayati, T. 2007. Penapisan bakteri penghasil enzim kitosanase yang berasosiasi dengan spons laut. *Jurnal Pascapanen dan Bioteknologi Kelautan dan Perikanan*. 2(2): 161–169.
- Chernin, L.S., Ismailov, Z., Haran, S., and Chet, I. 1995. Chitinolytic *Enterobacter agglomerans* antagonistic to fungal plant pathogens. *Applied and Environmental Microbiology* 61(5): 1720–1726.
- Chernin, L.S., Winson, M.K., Thompson, J.M., Haran, S., Bycroft, B.W., Chet, I., Williams, P., and Stewart, G.S.A.B. 1998. Chitinolytic activity in *Chromobacterium violaceum*: Substrate analysis and regulation by quorum sensing. *J. of Bacteriology* 180(17): 4435–4441.
- Chien-Jui Huang, Tang-Kai Wang, Shu-Chun Chung, and Chao-Ying Chen. 2005. Identification of an anti-fungal chitinase from a potential biocontrol agent, *Bacillus cereus* 28-9. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*. 38(1): 82–88.
- Dahiya, N., Tewari, R., Tiwari, R.P., and Hoondal, G.S. 2005. Chitinase from *Enterobacter* sp. NRG4: Its purification, characterization and reaction pattern. *Electronic Journal of Biotechnology*. 8(2): 134–145.
- Donderski, W. and Trzebiatowska, M. 1999. Chitinase activity production by planktonic, benthic and epiphytic bacteria inhabiting the moty bay of the Jeziorak Lake (Poland). *Polish Journal of Environmental Studies* 8(4): 215–220.
- Donderski, W. and Brzezinska, M.S. 2001. Occurrence of chitinolytic bacteria in water and bottom sediment of eutrophic lakes in I³awskie Lake District. *Polish Journal of Environmental Studies* 10(5): 331–336.
- Gohel, V., Singh, A., Vimal, M., Ashwini, P., and Chhatpar, H.S. 2006. Bioprospecting and antifungal potential of chitinolytic microorganisms. *African Journal of Biotechnology* 5(2): 54–72.
- Gooday, G.W. 1990. The ecology of chitin degradation. In Marshall, K.C. (ed.). *Advances in Microbial Ecology*. Plenum Press, New York. p. 387–430.
- Hunter-Cevera, J.C., Fonda, M.E., and Belt, A. 1986. Isolation of cultures. In Demain, A.L. and Solomon, N.A. (eds.). *Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology*. American Society of Microbiology, Washington, D.C. p. 3–23.
- Johnson, D.E. 1931. Some observation on chitin destroying bacteria. *Journal Series of the Minnesota Agricultural Experiment Station*. 1053: 335–340
- Marchesi, J.R., Sato, T., Weightman, A.J., Martin, T.A., Fry, J.C., Hiom, S.J., and Wade, W.G. 1998. Design and evaluation of useful bacterium-specific PCR primers that amplify genes coding for bacterial 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 795–799.
- Madigan, M.T., Martinko, J.M., and Parker, J. 1997. *Brock Biology of Microorganism*. 8th ed. Prentice Hall International, Inc., London: xviii + 1038 pp.
- Malik, A., Wenuganen, S., Suwanto, A., and Tjahjono, B. 2003. Cloning, DNA sequence, and expression of *Aeromonas caviae* WS7b chitinase gene. *Molecular Biotechnology*. 23(1): 1–10.
- Moat, A.G., Foster, J.W., and Spector, M.P. 2002. *Microbial Physiology*. 4th ed. Wiley-Liss, Inc., New York: xx + 715 pp.
- Montgomery, M.T. and Kirchman, D.L. 1994. Induction of chitin-binding proteins during the specific attachment of the marine bacterium *Vibrio harveyi* to chitin. *Applied and Environmental Microbiology*. 60(12): 4284–4288.
- Nasran, S., Ariyani, F., dan Indriati, N. 2003. Produksi kitinase dan kitin deasetilase dari *Vibrio harveyi*. *J. Penel. Perik. Indonesia*. 9(5): 33–38.
- Nasution, Z., Tazwir, dan Zilda, D.S. 2004. Potensi, pemanfaatan dan nilai ekonomi limbah udang dan rajungan di propinsi Lampung. *Warta Penelitian Perikanan Indonesia*. 10(7): 2–5.
- Noviendri, D., Chasanah, E., dan Fawzya, Y.N. 2006. Karakterisasi enzim kitinase yang diproduksi oleh isolat bakteri JB4 dari terasi. *Jurnal Pascapanen dan Bioteknologi Kelautan dan Perikanan*. 1(2): 85–92.
- Patil, R.S., Ghormade, V., and Deshpande, M.V. 2000. Chitinolytic enzymes: An exploration. *Enzyme and Microbial Technology*. 26: 473–483.
