

**KITIN DARI LIMBAH CANGKANG UDANG SEBAGAI MEDIA UNTUK
BAKTERI KITINOLITIK YANG DIISOLASI DARI LUMPUR SAWAH**
*(Chitin from Waste of Shrimp Crab As Growth Medium for
Chitinolytic Microorganism, Isolated from the Field Mud)*

Nuniek Herdyastuti*, Tri Joko Raharjo, Mudasir**, Sabirin Matsjeh****

*Department of Chemistry, Surabaya State University, Jl. Ketintang Surabaya 60231

**Department of Chemistry, Gadjah Mada University, Sekip Utara Yogyakarta, 55281

E-mail : nherdyastuti@yahoo.com

Diterima: 4 Mei 2009

Disetujui: 1 Juni 2009

Abstrak

Limbah cangkang udang dimanfaatkan untuk memproduksi kitin sebagai media pertumbuhan bakteri kitinolitik. Enam isolat yang diperoleh dari Lumpur sawah semuanya menunjukkan aktivitas kitinolitik. Hasil analisis selama 5 hari inkubasi menunjukkan bahwa jumlah sel dan kadar protein diproduksi paling besar pada hari ke empat oleh isolate TNH23. Aktivitas kitinase tertinggi ditunjukkan oleh isolate TNH54 pada hari ke dua sebesar 0,331 U/mL dan ajituvitas soesufuj 0,721 U/mg. Isolat TNH23 dan TNH54 diduga mempunyai genus yang berbeda yaitu *Aeromonas hydrophyla* and *Burkholderia pseudomallei*.

Kata kunci: cangkang udang, kitin, Lumpur sawah, mikroorganisme kitinolitik

Abstract

*A shrimp crab waste have been using to produce chitin as growth medium chitinolytic microorganism. Six isolate has been isolated from field mud showed that all have chitinolytic activity. The analysis result in 5 day incubation showed that the highest cell number and protein concentration is shown by TNH23 isolate. Chitinase activity is showed by TNH54 in second day 0.331 U/mL and specific activity 0.721U/mg. TNH23 and TNH54 isolate are presumed to have different genus, *Aeromonas hydrophyla* and *Burkholderia pseudomallei**

Key words : shrimp crab, chitin, field mud, chitinolytic microorganism

PENGANTAR

Kitin adalah suatu polisakarida yang tersusun oleh monomernya β -1,4-N-asetilglukosamin. Kitin merupakan salah satu polimer alami yang cukup melimpah dan merupakan biopolimer terbanyak kedua di alam setelah selulosa. Polimer ini ditemukan sebagai komponen struktural *eksoskeleton* pada insekta, dalam kulit *krustacea*, dalam dinding sel beberapa fungi dan *alga* serta *nematoda*. Sirkulasi kitin dari material yang tersedia

dan organisme mati utamanya dihasilkan dari aktivitas kitinolitik mikroorganisme. Kitin menyusun hampir separoh dari total bahan organik dalam bahan-bahan yang mengandung kitin. Konsentrasi tertinggi mencapai 85% ditemukan pada *Arthropoda* [Folders et al, 2001]. Jumlah kitin yang dapat dihasilkan per tahunnya dalam biosfer sangat banyak sekali. Pada tahun 1993 diperkirakan dunia dapat memperoleh kembali kitin dari invertebrata laut sebanyak 37.000 ton dan meningkat menjadi 80.000 ton pada tahun 2000 [Ogawa et al. 2002].

Dengan kata lain kitin dapat diproduksi secara murah dan sekaligus membantu menyelesaikan masalah lingkungan serta mempromosikan nilai ekonomis produksi laut .

Pabrik pembekuan udang (*cold storage*) yang mengolah udang untuk ekspor dalam bentuk udang beku *headless* atau *peeled* menghasilkan limbah berupa kulit keras (cangkang) sekitar 50-60% yang dibuang atau hanya digunakan sebagai campuran makanan ternak [Ratanakkit et al, 2002]. Limbah cangkang udang yang dibuang begitu saja akan menghasilkan bau busuk, meningkatkan BOD air sehingga kualitas air menurun dan berpotensi sebagai pencemar lingkungan (Indra dan Syafsir, 1993). Limbah cangkang udang tersebut dapat dimanfaatkan untuk menghasilkan kitin.

