

**ISOLASI BAKTERI KITINOLITIK DARI LUMPUR MANGROVE  
BEEJAY BAKAU RESORT DAN UJI AKTIVITAS ENZIM KITINASE  
DENGAN VARIASI SUHU INKUBASI**

**SKRIPSI**

Oleh:  
**MIFTAHUL MUTHMAINNAH**  
**NIM.12630096**



**JURUSAN KIMIA  
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI  
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK BRAHIM  
MALANG  
2018**

**ISOLASI BAKTERI KITINOLITIK DARI LUMPUR MANGROVE  
BEEJAY BAKAU RESORT DAN UJI AKTIVITAS ENZIM KITINASE  
DENGAN VARIASI SUHU INKUBASI**

**SKRIPSI**

Oleh:  
**MIFTAHUL MUTHMAINNAH**  
**NIM.12630096**

**Diajukan Kepada:**  
**Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang**  
**Untuk Memenuhi Salah Satu Persyaratan dalam**  
**Memperoleh Gelas Sarjana Sains (S.Si)**

**JURUSAN KIMIA**  
**FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI**  
**UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM**  
**MALANG**  
**2018**

**ISOLASI BAKTERI KITINOLITIK DARI LUMPUR MANGROVE  
BEEJAY BAKAU RESORT DAN UJI AKTIVITAS ENZIM KITINASE  
DENGAN VARIASI SUHU INKUBASI**


**SKRIPSI**


Oleh:  
**MIFTAHUL MUTHMAINNAH**  
NIM. 12630096

Telah Diperiksa Dan Dipersetujui untuk Diuji:  
Tanggal: 15 Februari 2018

Pembimbing I


Pembimbing II

  
Hj. Akyunul Jannah, S.Si., M.P  
NIP. 19750410 200501 2 009

  
Ahmad Hanapi, M.Sc.  
NIDT. 19851225 20160801 1 069

Mengetahui,  
Ketua Jurusan Kimia  
Fakultas Sains dan Teknologi  
Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang



  
Elok Kamillah Hayati, M.Si  
NIP. 19790620/200604 2 002

**ISOLASI BAKTERI KITINOLITIK DARI LUMPUR MANGROVE  
BEEJAY BAKAU RESORT DAN UJI AKTIVITAS ENZIM KITINASE  
DENGAN VARIASI SUHU INKUBASI**

**SKRIPSI**

Oleh:  
**MIFTAHUL MUTHMAINNAH**  
NIM. 12630096

Telah dipertahankan di Depan Dewan Penguji Skripsi  
Dan Dinyatakan Diterima Sebagai Salah Satu Persyaratan  
Untuk Memperoleh Gelas Sarjana Sains (S.Si):  
Tanggal: 15 Februari 2018

- |                       |  |         |
|-----------------------|--|---------|
| 1. Penguji Utama      | : Elok Kamilah Hayati, M.Si<br>NIP. 19790620 200604 2 002    | (.....) |
| 2. Ketua Penguji      | : Anik Maunatin S.T, M.P<br>NIDT. 19760105 20180201 2 248    | (.....) |
| 3. Sekretaris Penguji | : Hj. Akyunul Jannah S.Si, M.P<br>NIP. 19750410 200501 2 009 | (.....) |
| 4. Anggota Penguji    | : Ahmad Hanapi, M.Sc<br>NIDT. 19851225 20160801 1 069        | (.....) |

Mengesahkan,  
Ketua Jurusan Kimia  
Fakultas Sains dan Teknologi  
Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang



Elok Kamilah Hayati, M.Si  
NIP. 19790620 200604 2 002

## LEMBAR PERSEMBAHAN

Tugas akhir ini akan kupersembahkan kepada

Kedua orang tuaku, Dosen serta Guru-guruku yang telah sabar membimbing dan menasihati, serta meluangkan waktunya yang tidak tergantikan dengan sesuatu apapun. Serta berbagai support baik riil maupun materiil yang telah diberikan kepadaku. Semoga Allah menjaga beliau semua dalam kebaikan dan limpahan rahmatNya yang Maha Rahim.

Karya ini adalah bagian kecil hasil jerih payahmu yang selama ini engkau luahkan dalam mendidiku. Teruntuk Abi Mochamad Samir S.Pd dan Umi Murniani yang tidak henti memberikan support, doa dan kasih sayang yang mendalam. Teruntuk pasangan dunia akhirat Taufik Rohman, S.T. Mereka semua adalah ruh diri yang terus menyemangati penulis dalam menyelesaikan studi ini.

Aku mengucapkan terima kasih pula kepada kelima adik nan unik. Yang dengan caranya mereka memberi aku senyuman dan bahagia. Thoriq, Syuhada, Tazkia, Azis dan Rouf. Semoga Allah menjaga mereka tetap dalam kebaikan dan tumbuh menjadi insan yang bermanfaat. Tidak lupa kuucapkan beribu terima kasih kepada ketiga sahabatku Farda, Luluk dan Ita, semoga persahabatan ini sampai ke syurga-Nya

**SURAT PERNYATAAN  
ORISINALITAS PENELITIAN**

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Miftahul Muthmainnah

NIM : 12630096

Fakultas/Jurusan : Sains dan Teknologi/Kimia

Judul penelitian : Isolasi Bakteri Kitinolitik dari Lumpur Mangrove Beejay Bakau Resort dan Uji Aktivitas Enzim Kitinase dengan Variasi Suhu Inkubasi

Menyatakan dengan sebenar-benarnya bahwa hasil penelitian saya ini tidak terdapat unsur-unsur penjiplakan karya penelitian atau karya ilmiah yang pernah dilakukan atau dibuat oleh orang lain, kecuali yang secara tertulis telah dikutip dalam naskah ini dan disebutkan dalam sumber kutipan dan daftar pustaka.

Apabila ternyata hasil penelitian ini terbukti terdapat unsur jiplakan, maka saya bersedia untuk mempertanggung jawabkan, serta diproses sesuai peraturan yang berlaku.

Malang, 19 Februari 2018  
Yang Membuat Pernyataan,



Miftahul Muthmainnah  
NIM. 12630096

## KATA PENGANTAR

*Assalamu'alaikum wa Rahmatullahi wa Barokatuh*

Puji syukur penulis ucapkan kehadiran Allah SWT karena atas limpahan rahmat dan hidayah-Nya, sehingga penulis mampu menyelesaikan skripsi ini dengan judul “*Isolasi Bakteri Kitinolitik dari Lumpur Mangrove Beejay Bakau Resort dan Uji Aktivitas Enzim Kitinase dengan Variasi Suhu Inkubasi*”. Shalawat serta salam senantiasa tercurahkan kepada nabi Muhammad SAW yang telah memberi bimbingan ke jalan yang diridhoi Allah SWT.

Penyelesaian penelitian ini tidak lepas dari bantuan berbagai pihak. Oleh karena itu, seiring terselesaikannya penyusunan skripsi ini, dengan penuh rasa hormat, kesungguhan dan kerendahan hati, penulis mengucapkan banyak terima kasih kepada:

1. Prof. H. Abdul Haris, M.A., selaku Rektor Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
2. Ibu Dr. Sri Harini, Msi., selaku Dekan Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
3. Ibu Elok Kamilah Hayati, M. Si., selaku Ketua Jurusan Kimia Fakultas sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
4. Ibu Hj. Akyunul Jannah, S.Si. M. P. Selaku Pembimbing I dan Bapak Ahmad Hanapi, M.Sc selaku Pembimbing II
5. Ibu Anik Maunatin, S.T., M.P, selaku konsultan yang telah meluangkan waktu untuk membimbing, memberi arahan dan nasihat kepada penulis hingga terselesaikannya penelitian ini.

6. Ibu Elok Kamilah Hayati, M.Si., selaku penguji.
7. Seluruh teman-teman Farda Farchana, Chafidzatul Ulum, dan Tri Zulfi Anita keluarga besar Paguyuban Akhwat Sholihah yang telah memberi dukungan dan semangat kepada penulis.

Penulis menyadari bahwa skripsi ini masih jauh dari sempurna. Akhirnya tiada kata selain harapan semoga skripsi ini bermanfa'at sesuai dengan maksud dan tujuannya. Amin Ya Rabbal Alamin.

