

Isolasi dan Identifikasi Bakteri Kitinolitik Asal Rumen

(Isolation and Identification of the Chitinolytic Bacteria from Rumen Ecosystem)

Sri Rahayu, F.M. Suhartati, Efka Aris Rimbawanto dan Ning Iriyanti

Fakultas Peternakan Universitas Jenderal Soedirman, Purwokerto

Abstract

Rumen is an interesting ecosystem for microbial exploration and their products. Isolation of the chitinolytic bacteria from the rumen ecosystem found 109 colonies that produced clear zone, 84 colonies (86%) anaerobic and 17 colonies (14%) aerobic. Clear zone appeared in the third and fourth days incubation. Four potential isolates were chosen for identification purposes. Results showed that the bacteria were sticky, gram-positive, motile, endospore-forming, mesophilic and aerobic. It was supposed to *Bacillus spp.* the optimal pH and temperature to produce chitinase from isolate 18 are pH 6.0 and temperature of 35-40°C. Divalent cations Mg, Ca, Zn, and Mn increase chitinase activity, while Cu and Co inhibit enzyme activity. When isolate 18 was grown on shrimp waste meal, it showed optimal activity on the fifth days incubation.

Key Words: Isolation, Identification, Chitinolytic Bacteria, Rumen

Pendahuluan

Kitin merupakan polimer golongan karbohidrat yang dihasilkan dari limbah hasil laut khususnya golongan udang, kepiting, ketam dan kerang. Secara hayati polimer polisakarida ini disintesis hampir satu miliar ton per tahun di dunia. Kadar kitin dalam kulit udang dan kepiting sekitar 40–60 persen, sedangkan pada dinding sel fungi 22–44 persen. Kitin yang diperoleh dari berbagai sumber memiliki struktur sama, kecuali ikatannya dengan protein dan kalsium karbonat yang merupakan dua komponen lain pada kulit udang.

Selama ini, limbah udang jarang diberikan kepada ternak ayam mengingat kualitasnya yang rendah karena sulit dicerna. Kulit udang tersusun dari polimer N-asetil glukosamin dan diikat oleh ikatan β -1,4-glikosidik. Secara kimiawi, ikatan tersebut dapat diputus oleh asam-asam kuat, sedangkan secara biologis ikatan β -1,4-glikosidik hanya dapat didegradasi oleh enzim kitinase. Enzim kitinase dihasilkan oleh berbagai makhluk hidup pada berbagai lingkungan terutama mikroba.

Pada bakteri, kitinase diperlukan untuk memenuhi kebutuhan nutrisi sementara pada tanaman kitinase digunakan untuk melawan jamur patogen maupun parasit.

Degradasi kitin menjadi monomer glukosamin memerlukan enzim endo-kitinase dan eksokitinase yang bekerja sinergistik dalam dua tahap.

Rumen merupakan bagian lambung sapi yang merupakan organ utama proses pencernaan fermentatif. Di dalam rumen, hidup berbagai jenis mikroba seperti bakteri, fungi, yeast dan protozoa. Patton dan Chandler (1975) yang menguji pencernaan secara *in vivo* berbagai materi bahan pakan berkitin pada sapi, menduga adanya flora dalam rumen yang bersifat kitinolitik.

Berdasarkan asumsi di atas maka dilakukan penelitian dengan tujuan utama untuk mendapatkan bakteri penghasil enzim kitinase (bakteri kitinolitik) yang hidup dalam rumen sapi dan selanjutnya melakukan karakterisasi baik terhadap bakteri maupun enzim kitinase yang dihasilkan. Selanjutnya isolat potensial digunakan dalam biofermentasi tepung limbah udang sebagai pakan ternak unggas.

Metode Penelitian

Pengambilan Sampel

Sampel diambil dari Rumah Pemo-tongan Hewan dengan menggunakan botol steril. Semua sampel disegarkan dalam

media cair LB (*Luria Broth*), kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 39°C dan agitasi 120 rpm. Suspensi sampel diambil 50 µl kemudian disebarkan pada media padat LA (*Luria Agar*) mengandung substrat koloidal kitin. Isolat bakteri yang membentuk zona bening diambil untuk digores kuadran dan dimurnikan.