Kitin banyak digunakan sebagai substrat pada media fermentasi enzim kitinase, karena aktivitas kitinolitik diinduksi dalam media pertumbuhan strain dengan adanya kitin sebagai sumber karbon (Chernin et al, 1998). *Aeromonas sp* dan *Aeromonas schubertii* adalah bakteri yang mempunyai potensi aktivitas kitinolitik, ditumbuhkan dalam kultur yang mengandung 0,2% kitin koloidal dari kepiting sebagai sumber karbon (Guo et al, 2004 ; Huang and Chen, 2005).

Mikroorganisme kitinolitik adalah mikroorganisme yang dapat mendegradasi kitin dengan menggunakan enzim kitinase. Mikroorganisme ini dapat diperoleh dari tanah atau dari lingkungan air seperti laut, danau, kolam, limbah udang dan sebagainya. Salah satu aplikasi kitinase dalam bidang bioteknologi adalah sebagai biokontrol. Pada tumbuhan enzim ini digunakan sebagai pertahanan dalam melawan serangan organisme patogen yang mengandung kitin. Beberapa bakteri kitinolitik seperti *Serratia plymuthica C48* yang diisolasi dari tanah berpotensi sebagai agensia biokontrol yang mampu menekan pertumbuhan jamur *Verticillium dahliae* [Berg et al, 1999]. Genus *Trichoderma* merupakan jamur non patogen dengan beberapa strain yang sangat efektif

berperan sebagai biokontrol [Minarsih dan Santoso, 2003].

BAHAN DAN CARA KERJA

Bahan-bahan yang digunakan adalah : Bacto agar (Difco), *bacto-tripton* (Difco), *yeast extract*, kitin yang diisolasi dari cangkang udang windu. Bahan kimia dengan kemurnian p.a : NaCl, Na₂CO₃, CuSO₄.5H₂O, Na₃C₆H₅O₇.2H₂O, N-asetil-glukosamin (SIGMA), 3,5-asam dinitrosalisilat (SIGMA). Peralatan yang digunakan adalah : Spektrofotometer UV-Vis (UV-1700, Shimadzu), sentrifuga, *autoclave*, *shaker*, mikropipet dan peralatan gelas.

Persiapan Substrat Kitin Koloidal

Kitin diisolasi dari limbah cangkang udang windu dari industri pembekuan udang yang telah dikeringkan dan dihaluskan kemudian dilanjutkan dengan proses isolasi menggunakan metode No dan Meyer . Proses isolasi kitin terdiri dari dua tahap, yaitu deproteinasi dan demineralisasi. Kitin yang diperoleh selanjutnya dibuat bentuk koloid dengan menggunakan cara menurut Hsu and Lockwood (1975). Kitin dilarutkan dalam HCl pekat (37%), kemudian diendapkan sebagai suspensi koloid dengan penambahan air dingin (5°C). Suspensi disaring dan residu dicuci dengan aquades sampai pH netral kemudian dikeringkan dengan oven. Proses ini memberikan *recovery* ± 85% .

Isolasi Mikroorganisme dari Lumpur Sawah

Sampel lumpur sawah disuspensikan dengan air steril dan dicampur sampai homogen, kemudian suspensi diinokulasikan ke dalam media *Luria Bertani* (LB) cair yang terdiri dari : *bacto-triptone* , *yeast extract* dan NaCl. Media cair yang mengandung suspensi dikocok dengan *shaker* pada kecepatan 150 rpm selama 18 – 20 jam pada suhu kamar. Sebanyak 50 µL kultur ditumbuhkan pada media LB padat dan diinkubasi pada suhu kamar selama 18 – 20 jam untuk mendapatkan koloni tunggal.

