

ISOLASI DAN PENGAMATAN MORFOLOGI KOLONI BAKTERI KITINOLITIK

(Isolation and Observation of Morphology of Chitinolytic Bacteria Colony)

Lenni Fitri¹, Yekki Yasmin²

^{1,2} Jurusan Biologi FMIPA Unsyiah, Darussalam Banda Aceh

E-mail: l.fitri_bio@yahoo.com.id

Abstract

The research is aimed to isolate and observe the morphology of chitinolytic bacteria. The research was conducted since November 2010 until April 2011 at Microbiology Laboratory of Mathematics and Sciences Faculty, University of Syiah Kuala. The method used is experimental method. Locations of water sample taken are at sea, river, and embankment which taken in some areas around Banda Aceh and Aceh Besar. The results showed that there are 18 pure cultured chitinolytic bacteria isolates. And the results of morphological bacteria colony showed that all isolates were circle shape colony. It was found that the flat shape of colony is 14 isolates and 4 serrated. The sizes of colony were found from 1,0 mm until 3,5 mm. The white isolate are 13 and 5 yellowish. The most of isolates are negative gram which bacil and coccus cell shape.

Key words: *chitinolytic bacteria, isolation, morphology bacteria.*

PENDAHULUAN

Bakteri kitinolitik merupakan kelompok bakteri yang mampu menghasilkan enzim kitinase untuk menguraikan zat kitin (Budiani *et al.*, 2004). Beberapa bakteri yang telah diketahui mampu menghasilkan enzim kitinase adalah *Bacillus papandayan* (Rochima, 2006), *Bacillus thuringiensis* (Blondine, 2005), *Vibrio harveyi* (Nasran *et al.*, 2003), dan *Aeromonas* sp. (Suryanto *et al.*, 2005). Upaya untuk mengisolasi bakteri kitinolitik dari berbagai sumber telah banyak dilakukan di Indonesia. Isolat bakteri kitinolitik dapat diperoleh dari sumber air panas (Dewi, 2008), tanah dan lumpur (Suryanto *et al.*, 2005) serta dari sumber perairan lain seperti sungai dan laut (Pujiyanto *et al.*, 2008). Rostinawati (2008) mengatakan bahwa enzim kitinase yang dihasilkan oleh bakteri kitinolitik berasal dari perairan berperan dalam proses daur ulang kitin, dengan adanya enzim kitinase ini maka proses penguraian kitin berlangsung berkesinambungan sehingga tidak terjadi akumulasi dari sisa-sisa cangkang udang, kepiting, cumi-cumi dan organisme perairan lainnya. Bakteri kitinolitik dapat diperoleh dengan cara mengisolasi atau memindahkan bakteri tersebut dari lingkungannya di alam bebas ke dalam medium buatan.

Karakteristik dari bakteri kitinolitik dapat diketahui dengan melakukan pengamatan morfologi koloni bakteri, dimana dengan mengetahui ciri-ciri morfologi tersebut maka dapat mempermudah dalam

melakukan identifikasi jenis bakteri kitinolitik. Mengingat besarnya potensi perairan di kawasan Aceh, tidak menutup kemungkinan untuk mengisolasi bakteri kitinolitik yang berasal dari perairan Aceh, khususnya perairan Banda Aceh dan Aceh Besar, seperti laut, sungai dan tambak. Oleh karena itu perlu dilakukan penelitian untuk mengisolasi dan melakukan pengamatan morfologi koloni bakteri kitinolitik yang berasal dari perairan Aceh.

Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi dan melakukan pengamatan morfologi koloni bakteri kitinolitik.

METODE

Alat dan Bahan

Peralatan yang dipakai dalam penelitian ini adalah botol sampel, cawan petri, gelas ukur, erlenmeyer, *autoclave*, *magnetic stirrer*, inkubator, oven, penggaris, mikroskop, kaca benda dan kaca penutup, timbangan digital, tabung reaksi dan rak tabung, pipet tetes, batang pengaduk, *aluminium foil*, *Laminar Air Flow* (LAF), lemari pendingin, bunsen, ose, alat tulis dan kamera digital.