Komposisi Media

Digunakan 2 macam media yaitu media LA. dengan komposisi sebagai berikut: 1,0% bacto trypton; 0,5% ekstrak khamir; 1,0% NaCl; 1,5% bacto agar dan 2,0% koloidal kitin. Komposisi media LB hampir sama dengan media LA, hanya penggunaan koloidal kitin sebesar 0,5%.

Pengukuran Indeks Kitinolitik (IK)

Koloni bakteri yang potensial mensekresikan enzim kitinase akan memperlihatkan kemampuan membentuk zona bening di sekeliling koloni. Nilai IK diperoleh dengan membandingkan diameter koloni dan zona bening. Koloni dengan nilai IK 1-3 diambil untuk disimpan dalam *cryobuffer*.

Uji Aktivitas Enzim Kitinase

Uji aktivitas kitinase pada saat isolasi dan identifikasi bakteri menggunakan metoda reduksi kitin menurut Ueda dan Arai (1992). Uji aktivitas kitinase saat penentuan waktu panen isolat unggulan dilakukan menggunakan metode Wang dan Chang (1997). Setelah disentrifus, filtrat yang diperoleh diukur jumlah produk gula reduksinya menggunakan metode DNS. Satu unit aktivitas enzim diukur sebagai jumlah enzim yang membebaskan 1 µmol glukosa min/menit. Adapun kadar protein diukur menggunakan metode Bradford (1976).

Identifikasi

Identifikasi bakteri secara terbatas dilakukan dengan uji fisiologis untuk mengetahui bentuk gram, motilitas dengan menumbuhkan bakteri pada agar miring dengan substrat koloidal kitin 0.5 persen, pewarnaan spora menggunakan safranin dan malasit hijau, dan pewarnaan gram menggunakan violet kristal dan lugol (Fardiaz, 1989).

Hasil dan Pembahasan

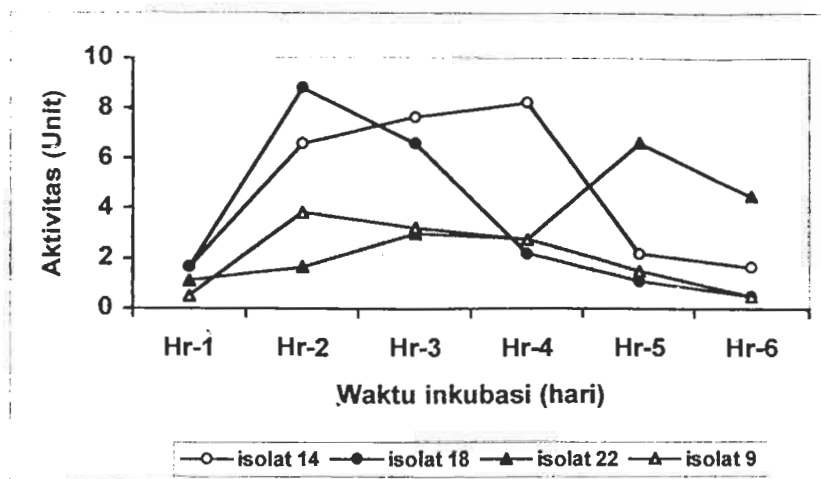
Isolasi

Tahap ini dimulai dengan pengambilan sampel cairan rumen sapi dari Rumah Pemotongan Hewan. Sampel diambil dan ditempatkan dalam botol steril yang telah disiapkan sebelumnya. Setiap hari diperoleh sampel cairan rumen sebanyak 4-5 ekor sapi. Semua sampel disegarkan, kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 39°C dan agitasi 120 rpm. Selanjutnya, suspensi sampel diambil 100 µl dan dihomogenkan dengan 900 µl akuades steril, kemudian 50 µl di antaranya disebar pada media padat (L.A) pH 6,5 mengandung koloidal kitin dan diinkubasi pada 39°C selama 1-5 hari.

Media koloidal kitin berwarna putih keruh dan bakteri yang menghasilkan enzim kitinase akan membentuk zona bening atau halo di sekitar koloninya. Pengambilan sampel dilakukan selama satu bulan. Enzim kitinase merupakan enzim yang bersifat *inducible* (Gooday, 1990) sehingga untuk sekresinya diperlukan agen penginduksi seperti koloidal kitin, etilen glikol, kitin, kitosan.