*Wassalamu'alaikum wa Rahmatullohi wa Barokatuh*

Malang, 19 Februari 2018

Penulis





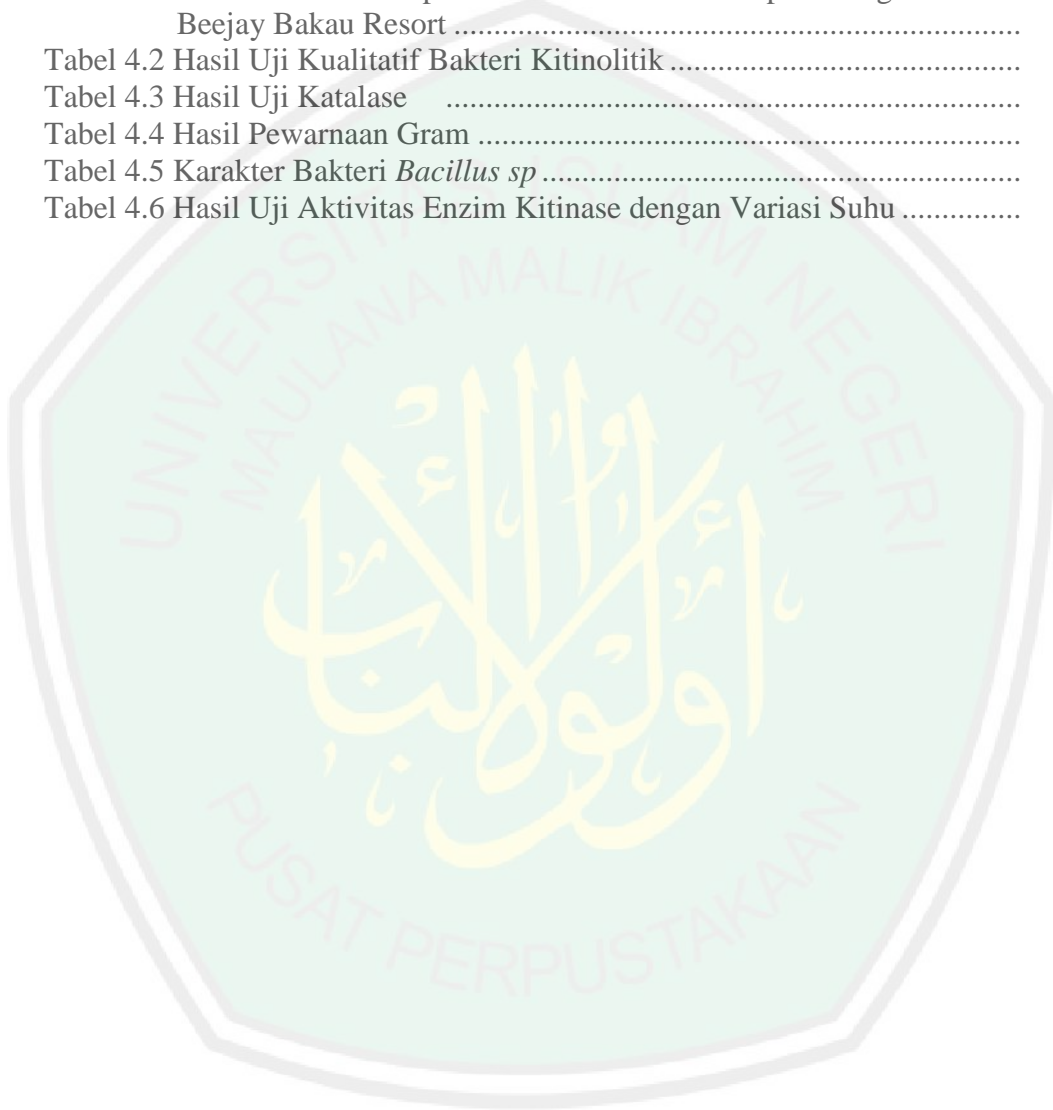
## DAFTAR ISI

	<b>Halaman</b>
HALAMAN JUDUL.....	i
HALAMAN PERSETUJUAN.....	ii
HALAMAN PENGESAHAN.....	iii
HALAMAN PERSEMBAHAN .....	iv
HALAMAN PERNYATAAN .....	v
KATA PENGANTAR .....	vi
DAFTAR ISI.....	viii
DAFTAR TABEL.....	x
DAFTAR GAMBAR .....	xi
DAFTAR LAMPIRAN.....	xii
ABSTRAK.....	xiii
ABSTRACT.....	xiv
الخلاصة.....	xv
<b>BAB I PENDAHULUAN .....</b>	<b>1</b>
1.1 Latar Belakang .....	1
1.2 Rumusan Permasalahan .....	6
1.3 Tujuan Penelitian .....	6
1.4 Batasan Masalah .....	7
1.5 Manfaat Penelitian .....	7
<b>BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....</b>	<b>8</b>
2.1 Mangrove dan Ekosistem Fauna Laut .....	8
2.2 Udang .....	10
2.3 Bakteri Kitinolitik dan Kitinase.....	13
2.4 Klasifikasi Enzim Kitinase .....	16
2.5 Identifikasi Bakteri Kitinolitik.....	17
2.5.1. Identifikasi Morfologi.....	17
2.5.2. Pewarnaan Gram.....	20
2.5.3. Pewarnaan Endospora.....	21
2.5.4. Uji Katalase .....	22
2.6. Uji Kualitatif Bakteri dengan Congo Red .....	23
2.7 Uji Aktivitas Enzim Kitinase dengan Metode DNS .....	24
2.8 Spektrofotometer <i>UV-Vis</i> .....	25
<b>BAB III METODOLOGI PENELITIAN.....</b>	<b>27</b>
3.1 Waktu dan Tempat Penelitian.....	27
3.2 Alat dan Bahan .....	27
3.2.1 Alat .....	27
3.2.2 Bahan .....	27
3.3 Rancangan Penelitian .....	28
3.4. Tahapan Penelitian .....	29
3.5 Pelaksanaan Penelitian .....	30

3.5.1 Preparasi Alat dan Bahan .....	30
3.5.2 Pembuatan Koloidal Kitin .....	30
3.5.3 Pembuatan Media .....	31
3.5.3.1. Media Isolasi Bakteri.....	31
3.5.3.2. Media Kultur Bakteri.....	31
3.5.4 Isolasi dan Seleksi Bakteri Kitinolitik dari Lumpur Mangrove ..	31
3.5.5 Uji Bakteri Kitinolitik Secara Kualitatif.....	32
3.5.6 Karakterisasi Bakteri Kitinolitik.....	32
3.5.6.1 Identifikasi Makroskopis.....	32
3.5.6.2 Uji Katalase .....	32
3.5.6.3 Pewarnaan Endospora.....	33
3.5.6.4 Pewarnaan Gram .....	33
3.5.7 Pembuatan Kurva Pertumbuhan Bakteri .....	34
3.5.8. Produksi Kitinase.....	34
3.5.9. Uji Aktivitas Enzim Kitinase.....	34
3.5.9.1 Pembuatan Kurva Standar.....	34
3.5.9.2 Uji Aktivitas Enzim Kitinase dengan Variasi Suhu.....	35
3.5.10. Analisis Data.....	35
<b>BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN .....</b>	<b>36</b>
4.1 Pembuatan Koloidal Kitin .....	36
4.2 Isolasi dan Seleksi Bakteri Kitinolitik.....	37
4.3 Uji Bakteri Kitinolitik Secara Kualitatif.....	39
4.4 Karakterisasi Mikroskopis Bakteri Kitinolitik .....	43
4.4.1 Uji Katalase Bakteri Kitinolitik .....	43
4.4.2 Uji Pewarnaan Gram .....	44
4.4.3 Uji Endospora .....	48
4.5 Kurva Pertumbuhan Bakteri Kitinolitik .....	49
4.6 Uji Aktivitas Enzim Kitinase.....	52
4.7 Hikmah Penelitian .....	54
<b>BAB V KESIMPULAN DAN SARAN.....</b>	<b>57</b>
5.1 Kesimpulan .....	57
5.2 Saran .....	57
<b>DAFTAR PUSTAKA .....</b>	<b>58</b>
<b>LAMPIRAN-LAMPIRAN.....</b>	<b>65</b>

## DAFTAR TABEL

	<b>Halaman</b>
Tabel 2.1 Komponen Penyusun Cangkang Udang .....	10
Tabel 2.2 Hasil Identifikasi Bakteri Kitinolitik .....	19
Tabel 2.3 Warna-warna Komplementer pada Spektrum Sinar Tampak .....	26
Tabel 4.1 Karakter Makroskopis Isolat Bakteri asal Lumpur Mangrove Beejay Bakau Resort .....	39
Tabel 4.2 Hasil Uji Kualitatif Bakteri Kitinolitik .....	41
Tabel 4.3 Hasil Uji Katalase .....	43
Tabel 4.4 Hasil Pewarnaan Gram .....	45
Tabel 4.5 Karakter Bakteri <i>Bacillus sp</i> .....	49
Tabel 4.6 Hasil Uji Aktivitas Enzim Kitinase dengan Variasi Suhu .....	53



## DAFTAR GAMBAR

	<b>Halaman</b>
Gambar 2.1 Struktur Kitin .....	11
Gambar 2.2 Mekanisme Kerja Enzim Kitinase .....	15
Gambar 2.3 Proses Sporulasi .....	22
Gambar 2.4 Reaksi Uji Katalase .....	23
Gambar 2.5 Struktur Congo Red .....	23
Gambar 2.6 Reaksi DNS dengan Glukosa .....	24
Gambar 4.1 Reaksi Demineralisasi .....	37
Gambar 4.2 Zona Bening Hasil Uji Kualitatif Bakteri Kitinolitik.....	41
Gambar 4.3 Ikatan Hidrogen Antara Congo Red Dengan Kitin.....	42
Gambar 4.4 Mekanisme Kerja Enzim Kitinase .....	42
Gambar 4.5 Reaksi Degradasi H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> oleh Enzim Katalase .....	44
Gambar 4.6 Hasil Pewarnaan Isolat A dan B .....	45
Gambar 4.7 Struktur Sel Bakteri Gram Positif .....	46
Gambar 4.8 Hasil Pewarnaan Endospora.....	48
Gambar 4.9 Kurva Pertumbuhan Bakteri Kitinolitik.....	50

## DAFTAR LAMPIRAN

	<b>Halaman</b>
Lampiran 1	Metodologi Penelitian ..... 65
Lampiran 2	Preparasi Larutan ..... 74
Lampiran 3	Menentukan Kurva Standart N-asetil glukosamin ..... 79
Lampiran 4	Pengukuran Absorbansi dan Aktivitas Ekstrak Kasar Kitinase dengan Variasi Suhu ..... 80
Lampiran 5	Dokumentasi ..... 83
Lampiran 6	Statistik Two Way ANOVA ..... 88



## ABSTRAK

Muthmainnah, Miftahul. 2018. Isolasi Bakteri Kitinolitik dari Lumpur Tanaman Bakau Beejay Bakau Resort dan Uji Aktivitas Enzim Kitinase dengan Variasi Suhu Inkubasi. Skripsi. Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang. Pembimbing: (I) Akyunul Jannah, S.Si, M.P. (II) Ahmad Hanapi M,Sc.

---

Kata Kunci: Lumpur Mangrove, Isolasi Bakteri Kitinolitik, Enzim Kitinase, Aktivitas enzim, standar N-asetil glukosamin

Enzim kitinase merupakan enzim yang digunakan untuk mendegradasi kitin sebagai limbah alam. Enzim kitinase dapat diproduksi oleh bakteri kitinolitik. Bakteri kitinolitik dapat diisolasi dari tanah dan air. Lumpur mangrove merupakan salah satu tempat berkembangnya bakteri kitinolitik karena mangrove menjadi habitat dari beberapa jenis udang dan kepiting. Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi bakteri kitinolitik yang mampu memproduksi enzim kitinase dan menguji aktivitas ekstrak kasar enzim dengan variasi suhu inkubasi.

Penelitian ini diawali dengan tahapan isolasi dan seleksi bakteri menggunakan media selektif pertumbuhan bakteri kitinolitik yang mengandung kitin dan karakterisasi bakteri secara makroskopis dan mikroskopis. Kemudian tahapan selanjutnya yaitu produksi enzim kitinase kasar dan uji aktivitas enzim dengan variasi suhu inkubasi antara 30°C-50°C. Pengujian aktivitas enzim menggunakan metode DNS (*3,5-asam dinitrosalisilat*) dengan standart N-asetil glukosamin.

Hasil penelitian ditemukan 5 isolat bakteri yang berhasil diisolasi dari lumour mangrove Beejay Bakau Resort. Isolat yang memiliki aktivitas kitinolitik terbesar adalah isolat A dan B dengan indeks kitinolitik sebesar 0,65 dan 0,6. Kedua isolat memiliki sifat gram-positif, endospora dan memiliki aktivitas katalase. Enzim kitinase memiliki aktivitas optimum pada suhu 45°C dengan nilai 0,0943 U/ml untuk isolat A dan 0,1705 U/ml untuk isolat B.

## ABSTRACT

Muthmainnah, Miftahul. 2018. Isolation of Chitinolytic Bacteria from Mangrove Mud of *Beejay Bakau Resort* and Chitinase Activity Assay with Various Incubated Temperature. Thesis. Chemistry Department Science and Technology Faculty Islamic State University of Maulana Malik Ibrahim Malang. Supervisor: (I) Akyunul Jannah, S.Si, M.P. Supervisor: (II) Ahmad Hanapi M,Sc.

---

**Key Words:** Mangrove Mud, Isolation Chitinolytic Bacteria, Chitinase Enzyme, Enzyme Activity, N-acetyl glucosamine standart

Chitinase enzyme is an enzyme which is used to degrade chitin as a natural waste. Chitinase enzyme could be produced by Chitinolytic bacteria. Chitinolytic bacteria could be isolated from soil and water. Mangrove soil is a one of place for chitinolytic bacteria growth because it is a habitat for some shrimps and crabs. The purpose of this study was to isolated chitinolytic bacteria that produced chitinase enzyme and crude enzyme activity tested with various incubation temperature.

This research begun with isolation and selection step for this bacteria using the chitinolytic bacteria selective agar that contain chitin, and then characterization of the bacteria using macroscopic and microscopic assay. The next step was crude enzyme production, it's activity was tested with temperature between 30°C-50°C. Crude chitinase assay using DNS (*3,5-dinitrocalicilat acid*) method with N-acetyl glucosamine as a standart.

The result of experiment found five isolates were isolated from mangrove mud of Beejay Bakau Resort. Isolate A and B showed the largest chitinolytic activity with chitinolytic index for both are 0.65 and 0.6. Isolate A and B is a Gram-positive bacteria, it has an endospore and has a catalase activity. The optimum temperature for crude enzyme chitinase is 45°C with the activity 0,0943 U/ml for isolate A and 0,1705 U/ml for isolate B.

## الخلاصة

المطبعة، مفتاح. ٢٠١٨. عزل البكتيري الكيتينوليتيك من الأرض طينية منغروف *Beejay Bakau Resort* والإختبار النشاط الإنزيمية باختلاف درجة الحرارة الحضانة. المقالة. بإدارة الكيمياء كلية العلوم والتكنولوجيا الجامعة الدولية الإسلامية مولانا مالك إبراهيم ملغ. المستشار الأولى: أكين الجنة الماجستير. والمستشار الثاني: أحمد حنفي الماجستير.

مفتاح الكلمات: أرض طينية، عزل البكتيري الكيتينوليتيك، إنزيم كيتيناسي، نشاط الإنزيمية، قياس *N-asetil glukosamin*.

إنزيم كيتيناسي هو الإنزيم الذي يستخدم لتحليل تشيين كنفيات الطبيعية. يمكن إنتاج إنزيم كيتيناسي بالبكتيري الكيتينوليتيك. يمكن عزل البكتيري الكيتينوليتيك من الأرض أو الماء. والأرض الطينية تكون موقع النامي للبكتيري لأنها الوئل لجميري و سلطعون. والهدف لهذا البحث يعني لعزم البكتيري الكيتينوليتيك الذي يستطيع أن إنتاج إنزيم كيتيناسي بإختباري النشاطه باختلاف درجة الحرارة الحضانة.