Screening Mikroorganisme Penghasil Kitinase dari Lumpur Sawah

Screening mikroorganisme penghasil kitinase dapat dilakukan pada media padat atau media cair minimal yang mengandung kitin. Isolat dimasukkan dalam media yang mengandung 0,4% kitin koloidal dan campuran garam mineral K_2HPO_4 0,7 g ; KH_2PO_4 0,3 g ; $MgSO_4 \cdot 5H_2O$ 0,5 g ; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,01g ; $MnCl_2$ 0,001g ; kemudian dilarutkan dalam 1 liter air. Kultur diinkubasi selama 48 jam dengan kecepatan 150 rpm pada suhu kamar. Kultur cair masing-masing koloni disentrifugasi pada 4000 rpm selama 15 menit suhu 4°C, supernatan yang diperoleh diuji aktivitasnya. Aktivitas kitinase pada media padat dapat diamati berdasarkan pembentukan halo transparan setelah diinkubasi selama 7 sampai 10 hari [Hsu and Lockwood, 1975 ; Folders et al, 2001].

Penentuan Aktivitas Enzim Kitinase

Aktivitas enzim ditentukan berdasarkan N-asetilglukosamin yang dilepaskan dan diukur secara kolorimetri [Monreal and Reese, 1969]. 2 mL larutan kitin 1,25% (b/v) dilarutkan dalam 200 mM buffer kalium fosfat dan ditambahkan 0,5 mL larutan enzim. Campuran diinkubasi selama 2 jam pada suhu kamar kemudian tabung ditempatkan ke dalam air

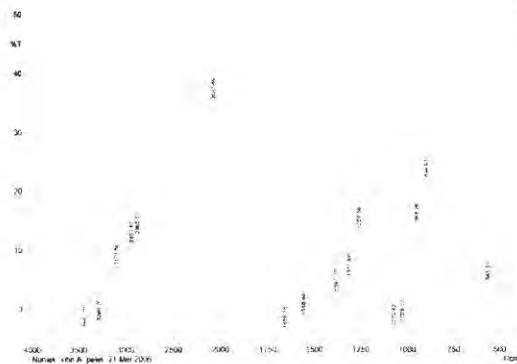
mendidih selama 5 menit dan dinginkan pada suhu kamar. Suspensi disentrifugasi selama 10 menit pada kecepatan 4000 rpm kemudian pindahkan 1,5 mL supernatan dan disentrifugasi kembali 10 menit pada kecepatan 10000 rpm. Sebanyak 1 mL supernatan pada tabung sampel ditambahkan 2 mL air deionisasi dan 1,5 mL reagen pewarna yang mengandung 5,3 M larutan Natrium kalium tartrat dan Asam 3,5 Dinitrosalisilat 96 mM. Campuran dipanaskan dalam air mendidih selama 5 menit setelah dingin diukur serapannya dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 540 nm. 1 unit aktivitas enzim setara dengan 1 µmol N-Asetilglukosamin yang dihasilkan selama 1 jam.

Penentuan Kadar Protein

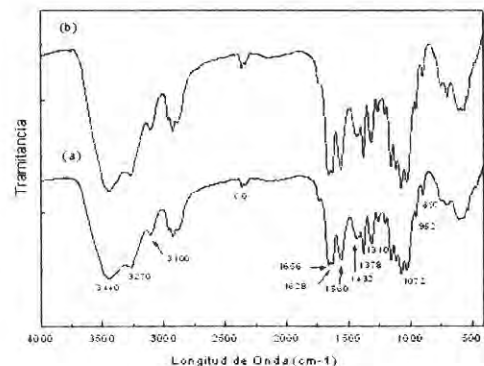
Kadar protein ditentukan dengan menggunakan metode Lowry dan sebagai standart digunakan Bovine serum albumin [Bollag et al, 1996].

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hampir semua industri pengolahan daging kepiting, udang dan sejenisnya menghasilkan limbah yang mengandung kitin dalam jumlah besar. Limbah cangkang udang pada cold



(a)



(b)

