

## Potensi *Pseudomonas fluorescens* dalam menghasilkan asam salisilat dengan menggunakan limbah udang sebagai substrat

Ririn Puspawati\*, Putranti Adirestuti, Mira Andam Dewi, Aditya Ayuning Tyas  
Program Studi Farmasi, Fakultas Farmasi, Universitas Jenderal Achmad Yani Cimahi,  
Jawa Barat, 40531

\*Email korespondensi: ririn.puspawati@lecture.unjani.ac.id

Accepted: 13 Februari 2020; revision: 10 Juni 2020; published: 30 Juni 2020

### Abstrak

**Latar Belakang:** Pemanfaatan limbah udang saat ini kurang mendapatkan perhatian dikarenakan kurangnya pengetahuan masyarakat akan manfaat kandungan dalam limbah udang. Limbah udang mengandung protein sebagai nutrisi terpenting bagi pertumbuhan bakteri dalam pembentukan sel dan pertumbuhan sehingga dapat dimanfaatkan sebagai substrat untuk pertumbuhan mikroba *Pseudomonas fluorescens*. Tujuan penelitian adalah memanfaatkan limbah udang sebagai substrat untuk pertumbuhan *Pseudomonas fluorescens* dalam menghasilkan asam salisilat.

**Metode:** Fermentasi dilakukan pada suhu 30°C dengan pengadukan kontinyu dengan kecepatan 150 rpm. Substrat dibuat dalam dua formula yaitu formula 1 (limbah udang), formula 2 (limbah udang dan MgSO<sub>4</sub> 0,02% w/w). Asam salisilat sebagai produk fermentasi dianalisis secara kimia kualitatif dan uji aktivitas anti mikroba terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Propionibacterium acnes*.

**Hasil:** Hasil penelitian menunjukkan bahwa uji kimia kualitatif dengan uji esterifikasi terdapat bau ester khas seperti minyak gandapura, uji dengan FeCl<sub>3</sub> menunjukkan warna ungu, sedangkan uji dengan HCl menunjukkan hasil negatif. Uji aktivitas antimikroba asam salisilat dari formula 1 setelah fermentasi 28 jam terhadap *Staphylococcus aureus* menghasilkan zona bening sebesar 18,65 mm dan terhadap *Propionibacterium acnes* sebesar 19,65 mm.

**Kesimpulan:** Limbah udang dapat digunakan untuk substrat pada pertumbuhan *Pseudomonas fluorescens* dalam menghasilkan asam sitrat

**Kata kunci:** asam salisilat, fermentasi, limbah udang, *Pseudomonas fluorescens*

### Abstract

**Background:** Utilization of shrimp waste is currently receiving less attention due to the lack of public knowledge about the benefits of the content in shrimp waste. Shrimp waste contains protein as the most important nutrient for bacterial growth in cell formation and its growth so that can be used as a substrate for microbial growth. The research objective is to use shrimp waste as a substrate for the growth of *Pseudomonas fluorescens* in producing salicylic acid.

**Method:** Conditions needed for fermentation are temperature 30 °C, with continuous shaking at 150 rpm. The substrate is made in two formulas, namely, formula 1 (shrimp waste), formula 2 (shrimp waste and MgSO<sub>4</sub> 0.02%). Salicylic acid as a fermentation product is analyzed chemically qualitatively and antimicrobial activity test against *Staphylococcus aureus* and *Propionibacterium acnes*.

**Results:** The results showed that a qualitative chemical test with an esterification test contained a distinctive ester odour such as gandapura oil, a test with FeCl<sub>3</sub> showed a purple colour, whereas a test with HCl showed a negative result. Antimicrobial activity test on *Staphylococcus aureus* produces a clear zone of 18.55 mm from formula 1 after 22 fermentation and against *Propionibacterium acnes* produces a clear zone of 19.65 mm from the formula 1 substrate after 28 hours fermentation.

**Conclusion:** Shrimp waste can be used as a substrate. on the growth of *Pseudomonas fluorescens*.

**Key words:** fermentation, *Pseudomonas fluorescens*, salicylic acid, shrimp waste

## PENDAHULUAN

Udang yang merupakan bagian dari biota laut, pada saat ini banyak dibudidayakan dengan menggunakan tambak air tawar. Hasilnya mempunyai nilai ekonomis tinggi dan udang merupakan komoditi ekspor yang dapat diandalkan. Secara umum udang dikonsumsi bagian dagingnya saja sedangkan bagian kepala dan kulit udang tidak dimanfaatkan sehingga hal tersebut akan menjadi limbah rumah tangga maupun limbah industri rumah tangga yang menggunakan udang sebagai bahan utamanya (1).

