

Diversitas dan Uji Potensi Bakteri Kitinolitik dari Limbah Udang

Imanda Nurul Setia¹⁾, Suharjono²⁾

^{1),2)} Laboratorium Mikrobiologi, Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam,

Universitas Brawijaya, Jalan Veteran Malang, Jawa Timur, Indonesia

Email: ¹⁾ imandanurulsetia@yahoo.com & ²⁾ calistus@ub.ac.id

ABSTRAK

Proses pengolahan udang dari industri akan menghasilkan limbah cair dan padat sebanyak 30 – 75 % dari berat udang. Limbah udang mengandung 20 – 60 % kitin sehingga dapat menjadi sumber bakteri kitinolitik. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui diversitas bakteri kitinolitik dan mengetahui potensi bakteri yang memiliki aktivitas kitinolitik yang tinggi pada limbah udang. Tahapan penelitian meliputi isolasi bakteri pada media CCA (*Colloidal Chitin Agar*), penghitungan diversitas bakteri kitinolitik, dan seleksi isolat berdasarkan indeks kitinolitik. Diversitas bakteri kitinolitik dihitung menggunakan indeks diversitas Simpson. Penelitian uji potensi kitinolitik menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan tiga kali ulangan. Data indeks kitinolitik dianalisis menggunakan analisis ragam dilanjutkan uji *Games-Howell* ($\alpha = 0,05$). Indeks diversitas limbah padat lebih tinggi (0,646) daripada limbah cair (0,213). Dua dari 18 isolat yaitu isolat PBK 2 (berasal dari limbah cair) dan SA 1.2 (berasal dari limbah padat) memiliki indeks kitinolitik tertinggi yaitu secara berturut-turut sebesar 2,069 dan 2,084.

Kata kunci : bakteri kitinolitik, limbah cair, limbah padat, kitin, udang

ABSTRACT

Shrimp processing from industrial activity produce solid waste and wastewater 30 – 75 % from shrimp weight. Shrimp waste contains 20 – 60 % chitin and possible to be source of chitinolytic bacteria. The objectives of this research was to observe diversity of chitinolytic bacteria and to analyze potency of bacteria which have high activity of chitin degradation in shrimp waste. The research consist of isolation of bacteria using *Colloidal Chitin Agar* (CCA) medium, quantification of chitinolytic bacteria diversity, and screening of bacteria based on chitinolytic index. Diversity of chitinolytic bacteria quantified with Simpson diversity index. Chitinase assay carried out according Complete Randomized Design with three replications. Diameter of clear zone data was analyzed using analysis of variance continued with *Games-Howel* test ($\alpha = 0.05$). Diversity index of solid waste more higher (0.646) than wastewater (0.213). Only two of eighteen isolates of chitinolytic bacteria (PBK 2 and SA 1.2 isolates) showed highest chitinolytic index.

Key words: chitinolytic bacteria, chitin, shrimp, waste

PENDAHULUAN

Udang merupakan komoditas utama ekspor perikanan Indonesia sehingga banyak industri yang menyediakan produk olahan udang [1]. Umumnya udang diekspor dalam bentuk beku tanpa kepala atau tanpa kepala dan kulit, sehingga dari produksi tersebut akan menghasilkan limbah organik sebanyak 30 – 75% dari berat udang. Limbah organik tersebut dapat berupa limbah padat kulit dan kepala maupun limbah cair sisa proses pengolahan udang [2] [3]. Pengolahan limbah udang secara biologi lebih banyak digunakan pada skala industri karena lebih murah dan efisien. Salah satu contohnya yaitu sistem lumpur aktif (*activated sludge*) dengan memanfaatkan *indigenous microorganism* (mikroorganisme

yang secara alami tumbuh pada limbah tersebut) sebagai agen pendegradasinya [4].

Bakteri kitinolitik merupakan bakteri yang mampu menghasilkan enzim kitinase untuk mendegradasi kitin menjadi monomer N-asetilglukosamin [5]. Bakteri kitinolitik dapat diperoleh dari limbah krustasea baik limbah padat maupun cair karena mengandung 20 – 60 % kitin [6] [7]. Berdasarkan latar belakang tersebut, maka limbah organik hasil pengolahan udang tersebut diduga dapat menjadi sumber isolat bakteri kitinolitik. Oleh karena itu, penelitian ini dilakukan untuk memperoleh isolat bakteri kitinolitik unggul dari limbah industri udang untuk dapat meningkatkan kemampuan degradasi limbah tersebut.