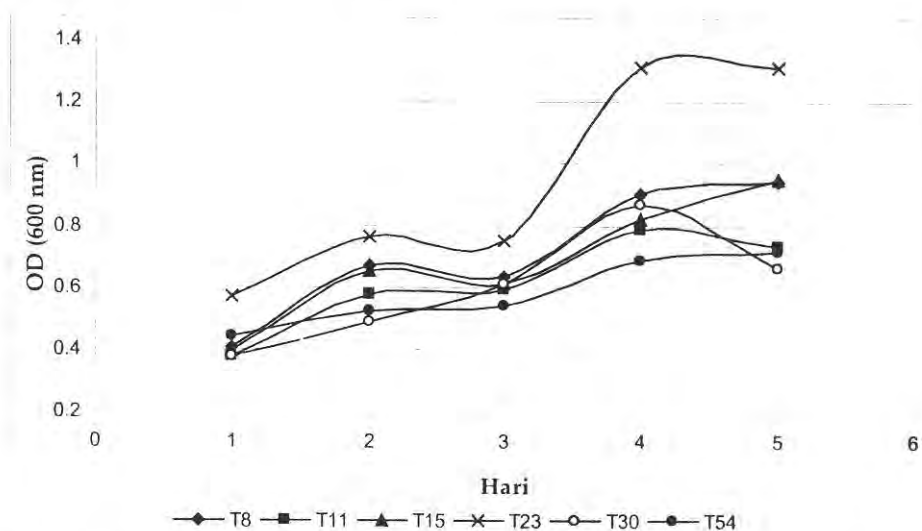
Gambar 1. Hasil spektra IR kitin yang diisolasi dari cangkang udang windu (a) dan kitin dari SIGMA (b)

storage tersebut hanya dibuang begitu saja, atau dimanfaatkan peternak sebagai makanan ternak atau juga bisa dimanfaatkan oleh industri pembuat terasi. Limbah cangkang udang windu yang diperoleh dari suatu industri pembekuan udang dapat digunakan sebagai sumber untuk mendapatkan kitin. Koloidal kitin adalah kitin yang dihidrolisis parsial dengan menggunakan asam klorida. Koloidal kitin tersebut banyak digunakan sebagai substrat dalam medium fermentasi untuk mendapatkan enzim kitinase.

Pembentukan koloidal kitin dimaksudkan untuk melepaskan protein dan lemak yang ada di dalam kitin sehingga memudahkan interaksi enzim dan substrat [Suraini et al, 2008]. Hasil analisis IR kitin dibandingkan dengan kitin dari SIGMA menunjukkan spektra yang sama, yaitu adanya serapan yaitu pada 3441 dan 3286 cm^{-1} (adanya OH dan NH_2), 1658 cm^{-1} (C=O), 1072 cm^{-1} (C-O) seperti pada gambar 1.

Enam isolat yang diperoleh dari hasil isolasi lumpur sawah menunjukkan aktivitas kitinolitik pada ekstrak kasarnya yaitu TNH8, TNH11, TNH15, TNH23, TNH30 dan TNH54. Isolat tersebut dianalisis selama 5 hari meliputi

optical density (OD), aktivitas kitinase dan kadar protein. Semua isolat ditumbuhkan pada media yang mengandung 0,4% kitin koloidal dan diamati pertumbuhan selnya selama 5 hari menunjukkan pola yang hampir sama seperti pada gambar 2. Seperti diketahui bahwa kitin merupakan polimer yang mempunyai jumlah molekul sangat besar dan tidak larut dalam air sehingga mikroba membutuhkan waktu yang cukup lama untuk mendegradasinya. Jumlah sel mengalami kenaikan sampai hari ke-4 yang merupakan fase logaritma di mana sel paling banyak dihasilkan, hasil tertinggi ditunjukkan oleh isolat TNH23 yaitu 1,314. Pada hari ke-3 jumlah sel masing-masing isolat menunjukkan penurunan. Hal ini diduga mikroorganisme yang ditumbuhkan dalam substrat yang tidak larut dalam air tetapi esensial baginya, maka pertumbuhannya akan dibatasi oleh laju kelarutan nutrisi tersebut. Hal ini biasa terjadi pada sel-sel yang ditumbuhkan secara aerobik dalam botol guncang dengan kondisi sel yang cukup tinggi. [Judoamidjojo et al, 1992]. Pada hari ke-5 masing-masing isolat mulai memasuki fase stasioner. Jumlah sel tersebut sebanding dengan kadar protein masing-masing sel seperti ditunjukkan pada gambar 3. Protein