الخطوة الأولى لهذا البحث يعني لعزم و الإختبار البكتيري الكيتينوليتيك بإستخدام وسائط الحاض للبكتيري. والخطوة الثاني يعني إنتاج إنزيم و إختباره باختلاف دراحة الحرارة الحضانة بين ٣٠-٥٠ درجة ساسيوس. إختبارنشاط الإنزيم بأسلوب (*DNS (3,5-asam dinitrosalisilat)*.

وجدت نتائج البحث خمس عزلات من الأرض طينية منغروف. وظهرت عزل أ و ب بأكبر النشاط الإنزيمية ب- *indeks kitinolitik* ٠,٦٥ و ٠,٦. يملك عزل أ و ب طابع غرم بوسيتف، إندوسبورا و كتلسي. و أفضل درجة الحرارة المثلي في درجة ٤٥ درجة سلسيوس بنشاط الإنزيم يعني ٠,١٧٥ U/ml لعزل أ و ٠,٠٩٤٣ U/ml لعزل ب.





## BAB I PENDAHULUAN

### 1.1.Latar Belakang

Indonesia sebagai salah satu Negara tropis yang memiliki kekayaan hutan mangrove yang sangat luas. Menurut *Spalding et al.*, (2010) pada tahun 2010 diperkirakan total luas mangrove sebesar 60% dari total seluruh mangrove yang ada di kawasan asia tenggara mencapai 3.189.359 hektare. Luas mangrove tersebut menutupi 20% jumlah total seluruh mangrove yang ada di dunia. Mangrove memiliki berbagai macam kekayaan. Diantaranya kekayaan flora dan fauna, termasuk kekayaan mikrobiologi yang digunakan dalam bidang bioteknologi yang saat ini mulai dikembangkan. Namun, belum banyak yang melakukan penelitian tentang potensi mikrobiologi mangrove dan pemanfaatannya dalam bidang bioteknologi. Mangrove memiliki peranan ekologis sebagai *nursery area* dan habitat dari berbagai macam jenis ikan, udang, kepiting, kerang dan yang lainnya. Selain itu, mangrove juga menjadi sumber berbagai macam makanan bagi fauna yang bermigrasi. Misalnya adalah burung-burung pantai dalam Sulistyowati *dkk*, (2009). Selain menjadi habitat jenis artropoda, mangrove juga memiliki keanekaragaman dalam mikrobiologi bakteri. Allah berfirman dalam Surat An-Nahl ayat 13

وَمَا ذَرَأْنَا لَكُمْ فِي الْأَرْضِ مُخْتَلِفًا أَلْوَنًا، إِنَّ فِي ذَلِكَ لَآيَةً لِّقَوْمٍ يَتَذَكَّرُونَ ۝ ١٣

“dan Dia (menundukkan pula) apa yang Dia ciptakan untuk kamu di bumi ini dengan berlain-lainan macamnya. Sesungguhnya pada yang demikian itu benar-benar terdapat tanda (kekuasaan Allah) bagi kaum yang mengambil pelajaran”

Al Qurthubi dalam tafsirnya menjelaskan maksud dari Firman Allah “وما ذرأ” Dan Dia yang menundukkan pula apa yang telah Dia ciptakan. Maksud dari

kalimat tersebut adalah menundukkan apa yang Dia ciptakan di muka bumi semuanya adalah untuk manusia. Dia juga lah yang telah membuat dan mengadakan. Allah SWT telah menundukkan apa-apa yang ada di bumi ini dari segala macam ciptaannya yang berbeda-beda karakter dan keistimewanya. Salah satu ciptaan-Nya yang telah Dia tundukkan adalah bakteri yang berukuran sangat kecil yang tidak terlihat oleh mata. Allah SWT telah menundukkan dan memberikan keistimewaan kepadanya, walaupun yang Dia ciptakan ukurannya sangat kecil dan tidak terlihat dengan mata telanjang. Dimana bakteri ini banyak sekali hidup disekitar kita. Bahkan jumlahnya yang tidak terhingga. Bakteri merupakan makhluk hidup yang berukuran mikroskopis yang tidak dapat dilihat dengan mata telanjang dalam Volk dan Wheeler, (1993).

Menurut *Das et al.*, (2006) ada berbagai macam jenis bakteri yang dapat diisolasi dari ekosistem mangrove, dimana bakteri-bakteri tersebut menghasilkan variasi aktivitas yang beraneka ragam. Aktivitas bakteri yang berasal dari mangrove berupa bakteri fotosintesis, bakteri pendaur ulang nitrogen, metanogenesis, agarolisis dan bakteri penghasil enzim. Enzim yang dapat diisolasi dari mangrove diantaranya adalah enzim kitinase. Dari berbagai jenis bakteri yang menghasilkan enzim tersebut hanya sedikit yang telah dieksplorasi dan diketahui manfaatnya. Salah satu bakteri yang bermanfaat dalam bidang bioteknologi adalah bakteri yang mampu menghasilkan enzim kitinase.

Enzim kitinase merupakan enzim yang berguna untuk mendegradasi kitin. Enzim kitinase termasuk ke dalam kelompok enzim hidrolase yang dapat mengubah polimer kitin menjadi monomer  $\beta$ -1,4 N-asetilglukosamin. Enzim kitinase dapat dijadikan sebagai agen biokontrol hama tanaman dan dalam proses

pengolahan limbah industri yang mengandung kitin. Pada bidang pertanian kitinase berfungsi sebagai agen biokontrol yang berperan dalam pembunuhan larva *Haemoncus contortus* dengan cara mendegradasi dan melisiskan dinding kulit larva cacing dalam Pratiwi *dkk*, (2015). Enzim kitinase dapat diisolasi dari bermacam-macam bakteri kitinolitik (Setyahadi *dkk*, 2006). Penelitian ini perlu dilakukan dengan asumsi bahwa di dalam lumpur mangrove terdapat bakteri kitinolitik yang dapat memproduksi enzim kitinase untuk mendegradasi kitin, mengingat mangrove merupakan habitat bagi sekelompok udang dan kepiting.

Biodiversitas dari bakteri kitinolitik sendiri berbeda-beda di setiap daerah. Menurut Pratiwi *dkk*, (2015) mikroorganisme penghasil enzim kitinase dapat diisolasi dari air dan tanah dan produksinya dari sumber mikroorganisme menjadi produsen penghasil enzim yang lebih baik dibandingkan dengan produsen yang lain dikarenakan waktu produksi yang relative singkat. Berbagai macam genus bakteri kitinolitik yang dapat menghasilkan enzim kitinase diantaranya adalah *Aeromonas*, *Alteromonas*, *Chromobacterium*, *Enterobacter*, *Ewingella*, *Pseudoalteromonas*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Vibrio* (Gooday, 1994), *Bacillus*, dan *Pyrococcus* (Tronsmo *et al.*,1993).

Spesies bakteri kitinolitik yang berasal dari kawasan marine diantaranya adalah *Bacillus licheniformis* (Kamil *et al*,2007), *Bacillus circulans* (Ikegami,2000), *Bacillus thuringiensis* (Chaiharn and Lumyong,2012), *Bacillus thermoalkalophilus* (Purwani *et al*,2004), dan *Bacillus subtilis* (Wang *et al*,2006) *Pseudomonas* dengan spesies *Pseudomonas pseudomallei* (Purkan *et al*,2014), *Pseudomonas aureginosa* (Wang *et al*,1997), *Pseudomonas subrubra* dan *Pseudomonas cryotasia* (Campbell and William,1951) dan *Vibrio sp* dengan

spesies *Vibrio harveyi* (Stivil *et al.*,1997), *Vibrio furnishii* (Bassler,1991) adalah jenis yang dapat menghasilkan aktivitas kitinolitik. Pendapat tersebut juga dikuatkan oleh (Sahoo dan Dhal.,2008) bahwa sebagian besar genus *Bacillus sp* dan *Vibrio sp* dapat menghasilkan aktivitas kitinolitik.

Herdyastuti *dkk.*, (2010) melakukan isolasi dan pengujian aktivitas bakteri kitinolitik dari lumpur sawah, hasil penelitian ini menunjukkan aktivitas enzim berkisar antara 0,24-0,33 U/ml. Penelitian lain yang telah dilakukan adalah karakterisasi enzim dari isolate murni bakteri yang diisolasi dari terasi Novindri *dkk.*, (2008) dengan aktivitas sebesar 1.759 U/ml. Deepthi *et al.*,. (2012) melakukan isolasi bakteri aktinomisetes dan bakteri penghasil enzim yang diisolasi dari tanah hutan mangrove Coringa di India menunjukkan bahwa kitinase adalah salah satu enzim yang dapat diisolasi dari mangrove dengan aktivitas enzim terbesar yaitu 1.356 U/ml. Variasi aktivitas enzim kitinase itulah yang menjadi acuan agar dilakukan eksplorasi lebih jauh dalam mencari bakteri kitinolitik yang memiliki aktivitas yang lebih besar dan dapat bermanfaat dalam berbagai bidang.

Aktivitas optimum enzim kitinase dapat dipengaruhi oleh beberapa faktor. Faktor yang mempengaruhi diantaranya ialah konsentrasi enzim, Konsentrasi substrat, suhu, pH dan inhibitor logam (Poedjadi dan Supriyanti, 2012). Menurut Annamalai *et al.*,.2011 aktivitas optimum enzim kitinase berada pada suhu 40°C dengan aktivitas spesifik sebesar 100 U/ml. Selanjutnya Annamalai *et al.*,.2010 juga melaporkan bahwa aktivitas enzim kitinase yang berasal dari lingkungan laut memiliki aktivitas optimum pada suhu 40°C dengan aktivitas optimum sebesar 100 IU/mL. Purkan *dkk.*,.2014 melaporkan bahwa aktivitas enzim kitinase terus meningkat dimulai pada suhu 30°C-50°C dan aktivitas optimum

enzim kitinase berada pada suhu 50°C dengan aktivitas sebesar 7,0329 U/mL. Maka dari itu, dalam penelitian ini diambil variasi suhu dimulai pada rentang 30°C, 35°C, 40°C, 45°C dan 50°C.

Allah SWT bersabda dalam Al Qur'an bahwa segala sesuatu yang Dia ciptakan di langit maupun di bumi ini adalah tidak lain kecuali dengan hikmah yang terkandung di dalamnya. Begitu pula ketika Allah SWT telah menciptakan bakteri di bumi ini. Walaupun ukurannya sangat kecil bahkan tidak terlihat oleh mata Allah tetap menjadikan sesuatu itu bermanfaat untuk kelangsungan hidup manusia. Seperti dalam Q.S Saad ayat 27 yang berbunyi.

وَمَا خَلَقْنَا السَّمَاءَ وَالْأَرْضَ وَمَا بَيْنَهُمَا بَطْلًا ۚ أَذَلُّكَ ظُلُّ الَّذِينَ كَفَرُوا فَوَيْلٌ لِّلَّذِينَ كَفَرُوا مِنَ النَّارِ ۚ ٢٧

*“Dan Kami tidak menciptakan langit dan bumi dan apa yang ada antara keduanya tanpa hikmah. Yang demikian itu adalah anggapan orang-orang kafir, maka celakalah orang-orang kafir itu karena mereka akan masuk neraka” (Q.S. Saad: 27)*

Bakteri seringkali dimaknai sebagai ciptaan Allah yang berkonotasi negatif. Namun, melalui ayat tersebut Allah telah menjelaskan kepada kita bahwa Dia menciptakan langit dan bumi ini dan apa yang diantara keduanya kecuali dengan hikmah dan manfaat di dalamnya. Ibnu Katsir (2004) dalam tafsirnya menjelaskan bahwa Dia (Allah) tidak menciptakan satu makhluk pun dengan sia-sia, akan tetapi Dia menciptakan mereka untuk beribadah dan mengesakanNya. Maka sepatutnya penelitian ini dilakukan dalam rangka untuk semakin mendekatkan diri kita (manusia) kepada Sang Khaliq melalui hikmah yang Allah titipkan dalam bakteri kitinolitik yang diisolasi dari lumpur mangrove. Dimana bakteri tersebut mampu memproduksi enzim kitinase yang berguna untuk mendegradasi limbah kitin yang ada di alam ini.