Pengolahan udang memberikan hasil sisa berupa bagian kepala, ekor, dan kulit udang serta udang yang rusak. Hasil sisa ini menjadi limbah yang sangat potensial untuk dijadikan sumber protein hewani karena ketersediaannya cukup banyak dan mengandung zat-zat gizi yang tinggi, terutama protein dan mineralnya. Kandungan nutrisi dari limbah udang yaitu 42,65% protein kasar, 8,07% lemak kasar, dan 18,18% serat kasar (2).

Pemanfaatan limbah di era globalisasi saat ini kurang mendapatkan perhatian dikarenakan kurangnya pengetahuan masyarakat akan manfaat kandungan dalam limbah. Berdasarkan alasan tersebut protein sebagai sumber nitrogen dan mineral dari limbah udang diharapkan dapat dimanfaatkan sebagai substrat untuk pertumbuhan mikroba *Pseudomonas fluorescens* dalam mensintesis asam salisilat. Protein merupakan nutrisi terpenting bagi pertumbuhan bakteri untuk mensintesis makanan dalam pembentukan sel dan pertumbuhan (3). Tujuan penelitian adalah memanfaatkan limbah udang sebagai substrat untuk pertumbuhan *Pseudomonas fluorescens* dalam menghasilkan asam salisilat. Penelitian diharapkan mampu mengurangi limbah udang dengan memanfaatkannya sebagai substrat pertumbuhan *Pseudomonas fluorescens* dalam menghasilkan asam salisilat.

## METODE

### Alat

Ose, bunsen, tabung reaksi, labu erlenmeyer, gelas ukur, gelas piala, labu

ukur, batang pengaduk, pipet, spatel logam, aluminium foil, timbangan analitik, inkubator, inkubator shaker, alat sentrifugasi, lemari es, autoklaf, kertas pH, termometer, cawan petri, kapas, kasa, kertas sampul, mikropipet, perforator.

### Bahan

Limbah udang yang diperoleh dari Pasar Antri Cimahi, Jawa Barat, NA (*Nutrient Agar*), NB (*Nutrient Broth*), air pepton, media MR-VP, Cimmon's Citrate Agar, aquadest, natrium klorida 0,9%, natrium hidroksida 1M, besi (III) klorida, asam klorida encer, asam sulfat pekat, kalium dihidrogen fosfat magnesium sulfat, metanol, etanol 70%, asam salisilat, metil merah, pereaksi kovacks, larutan  $\alpha$ -naftol.

Kultur Bakteri *Pseudomonas fluorescens* diperoleh dari laboratorium Mikrobiologi Sekolah Ilmu dan Teknologi Hayati ITB dan *Staphylococcus aureus* dan *Propionibacterium acnes* dari laboratorium Teknik Kimia ITB.

### Pembuatan kurva pertumbuhan *Pseudomonas fluorescens*.

Kultur *Pseudomonas fluorescens* diinokulasikan secara aseptis ke dalam labu Erlenmeyer berisi media NB, kemudian diinkubasi pada suhu 30°C dengan kecepatan 150 rpm. Pengamatan dilakukan setiap jam dengan mengukur nilai transmitansi menggunakan spektrofotometer Uv-visibel pada panjang gelombang 600 nm selama. Nilai serapan dan waktu pengambilan sampel menghasilkan kurva pertumbuhan bakteri. Nilai serapan yang diukur adalah gambaran jumlah populasi sel bakteri pada setiap fase pertumbuhan (4).

### Proses fermentasi untuk menghasilkan asam salisilat.

Kultur bakteri hasil peremajaan kultur diinokulasikan masing-masing 10% v/v pada substrat limbah udang formula 1 hanya terdiri dari limbah udang dan air, formula 2 terdiri dari limbah udang, air, dan MgSO<sub>4</sub> 0,02% w/w. Substrat diinkubasi pada suhu 30°C secara aerob. Substrat hasil fermentasi yang mengandung asam salisilat kemudian

disentrifugasi pada kecepatan 3000 rpm selama 20 menit. Biomassa dan filtrat dipisahkan untuk selanjutnya dilakukan pengujian kualitatif terhadap asam salisilat dan uji mikrobiologi untuk mengetahui kemampuan hambatannya.