Bahan yang dipakai adalah sampel air (air laut, air tambak, dan air sungai), akuades, media agar kitin, alkohol 96%, lugol, safranin, kristal violet, minyak emersi, spiritus, dan tissue.

Metode Penelitian

Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode eksperimental. Lokasi pengambilan sampel air yaitu laut, tambak dan sungai yang diambil di beberapa kawasan di Banda Aceh dan Aceh Besar.

Prosedur Penelitian

Tahap pembuatan kitin

Sampel yang digunakan untuk pembuatan kitin adalah limbah cangkang udang. Cangkang udang yang diperoleh dicuci hingga bersih dan dikeringkan di bawah sinar matahari selama satu hari. Cangkang kering kemudian digiling hingga menjadi serbuk halus. Proses pembuatan kitin selanjutnya meliputi tahap deproteinase dan tahap demineralisasi.

1) Tahap deproteinasi:

Sebanyak 100 gr serbuk kulit udang dimasukkan ke dalam erlenmeyer dan ditambahkan NaOH sebanyak 500 ml. Campuran kemudian diaduk di atas *magnetic stirrer* selama 2 jam pada suhu 60°C. Endapan yang terbentuk dipisahkan dari filtrat. Endapan dicuci dengan akuades hingga pH netral dan selanjutnya dikeringkan dalam oven selama 4 jam pada suhu 60°C (Ramadhan *et al.*, 2010).

2) Tahap demineralisasi:

Sebanyak 64 gr kulit udang kering hasil deproteinasi dilarutkan dalam HCl pekat sebanyak 640 ml. Campuran kemudian didiamkan selama dua hari pada suhu kamar. Endapan yang diperoleh dicuci dengan akuades hingga pH netral dan dikeringkan kembali dalam oven selama 4 jam pada suhu 60°C, diperoleh kitin (Ramadhan *et al.*, 2010).

Pembuatan media agar kitin

Bahan media agar kitin dan koloid kitin disterilisasi dengan menggunakan *autoclave* dalam wadah yang berbeda selama 15 menit pada suhu 121°C, setelah dingin kemudian koloid kitin dicampur dengan bahan media agar kitin lain dalam keadaan steril. Selanjutnya media agar kitin steril dituang ke dalam cawan petri (Pujiyanto *et al.*, 2008).

Isolasi bakteri kitinolitik

Bakteri kitinolitik diisolasi dari sampel air yaitu air laut, air tambak dan air sungai yang diambil di beberapa tempat di kawasan Banda Aceh dan Aceh Besar. Masing-masing kawasan diambil sebanyak

20 sampel. Sampel air laut diperoleh dari Laut Ujoeng Batee, Ulee Lheue, Syiah Kuala dan Alue Naga. Sampel air tambak diperoleh dari tambak di daerah Baet, Tibang, Dayah Raya dan Lam Pasee. Sampel air sungai diperoleh dari Krueng Lamnyong, Kr. Aceh, Kr. Raba dan Kr. Daroi. Masing-masing lokasi pengambilan sampel diambil sampel sebanyak 5 titik. Sampel air diambil dengan menggunakan botol sampel yang sudah disterilkan dan dibawa ke laboratorium. Sampel yang diperoleh diambil sebanyak 1 ml sampel lalu dicawakan pada media agar kitin dan diinkubasi selama 48-72 jam pada suhu 30°C (Pujiyanto *et al.*, 2008). Bakteri yang tumbuh kemudian diambil dan dibiakkan kembali pada media agar kitin hingga diperoleh biakan murni.

Teknik pewarnaan Gram

Diambil akuades diteteskan pada kaca objek ditambahkan 1 ose biakan sampel, lalu difiksasi di atas api. Tetesi pewarnaan kristal violet dan biarkan selama 1 menit, cuci dengan air mengalir, kemudian tetesi lugol biarkan selama satu menit dan kembali dicuci dengan air mengalir. Selanjutnya tetesi alkohol 96% biarkan selama 10-20 detik, cuci dengan air mengalir dan tambahkan safranin biarkan selama 20-30 detik kemudian cuci lagi dengan air mengalir. Tahap selanjutnya keringkan dengan menggunakan kertas serap dan tambahkan minyak emersi dan amati di bawah mikroskop. Bila hasil pewarnaan diperoleh bakteri berwarna merah maka bakteri tersebut adalah bakteri gram negatif, sedangkan bila diperoleh bakteri berwarna ungu maka bakteri tersebut adalah gram positif.