## 1.2.Rumusan Masalah

Rumusan masalah yang diangkat dalam penelitian ini adalah:

1. Apakah bakteri kitinolitik dapat diisolasi dari lumpur mangrove?
2. Bagaimana pengaruh suhu terhadap aktivitas enzim kitinase yang dihasilkan oleh bakteri kitinolitik?

## 1.3.Tujuan Penelitian

Tujuan dalam penelitian ini adalah:

1. Untuk mencari bakteri kitinolitik yang diisolasi dari lumpur mangrove Beejay Bakau Resort Kota Probolinggo;
2. Untuk mengetahui pengaruh perbedaan suhu terhadap aktivitas enzim kitinase hasil isolat bakteri kitinolitik yang berasal dari lumpur mangrove Beejay Bakau Resort Kota Probolinggo.

## 1.4.Batasan Masalah

Batasan masalah dalam penelitian ini adalah:

1. Lumpur yang digunakan dalam isolasi berasal dari kawasan mangrove BeeJay Bakau Resort Kota Probolinggo Jawa Timur
2. Penentuan aktivitas enzim menggunakan faktor perbedaan suhu. Suhu yang digunakan adalah 30°C, 35°C, 40°C, 45°C dan 50°C.
3. Pengujian aktivitas enzim kitinase dengan variasi suhu inkubasi menggunakan isolat bakteri dengan aktivitas bakteri tertinggi hasil uji kualitatif bakteri kitinolitik.

## 1.5.Manfaat Penelitian

Manfaat dari adanya penelitian ini adalah eksplorasi kekayaan Indonesia yang beraneka ragam. Sehingga, menambah khazanah kekayaan enzim kitinase

yang dihasilkan dari bakteri kitinolitik yang berasal dari tanah mangrove kawasan Beejay Bakau Resort. Enzim kitinase sendiri berfungsi untuk mendegradasi kitin limbah alam.





## BAB II TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1. Mangrove dan Ekosistem Fauna Laut

Mangrove berasal dari bahasa portugis (*mangue*) yang artinya tumbuhan dan *Grove* yang berasal dari Bahasa inggris yang artinya belukar atau hutan kecil. Mangrove dapat disebut sebagai tumbuhan belukar atau tumbuhan yang hidup seperti hutan kecil. Ghufron, (2012) menyatakan bahwa mangrove merupakan kumpulan tumbuhan berkayu yang tumbuh di sekeliling garis pantai dan memiliki adaptasi tinggi dan hidup dalam kondisi salinitas payau yang tinggi. Menurut Setyawan *dkk*, (2002) Istilah mangrove digunakan secara luas untuk menamai tumbuhan yang dapat beradaptasi dengan baik pada ekosistem hutan tropis dan subtropis pasang-surut, meliputi pantai dangkal, muara sungai, delta, rawa belakang dan laguna.

Mangrove memiliki beragam fauna yang hidup dalam daerah tersebut. Termasuk biodiversitas mikroba. Sesendok teh lumpur mangrove mengandung lebih dari 10 juta bakteri, Jumlah ini lebih kaya dari lumpur manapun. Berbagai macam organisme mikro ditemukan dalam ekosistem mangrove. Diantaranya adalah fitoplankton yang didominasi oleh diatom khususnya genus *coscinodiscus*, *pleurosigma* dan *biddulphia*. Zooplankton yang berupa hewa akuatik semilasal protozoa, telur ikan dan larva semua hewan Echinodermata. Bakteri patogen juga terdapat dalam ekosistem majemuk yang ada dalam mangrove. Bakteri tersebut adalah *shigella*, *aeromonas* dan *vibrio*. Bakteri lignolitik, sellulolitik, proteolitik dapat menguraikan molekul organik besar seperti tanin dan sellulosa. Selain itu,

terdapat juga alga yang sering ditemukan menempel pada tumbuhan mangrove di akar penyangga dan akar napas. Menurut Setyawan *dkk*, (2002) dalam bukunya tentang biodiversitas Genetic, Spesies dan Ekosistem Mangrove di Jawa bahwa mikroba, bakteri, fungi, dan alga hijau-biru (*cyanobacteria*) merupakan elemen tanah mangrove yang penting.

Insekta juga ditemukan dalam ekosistem mangrove. Mulai dari jenis ngengat (*odites*), kutu (*Crypticerya jacobsoni* dan *Dysdercus decussatus*), kumbang (*monolepta*), lalat (*Elleipsa quadrifasciata*), semut (*tetraponera*) dan jangkrik (*Apteronemobius asahinai*). Selain insekta, crustacea dan chelicera juga banyak ditemukan dalam mangrove, semua hewan tersebut merupakan jenis arthropoda. Crustacea yang banyak ditemukan yaitu udang remis dan salah satu yang terkenal adalah kepiting lumpur (*Thalassina anomala*) yang dapat membentuk gundukan besar dan kepiting biola (*Uca spp*) yang capitnya besar. Crustacea lain yang hidup dalam ekosistem mangrove adalah *Macrobarchium equidens* (udang muara), *Caridina propinqua* (udang laut), *Penaeus* (udang laut), *Varua yui* (kepiting pendayung), *Scylla olivacea* (kepiting lumpur kuning), *Myomenippe harwicki* (kepiting batu), *Thalassina anomala* (kepiting lumpur), *Coenobita cavipes* (pong-pongan), dan *Euraphia withersi* (teritip) (Setyawan *dkk*, 2002). Chelicera yang dapat dijumpai di hutan mangrove antara lain laba-laba, contohnya *Hyllus diardii*, *Argiope mangal*, *Ligurra latidens*; kutu (mite), misalnya *Trombiculus*; dan kepiting ladam (*Carcinoscorpius rotundicauda*). Moluska, beserta Arthropoda, merupakan invertebrata paling banyak dijumpai di hutan mangrove, baik Gastropoda maupun Bivalvia. Contoh molusca yang hidup

di ekosistem mangrove yaitu *Nerita lineata*, *Chicoreus capucinus*, *Nassarius jacksonianus*, *Onchidium griseum*, dan *Marcia marmorata* (Setyawan *dkk*, 2002).

## 2.2. Udang

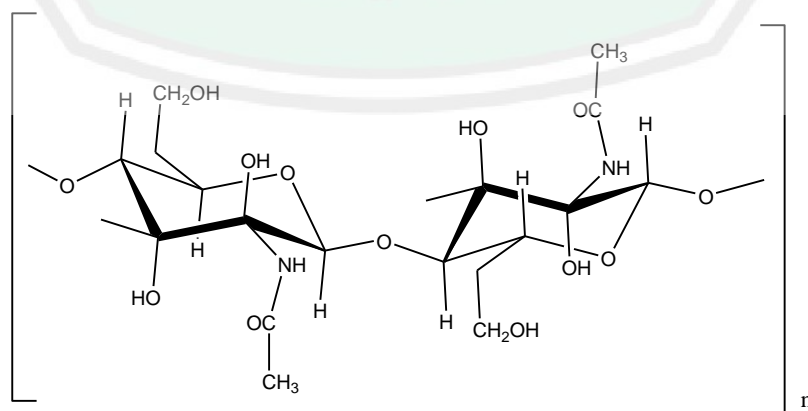
Umumnya Indonesia mengekspor udang dalam bentuk beku tanpa cangkang. Cangkang dari industri udang beku sangat melimpah sebagai limbah udang (Mawarda *dkk*, 2011). Limbah udang dapat diperoleh dari industri pengolahan udang beku dan pengalengan udang. Limbah udang tersebut pada umumnya terdiri dari bagian kepala, kulit ekor dan sedikit daging udang. Limbah udang yang dihasilkan dari proses tersebut berkisar antara 30–75% dari berat total udang (Darmawan *dkk*, 2007), dengan demikian jumlah limbah dari usaha pengolahan udang cukup tinggi. Cangkang udang mengandung serat, protein, lemak juga kitin. Komponen penyusun cangkang udang disajikan pada Tabel 2.1.

Tabel 2.1. Komponen penyusun cangkang udang

Komponen	Jumlah Komponen (%)
Air	7,87
Serat Kasar	26,89
Protein Kasar	24,03
Lemak	5,14
Kalsium	16,69
Kitin	0,85
Fosfor	18,7

Sumber: Cahyani, 2013.

Kitin yang merupakan komponen penyusun cangkang udang adalah suatu polisakarida alami dan polimer organik alam terbanyak kedua setelah selulosa (Tsigos *et al.*, 2000). Kitin merupakan suatu polisakarida struktural yang mengandung nitrogen dan bergabung dengan protein sebagai bahan dasar pembentuk kerangka luar (eksoskeleton) *Invertebrata* (Rahayu *dkk.*, 1999), dan melekat pada suatu matriks dari  $\text{CaCO}_3$  dan fosfat yang menyebabkan kerasnya kulit *crustaceae* (udang) dan *molusca* (kerang). Kitin termasuk golongan polisakarida yang mempunyai berat molekul tinggi dan merupakan polimer berantai lurus dengan nama lain  $\beta$  (1-4)-N-asetil-D4Glukosamin (Hirano *et al.*, 1986). Struktur kitin sama dengan selulosa dimana ikatan yang terjadi antara monomernya terangkai dengan ikatan glikosida pada posisi  $\beta$ -(1-4). Perbedaan antara kitin dengan selulosa adalah gugus hidroksil yang terikat pada atom karbon nomor dua digantikan oleh gugus asetamida ( $\text{NHCOCH}_3$ ), sehingga kitin menjadi sebuah polimer berunit N-asetilglukosamin sedangkan pada kitosan digantikan oleh gugus amin ( $\text{NH}_2$ ) (Fernandez *et al.*, 1982). Perbedaan struktur kitin, kitosan dan selulosa disajikan pada Gambar 2.1.



Gambar 2.1. Struktur kitin (Yurnaliza, 2002)

Kitin merupakan biopolimer kristalin yang tersebar di alam dengan 3 struktur yaitu  $\alpha$ ,  $\beta$ , dan  $\gamma$ . Struktur  $\alpha$  kitin terdapat dalam jumlah yang melimpah dalam bentuk isomorfus, struktur kristalinnya tersusun rapat, padat dengan rantai yang tersusun secara antiparalel serta mempunyai ikatan hidrogen yang kuat. Struktur  $\beta$  kitin rantainya tersusun secara paralel dengan gaya intermolekuler yang lemah, molekulnya kurang stabil dibandingkan dengan  $\alpha$  kitin. Sedangkan struktur  $\gamma$  kitin merupakan perpaduan antara  $\alpha$  dan  $\beta$  kitin (Matsumoto, 2006). Struktur  $\gamma$  kitin fibrilnya masing-masing tersusun dari tiga rantai, dua rantainya tersusun paralel dan rantai ketiga anti paralel (Yurnaliza, 2002). Kitin  $\alpha$  diantaranya terdapat pada Hydrozoa, nematoda, rotifer, dan arthropoda. Kitin  $\beta$  ditemukan pada molusca dan sebagai pembentuk dinding sel luar serangga, sedangkan kitin  $\gamma$  terdapat pada lambung cumi-cumi (Stivil *et al.*, 1993).

Unit monomer Kitin memiliki rumus molekul  $(C_8H_{13}NO_5)_n$  dengan komposisi perbandingan massa atom C: 47,29%, H : 6,45%, N : 6,89%, O : 39,37% (Hirano, 1976). Kitin merupakan zat padat yang tak berbentuk amorf, tidak dapat larut dalam air, asam anorganik encer, alkali encer dan pekat, serta alkohol tetapi larut dalam asam-asam mineral yang pekat. Rantai kitin tersusun atas ikatan hidrogen yang sangat kuat antara gugus NH dari satu rantai dan gugus C=O dari rantai berdekatan. Ikatan hidrogen menyebabkan kitin tidak dapat larut dalam air membentuk formasi serabut (fibril) (Yurnaliza, 2002). Sifat kitin yang tidak larut dalam air dan pelarut organik menyebabkan kitin harus dikonversi terlebih dahulu menjadi koloidal kitin sebelum digunakan pada suatu penelitian. Koloidal kitin adalah kitin yang telah dihidrolisis secara parsial dengan larutan asam klorida

(HCl) 10 N, sehingga ikatan hidrogen yang terdapat pada kitin terputus (Haran *et al.*, 1995).