- Purwani, E.Y., Toharisman, A., Chasanah, E., Laksmi, J.F., Welan, V., Suhartono, M.T., Purwadaria, T., Jae Kwan Hwang, and Yu Ryang Pyun. 2002. Studi pendahuluan enzim kitinolitik ekstraseluler yang dihasilkan oleh isolat bakteri asal Manado. *Jurnal Teknologi dan Industri Pangan*. 8(2): 111–117.
- Purwani, E.Y., Suhartono, M.T., Rukayadi, Y., Jae Kwan Hwang, and Yu Ryang Pyun. 2004. Characteristics of thermostable chitinase enzymes from the Indonesian *Bacillus* sp. 13.26. *Enzyme and Microbial Technology*. 35: 147–153.
- Sakai, K., Yokota, A., Kurokawa, H., Wakayama, M., and Moriguchi, M. 1998. Purification and characterization of three thermostable endochitinases of a noble *Bacillus* Strain, MH-1, isolated from chitin-containing compost. *Applied and Environmental Microbiology*. 64(9): 3397–3402.
- Shahidi, F., Arachi, J.K.V., and Jeon, Y.J. 1999. Food applications of chitin and chitosan. *Trends in Food Science & Technology*. 10: 37–51.
- Sørbotten, A., Horn, S.J., Eijsink, V.G.H., and Vårum, K.M. 2005. Degradation of chitosans with chitinase B from *Serratia marcescens*: Production of chito-oligosaccharides and insight into enzyme processivity. *FEBS Journal*. 272: 538–549.
- Suginta, W., Robertson, P.A.W., Austin, B., Fry, S.C., and L.A. Fothergill-Gilmore. 2000. Chitinases from *Vibrio*: activity screening and purification of chiA from *Vibrio carchariae*. *Journal of Applied Microbiology* 89: 76–84.
- Suzuki, K., Taiyoji, M., Sugawara, N., Nikaidou, N., Henrissat, B., and Watanabe, T. 1999. The third chitinase gene (chiC) of *Serratia marcescens* 2170 and the relationship of its product to other bacterial chitinases. *Biochemistry Journal*. 343: 587–596.

- Suzuki, K., Sugawara, N., Suzuki, M., Uchiyama, T., Katouno, F., Nikaidou, N., and Watanabe, T. 2002. Chitinase A, B, and C1 of *Serratia marcescens* 2170 produced by recombinant *Escherichia coli*: Enzymatic properties and synergism on chitin degradation. *Bioscience of Biotechnology and Biochemistry*. 66(5): 1075–1083.
- Svitil, A.L., Chadhain, S.M.N., Moore, J.A., and Kirchman, D.L. 1997. Chitin degradation proteins produced by the marine bacterium *Vibrio harveyi* growing on different forms of chitin. *Applied and Environmental Microbiology* 63(2): 408–413.
- Svitil, A.L. and Kirchman, D.L. 1998. A chitin-binding domain in a marine bacterial chitinase and other microbial chitinases: implications for the ecology and evolution of 1,4- β -glycanases. *Microbiology*. 144: 1299–1308.
- Ueda, M., Kojima, M., Yoshikawa, T., Mitsuda, N., Araki, K., Kawaguchi, T., Miyatake, K., Arai, M., and Fukamizo, T. 2003. A novel type of family 19 chitinase from *Aeromonas* sp. No.10S-24: Cloning, sequence, expression, and the enzymatic properties. *European Journal of Biochemistry*. 270: 2513–2520.
- Uria, A.R., Chasanah, E., and Fawzya, Y.N. 2005. Optimization of *Bacillus* sp. K-29-14 Chitinase Production Using Marine Crustacean Waste. *Journal of Coastal Development*. 8(3): 155–162.
- Vogan, C.L., Costa-Ramos, C., and Rowley, A.F. 2002. Shell disease syndrome in the edible crab, *Cancer pagurus*—isolation, characterization and pathogenicity of chitinolytic bacteria. *Microbiology* 148: 743–754.
- Xibing, Li and Roseman, S. 2004. 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* 101(2): 627–631.
- Yu, C., Lee, A.M., Bassler, B.L., and Roseman, S. 1991. Chitin utilization by marine bacteria: A physiological function for bacterial adhesion to immobilized carbohydrates. *The Journal of Biological Chemistry* 266(36): 24260–24267.
- ZHU Xu-Fen, WU Xiao-Yun, and DAY Yun. 2003. Fermentation conditions and properties of a Chitosanase from *Acinetobacter* sp. C-17. *Biosci. Bioethanol. Biochem.* 67(2): 284–290.
- ZHU Xu-Fen, ZHOU Ying, and FENG Jun-lin. 2007. Analysis of both chitinase and chitosanase produced by *Sphingomonas* sp. C7-5. *Journal of Zeijing Univ. Science B*. 8(11): 831–838.
- Zilda, D.S., Fawzia, Y.N., and Chasanah, E. 2006. Karakterisasi enzim kitosanase dari bakteri kitinolitik T5a1 yang diisolasi dari terasi. *Jurnal Pascapanen dan Bioteknologi Kelautan dan Perikanan*. 1(1): 43–50.