Rumen merupakan ekosistem yang terbuka dengan alam sehingga banyak spesies bakteri yang tinggal di dalamnya dan memberi kontribusi terhadap keragaman flora rumen. Hasil pengamatan selama isolasi menunjukkan sebesar 86% (102 koloni) bakteri anaerobik sedangkan bakteri aerobik hanya sebesar 14% (17 isolat). Menurut Dehority dan Orpin (1997), populasi terbesar mikroba rumen terutama adalah bakteri anaerobik dan protozoa bersilia yang berperan terutama dalam aktivitas fermentasi. Sejumlah kecil bakteri anaerobik fakultatif, bakteri aerobik, dan protozoa bersilia juga tinggal dalam rumen dan memberi kontribusi dalam proses fermentasi.

Hasil pengukuran indeks kitinolitik (IK) terhadap 17 koloni berkisar dari 0,2-2,5 dengan rata-rata 0,7. Empat koloni potensial dengan nilai IK 0,7; 1,0; 1,2 ; dan 2,5 dan waktu pembentukan zona bening cepat, selanjutnya diidentifikasi terbatas.



Gambar 1. Kurva Produksi Enzim Kitinase Isolat no. 9, 14, 18, dan 22.

Identifikasi

Karakterisasi terbatas dilakukan terhadap isolat potensial untuk mengetahui bentuk sel, gram, motilitas, spora, aerobatik, dan pertumbuhan. Hasil identifikasi terhadap isolat potensial menunjukkan keempat isolat diperkirakan merupakan genus *Bacillus* sp.

Bacillus merupakan genus yang bersifat kosmopolitan sehingga dapat ditemukan secara luas di berbagai tempat. Menurut Claus dan Barkeley (1986), sifat *Bacillus* spp. di antaranya adalah pembentuk spora, tahan terhadap berbagai senyawa antiseptik, aerob, dan fakultatif anaerob, mampu mendegradasi berbagai macam senyawa organik seperti protein, pati, dan polimer selulosa.

Sampel isolasi diperoleh dari rumah pemotongan hewan yang sapinya berasal dari daerah di sekitar Purwokerto. Mengingat sistem pemeliharaan sapi di daerah umumnya masih bersifat tradisional dan kebiasaan sapi yang terus-menerus melakukan ruminasi, hal ini memungkinkan flora aerobik atau anaerob fakultatif hidup di dalam rumen.

Jayne-Williams (1979) berhasil mengisolasi beberapa bakteri aerobik dari rumen sapi yaitu: *Acinetobacter* spp., *Pseudomonas aeruginosa* spp., *Alkaligenes faecalis* spp., *Micrococcus varians* spp., dan *Flavobacterium* spp. Penelitian Williams dan Withers (1983) menghasilkan beberapa spesies *Bacillus* spp. pembentuk

spora dari ekosistem rumen sapi. Selanjutnya, Degrassi *et al.* (2000) berhasil mengidentifikasi dan mengkarakterisasi gen penyandi asetil xilan esterase dari *Bacillus pumilus* yang berasal dari cairan rumen. Menurut Gooday (1990), prokariot pendegradasi kitin pada umumnya adalah *Pseudomonas*, *Vibrio*, *Photobacterium*, bakteri usus, *Actinomycetes*, *Bacillus*, dan *Clostridia*. Menurut Atlas dan Bartha (1987) *Bacillus* spp. memiliki suhu dan pH pertumbuhan yang luas, mempunyai kemampuan enzimatik yang beragam, bersifat kemolitotrof fakultatif, asidofilik maupun alkalofilik, psikrofilik-mesofilik maupun termofilik.

Pemilihan Isolat Unggulan

Untuk memilih satu isolat yang akan digunakan pada produksi biomasa tepung limbah udang, maka keempat isolat ditumbuhkan dalam media cair (LB) mengandung 0,5% koloidal kitin pada kondisi pH 6,5 dan suhu 39°C. Inkubasi dilakukan selama 5 hari dan setiap hari dilakukan pengambilan sampel.

Isolat 14 dan 18 tampak menghasilkan aktivitas kitinase yang tinggi. Aktivitas optimal isolat 14 dicapai pada hari ketiga inkubasi (8,75 U/ml), sedangkan isolat 18 dicapai pada hari kedua inkubasi (11 U/ml). Isolat 9 dan 22 menghasilkan aktivitas kitinase yang secara umum lebih rendah dari isolat 14 dan 18 (Gambar 1). Isolat 18 merupakan isolat dengan waktu produksi optimal paling cepat dibanding tiga isolat

yang lain yaitu pada hari kedua inkubasi. Bakteri mesofilik *Aeromonas sp.* (Ueda dan Arai, 1992) dan *Bacillus circulans* WL-12 (Mitsutomi *et al.*, 1995) diketahui mengha-silkan kitinase dengan waktu panen dua hari inkubasi, sedangkan waktu panen enzim kitinase dari bakteri termofilik *Bacillus sp.* K29-14 dilakukan pada jam ke-28 inkubasi (Rahayu, 2000).