Beberapa manfaat yang dapat diambil dari kitin dan derivatnya adalah pada bidang kedokteran atau kesehatan yaitu dapat digunakan sebagai immunoadjuvant (stimulator non spesifik respons imun), bahan dasar pembuatan benang operasi, benang operasi ini mempunyai keunggulan dapat diuraikan dan diserap dalam jaringan tubuh, tidak toksik, dapat disterilisasi dan dapat disimpan lama (Kaban, 2009). Senyawa N-asetil glukosamin hasil hidrolisis kitin digunakan dalam pengobatan osteoarthritis dan digunakan juga sebagai suplemen makanan (Sashiwa *et al.*, 2002). Pada bidang kecantikan derivat kitin dapat digunakan sebagai bahan kosmetik, pasta gigi, krim badan, serta produk perawatan rambut. Pada bidang tekstil banyak digunakan sebagai *coating material* untuk serat selulosa, nilon, kapas, dan wool (Kaban, 2009).

### 2.3. Bakteri Kitinolitik dan Enzim Kitinase

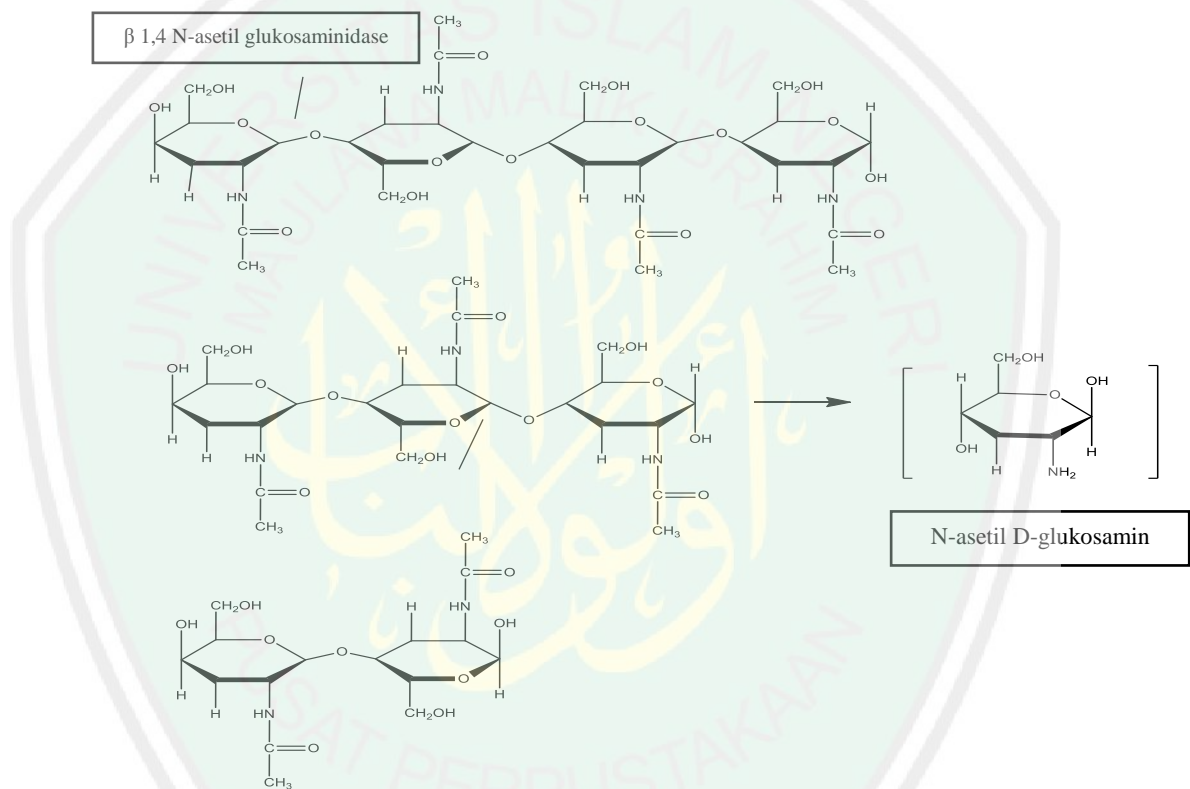
Bakteri kitinolitik merupakan bakteri yang memiliki enzim kitinase. Kemampuan isolat bakteri kitinolitik dalam mendegradasi kitin diketahui dari aktivitas hidrolisisnya. Nilai aktifitas hidrolisis bisa dilihat dari zona bening yang terbentuk disekitar koloni jika bakteri kitinolitik ditumbuhkan pada media agar kitin. Suryanto dan Munir (2006) menyatakan bahwa aktifitas hidrolisis diukur dengan membandingkan diameter zona bening disekitar koloni dengan diameter koloni. Semakin besar zona bening yang terbentuk maka semakin tinggi aktifitas hidrolisisnya. Genus bakteri yang banyak dilaporkan memiliki kitinase antara lain *Aeromonas*, *Alteromonas*, *Chromobacterium*, *Enterobacter*, *Ewingella*, *Pseudoalteromonas*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Vibrio* (Gooday, 1994), *Bacillus*, dan

*Pyrococcus* (Harman *et al.*,1993). Bakteri-bakteri yang telah diislasasi dari lingkungan laut dan memiliki aktivitas enzim kitinase menurut Das *et al.* (2006) mengerucut pada genus *Bacillus sp*, *Pseudomonas sp*, dan *Vibrio sp*, yang dikuatkan oleh Sahoo dan Dhal, (2008) yang juga menemukan genus *Bacillus sp* dan *Vibrio sp* di lingkungan laut. Sedangkan Brzezinska *et al.*,(2013) menambahkan genus bakteri yang dapat diisolasi dari lingkungan laut yaitu genus *Streptomyces sp*. Pendapat tersebut juga dikuatkan oleh Deepthi *et al.* (2012) yang menemukan genus *Streptomyces sp* dalam kawasan mangrove.

Kitinase merupakan enzim yang aktif mengkatalisis hidrolisa polimer kitin menjadi kitin oligosakarida atau monomer N-asetilglukosamin. Berdasarkan cara kerjanya dalam mendegradasi substrat, kitinase dikelompokkan menjadi dua, yaitu Endokitinase dan Eksokitinase. Endokitinase menghidrolisa kitin secara acak dari bagian dalam menghasilkan kitooligomer. Sedangkan Eksokitinase menghidrolisa kitin secara berurutan dari ujung nonreduksi menghasilkan kitobiosa sebagai produk akhir dan  $\beta$ -N-asetilheksosaminidase yang menghidrolisa kitin secara berurutan dari ujung nonreduksi menghasilkan N-asetilglukosamin (Patil *et al.*,2000) (Gambar 2.2). Degradasi kitin yang selanjutnya yaitu mekanisme pengubahan kitin oleh deasetilase kitin menjadi kitosan. Dimana ikatan glikosida  $\beta$ -(1,4) pada kitosan akan dihidrolisis dan menghasilkan diasetilkitobiosa (kitobiosa) yang kemudian dihidrolisis kembali menjadi glukosamin (Gooday, 1990).

Kitin dihidrolisis oleh kitinase secara acak pada ikatan glikosidiknya (Nasran *dkk.*, 2003). Degradasi kitin secara enzimatik oleh kitinase berlangsung secara bertahap. Awalnya polimer kitin dipecah menjadi oligomer kitin (umumnya

berupa dimer) dan selanjutnya diuraikan menjadi monomer N-asetil glukosamin oleh N-asetilglukosaminidase (Purwani *et al.*, 2002). Gambar 2.2 menunjukkan pemutusan rantai kitin menjadi N-asetil glukosamin. Kitin dalam bidang pertanian, kitinase berperan sebagai agen pengendali hayati penyakit tanaman yang disebabkan oleh jamur. Kitinase menyebabkan terjadinya lisis pada dinding sel jamur yang umumnya mengandung kitin (Patil *et al.*, 2000).



Gambar 2.2. Mekanisme kerja enzim kitinase (Pratiwi, *dkk.* 2015)

#### 2.4. Klasifikasi Enzim Kitinase

Kitinase Poli 1,4-β(2 asetamido-2-doeksi-D-glukosaminide) glikano hydrolase adalah enzim yang menghidrolisis ikatan β-1,4 asetamido-2-doeksi-D-glukosida dari kitin dan kitodekstrin. Mekanisme proses hidrolisis tersebut tergantung pada tipe-tipe kitinase dan kemampuan katalisis dengan produk akhir



yang berbeda. Polimer N-asetil glukosamin banyak ditemukan pada dinding sel jamur, eksoskeleton serangga dan cangkang *crustacea*, dimana kesamaan rangkaian telah digunakan untuk mengelompokkan kitinase ke dalam lima kelas. Kelas I, II dan IV terdiri dari kitinase yang bersumber dari tanaman dan secara structural tidak berhubungan dengan kelas III dan V. kitinase kelas III diperoleh terutama dari tumbuhan dan jamur, sedangkan kelas V mewaliki sebagian besar bakteri kitinase. (Cohen-Kupiec & Chet, 1998).

Sistem tata nama dan penggolongan enzim kitinase masih banyak menimbulkan kerancuan. Harma et al membagi kitinase ke dalam tiga tipe yaitu:

- a. Eksokitinase (belum terdaftar dalam *enzyme nomenclature*) dinamakan juga kitobiosidae atau kitin-1,4- $\beta$ -kethobiosidae yaitu enzim yang memutus secara aktif pembebasan unit-unit diasetilkitobiosae tanpa ada unit-unit monosakarida atau oligosakarida yang dibetuk. Pemotongan hanya terjadi pada ujung nonreduksi mikrofibril kitin.
- b. Endokitinase (E.C.3.2.1.14) yaitu enzim yang memutus secara acak ikatan  $\beta$ -1,4 internal mikrofibril kitin. Produk akhir yang terbentuk adalah oligomer pendek N-asetilglukosamin yang mempunyai berat molekul rendah seperti kitotriose, dengan didominasi oleh diasetilkitobiose. Produk yang dihasilkan bersifat mudah larut.
- c.  $\beta$ -1,4-N asetilglukosamidase (E.C.3.2.1.30) adalah suatu enzim kitinolitik yang memutus diasetilkitobiose, kitotriose dan kitotetraose dengan menghasilkan monomer N-asetilglukosamin.

## **2.5. Identifikasi Bakteri Kitinolitik**

### **2.5.1. Identifikasi Morfologi**

Identifikasi makteri dapat meliputi warna, bentuk koloni, tepian koloni dan elevasi. Sel-sel individu bakteri dapat berbentuk seperti elips, bola, batang, atau spiral. Masing-masing ciri ini penting dalam mencirikan morfologi suatu spesies. Sel bakteri yang berbentuk seperti bola atau elips dinamakan kokus. Kokus muncul dalam beberapa penataan yang khas tergantung pada spesiesnya. Sel berbentuk silindris atau batang dinamakan basilus. Ada banyak perbedaan dalam ukuran panjang dan lebar di antara berbagai spesies basilus. Ujung beberapa basilus tampak persegi, yang lain bundar, dan yang lain lagi meruncing atau lancip seperti ujung cerutu. Kadang-kadang basilus tetap saling melekat satu sama lainnya, ujung dengan ujung, sehingga memberikan penampilan rantai (Funke et al, 2004).

Bakteri berbentuk spiral terutama dijumpai sebagai individu-individu sel yang tidak saling melekat. Tercakup di dalam kelompok morfologis ini adalah spiroketa, beberapa diantaranya menyebabkan penyakit yang berbahaya bagi manusia. Individu-individu sel dari spesies yang berbeda-beda menunjukkan perbedaan-perbedaan yang mencolok dalam hal panjang, jumlah, dan amplitudo spiralnya serta kekakuan dinding selnya. Sebagai contoh, beberapa spirillum berukuran pendek, spiralnya berpilin ketat; yang lain sangat panjang dan menunjukkan sederetan pelintiran dan lengkungan. Spiral yang pendek dan tidak lengkap disebut sebagai bakteri koma, atau vibrio (Holt dan Bergey, 1994). Hasil karakterisasi yang telah dilakukan dilaporkan dalam Tabel 2.2.