METODE PENELITIAN

Pembuatan Koloidal Kitin . Sebanyak 20 gram kitin dilarutkan pada 200 ml HCl pekat (37 %), *distirer* selama 2 jam, kemudian ditambah 1 L etanol absolut dingin sambil *distirer* hingga terbentuk koloid putih kental. Selanjutnya koloid diatur hingga pH 7 dan disentrifugasi. Endapan dikeringkan hingga berbentuk serbuk. Serbuk koloidal kitin tersebut digunakan sebagai substrat media sebagai sumber karbon dan nitrogen [8].

Isolasi Bakteri Kitinolitik dari Limbah Udang. Limbah padat dan cair diperoleh dari industri pengolahan udang PT. Bumi Menara Internusa. Bakteri kitinolitik diisolasi menggunakan media CCA (*Colloidal Chitin Agar*) yang terdiri dari (g/L): Na₂HPO₄ (6); KH₂PO₄ (3); NH₄Cl (1); NaCl (0.5); ekstrak khamir (0,05); agar (15) dan koloidal kitin 0,5 % (b/v) dengan metode *spread plate* kemudian diinkubasi selama 48 – 72 jam pada 30 °C. Bakteri kitinolitik ditandai dengan adanya zona bening di sekitar koloni [5]. Isolat yang didapat selanjutnya dimurnikan, ditumbuhkan pada media agar miring sebagai stok, dan dikarakterisasi secara makroskopis melalui karakter morfologi koloni dan secara mikroskopis melalui pewarnaan Gram [9].

Penghitungan Indeks Diversitas. Keragaman komunitas bakteri kitinolitik ditentukan melalui indeks diversitas Simpson. Diversitas bakteri kitinolitik dihitung melalui jumlah sel masing-masing isolat yang didapatkan [10].

$$D = 1 - \frac{n(n-1)}{N(N-1)} \quad (1)$$

Keterangan :

D = Indeks Diversitas Simpson

n = Jumlah individu jenis ke-i

N = Jumlah total individu

s = Jumlah total spesies di dalam komunitas

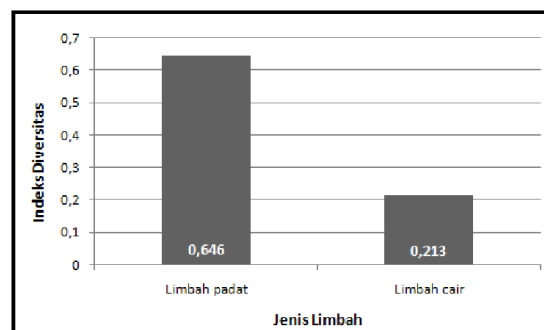
Seleksi Bakteri Kitinolitik. Seleksi bakteri dilakukan dengan difusi cakram dengan tiga kali ulangan. Sebanyak satu ose kultur bakteri ditumbuhkan pada media cair (1 % koloidal kitin) dan diinkubasi selama 24 jam, 180 rpm, 30 °C. Kultur cair masing-masing isolat bakteri (10⁷ sel/ml) diinokulasikan pada *paper disc* steril (d = 5 mm, Whatman No.1) dan diletakkan pada permukaan media agar (1 % koloidal kitin) menggunakan pinset steril [11]. Selanjutnya diinkubasi selama 72 jam pada 30 °C dan dilakukan pengukuran zona bening dan koloni bakteri hingga 7 hari untuk menghitung indeks

kitinolitik. Indeks kitinolitik diperoleh melalui perbandingan antara diameter zona bening yang terbentuk dengan diameter koloni [8]. Data dianalisis menggunakan analisis ragam dilanjutkan uji *Games-Howell* ($\alpha = 0,05$).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Bakteri Kitinolitik Hasil Isolasi dari Limbah Udang. Sebanyak 18 isolat didapatkan dari hasil isolasi limbah udang, 14 isolat didapatkan dari limbah cair udang (KBA 2, KBA 3, KBA 5, KBA 6, KBA 6.1, KBA 7, KBA 8, KBA 9, KBK 1, KBK 2, KBK 3, KBK 4, PBK 1, PBK 2) dan 4 isolat berasal dari limbah padat udang (SA 1.2, SA 3.2, SK 1.1, SK 3.2). Limbah cair mendapat perlakuan aerasi sehingga dapat mendukung pertumbuhan bakteri lebih banyak. Bakteri tersebut akan tumbuh dan bertahan hidup dengan cara menggunakan oksigen untuk memecah senyawa pada limbah [12].

Diversitas Bakteri Kitinolitik. Indeks diversitas merupakan hasil dari kombinasi antara kekayaan dan kesamaan spesies [10]. Berdasarkan Gambar 1, limbah padat memiliki indeks diversitas lebih tinggi daripada limbah cair. Hal ini dikarenakan terdapat dominasi satu atau beberapa spesies bakteri yang ada pada limbah padat, sedangkan pada limbah cair lebih banyak beragam spesies bakteri namun tidak terjadi dominasi antarspesies tersebut.