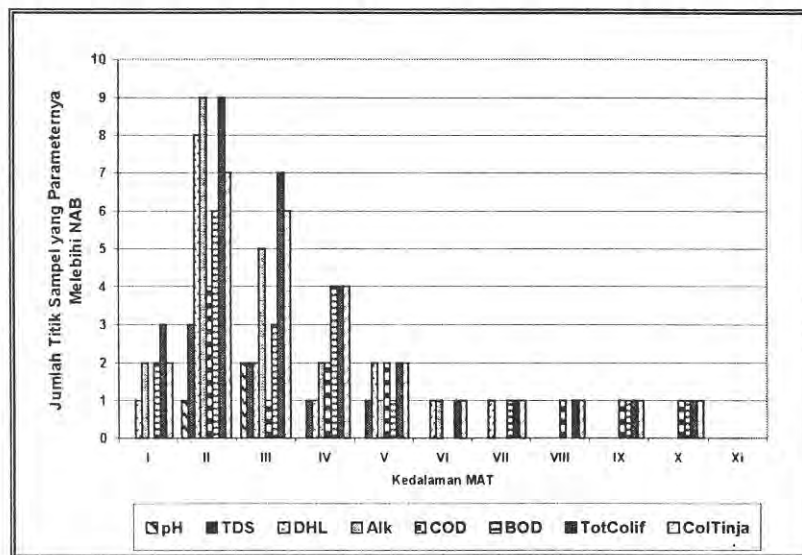
Gambar 2. Hasil pengukuran *Optical Density* (OD) selama 5 hari inkubasi menggunakan spektrofotometer pada $\lambda = 600$. Isolat T23 menunjukkan jumlah sel tertinggi pada hari ke-4 sebesar 1,314

diproduksi pada fase logaritma, sehingga pada saat sel banyak diproduksi maka protein dapat dihasilkan sebagai produk metabolitnya ke dalam media. Pada hari ke-4 diketahui bahwa jumlah sel paling banyak diproduksi oleh isolat TNH23 dan pada hari tersebut isolat TNH23 memproduksi protein secara maksimal sebesar 1,032 mg/mL. Pada hari ke-5 sel mulai memasuki fase stasioner bahkan isolat TNH30 jumlah selnya mulai menurun. Hal ini juga terjadi pada kadar protein dan berlaku sama pada keempat isolat lainnya.

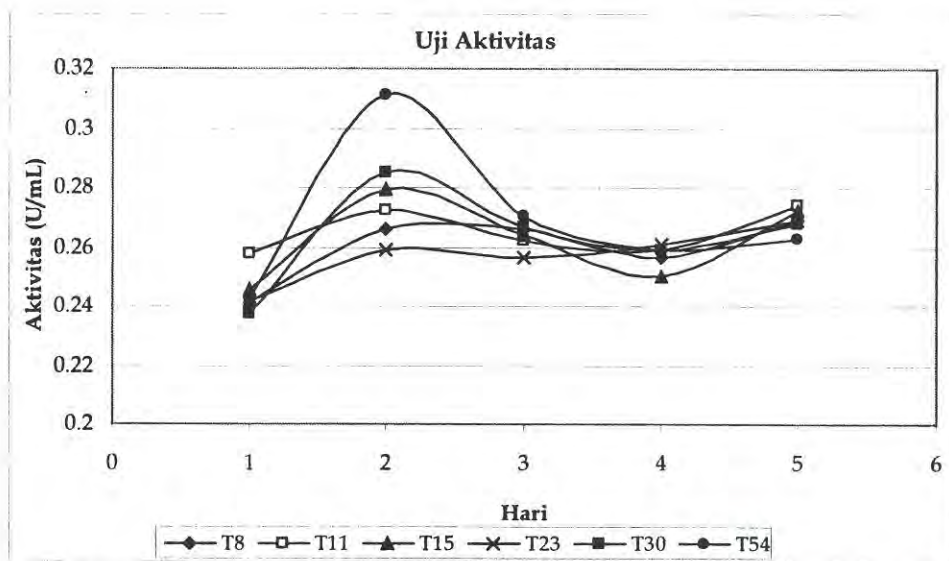
Aktivitas kitinase dari 6 isolat yang diamati menunjukkan bahwa isolat TNH54 mempunyai aktivitas kitinase tertinggi pada hari ke-2 seperti terlihat pada gambar 4. Hal ini tidak sesuai dengan hasil OD dan kadar protein yang dihasilkan maksimal pada hari ke-4. Kadar protein yang dihasilkan maksimal pada hari ke-4 diduga bukan merupakan protein yang mengandung enzim kitinase, karena aktivitas tertinggi dihasilkan pada hari ke-2 dan semakin menurun sampai hari ke-5. Hal ini menunjukkan bahwa enzim kitinase diproduksi maksimal pada hari ke-2 dengan menggunakan koloidal kitin sebagai substrat. Seperti diketahui kitinase adalah enzim inducibel dengan kitin dan produk degradasinya sebagai inducernya