Parameter Penelitian

Parameter yang diamati dalam penelitian ini adalah jumlah isolat yang ditemukan, ukuran koloni bakteri, bentuk koloni bakteri, bentuk bagian tepian koloni, dan warna koloni bakteri. Mengamati bakteri gram negatif dan gram positif serta pengamatan bentuk sel bakteri kitinolitik.

Analisis Data

Data morfologi koloni bakteri yang diperoleh dianalisis secara deskriptif dan ditampilkan dalam bentuk tabel dan gambar.

HASIL DAN PEMBAHASAN

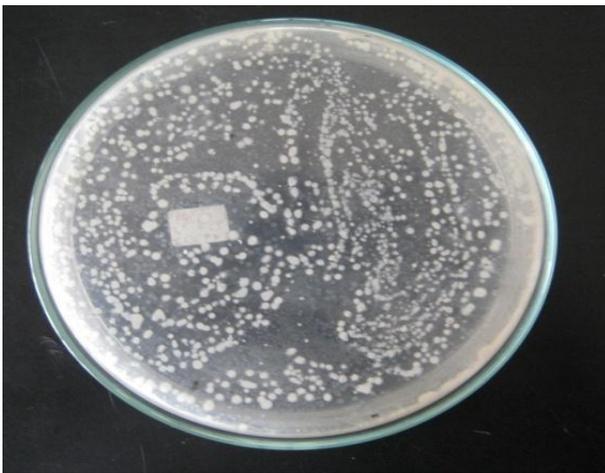
Isolasi Bakteri Kitinolitik

Isolasi bakteri kitinolitik yang diperoleh dari penelitian ini berasal dari

sampel air yang diambil dari air laut, air sungai dan air tambak di kawasan Banda Aceh dan Aceh Besar. Sampel air yang diambil dari ketiga sumber air tersebut sebanyak 60 sampel yaitu 20 sampel air laut, 20 sampel air sungai dan 20 sampel air tambak. Seluruh sampel kemudian ditumbuhkan pada media agar kitin, sehingga didapat sebanyak 18 isolat bakteri kitinolitik yang mampu tumbuh pada media tersebut. Menurut Dewi (2008), isolasi bakteri merupakan pengambilan atau memindahkan mikroba dari lingkungannya di alam dan

menumbuhkannya sebagai biakan murni dalam medium buatan. Salah satu isolat tersebut dapat dilihat pada Gambar 1 berikut ini.

Pemurnian isolat bertujuan untuk mendapatkan biakan murni, pada penelitian ini pemurnian isolat dilakukan sebanyak dua kali sehingga diperoleh isolat yang benar-benar murni. Lay (1994) menyatakan bahwa biakan murni merupakan biakan yang hanya mengandung satu jenis bakteri. Di bawah ini adalah Tabel 1 kode isolat dan asal isolat.



Gambar 1. Hasil isolasi bakteri kitinolitik

Tabel 1. Kode dan asal isolat

No.	Kawasan	Kode isolat	Asal isolat
1.	Laut	AN1	Alue Naga
2.		AN3	Alue Naga
3.		AN4	Alue Naga
4.		SK1	Syiah Kuala
5.		SK3	Syiah Kuala
6.		SK4	Syiah Kuala
7.		SK5	Syiah Kuala
8.	Tambak	DR4	Deah Raya
9.		B2	Baet
10.		B3	Baet
11.		B5	Baet
12.	Sungai	L1	Lamnyong
13.		L2	Lamnyong
14.		L3	Lamnyong
15.		L4	Lamnyong
16.		KA1	Krueng Aceh
17.		KD1	Krueng Daroi
18.		KR4	Krueng Raba

Tabel 1 diatas menunjukkan bahwa hasil dari 18 isolat bakteri kitinolitik benjolan putih isolat berasal dari kawasan laut, empat isolat dari kawasan tambak dan tujuh isolat dari kawasan sungai diperoleh dari ukuran yang paling kecil hingga yang paling besar yaitu berkisar antara 1,0 mm hingga 3,5 mm. Seluruh isolat berwarna putih susu dan semuanya bersifat gram negatif serta bentuk sel basil.