### Analisis kualitatif kimia metabolit bakteri *Pseudomonas fluorescens*

Asam salisilat sebagai metabolit dari hasil fermentasi yang diperoleh dapat diketahui keberadaannya dengan melakukan pengujian identifikasi secara kualitatif dengan cara:

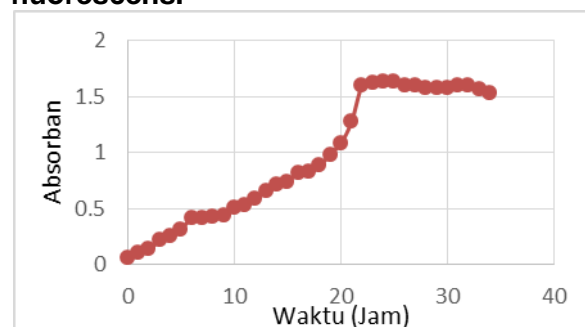
1. Sampel direaksikan dengan besi (III) klorida, sampel akan menghasilkan warna biru violet-merah lembayung tua.
2. Sampel direaksikan dengan 1,5 mL asam sulfat pekat dan 3 mL metanol dan keseluruhannya dipanaskan perlahan-lahan, maka akan diperoleh bau yang khas dari esternya (seperti bau minyak gandapura).
3. Sampel direaksikan dengan asam klorida encer, sampel akan menghasilkan endapan kristalin asam salisilat.
4. Sampel dibandingkan nilai serapannya dengan spektrum standar asam salisilat menggunakan spektrofotometer UV pada panjang gelombang 302 nm dalam pelarut metanol.

### Pengujian mikrobiologi metabolit bakteri *Pseudomonas fluorescens*

Cawan petri steril diisi dengan 1 mL mikroba uji yaitu *Staphylococcus aureus* dan *Propionibacterium acnes* yang mengandung populasi 10<sup>8</sup> koloni/mL, ditambahkan 20 mL media NA dihomogenkan dan di diamkan pada suhu kamar hingga dingin dan beku. Cawan dibuat lubang sumuran dan diisi dengan hasil fermentasi dari kultur bakteri dari U0 dan U1 yang diduga mengandung asam salisilat masing-masing sebanyak 50 µL diukur dengan mikropipet standar, asam salisilat sebagai kontrol positif dan air steril sebagai kontrol negatif. Cawan di pra-inkubasi pada suhu kamar selama 15 menit, kemudian di inkubasi pada suhu 35-37°C selama 24 jam. Lubang pada cawan yang berisi sampel uji diamati adanya hambatan terhadap pertumbuhan mikroba uji, yang

ditunjukkan dengan zona bening. Diameter zona bening atau zona hambat di ukur dengan jangka sorong (5).

### HASIL Kurva pertumbuhan *Pseudomonas fluorescens*.



Gambar 1. Kurva pertumbuhan *Pseudomonas fluorescens* dalam media NB

Untuk melihat pola pertumbuhan bakteri, maka dibuat kurva pertumbuhan dengan tujuan untuk menentukan fase pertumbuhan bakteri yang optimal saat produksi metabolit sekunder. Pola pertumbuhan dilihat dari tingkat kekeruhan media yang diukur setiap jam selama 34 jam.

### Proses fermentasi untuk menghasilkan asam salisilat



Gambar 2. Substrat untuk proses fermentasi

Setelah mengetahui fase-fase pertumbuhan bakteri yang tepat untuk memantau metabolit yang dihasilkan dilanjutkan dengan proses fermentasi.

### **Analisis kualitatif kimia metabolit bakteri *Pseudomonas fluorescens***

Hasil pengujian secara kualitatif terhadap metabolit setelah fermentasi 6 jam pada formula 1 (limbah udang +air) dan formula 2 (limbah udang + air +  $MgSO_4 0,02\%$ ) tidak tercium bau minyak gandapura. Hasil pengujian setelah fermentasi 22 jam pada formula 1 tercium bau minyak gandapura tapi pada formula 2 tidak tercium. Hasil pengujian setelah fermentasi 28 jam pada kedua formula tercium bau minyak gandapura.

Pengujian yang dilakukan berdasarkan reaksi  $FeCl_3$  warna menunjukkan hasil yang positif terhadap asam salisilat yaitu warna ungu pada seluruh sampel.