Gambar 1. Diversitas bakteri kitinolitik pada limbah padat dan limbah cair

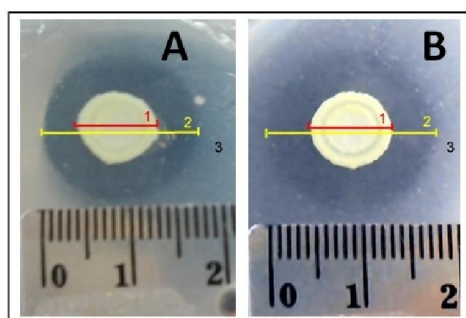
Indeks diversitas Simpson digunakan untuk mengetahui kompleksitas suatu komunitas yang memiliki populasi tak terhingga. Indeks ini berkisar antara 0 – 1. Semakin mendekati angka 1 maka komunitas semakin kompleks [10]. Pertumbuhan mikroorganisme selain dipengaruhi oleh nutrisi juga dipengaruhi oleh faktor lingkungan. Diversitas bakteri kitinolitik dipengaruhi oleh berbagai faktor seperti faktor lingkungan. Faktor lingkungan dapat dibagi atas

faktor biotik dan faktor abiotik yang ikut berperan dalam menentukan tingkat pertumbuhan dan aktivitas mikrobia tersebut [13].

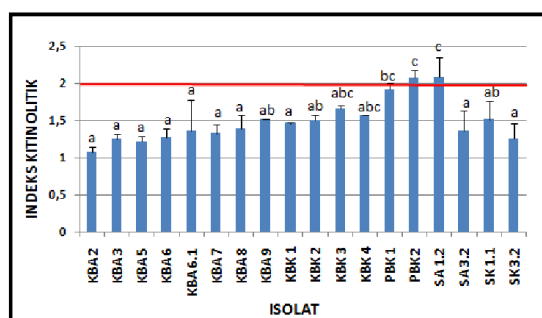
Aktivitas Kitinolitik berdasarkan Indeks Kitinolitik dan Karakteristik Fenotip Bakteri.

Zona bening yang terbentuk di sekitar koloni mengindikasikan adanya aktivitas pemecahan kitin pada media. Zona bening terbentuk karena terjadi pemutusan ikatan β -1,4 homopolimer N-asetilglukosamin pada kitin oleh kitinase menjadi monomer N-asetilglukosamin (Gambar 2) [8]. Untuk itu, dilakukan seleksi bakteri kitinolitik untuk mengetahui kemampuan bakteri tersebut dalam mendegradasi kitin berdasarkan indeks kitinolitik.

Indeks kitinolitik bernilai tinggi apabila lebih dari dua ($CZ/CS > 2$), sedangkan dinyatakan bernilai rendah apabila kurang dari 2 ($CZ/CS < 2$) [7]. Terdapat dua isolat dengan aktivitas kitinolitik tertinggi yaitu PBK 2 dan SA 1.2 dengan indeks kitinolitik secara berturut-turut sebesar 2,069 dan 2,084; sedangkan isolat KBA 2 memiliki aktivitas kitinolitik terendah dengan indeks kitinolitik sebesar 1,07 (Gambar 3). Isolat PBK 2 dan SA 1.2 dapat digunakan sebagai kandidat agen pendegradasi limbah yang mengandung senyawa kitin.



Gambar 2. Seleksi primer kultur cair isolat unggul (a) isolat PBK 2 (b) isolat SA 1.2 (Keterangan = 1. Diameter koloni 2. Diameter zona bening 3. Media CCA)



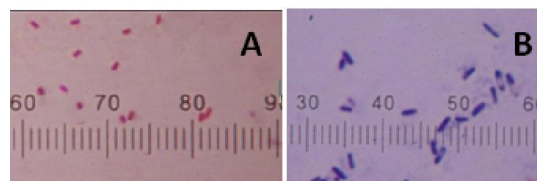
Gambar 3. Indeks kitinolitik masing-masing isolat selama 7 hari inkubasi

Dua isolat bakteri kitinolitik unggul memiliki karakter koloni yang berbeda (Tabel 1), sedangkan berdasarkan pengecatan Gram diketahui bahwa isolat PBK 2 berbentuk *coccibacil* dan Gram negatif, sedangkan isolat SA 1.2 memiliki sel yang berbentuk batang dan Gram positif (Gambar 4).