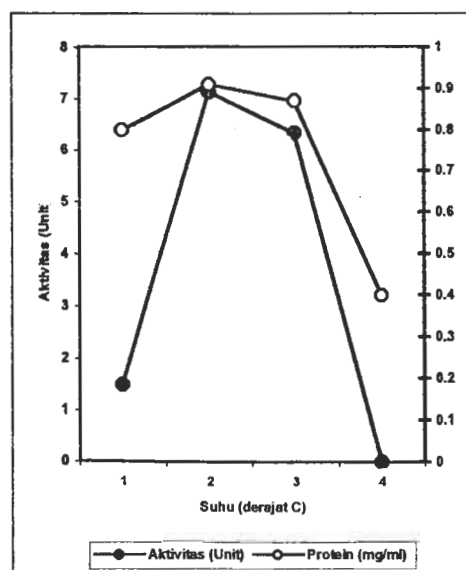
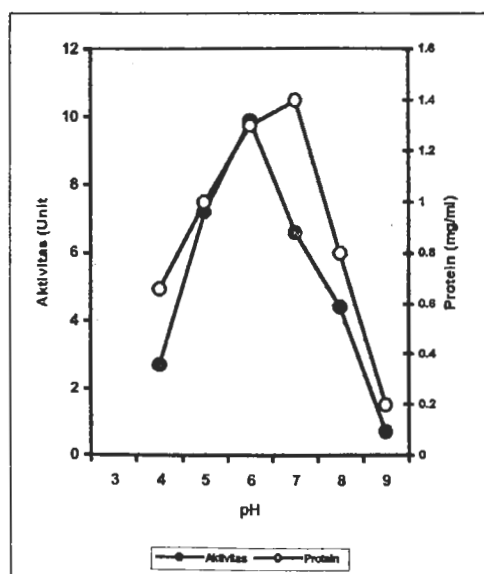
Penentuan pH dan Suhu Optimum Produksi

Isolat 18 yang ditumbuhkan pada media dengan pH 5,0; 6,0; dan 7,0 tampak menghasilkan aktivitas kitinase yang baik, masing-masing sebesar 7,15 U/ml; 9,9 U/ml, dan 6,5 U/ml. Aktivitas optimal diperoleh pada pH 6,0, hal ini tampak tidak jauh dengan kondisi lingkungan dalam rumen yang memiliki pH sekitar 6,0–7,0.

Berbagai bakteri mesofilik penghasil kitinase diketahui diproduksi pada pH media sekitar 5,0–7,0. Enzim kitinase asal *Streptomyces sp.* diproduksi pada kultur pH 6,0 (Okazaki *et al.*, 1995); *Bacillus circulans* WL-12 pada pH 5,0 (Mitsutomi *et al.*, 1995); *Aeromonas sp.* (Ueda dan Arai, 1992), dan *Enterobacter sp.* (Yamasaki *et al.*, 1993) pada pH 7,0.

Enzim kitinase asal isolat 18 mempunyai aktivitas stabil pada pH 3,0–5,0, dan aktivitas optimal diperoleh pada pH 5,0 yaitu sebesar 5,8 U/ml. Meningkatnya aktivitas enzim pada pH