yang umumnya diproduksi pada fase logaritma [Nielsen and Sørensen, 1999]. Berdasarkan perhitungan aktivitas spesifik ekstrak kasar dari masing-masing isolat pada Tabel 1 menunjukkan bahwa harga aktivitas spesifiknya lebih besar bila dibandingkan dengan *Trichoderma viride* TNJ63 yang mempunyai aktivitas spesifik 0,142 U/mg [Nugroho, 2003], *Aeromonas schubertii* 0,47 U/mg [Guo et al, 2004] atau *Pseudomonas aeruginosa* K-187 dengan aktivitas spesifik 0,15 U/mg [Wang and Chang 1997] ataupun *Vibrio sp.* 98CJ11027 sebesar 1,3 U/mg [Park et al, 2000].

Aktivitas spesifik dapat ditentukan dari data aktivitas kitinase dan kadar protein seperti pada gambar 5. Aktivitas spesifik menyatakan jumlah unit enzim per miligram protein. Aktivitas spesifik adalah suatu ukuran kemurnian enzim, nilainya meningkat selama pemurnian suatu enzim dan menjadi maksimum dan tetap jika enzim sudah dalam keadaan murni [Lehninger, 1995]. Perhitungan aktivitas spesifik dipengaruhi oleh kadar protein, semakin tinggi harga kadar protein maka semakin kecil nilai aktivitas spesifik dan sebaliknya. Berdasarkan identifikasi morfologi dan fisiologi diduga bahwa isolat TNH8, TNH11 dan TNH54 merupakan *Burcholderia*



Gambar 3. Hasil pengukuran Kadar protein dengan menggunakan metode Lowry selama 5 hari inkubasi. Isolat T23 menunjukkan kadar protein tertinggi pada hari ke-4 sebesar 1,032 mg/mL



Gambar 4. Aktivitas kitinase selama 5 hari inkubasi yang diukur menggunakan spektrofotometer pada $\lambda=540$ nm. Isolat T54 menunjukkan aktivitas kitinase tertinggi pada hari ke-2 sebesar 0,331 U/mL

Tabel 1. Hasil perhitungan Aktivitas spesifik selama 5 hari inkubasi

No.	Nama Isolat	Aktivitas spesifik pada hari ke-				
		1	2	3	4	5
1.	Isolat TNH8	0,446	0,842	0,773	0,376	0,700
2.	Isolat TNH11	0,826	1,269	0,868	7,345	4,159
3.	Isolat TNH15	0,563	0,945	0,699	0,575	0,909
4.	Isolat TNH23	0,506	0,546	0,349	0,253	0,410
5.	Isolat TNH30	0,449	1,349	0,505	0,805	1,334
6.	Isolat TNH54	0,541	0,721	0,588	6,325	1,575

pseudomallei, isolat TNH15, dan TNH30 merupakan genus *Vibrio alginolyticus*, adapun isolat TNH23 merupakan *Aeromonas hydrophila*.

KESIMPULAN

Koloidal kitin yang diproduksi dari limbah cangkang udang windu dapat digunakan sebagai substrat untuk mendapatkan mikroorganisme kitinolitik. Enam isolat yang

diperoleh dari lumpur sawah mempunyai aktivitas kitinolitik. Aktivitas kitinase tertinggi ditunjukkan oleh isolat TNH54 yaitu 0,331 U/mL pada hari ke-2 dengan aktivitas spesifik 0,721 U/mg. Enam isolat tersebut mempunyai genus yang berbeda, diduga TNH8, TNH11 dan TNH54 merupakan *Burkholderia pseudomallei*, isolat TNH15, dan TNH30 merupakan genus *Vibrio alginolyticus*, adapun isolat TNH23 merupakan *Aeromonas hydrophila*

UCAPAN TERIMA KASIH

Sebagian dari penelitian ini didanai oleh Dana Dikti DP2M Penelitian Hibah Bersaing XVI tahun 2008.