Tabel 1. Karakter morfologi koloni isolat unggul bakteri kitinolitik dari limbah udang

Karakter Fenotip	PBK 2	SA 1.2
Bentuk koloni		
- Bulat	+	+
Elevasi Koloni		
- Cembung	+	+
Konfigurasi		
- Menyeluruh	+	+
Tekstur		
- Berkontur	+	+
Ciri Optik		
- Pendaflour	+	-
- Iridesens	-	+
Warna Koloni		
- Krem	+	+
Bentuk Sel		
- Batang	-	+
- Coccibacil	+	-
Gram		
- Positif	-	+
- Negatif	+	-

Keterangan: (+) memiliki dan (-) tidak memiliki karakter yang disebutkan



Gambar 4. Morfologi sel bakteri isolat unggul bakteri kitinolitik dengan pewarnaan Gram (a) isolat PBK 2 (b) isolat SA 1.2

Komposisi komunitas mikroorganisme yang hidup dengan memanfaatkan nutrisi dari kitin akan menentukan kecepatan degradasi kitin. Bakteri Gram positif merupakan konsumen kitin yang lebih banyak menggunakan N-asetilglukosamin pada proses anabolisme untuk mensintesis murein yang berfungsi dalam pembentukan dinding sel bakteri tersebut, sedangkan bakteri Gram negatif lebih menggunakan substrat tersebut untuk proses katabolisme [14].

KESIMPULAN

Indeks diversitas limbah padat lebih tinggi (0,646) daripada limbah cair (0,213). Dua dari 18 isolat yaitu isolat PBK 2 (berasal dari limbah cair) dan SA 1.2 (berasal dari limbah padat) memiliki indeks kitinolitik tertinggi yaitu secara berturut-turut sebesar 2,069 dan 2,084.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih disampaikan kepada Bapak Suharjono dan Ibu Tri Ardyati yang telah banyak membantu dalam proses penyelesaian penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- [1]. Irianto, H.E. 2011. Strategi Pengembangan Produk Indikasi Geografis berbasis Komoditas Perikanan Budaya. *Prosiding Forum Inovasi Teknik Akuakultur*.
- [2]. Sachindra, N.M., N. Bhaskar, dan N.S. Mahendrakar. 2005. Carotenoids in Different Body Components of Indian Shrimps. *J. Sci. Food Agr.* 85:167–172.
- [3]. Manjang, Y. 1993. Analisa Ekstrak Berbagai Jenis Kulit Udang Terhadap Mutu Khitosan. *Jurnal Penelitian Andalas* (12):138–143.
- [4]. Oktavia, D.A., D. Mangunwidjaja, dan S. Wibowo. 2012. Pengolahan Limbah Cair Perikanan menggunakan Konsorsium Mikroba Indigenous Proteolitik dan Lipolitik. *Agrointek* 6(2):65–71.
- [5]. Frändberg, E. 1997. **Antifungal Compounds of Chitinolytic Bacteria from Grain Ecosystems**. Doctor's dissertation. ISSN 1401-6249, ISBN 91-576-5275-9.
- [6]. Herdyastuti, N., T.J. Raharjo, Mudasir, dan S. Matsjeh. 2009. Chitinase and Chitinolytic Microorganism: Isolation, Characterization, and Potential [Review]. *Indo. J Chem.* 9(1):37–47.
- [7]. Haliza, W. dan M.T. Suhartono. 2012. Karakteristik Kitinase dari Mikroba. *Balai Teknologi Pascapanen Pertanian*. 8(1).
- [8]. Faramarzi, M.A., M. Fazeli, M.T. Yazdi, S. Adrangi, K.J. Al-Ahmadi, N. Tasharrofi, dan F.A. Mohseni. 2009. Optimization of Cultural Condition for Production Chitinase by Soil Isolate of *Massilia timonae*. *Biotechnol.* 8(1):93 – 99.
- [9]. Cappuccino, J. G. 1983. **Microbiology: A Laboratory Manual**. Addison-Wesley. USA.
- [10]. Ludwiq, J.A., and J.F. Reynolds. 1988. **Statistical Ecology a Primer on Methods and Computing**. John Wiley & Sons. New York.
- [11]. Jiang, L. 2009. **Comparison of Disk Diffusion, Agar Dilution, and Broth Microdilution for Antimicrobial Susceptibility Testing of Five Chitosans**. Thesis. Fujian Agricultural and Forestry University.
- [12]. Metcalf, L., H.P. Eddy, G. Tchobanoglous, F.L. Burton, H.D. Stensel. 2003. **Wastewater Engineering: Treatment and Reuse**. 4th Edition. McGraw Hill International Editions. New York.
- [13]. Subba, R. 1994. **Mikroorganisme tanah dan Pertumbuhan tanaman. Terjemahan**. UI Press. Jakarta.
- [14]. Beier, S. dan S. Bertilsson. 2013. Bacterial Chitin Degradation—Mechanisms and Ecophysiological Strategies [Review Article]. *Front. Microbiol.* 4(149):1–12.