optimal tersebut dapat dikaitkan dengan terjadinya perubahan ionisasi gugus ionik enzim pada sisi aktifnya, sehingga konformasi sisi aktif menjadi lebih efektif dalam mengikat dan mengubah substrat menjadi produk. Pada pH 6,0 terjadi penurunan aktivitas sebesar 34% menjadi 3,3 U/ml dan pada pH 9,0 aktivitas sisa sebesar 20% (1,1 U/ml). Berdasar pengujian tersebut, maka enzim kitinase isolat 18 bersifat asam. Beberapa bakteri diketahui menghasilkan kitinase yang bersifat asam seperti *Aeromonas sp.* menghasilkan enam jenis kitinase yang memiliki aktivitas optimal pada pH 3,5–4,5 (Ueda *et al.*, 1995), *Bacillus* strain MH-1 menghasilkan kitinase dengan aktivitas optimal pada pH 4,0 (Sakai *et al.*, 1998), isolat bakteri asidofilik asal kawah Kamojang menghasilkan kitinase asam yang optimal pada pH 5,0 (Natsir, 2000). Untuk mengetahui suhu optimal produksi kitinase, isolat 18 ditumbuhkan dalam media cair mengandung koloidal kitin 0,5% pH 6,0 pada suhu kamar (29°C), 35°C, 40°C, dan 45°C. Inkubasi dilakukan selama dua hari. Suhu merupakan satu faktor penting dalam pertumbuhan sel dan produksi enzim.



Gambar 2. Kurva Produksi Kitinase Isolat 18 pada Berbagai pH dan Suhu.

Gambar 2 menunjukkan aktivitas optimal kitinase diperoleh jika mikroba ditumbuhkan pada suhu 35°C (7,1 Unit/ml), pada suhu 40°C terjadi penurunan aktivitas sebesar 10% (6,35 Unit/ml). Berdasar hasil karakterisasi ternyata isolat 18 yang diduga genus *Bacillus* sp. mampu tumbuh pada suhu 30°C, 35°C, dan 40°C, berarti isolat 18 merupakan mikroba mesofil. Menurut Madigan *et al.* (2000), mikroba mesofil merupakan mikroba yang mampu tumbuh optimal pada suhu 20°-40°C.

Pengaruh Kation Divalen

Beberapa enzim memerlukan ion-ion logam tertentu untuk meningkatkan aktivitasnya. Pada konsentrasi tertentu, ion logam dapat bertindak sebagai aktivator dan pada konsentrasi tertentu pula dapat bertindak sebagai inhibitor. Logam dapat berfungsi sebagai kofaktor bagi enzim karena berperan dalam pengikatan enzim dengan substrat untuk menstabilkan konformasi enzim. Kitinase isolat 18 diaktifkan oleh logam Mg, Mn, Ca, dan Zn pada konsentrasi 1 mM dan 2 mM, sedang logam Co dan Cu merupakan penghambat aktivitas enzim. Kemampuan tersebut mirip dengan enzim kitinase yang dihasilkan oleh bakteri asidofilik asal kawah Kamojang yang diaktifkan oleh logam Mg, Mn, dan Ca pada konsentrasi 1 mM dan dihambat oleh ion Co, Cu, dan Zn (Natsir, 2000). Hal ini berbeda dengan sifat kitinase asal *P. aeruginosa* K-187 yang diaktifkan oleh logam Cu dan kitinase asal *Aeromonas* sp. 10S-24 yang diaktifkan oleh logam Ni.

Kesimpulan

Isolasi bakteri kitinolitik dari sampel cairan rumen sapi diperoleh 17 bakteri aerob (14 persen) yang berpotensi menghasilkan enzim kitinase dengan indeks kitinolitik sekitar 0,2–2,5. Identifikasi terhadap empat isolat potensial menunjukkan bahwa isolat adalah genus *Bacillus* sp. Isolat unggulan nomer 18 mempunyai pH dan suhu optimal produksi pada pH 6,0, 35–40 °C dan waktu panen lima hari.

Ucapan Terimakasih

Terima kasih dan penghargaan disampaikan kepada Direktur Pembinaan

Penelitian dan Pengabdian pada Masyarakat - Direktorat Jendral Pendidikan Tinggi yang telah memberi dukungan dana dalam penelitian ini melalui proyek Hibah Bersaing X Tahun 2001- 2003.