PUSTAKA

- Berg Gabriele, Frankowski and Bahl, H., 1999, *Biocontrol of Verticillium Wilt in Oilseed rape by Chitinolytic Serratia plymuthica*, Microbiology, University of Rostock, German.
- Bollag, M. Daniel, Rozycki, M. D., Edelstein, S. J., 1996, *Protein Methods*, 2nd edition, John Wiley & Sons, Inc., New York
- Chernin, L. S., Winson, M. K., Thompson, J. M., 1998, *Chitinolytic Activity in Chromobacterium violaceum : Substrat analysis and regulation by quorum sensing*, Journal of Bacteriology, Vol. 180 (17).
- Folders Jindra, Algra Jon, Roelofs Marc S. and Bitter Wilbert, 2001, *Characterization of Pseudomonas aeoginosa Chitinase a Gradually Secreted Protein*, Journal of Bacteriology, Vol. 183(24).
- Guo, S. H., Chen J. K. and Lee, W. C., 2004, *Purification and Characterization of Extracellular Chitinase From Aeromonas schubertii*, Enzyme and Microbial Technology, 35 : 550-556
- Hsu, S. C and Lockwood, J. L., 1975, *Powdreed Chitin Agar As a Selective Medium for Enumeration of Actinomycetes in Water and Soil*, Applied Microbiology, Vol. 29 (3) : 422-426.
- Huang, J. H and Chen J. J., 2005, *Production of Chitinolytic Enzymes from a Novel Species of Aeromonas*, Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology
- Indra dan Syafris, 1993, *Hidrolisis Khitin Menjadi Khitosan serta Aplikasinya Sebagai Pendukung Padat*, Jurusan Kimia FMIPA ITS, Surabaya.
- Judoamidjojo, M., Darwis, A. Z., dan Sa'id, E. G., 1992, *Teknologi Fermentasi*, PAU-Bioteknologi Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Lehninger A. L., 1995, *Dasar-dasar Biokimia*, terjemahan Maggy Thenawidjaya, Penerbit Erlangga, Jakarta.
- Minarsih dan Santoso, 2003, *Identification and Cloning of Antifungal Gene Enzyme Activity of Chitinase, Growth, Pattern, and RNA Synthesis of Trichoderma harzianum*, Indonesian Biotechnology Research.
- Monreal J. and Reese, E. T., 1969, *The Chitinase of Serratia marcescens*, Canadian Journal of Microbiology, 15 : 689-696.
- Nielsen, M. N, Sørensen Jan, 1999, *Chitinolytic Activity of Pseudomonas fluorescens isolates from barley and sugar beet rhizosphere*, Microbiology Ecology, vol 30
- Nugroho, T, 2003, *Isolasi dan Karakterisasi Sebagian Kitinase Trichoderma viride TNJ63*, Jurnal Natur Indonesia, 5(2) : 101-106
- Ogawa Kihachiro, et al, 2002, *Purification and Characterization of a Novel Chitinase from Burkholderia cepacia strain KH2 isolated from the Bed Log of Lentinus edodes, Shiitake mushroom*, J. Gen. Appl. Microbiol., 48 : 25-33.
- Park, S. H., Lee, J. H., and Lee, H. K., 2000, *The Journal of Microbiology*, Vol. 38 (4) : 224-229.
- Rattanakit N, Plikomol A, Yano S, Wakayama M, Tachiki T (2002). *Utilization of shrimp shellfish waste as a substrate for solid-state cultivation of Aspergillus sp. S1-13: Evaluation of a culture based on chitinase formation which is necessary for chitin-assimilation*. J.
- Suraini, A. A., Sin T. L., Alitheen N., Shahab N. and Kamaruddin K., 2008, *Microbial Degradation of Chitin Materials by Trichoderma virens UKMI*, Journal of Biological Science, Vol. 8 (1) : 52-59
- Wang San-Lang and Chang Wen-Tsu, 1997, *Applied and Environmental Microbiology*, 380-386