Karakteristik Morfologi Koloni Bakteri Kitinolitik

Pengamatan morfologi yang dilakukan terhadap 18 isolat bakteri kitinolitik meliputi, bentuk koloni, bentuk tepian koloni, ukuran koloni, dan warna koloni, pengamatan gram positif dan negatif serta bentuk mikroskopis dari bakteri kitinolitik. Berikut ini adalah tabel hasil pengamatan morfologi koloni bakteri kitinolitik.

Tabel 2 memperlihatkan bahwa semua isolat yang berasal dari kawasan laut memiliki bentuk koloni bulat. Bentuk tepian

Tabel 3 memperlihatkan bahwa semua isolat yang berasal dari kawasan tambak memiliki bentuk koloni bulat. Semua isolat berbentuk tepian koloni rata. Ukuran koloni yang diperoleh berkisar antara 2,0 mm hingga 3,0 mm. Satu isolat berwarna putih kekuningan, tiga lainnya berwarna putih susu, dan hampir seluruh isolat bersifat gram negatif dengan bentuk sel basil dan kokus.

Tabel 2. Hasil pengamatan morfologi bakteri kitinolitik pada kawasan laut

No.	Isolat	Bentuk Koloni	Bentuk tepian Koloni	Ukuran Koloni	Warna koloni	Gram	Bentuk sel
1.	AN1	Bulat	Rata	2,0 mm	Putih susu	-	Basil
2.	AN3	Bulat	Bergerigi	3,5 mm	Putih susu	-	Basil
3.	AN4	Bulat	Bergerigi	2,0 mm	Putih susu	-	Basil
4.	SK1	Bulat	Rata	3,0 mm	Putih susu	-	Basil
5.	SK3	Bulat	Bergerigi	1,0 mm	Putih susu	-	Basil
6.	SK4	Bulat	Rata	1,0 mm	Putih susu	-	Basil
7.	SK5	Bulat	Rata	3,5 mm	Putih susu	-	Basil

Tabel 3. Hasil pengamatan morfologi bakteri kitinolitik pada kawasan tambak

No.	Isolat	Bentuk Koloni	Bentuk tepian Koloni	Ukuran koloni	Warna koloni	Gram	Bentuk sel
1.	DR4	Bulat	Rata	3,0 mm	Putih kekuningan	-	Basil
2.	B2	Bulat	Rata	2,0 mm	Putih susu	-	Kokus
3.	B3	Bulat	Rata	2,0 mm	Putih susu	-	Basil
4.	B5	Bulat	Rata	2,0 mm	Putih susu	+	Kokus

Tabel 4. Hasil pengamatan morfologi bakteri kitinolitik pada kawasan sungai

No.	Isolat	Bentuk Koloni	Bentuk tepian koloni	Ukuran koloni	Warna koloni	Gram	Bentuksel
1.	L1	Bulat	Rata	2,5 mm	Putih kekuningan	+	Basil
2.	L2	Bulat	Rata	1,5 mm	Putih susu	-	Kokus
3.	L3	Bulat	Rata	2,5 mm	Putih susu	-	Basil
4.	L4	Bulat	Rata	2,0 mm	Putih susu	+	Kokus
5.	KA1	Bulat	Rata	1,5 mm	Putih kekuningan	+	Kokus
6.	KD1	Bulat	Rata	3,0 mm	Putih kekuningan	-	Basil
7.	KR4	Bulat	Bergerigi	2,0 mm	Putih kekuningan	-	Basil

Tabel 4. memperlihatkan bahwa semua isolat yang berasal dari kawasan sungai memiliki bentuk koloni bulat, hampir semua isolat berbentuk tepian koloni rata, hanya satu yang bergerigi. Ukuran koloni yang diperoleh berkisar antara 1,5 mm hingga 3,0 mm. Empat isolat berwarna putih kekuningan dan tiga lainnya berwarna putih susu. Tiga isolat bersifat gram positif, sedangkan empat isolat lainnya bersifat gram negatif dengan bentuk sel basil dan kokus.