Daftar Pustaka

- Atlas, R.M. and R. Bartha. 1987. Microbial Ecology : Fundamentals and Applications. Second ed. The Benjamin/Cummings Pubs. Co. Inc. California.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilising the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.*, 72: 248–254.
- Chesson, A. and C.W. Forsberg. 1997. Polysaccharide degradation by rumen microorganism. *In: The Rumen Microbial Ecosystem*. P.N. Hobson and C.S. Stewart (Editors). Blackie Academic & Professional. London.
- Claus, D. and R.C.W. Berkeley. 1986. The Genus *Bacillus*. *In: Bergey's Manual of Systematics Bacteriology*. Vol.2. P.H. Sneath (Editor). Williams and Wilkins, Baltimore.
- Dehority, B.A. and C.G. Orpin. 1997. Development of and natural fluctuations in rumen microbial populations. *In: The Rumen Microbial Ecosystem*. P.N. Hobson and C.S. Stewart (Editors). Blackie Academic & Professional. London.
- Degrassi, G., M. Kojic, G. Ljubijankic and V. Venturi. 200. The acetyl xylan esterase of *Bacillus pumilus* belongs to a family of esterases with broad substrate specificity. *J. of Microbiology* 146: 1585–1591.
- Fardiaz, S. 1989. Penuntun Praktek Mikrobiologi Pangan. Fakultas Teknologi Pangan - IPB. Bogor.
- Gooday, G.W. 1990. The ecology of chitin degradation. *Advances. Microbial Ecology* 11: 387–430.
- Hobson, P.N and C.S. Stewart. 1997. The Rumen Microbial Ecosystem. Blackie Academic & Professional: London.
- Hoshino, S., R. Onodera, H. Minato and H. Itabashi. 1990. The Rumen Ecosystem: The Microbial Metabolism and its Regulation. Japan Scientific Societies Press. Tokyo.
- Leger, R.J.St., L. Joshi, M.J. Bidochka, N.W. Rizzo dan D.W. Robert. 1996. Characterization and ultrastructural localization of chitinases from *Metarhizium anisopliae*, *M. flavoviridae* and *Beauveria bassiana* during fungal invasion of host (*Manduca sexta*) cuticle. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 907–912.

- Jayne-Williams, D.J. 1979. The bacterial flora of the rumen of healthy and bloating calves. *J. Appl. Bacteriol.* 47: 271-284.
- Mitsutomi, M.; H. Kidoh, H. Tomita and T. Watanabe. 1994. The action of *Bacillus circulnas* WL-12 chitinases on partially N-acetylated chitosan. *Biosci. Biotech. Biochem.* 59 (3): 529 - 531.
- Mirzah. 2000. Pengaruh pengolahan dengan tekanan uap terhadap kualitas asam amino tepung limbah udang. *Jurnal Peternakan dan Lingkungan* 6 (1).
- Natsir. H. 2000. Karakterisasi dan Purifikasi Enzim Pedegradasi Kitin dari Bakteri Asidofilik asal kawah Kamojang. Tesis. PS - Bioteknologi. IPB - Bogor.
- Okazaki, K., F. Kato, N. Watanabe, dan S. Yusada. 1995. Purification and properties of two chitinases from *Streptomyces* sp. J-13-3. *Biosci. Biotech. Biochem.* 59: 1586-1587.
- Patton. R.S. dan P.T. Chandler. 1975. *In vivo* digestibility evaluation of chitinous material. *J. Dairy Sci.* 8: 397-403.
- Rahayu. S. 2000. Karakterisasi dan Pemurnian Enzim Kitinase dan Kitin Deasetilase Termotabil dari *Bacillus* sp. K29-14 asal kawah Kamojang. Tesis. PS - Bioteknologi. IPB - Bogor.
- Sakai, A., A. Yokota, H. Kurokawa, M. Wakayama, M. Moriguchi. 1998. Purification and characterization of three thermostable endochitinases of a *Bacillus* noble strain MfH-1 isolated from chitin containing compost. *Appl. Environ. Microbiol.* 64 (9): 397-340.
- Ueda, M. dan M. Arai. 1992. Purification and some properties of chitinases from *Aeromonas* sp. No.10S-24. *Biosci. Biotech. Biochem.* 56 (3): 460-464.
- Wang, S.L. dan W.T. Chang. 1997. Purification and characterization of two bifunctional chitinases/lysozymes extracellularly produced by *P. aeruginosa* K-187 in ashrimp and crab shell powder medium. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 380-386.
- Williams, A.G. dan Withers, S.E. 1983. *Bacillus* spp. in the rumen ecosystem. Hemicellulose depolymerases and glycoside hydrolases of *Bacillus* spp. and rumen isolate grown under anaerobic conditions. *J. Appl. Bacteriol.* 55: 283-292.
- Yamasaki, Y., I. Hayashi, Y. Ohta, T. Nakagawa, M. Kawamukai and H. Matsuda. 1993. Purification of two chitinases from *Rhizopus oligosporus* and isolation and sequencing of the encoding gen. *Biosci. Biotech. Biochem.* 57 (3): 1691 - 1698.