Identifikasi makroskopis dan mikroskopis bakteri ini berfungsi sebagai identifikasi pengenalan sifat-sifat bakteri. Jumlah bakteri sangat beragam dan

jutaan jumlahnya di alam ini. Dengan proses identifikasi tersebut akan memudahkan dalam pengelompokan dan pembagian genus bakteri. Seperti halnya manusia yang Allah ciptakan dalam beragam suku. Bakteri pun Allah ciptakan dengan genus yang beragam untuk memudahkan proses pengenalan bakteri tersebut sehingga akan lebih mudah dalam klasifikasi. Allah berfirman dalam surat Al Hujurat Ayat 13

يَا أَيُّهَا النَّاسُ إِنَّا خَلَقْنَاكُمْ مِنْ ذَكَرٍ وَأُنْثَىٰ وَجَعَلْنَاكُمْ شُعُوبًا وَقَبَائِلَ لِتَعَارَفُوا إِنَّ أَكْرَمَكُمْ عِنْدَ اللَّهِ أَتَقْوَاهُ إِنَّ اللَّهَ عَلِيمٌ

خَبِيرٌ ١٣

*“ Hai manusia, sesungguhnya Kami menciptakan kamu dari seorang laki-laki dan seorang perempuan dan menjadikan kamu berbangsa-bangsa dan bersuku-suku supaya kamu saling kenal-mengenal. Sesungguhnya orang yang paling mulia diantara kamu disisi Allah ialah orang yang paling takwa diantara kamu. Sesungguhnya Allah Maha Mengetahui lagi Maha Mengenal”*

Tabel 2.2. Hasil identifikasi bakteri kitinolitik

Nama spesies	Hasil identifikasi
<i>Bacillus licheniformis</i> (Kamil <i>et al</i> ,2007)	Tidak beraturan, datar, bergelombang/lobate, berwarna coklat/putih, permukaannya keriput halus dan berlendir, bersifat gram positif, memiliki endospore dan motil
<i>Bacillus circulans</i> (Ikegami <i>et al</i> ,2000)	Bersifat gram positif, berbentuk bulat,motil, berwarna putih
<i>Bacillus thuringiensis</i> (Nurdin <i>et al</i> ,2016) (Chaiharn <i>et al</i> ,2012)	Berbentuk bulat, berwarna merah, bentuk sel bulat dan bersifat gram negative
<i>Bacillus thermoalkalophilus</i> (Purwarni <i>et al</i> ,2004)	Berbentuk bulat, bersifat gram positif, memiliki spora, motil
<i>Bacillus subtilis</i> (Wang <i>et al</i> ,2006) (Velusamy and Das,2014)	Bersifat gram negatif, berbentuk bulat,motil, berwarna putih
<i>Pseudomonas pseudomallei</i> (Purkan <i>et al</i> ,2014) (Suyono <i>et al</i> ,2011)	Bersifat gram negatif, berbentuk batang, motil dan memiliki aktivitas katalase
<i>Pseudomonas aureginosa</i> (Wang <i>et al</i> ,1997) (Herdyatutik <i>et al</i> ,2012)	Berbentuk bulat, bentuk sel kokoid, berwarna kuning, cembung, motil, bersifat gram negative dan memiliki spora
<i>Pseudomonas subrubra</i> (Campbel and William,1951)	Berbentukbulat,motil,bersifat gram negative, melingkar dan halus
<i>Pseudomonas cryiotasia</i> (Campbell and William,1951)	Berbentuk bulat kecil, melingkar, halus, cembung, motil dan bersifat gram negative
<i>Vibrio harveyii</i> (Stivil <i>et al</i> ,1997) (Felix <i>et al</i> ,2011)	Bentuk sel koma, gramnegatif, motil, berwarna kuning dan katalase positif
<i>Vibrio furnishi</i> (Bassler <i>et al</i> ,1991) (Felix <i>et al</i> ,2011)	Bentuk sel koma, gramnegatif, motil, berwarna hijau dan katalase positif
<i>Serratia marcescens</i> (Nurdin <i>et al</i> ,2016)	Berbentuk bulat, berwarna putih, bentuk sel bulat dan bersifat gram positif
<i>Stenotrophomnas malthophilia</i> (Kamil <i>et al</i> ,2007)	Melingkar,datar, seluruh, berwarna kuning, berbentuk bulat, gram negative, tidak memiliki endospore dan motil

### 2.5.2. Pewarnaan Gram

Pewarnaan Gram atau metode Gram adalah suatu metode untuk menentukan jenis kelompok bakteri, gram positif dan gram negatif, Berdasarkan sifat kimia dan fisik dinding sel mereka. Bakteri Gram-negatif adalah bakteri yang tidak dapat mempertahankan zat warna metil ungu pada metode pewarnaan Gram. Bakteri Gram positif akan mempertahankan zat warna metil ungu setelah dicuci dengan alkohol. Pada uji pewarnaan Gram, suatu pewarna (counterstain) ditambahkan setelah metil ungu, yang membuat semua bakteri Gram negatif menjadi berwarna merah atau merah muda. Pengujian ini berguna untuk mengklasifikasikan kedua tipe bakteri ini berdasarkan perbedaan struktur dinding sel mereka (Prescott, 2003).

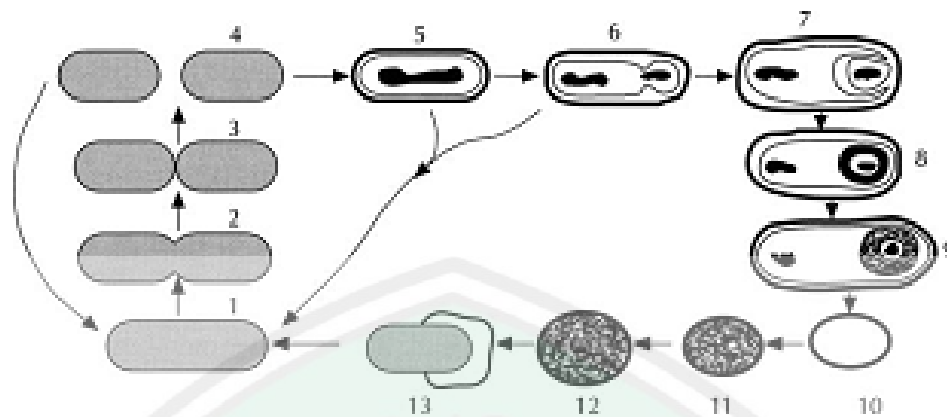
Bakteri Gram negatif adalah bakteri yang tidak mempertahankan zat warna metil ungu pada metode pewarnaan Gram. Bakteri Gram positif akan mempertahankan warna ungu gelap setelah dicuci dengan alkohol, sementara bakteri Gram negatif tidak (Fardiaz, 2002). Bakteri Gram positif adalah bakteri yang mempertahankan zat warna metil ungu sewaktu proses pewarnaan Gram. Bakteri jenis ini akan berwarna biru atau ungu di bawah mikroskop, sedangkan bakteri Gram negative akan berwarna merah. Perbedaan klasifikasi antara kedua jenis bakteri ini terutama didasarkan pada perbedaan struktur dinding sel bakteri. Bakteri gram negatif memiliki 3 lapisan dinding sel. Lapisan terluar yaitu liposakarida (lipid) kemungkinan tercuci oleh alkohol, sehingga pada saat diwarnai dengan safranin akan berwarna merah. Bakteri gram positif memiliki selapis dinding sel berupa peptidoglikan yang tebal. Setelah pewarnaan dengan

kristal violet, pori-pori dinding sel menyempit akibat dekolorisasi oleh alkohol sehingga dinding sel tetap menahan warna biru (Cowan, 2004).

### **2.5.3. Pewarnaan Endospora**

Endospora tidak mudah diwarnai dengan zat pewarna pada umumnya, tetapi sekali diwarnai, zat warna tersebut akan sulit hilang. Hal inilah yang menjadi dasar dari metode pengecatan spora secara umum. Pada metode Schaeffer-Fulton yang banyak dipakai dalam pengecatan endospora, endospora diwarnai pertama dengan malachite green dengan proses pemanasan. Larutan ini merupakan pewarna yang kuat yang dapat berpenetrasi ke dalam endospora. Setelah perlakuan malachite green, biakan sel dicuci dengan air lalu ditutup dengan cat safranin. Teknik ini akan menghasilkan warna hijau pada endospora dan warna merah muda pada sel vegetatifnya (Buchanan, 2003).

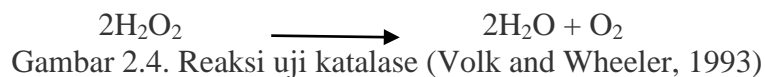
Ray, (2004) menjelaskan proses sporulasi melalui 7 tahapan. Tahapan yang pertama yaitu penghentian replikasi DNA yang diikuti dengan pengembangan kromosom di dalam filament aksial. Kemudian tahap yang kedua adalah pembentukan mesosom. Tahap ketiga adalah pembentukan septum. Kemudian pembentukan paraspora atau prespora dan selanjutnya adalah pembentukan dinding sel germinal dan korteks. Keenam adalah deposisi spora dan pematangan spora. Tahap terakhir adalah terjadinya lisis enzimatik pada dinding sel yang menyebabkan spora terbebas. Siklus sporulasi ada pada Gambar 2.3. .



Gambar 2.3. Proses sporulasi: (1-4) multiplikasi sel (5) pembentukan filament aksial (6) pembentukan septat (7) pembentukan prespora (8) pembentukan korteks (9) pembentukan mantel (10) spora bebas (11) germinasi yang diikuti dengan aktivasi (12) pembengkakan spora (13) pembentukan sel (Ray, 2004).

#### 2.5.4. Uji Katalase

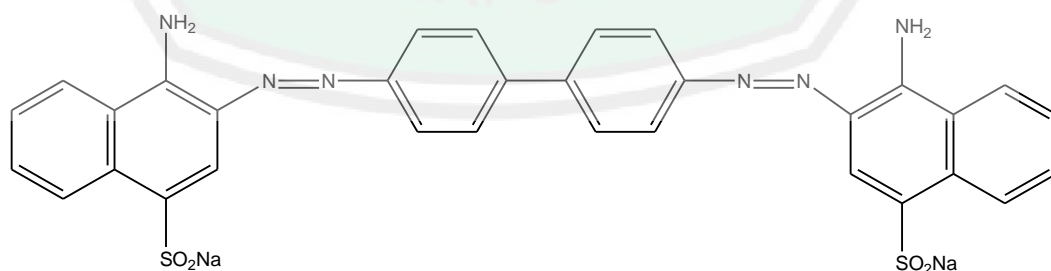
Uji katalase merupakan suatu pengujian terhadap bakteri tertentu untuk mengetahui apakah bakteri tersebut merupakan bakteri aerob, anaerob fakultatif, atau anaerob obligat dan digunakan untuk mengenyahui kemampuan mikroorganisme untuk mneguraikan hidrogen peroksida dengan menghasilkan enzim katalase. Bakteri yang memerlukan oksigen menghasilkan hidrogen peroksida ( $H_2O_2$ ) yang sebenarnya beracun bagi bakteri sendiri. Namun mereka tetap dapat hidup karena adanya metabolit yang menghasilkan enzim kalatase dan mengubah hydrogen peroksida menjadi air dan oksigen. Enzim merupakan katalisator sejati, dimana molekul ini mengikat dengan nyata kecepatan reaksi kimia spesifik yang jika tanpa enzim akan berlangsung sangat lambat.. enzim tidak dapat mengubah titik keseimbangan reaksi yang dikatalisnya, enzim juga tidak habis dipakai atau diubah secara permanen oleh reaksi-reaksi ini (Hadioetomo, 1993). Gambar 2.4. menunjukkan reaksi uji katalase.



## 2.6. Uji Kualitatif Bakteri dengan Congo Red

Congo red merupakan senyawa zat warna yang bermuatan negatif yang tidak dapat berikatan dengan muatan negatif yang terdapat dalam dinding sel, sitoplasma dan membrane sel mikroorganisme. Sehingga zat warna ini tidak mewarnai latar belakang sediaan (media pembiakan) (Yosmar, 2013). Hal itu menyebabkan daerah sekitar mikroorganisme dengan media lebih terlihat kontras dan daerah bening terbentuk akan semakin jelas.