Hasil pengamatan terhadap bentuk morfologi koloni bakteri kitinolitik maka didapat seluruh isolat berbentuk bulat, hampir semua isolat memiliki bentuk tepian koloni yang rata, ukuran koloni diperoleh dari ukuran yang paling kecil yaitu 1,0 mm hingga yang paling besar yaitu 3,5 mm dengan rata-rata ukuran dari masing-masing koloni adalah 2,0 mm. sebagian besar isolat berwarna putih susu dan bersifat gram negatif. Hasil yang didapat sama dengan penelitian Suryanto dan Munir (2006) bahwa lebih banyak didapat bentuk koloni bakteri yang bulat dan warna koloni putih susu.

Pengamatan tentang karakteristik morfologi koloni bakteri perlu dilakukan, agar mempermudah dalam proses identifikasi jenis bakteri. Hal ini sesuai dengan pernyataan Lay (1994), bahwa berdasarkan ciri morfologi koloni bakteri dan biakan murni maka dapat dilakukan proses identifikasi jenis-jenis mikroorganisme, namun untuk memperoleh hasil identifikasi yang sempurna maka harus dilanjutkan dengan uji biokimia.

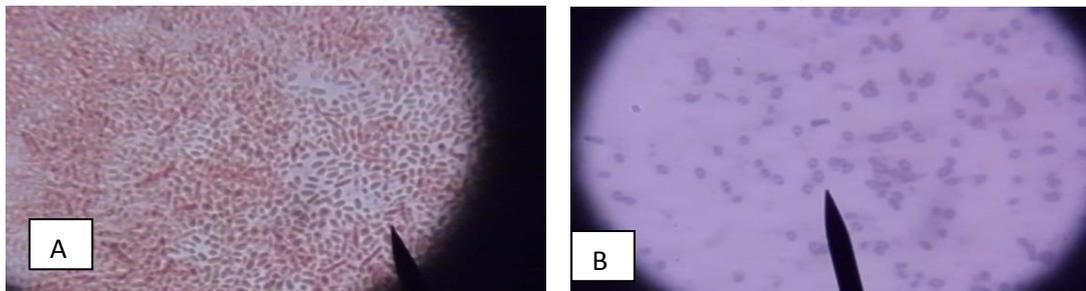
Pengamatan pewarnaan Gram menunjukkan 14 isolat bakteri kitinolitik bersifat gram negatif dan hanya empat isolat yang bersifat gram positif, dengan bentuk sel basil dan kokus. Dari 18 isolat lebih banyak didapat isolat yang berbentuk basil. Hal ini sesuai dengan penelitian Dewi (2008); Suryanto dan Munir (2006) bahwa lebih banyak didapat bakteri gram negatif dengan

bentuk sel basil dan kokus. Menurut Rostinawati (2008) pewarnaan Gram digunakan untuk mengetahui morfologi sel bakteri serta untuk membedakan bakteri gram positif dan gram negatif. Lay (1994) menyatakan bahwa bakteri gram positif pada pewarnaan Gram berwarna ungu disebabkan kompleks zat warna kristal violet-yodium tetap dipertahankan meskipun diberi larutan pemucat aseton alkohol, sedangkan bakteri gram negatif berwarna merah sebab kompleks tersebut larut pada saat pemberian larutan pemucat aseton alkohol sehingga mengambil warna merah safranin.

Perbedaan warna pada bakteri gram positif dan gram negatif menunjukkan bahwa adanya perbedaan struktur dinding sel antara kedua jenis bakteri tersebut. Bakteri gram positif memiliki struktur dinding sel dengan kandungan peptidoglikan yang tebal sedangkan bakteri gram negatif memiliki struktur dinding sel dengan kandungan lipid yang tinggi. Hasil pewarnaan bakteri dapat dilihat pada Gambar 2 berikut ini.