Uji dengan HCl tidak menunjukkan adanya endapan kristalin namun hanya ada perubahan warna sampel dari kuning kehijauan menjadi jernih hingga putih keruh, endapan kristalin tidak terbentuk dikarenakan kandungan asam salisilat dalam sampel masih belum murni.

### **Pengujian mikrobiologi metabolit bakteri *Pseudomonas fluorescens***

Pengujian kemampuan daya hambat terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Propionibacterium acnes* menunjukkan adanya hambatan terbesar pada formula 1 pada jam ke-28 fase tengah stasioner yaitu sebesar 18,65 mm dan 19,65 mm.

## **PEMBAHASAN**

### **Kurva pertumbuhan *Pseudomonas fluorescens*.**

Hasil menunjukkan awal fase log pada jam ke-6, awal stasioner pada jam ke 22, dan tengah fase stasioner pada jam ke 28. Dimana fase log yaitu sel berada dalam keadaan pertumbuhan yang seimbang, sel membelah dengan kecepatan konstan yang ditentukan oleh sifat intrinsik bakteri dan kondisi lingkungan. Fase stasioner terjadi kekurangan nutrisi, perubahan pH serta faktor lain yang dapat mendesak pertumbuhannya dan mengakibatkan penurunan kecepatan pertumbuhan sehingga substrat yang digunakan oleh

mikroba tidak lagi digunakan untuk pertumbuhan, tetapi lebih banyak untuk memproduksi metabolit sekunder (6). Namun setelah 28 jam tidak menunjukkan fase kematian karena pembuatan kurva pertumbuhan ini menggunakan metode tidak langsung, metode ini tidak dapat membedakan sel mati dan sel yang masih hidup sehingga seolah-olah tidak ada fase kematian (7).

### **Fermentasi untuk menghasilkan asam salisilat**

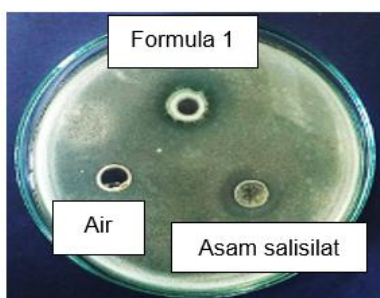
Fermentasi dilakukan pada suhu  $30^{\circ}C$  dan pengocokan secara terus menerus dalam *incubator shaker* dengan kecepatan 150 rpm selama proses fermentasi berlangsung. Mekanisme yang terjadi melalui jalur khorismat dimana terdapat air sehingga terjadi reaksi hidrofilik pada  $C_2$  dari khorismat sehingga terjadi perpindahan gugus hidroksil  $C_4$  dan terbentuklah enzim *Isochorismate Synthase* (ICS) dan dari enzim ICS menghasilkan asam salisilat (8).

### **Analisis kualitatif kimia metabolit bakteri *Pseudomonas fluorescens***

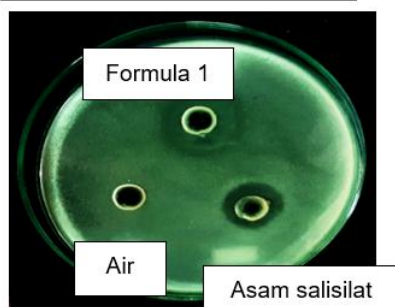
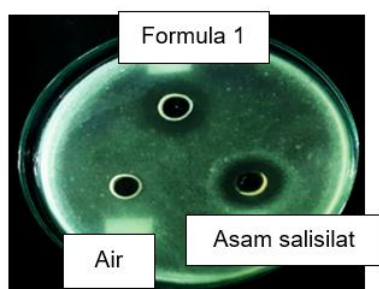
Untuk mengetahui keberadaan asam salisilat pada substrat fermentasi dilakukan uji kualitatif berdasarkan reaksi yang akan memberikan bau seperti minyak gandapura yang khas dari esternya dengan mereaksikan sampel, asam sulfat pekat yang bertindak sebagai zat pendehidrasi dan methanol.