Substrat kitin dalam bentuk koloidal kitin akan terhidrolisis oleh kitinase dan membentuk zona bening di sekeliling koloni bakteri. Zona bening akan terlihat semakin jelas ketika congo red berikatan dengan substrat dalam ikatan  $\beta$ -1,4 dalam media agar sehingga menjadi berwarna merah. Bagian kitin agar-agar terhidrolisis oleh kitinase yang menghasilkan N-asetil glukosamin yang tidak memiliki ikatan dengan monomer N-asetil glukosamin sehingga tidak dapat berikatan dengan kuat (Suryadi, 2013).



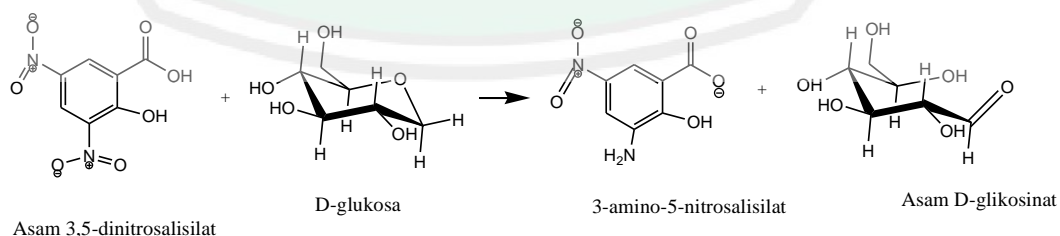
Gambar 2.5. Struktur congo red (Sereikaite et al, 2006)



## 2.7. Uji Aktivitas Enzim Kitinase dengan Metode DNS

Metode DNS merupakan metode yang paling banyak digunakan untuk menentukan kadar gula reduksi. Dalam metode DNS digunakan reagen dinitro salisilat (DNS). DNS merupakan senyawa aromatis yang dapat bereaksi dengan gula reduksi membentuk asam 3-amino-5-nitrosalisilat, suatu senyawa yang mampu menyerap radiasi gelombang elektromagnetik pada panjang gelombang maksimum 540 nm (Adney *and* Baker, 2008). Semakin tinggi kadar gula reduksi yang terdapat dalam sampel, maka akan semakin banyak pula molekul asam 3-amino-5-nitrosalisilat yang terbentuk, sehingga absorbansi sampel akan semakin tinggi.

Reaksi yang terjadi antara gula reduksi dengan DNS merupakan reaksi redoks pada gugus aldehid dan teroksidasi menjadi gugus karboksil. Sementara itu, DNS berperan sebagai oksidator akan tereduksi membentuk asam 3-amino dan 5-nitrosalisilat. Reaksi ini berlangsung dalam suasana basa dan suhu tinggi sekitar 90-100 °C. Bila terdapat gula reduksi pada sampel, maka larutan DNS yang awalnya berwarna kuning akan bereaksi dengan gula reduksi sehingga menimbulkan warna jingga kemerahan (Kusmiati dan Agustini, 2010).



Gambar 2.6. Reaksi DNS dengan glukosa

## 2.8. Spektrofotometer UV-Vis

Spektroskopi *Uv-Vis* adalah teknik analisis spektroskopi yang menggunakan sumber radiasi elektromagnetik dan sinar tampak dengan menggunakan instrumen. Spektrofotometri adalah penyerapan sinar tampak untuk ultraviolet dengan suatu molekul yang dapat menyebabkan eksitasi molekul dan tingkat dasar ke tingkat energi yang paling tinggi (Sumar, 1994).

Panjang gelombang cahaya *Uv-Vis* dan sinar tampak jauh lebih pendek daripada panjang gelombang radiasi inframerah. Satuan yang digunakan untuk menentukan panjang gelombang ini adalah monokromator ( $1 \text{ nm} = 10^{-7} \text{ cm}$ ). Spektrum tampak sekitar 400 nm (ungu) sampai 750 nm (merah) sedangkan spektrum UV adalah 100 – 400 nm (Day and Underwood, 2002). Spektrum cahaya tampak dan warna-warna komplementer ditunjukkan pada Tabel 2.3.

Konsentrasi dari analit di dalam larutan sampel bisa ditentukan dengan mengukur absorbansi sinar oleh sampel pada panjang gelombang tertentu dengan menggunakan hukum Lambert-Beer (Rohman, 2007). Hukum Lambert-Beer menyatakan hubungan linearitas antara absorbansi dengan konsentrasi larutan analit dan berbanding terbalik dengan transmittan. Hukum Lambert-Beer dinyatakan dalam rumus:

$$A = \epsilon \cdot b \cdot c$$

Ket: A = absorbansi

c = konsentrasi

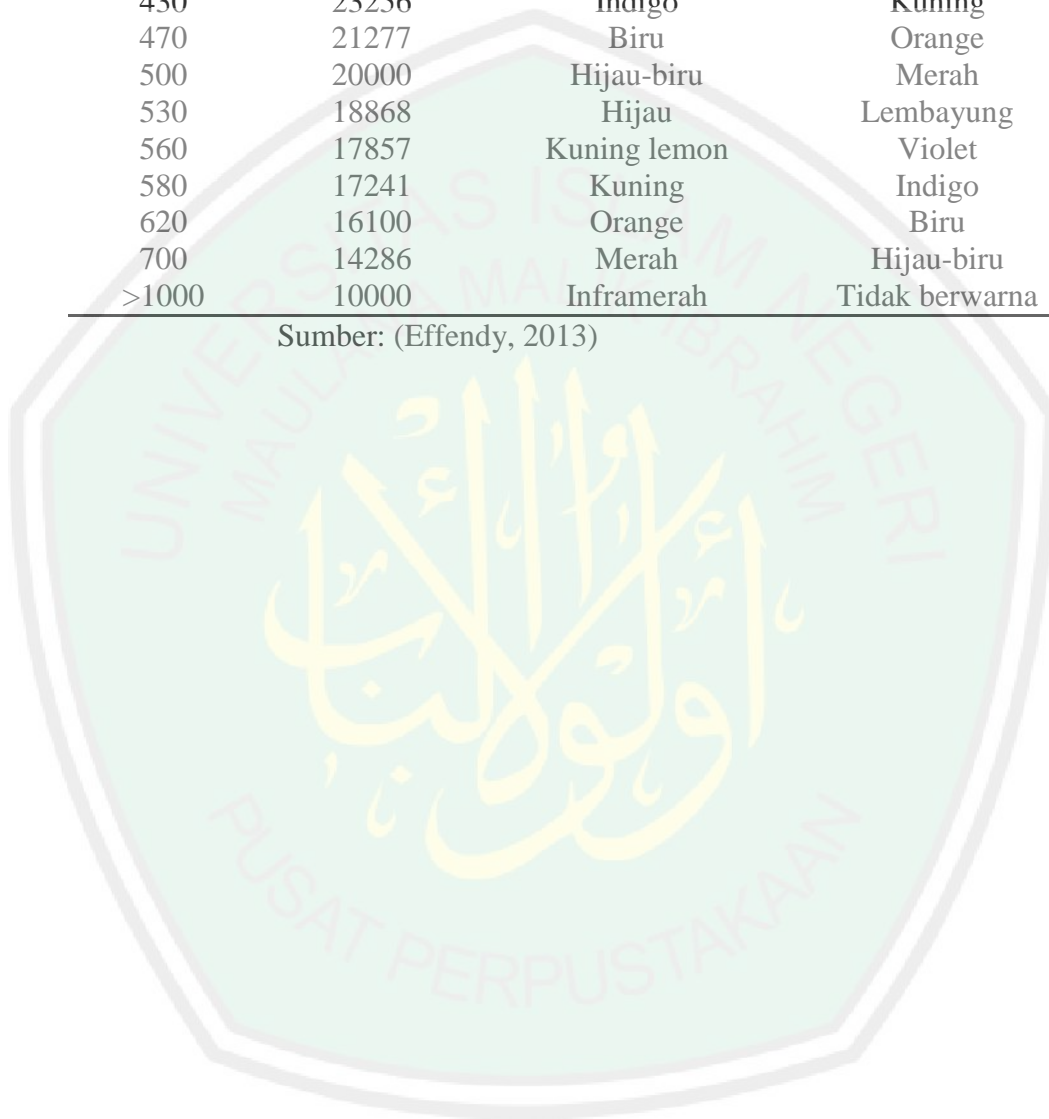
$\epsilon$  = absorptivitas molar

b = tebal kuvet (cm)

Tabel 2.3. Warna-warna komplementer pada spektrum sinar tampak

$\lambda$ (nm)	Frekuensi ( $\text{cm}^{-1}$ )	Warna yang diserap	Warna komplementer
<200	>5000	Ultraviolet jauh	Tidak berwarna
300	33333	Ultraviolet dekat	Tidak berwarna
420	23810	Violet	Kuning lemon
430	23256	Indigo	Kuning
470	21277	Biru	Orange
500	20000	Hijau-biru	Merah
530	18868	Hijau	Lembayung
560	17857	Kuning lemon	Violet
580	17241	Kuning	Indigo
620	16100	Orange	Biru
700	14286	Merah	Hijau-biru
>1000	10000	Inframerah	Tidak berwarna

Sumber: (Effendy, 2013)



## BAB III METODOLOGI

### 3.1. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan Maret-November 2017 di Laboratorium Bioteknologi Jurusan Kimia dan Laboratorium Mikrobiologi Jurusan Biologi Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang.

### 3.2. Alat dan Bahan

#### 3.2.1. Alat

Alat yang digunakan dalam praktikum ini adalah neraca analitik, *Beaker Glass* 100mL, *beaker glass* 50 mL, pipet tetes, pipet volume 10 mL, erlemeyer 100 mL, *autoclave*, *magnetic stirrer*, tabung reaksi, rak tabung, hotplate, *laminar flow*, lemari asap, batang pengaduk, oven, *sentrifuge* dan spektrofotometer Uv-Vis.

#### 3.2.2. Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah NaOH, HCl, Aquades, Cangkang Udang, NaCl, Buffer Fosfat, 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 70% etanol, trypton, MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, *yeast extract*, media agar, pepton, FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O, MnSO<sub>4</sub>.nH<sub>2</sub>O, CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O Kit Cat Pewarnaan gram (Kristal violet, lugol, 96% alcohol dan safranin), larutan asam 3,5-Dinitrosalisilat, *malachite green*, kalium tartrat, N-asetil glukosamin standart dan larutan 0,1% *congo red*.

### 3.3. Rancangan Penelitian

Penelitian ini dilakukan dalam 2 tahapan yaitu kualitatif dan kuantitatif. Tahapan kualitatif merupakan tahapan isolasi dan identifikasi bakteri kitinolitik baik baik secara makroskopis dan mikroskopisnya. Bakteri kitinolitik diisolasi dari Lumpur Mangrove yang diambil dari kawasan BeeJay Bakau Resort Probolinggo. Isolasi bakteri menggunakan *media agar* kitin dengan komposisi 0,75 gram koloidal kitin, 0,15 gram  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 0,03 gram  $K_2HPO_4$ , 0,15 gram Yeast Ekstrak dan 2,25 gram agar. Sedangkan untuk media kultur menggunakan media cair kitin dengan komposisi 1 gram pepton, 0,5 gram ekstrak yeast, 0,1 gram NaCl, 0,1 gram  $K_2HPO_4$ , 0,05 gram  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 0,001 gram  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ , 0,001 gram  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ , dan masing-masing 0,0001 gram  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ ,  $MnSO_4 \cdot nH_2O$ ,  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$  kemudian dilakukan pengamatan bakteri gram positif dan bakteri gram negative. Penelitian tahap kedua adalah penelitian kuantitatif menggunakan Rancangan Acak Kelompok dan Jenis Isolat dengan variasi suhu inkubasi diukur melalui aktivitas enzim kitinase dengan dipengaruhi perbedaan suhu. Masing-masing perlakuan diulang sebanyak 3(tiga) kali perlakuan:

Variabel terikat: aktivitas enzim

Variabel bebas: perbedaan Suhu dan jenis isolat

1 = 30°C

4 = 45°C

2 = 35°C

5 = 50°C

3 = 40°C

Pengujian aktivitas enzim kitinase menggunakan metode kalorimetri dengan reagen DNS. Diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer *Uv-Vis*.