SIMPULAN

Adapun kesimpulan yang dapat diambil dari penelitian ini adalah sebagai berikut: Hasil isolasi didapat 18 sampel yang mampu tumbuh pada media agar kitin. Tujuh isolat dari kawasan laut, empat isolat dari kawasan tambak dan tujuh isolat dari kawasan sungai. Hasil pengamatan morfologi koloni bakteri menunjukkan bahwa seluruh isolat memiliki bentuk koloni bulat. Bentuk tepian koloni yang rata berjumlah 14 isolat dan hanya empat yang bergerigi. Ukuran koloni diperoleh dari ukuran yang paling kecil yaitu 1,0 mm hingga yang paling besar yaitu 3,5 mm dengan rata-rata ukuran dari masing-masing koloni adalah 2,0 mm. Isolat berwarna putih susu berjumlah 13 isolat, 5 berwarna putih kekuningan dan sebagian besar isolat bersifat gram negatif dengan bentuk sel basil dan kokus.



Gambar 2. Pewarnaan Gram bakteri kitinolitik (pembesaran 1000 X) Keterangan: Bakteri gram negatif (a) dan bakteri gram positif (b)

DAFTAR PUSTAKA

- Blondine Ch.P. 2005. Pengendalian Vektor Malaria *An. maculatus* Menggunakan *Bacillus thuringiensis* H-14 Galur Lokal di Kecamatan Kokap, Kabupaten Kulon Progo, DIY. *Jurnal Kedokteran Yarsi*. 13 (1): 11-23.
- Budiani, A., Santoso, D.A., Susanti, I. Mawardi S., dan Siswanto. 2004. Ekspresi β -1,3 Glukanase dan Kitinase pada Tanaman Kopi Arabika (*Coffea arabica* L.) Tahan dan Rentan Karat Daun. *Jurnal Menara Perkebunan*. 72 (2): 57-71.
- Dewi, I. M. 2008. Isolasi Bakteri dan Uji Aktifitas Kitinase Termofilik Kasar dari Sumber Air Panas Tinggi Raja, Simalungun, Sumatera Utara. *Tesis*. Sekolah Pascasarjana Universitas Sumatera Utara, Medan.
- Lay, W. B. 1994. *Analisis Mikroba di Laboratorium*. PT Raja Grafindo Persada, Jakarta.
- Nasran, S., Ariyani, F. dan Indriat, N. 2003. Produksi Kitinase dan Kitin Deastilase dari *Vibrio harveyi*. *Jurnal Penelitian Perikanan Indonesia*. 9 (5): 33-38.
- Pujiyanto, S., Kusdiyantini, E. dan Hadi, M. 2008. Isolasi dan Seleksi Bakteri Kitinolitik Isolat Lokal yang Berpotensi untuk Mengendalikan Larva Nyamuk *Aedes aegypti* L. *Jurnal Biodiversitas*. 9 (1): 5-8.
- Ramadhan, L.O.A.N., Radiman, C.L., Wahyuningrum, D., Suendo, V., Ahmad, L.O., dan Valiyaveettil, S. 2010. Deastilasi Kitin secara Bertahap dan Pengaruhnya terhadap Derajat Deastilasi serta Massa Molekul Kitosan. *Jurnal Kimia Indonesia*. 5(1): 17-21.
- Rochima, E. 2005. Pemurnian dan Karakterisasi Kitin Deasetilase Termotabil dari *Bacillus papandayan* Asal Kawah Mojang, Jawa Barat. *Makalah Seminar Nasional dan Kongres PA TPI*, Jakarta. Hal: 193-209
- Rostinawati, T. 2008. Skrining dan Identifikasi Bakteri Penghasil Enzim Kitinase Dari Air Laut di Perairan Pantai Pondok Bali. *Penelitian Mandiri*. Fakultas Farmasi Universitas Padjadjaran Jatinangor.
- Suryanto, D. dan Munir, E. 2006. Potensi Pemanfaatan Isolat Bakteri Kitinolitik Lokal untuk Pengendali Hayati Jamur. *Prosiding Seminar Hasil-Hasil Penelitian USU*, Medan. Hal: 15-25.
- Suryanto, D., Munir, E. dan Yunarliza. 2005. Eksplorasi Bakteri Kitinolitik: Keragaman Gen Penyandi Kitinase pada Berbagai Jenis Bakteri dan Pemanfaatannya. *Laporan Hasil Penelitian Hibah Bersaing Perguruan Tinggi*. Universitas Sumatra Utara.