Pengujian berdasarkan reaksi yang akan memberikan warna merah lembayung tua hingga ungu dengan mereaksikan sampel dengan  $FeCl_3$ . Hal ini membuktikan adanya gugus karboksilat pada senyawa asam salisilat. Pengujian yang dilakukan berdasarkan reaksi  $FeCl_3$  warna menunjukkan hasil yang positif terhadap asam salisilat yaitu warna ungu pada seluruh sampel, sedangkan pada uji dengan HCl tidak menunjukkan adanya endapan kristalin namun hanya ada perubahan warna sampel dari kuning kehijauan menjadi jernih hingga putih keruh, endapan kristalin tidak terbentuk dikarenakan kandungan asam salisilat dalam sampel masih belum murni (9).

### Pengujian mikrobiologi metabolit bakteri *Pseudomonas fluorescens*



Gambar 3. Hasil analisis mikrobiologi difusi perforasi terhadap *Staphylococcus aureus* setelah fermentasi 28 jam.



Gambar 4. Hasil analisis mikrobiologi difusi perforasi terhadap *Propionibacterium acnes* setelah fermentasi 28 jam.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa fermentasi dengan formula 1 (tanpa penambahan mineral) pada fase tengah stasioner dapat menghasilkan metabolit sekunder asam salisilat lebih besar

dibandingkan dengan formula lain yang dikombinasikan dengan mineral. Berarti bahwa dengan penambahan mineral dalam substrat dapat menghambat pembentukan metabolit sekunder. Bakteri membutuhkan mineral untuk pertumbuhan normal hanya sedikit bahkan diukur dalam (3). Mika dkk, (2013) menunjukkan bahwa dalam udang terkandung asam amino esensial, komposisi lemak, makro mineral (Ca, Mg, P, K dan Na), dan mikro mineral (Cu, Fe, Mn, Se, Zn) (10). Sehingga kebutuhan mineral yang bersumber hanya dari limbah udang dapat mencukupi kebutuhan dalam proses biosintesis dari bakteri starter *Pseudomonas fluorescens*.

### KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan dapat disimpulkan bahwa limbah udang dapat digunakan sebagai substrat *Pseudomonas fluorescens* dalam melakukan biosintesis asam salisilat. Pengujian kemampuan daya hambat terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Propionibacterium acnes* menunjukkan adanya hambatan terbesar pada formula 1 pada jam ke-28 fase tengah stasioner yaitu sebesar 18,65 mm dan 19,65 mm.

### UCAPAN TERIMA KASIH

Tim peneliti mengucapkan terima kasih kepada LPPM Universitas Jenderal Achmad Yani (UNJANI) atas dana yang diberikan untuk penelitian ini.

### DAFTAR PUSTAKA

1. Saleha S, Murniana. Aktivitas Antioksidan Astaxanthin Dari Limbah Kulit Udang. 2009;1–26.
2. Gernat AG. The effect of using different levels of shrimp meal in laying hen diets. Poultry Sci. 2001;
3. Rosidah U. Diajukan oleh: Umi Rosidah NIM. G1C215008. 2016;
4. Sugiarti S, Sakti SP, Juswono UP. Pemanfaatan *Pseudomonas putida* dan *Pseudomonas fluorescens* Sebagai Biosensor untuk Mengukur Kadar BOD 5 Dalam Air. 2013;2(2):134–9.
5. Balouiri M, Sadiki M, Ibsouda SK.

- Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *J Pharm Anal* [Internet]. 2016;6(2):71–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpha.2015.11.005>
6. Listyawati AF. Pola Pertumbuhan *Pseudomonas* sp. dengan Menggunakan Variasi Konsentrasi D-glukosa dalam Media Pertumbuhan terhadap Waktu Inkubasi. *J Ilm Kedokt Wijaya Kusuma*. 2018;5(2):29.
  7. Studi P, Lingkungan T. Pada Lumpur Hasil Pengolahan Limbah Cat Identification of Bacterial Diversity in Waste Recycling Paint Sludge. *Program*. 2009;15(April):1–12.
  8. Dempsey DA, Vlot AC, Wildermuth MC, Klessig DF. Salicylic Acid Biosynthesis and Metabolism. *Arab B*. 2011;
  9. Fatmawati F, Herlina L. Validasi Metode dan Penentuan Kadar Asam Salisilat Bedak Tabur dari Pasar Majalaya. *EduChemia (Jurnal Kim dan Pendidikan)*. 2017;2(2):141–50.
  10. Ngginak J, Semangun H, Mangimbulude JC, Rondonuwu FS. Komponen Senyawa Aktif pada Udang Serta Aplikasinya dalam Pangan. 2013;5(2):128–45.