### 3.4. Tahapan Penelitian

1. Preparasi Alat dan Bahan
2. Pembuatan Koloidal Kitin
3. Pembuatan Media
  - a. Media Agar yang digunakan untuk isolasi bakteri
  - b. Media cair yang digunakan untuk kultur bakteri kitinolitik
4. Isolasi dan Seleksi Bakteri kitinolitik dari Lumpur Mangrove
5. Uji Bakteri Kitinolitik secara Kualitatif
6. Karakterisasi Bakteri Kitinolitik meliputi:
  - a. Identifikasi Makroskopis
  - b. Uji Katalase
  - c. Pewarnaan Endospora
  - d. Pewarnaan Gram
7. Pembuatan Kurva Pertumbuhan Bakteri Kitinase
8. Produksi Kitinase
9. Penentuan aktivitas enzim diukur menggunakan metode DNS
10. Analisis Data

### 3.5. Pelaksanaan Penelitian

#### 3.5.1 Tahap Preparasi Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam tahap ini adalah jarum ose, cawan petri, Erlenmeyer, tabung reaksi. Alat tersebut dibersihkan kemudian dikeringkan. Cawan petri dibungkus dengan kertas dan plastik yang tahan panas. Erlenmeyer dan jarum ose juga dimasukkan ke dalam plastik yang tahan panas. Selanjutnya dilakukan sterilisasi pada suhu 120°C menggunakan autoclave dengan tekanan 1 atm selama 15 menit.

Lumpur yang diambil dari kawasan mangrove BeeJay Bakau Resort Probolinggo Jawa Timur. Selanjutnya dimasukkan ke dalam wadah tertutup steril yang nantinya akan digunakan untuk proses isolasi.

### **3.5.2. Pembuatan Koloidal Kitin (Herdyastuti *dkk*, 2010)**

Kitin diisolasi dari cangkang udang yang telah dikeringkan dan dihaluskan kemudian dilanjutkan dengan proses isolasi. Proses isolasi kitin terdiri atas dua tahap, yaitu deproteinasi dan demineralisasi. Cangkang udang sebanyak 5 gram dipanaskan dengan 50 ml NaOH 3,5% (b/v) pada suhu 65° C selama 2 jam diaduk dengan pengaduk magnet. Hasilnya didinginkan dan disaring, residu yang diperoleh dicuci dengan aquades sampai netral. Residu hasil deproteinasi ditambahkan dengan 50 ml HCl 1M, diaduk dengan pengaduk magnet pada suhu kamar selama 30 menit. Hasilnya disaring, residu yang diperoleh dicuci dengan aquades sampai netral kemudian dikeringkan pada suhu 60° C, diperoleh kitin.

Kitin yang diperoleh selanjutnya dibuat bentuk koloid dengan menggunakan cara menurut Hsu dan Lockwood (1975). Kitin dilarutkan dalam (37%) HCl pekat, dan diendapkan sebagai suspensi koloid dengan penambahan air dingin. Suspensi disaring dan residu dicuci dengan aquades sampai pH netral kemudian dikeringkan dengan oven.

### **3.5.3. Pembuatan Media**

#### **3.5.3.1. Media Isolasi Bakteri**

Media isolasi bakteri menggunakan media agar kitin yang memiliki komposisi yaitu 0,75 gram koloidal kitin, 0,15 gram  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 0,03 gram  $K_2HPO_4$ , 0,15 gram Yeast Ekstrak dan 2,25 gram agar.

### 3.5.3.2. Media Kultur Bakteri

Media kultur menggunakan media cair kitin terdiri dari 0,4 gram koloidal kitin, dan campuran garam mineral yang terdiri dari 1 gram pepton, 0,5 gram ekstrak yeast, 0,1 gram NaCl, 0,1 gram K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,05 gram MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 0,001 gram FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 0,001 gram ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, dan masing-masing 0,0001 gram CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O, MnSO<sub>4</sub>.nH<sub>2</sub>O, CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O. Selain koloid kitin semua bahan tersebut disterilkan selama 15 menit pada suhu 121°C lalu pH media ditepatkan 7. Koloid kitin disterilkan secara terpisah dan baru dicampur dalam keadaan steril.

### 3.5.4. Isolasi dan Seleksi Bakteri Kitinolitik dari Lumpur Mangrove (Muharni *dkk*,2011)

Sampel lumpur sebanyak 5 gram dalam keadaan kering disuspensikan dalam 45 mL larutan garam fisiologis (0.85% NaCl) steril sampai homogen dan dilakukan pengenceran sampai 10<sup>-6</sup>, tiga pengenceran terakhir dicawankan pada media agar kitin dan diinkubasi selama 48 jam pada suhu ruang. Isolat yang diperoleh diinokulasikan secara serentak dengan cara ditotolkan pada media agar kitin dalam cawan petri.

### 3.5.5. Uji Bakteri Kitinolitik Secara Kualitatif

Uji kualitatif dilakukan tiga kali ulangan dan satu kontrol (hanya diisi dengan 5 µl bufer fosfat 0,2 M, pH 7). Indeks kitinolitik ditentukan menggunakan 2 ose kultur isolat dimasukkan ke dalam tabung mikro steril berisi 100 µl akuades steril. Sebanyak 5 µl larutan dimasukkan pada sumur di dalam media agar yang mengandung koloid kitin. Cawan diinkubasikan selama 7 hari. Zona bening yang terbentuk divisualisasikan dengan penambahan pewarna *congo red* 0,1%,



kemudian cawan dicuci dengan akuades dan diameter zona bening yang terbentuk diukur berdasarkan formula:

$$\text{Indeks Kitinolitik} = \frac{\text{Diameter Zona Bening}}{\text{Diameter Koloni.}}$$

### **3.5.6. Karakterisasi Bakteri Kitinolitik**

#### **3.5.6.1. Identifikasi Makroskopis**

Identifikasi morfologi bakteri menggunakan metode yang telah dilakukan oleh Muharni,2009. Screening yang dilakukan pada bakteri meliputi bentuk koloni, warna, elevasi bakteri dan tepian koloni.

#### **3.5.6.2.Uji Katalase (Lay, 1994)**

Uji katalase dilakukan untuk mengetahui apakah bakteri tersebut memiliki enzim katalase untuk mereduksi efek toksik H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Uji katalase dilakukan dengan cara gelas obyek disemprot dengan 70% etanol sampai tidak terbentuk lapisan minyak. Biakan murni bakteri yang berumur 24 jam diambil sedikit secara aseptis dengan menggunakan jarum ose dan disuspensikan dengan aquades steril yang ada di gelas obyek. Suspensi ditetesi dengan larutan 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sebanyak 3-4 tetes. Selanjutnya diamati pembentukan gelembung udara (positif) yang terjadi pada koloni dan sekitarnya. Terbentuknya gelembung gas menandai bahwa bakter tersebut bersifat aerobik (uji katalase tersebut positif).

#### **3.5.6.2. Pewarnaan Endospora (Lay, 1994).**

Biakan murni bakteri kitinolitik diambil sedikit secara aseptis dengan menggunakan jarum ose dan disuspensikan dengan aquades steril yang ada di gelas obyek, kemudian preparat difiksasi diatas api bunsen. Preparat ditetesi dengan *Malachit green* sebanyak 3 tetes. Preparat diletakkan dikawat yang sudah dipanaskan diatas air mendidih selama 10 menit. Preparasi dicuci dengan hati-hati

dengan air mengalir. Preparasi ditetesi dengan menggunakan safranin sebanyak 3 tetes, didiamkan selama 30 detik, kemudian dicuci menggunakan air mengalir dan dikeringkan dengan hati-hati. Preparat diamati dengan mikroskop, uji positif jika sel vegetative berwarna merah dan spora berwarna hijau.

#### **3.5.6.3. Pewarnaan Gram (Fitri *dkk*, 2011)**

Metode pewarnaan gram digunakan untuk menentukan bakteri kitinolitik yang berasal dari isolat kasar lumpur mangrove merupakan bakteri gram positif atau negatif. Diambil akuades ditetaskan pada kaca objek ditambahkan 1 ose biakan sampel, lalu difiksasi di atas api. Tetesi pewarnaan kristal violet sebanyak 3 tetes dan biarkan selama 1 menit, cuci dengan air mengalir, kemudian tetesi lugol sebanyak 3 tetes, biarkan selama satu menit dan kembali dicuci dengan air mengalir. Selanjutnya tetesi 96% alkohol 3 tetes 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 saring dan tambahkan minyak emersi dan amati di bawah mikroskop. Bila hasil pewarnaan diperoleh bakteri berwarna merah maka bakteri tersebut adalah bakteri gram positif, sedangkan bila diperoleh bakteri berwarna ungu maka bakteri tersebut adalah gram negatif.

#### **3.5.7. Pembuatan Kurva Pertumbuhan Bakteri**

Pembuatan Kurva Pertumbuhan bakteri dilakukan dengan cara satu koloni terpilih dimasukkan ke dalam 20 mL media cair dan diinkubasi selama semalam pada suhu 37°C dan digoyang dengan kecepatan 150 rpm. Sebanyak 1% (v/v) kultur yang diperoleh, dipindahkan kembali kedalam 100 mL media cair dalam Erlenmeyer 250 mL dan diinkubasi pada keadaan yang sama. Setelah itu,

dilakukan pengukuran OD (*Optical Density*) dengan diambil 3 mL selang 2 jam hingga nilai OD menunjukkan penurunan yang jelas. OD diukur menggunakan spektrofotometer *uv-vis* pada  $\lambda$  600 nm. Kemudian dibuat kurva pertumbuhan dengan nilai OD dengan plot nilai OD terhadap waktu.

### **3.5.8. Produksi Kitinase (Cahyani, 2013)**

Sebanyak 2,5 ml inokulum diinokulasikan ke dalam 22,5 ml media produksi kitinase. Selanjutnya diinkubasi pada suhu ruang dengan waktu inkubasi selama 24 jam. Ekstraksi enzim dilakukan dengan cara disentrifugasi dingin pada suhu 4°C dengan kecepatan 8000 rpm selama 10 menit. Supernatan yang dihasilkan merupakan kitinase ekstrak kasar.

### **3.5.9. Uji aktivitas Enzim Kitinase (Herdyastutik, 2010)**

#### **3.5.9.1. Pembuatan Kurva Standar**

Larutan standar dibuat dengan menyiapkan N-asetil glukosamin 1% (b/v) dalam air bebas ion. Disiapkan 5 tabung dan masing-masing dimasukkan larutan N-asetil glukosamin dengan variasi konsentrasi 0,1 mg/ml; 0,2 mg/ml; 0,3 mg/ml; 0,4 mg/ml dan 0,5 mg/ml. Kemudian ditambahkan 1,5mL reagen pewarna. Sebagai blanko ditambahkan 3 ml air deionisasi dan 1,5 mL K-Na Tartrat. Selanjutnya diukur dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 540nm.

#### **3.5.9.2. Uji Aktivitas Enzim Kitinase dengan variasi suhu**

Aktivitas kitinase didefinisikan sebagai satu unit enzim yang dihasilkan dalam satu menit. Sebanyak 0,5 mL ekstrak kasar enzim kitinase hasil sentrifugasi dicampur dengan 1,5 mL substrat koloidal kitin 1% yang dilarutkan dalam larutan buffer fosfat lalu diinkubasi selama 2 jam pada suhu inkubasi 30°C, 35°C, 40°C, 45°C dan 50°C. Akhir inkubasi tabung didinginkan pada suhu ruang. Reaksi dihentikan dengan penambahan 1 ml reagen pewarna asam 3,5-dinitrosalisilat dan

40% K-Na Tartrat. Campuran dipanaskan dalam air mendidih selama 5 menit kemudian didinginkan pada suhu kamar dan diukur absorbansinya pada panjang gelombang 540 nm. Blanko mendapat perlakuan yang sama tetapi tanpa penambahan ekstrak kasar enzim kitinase.

$$\text{Aktivitas Kitinase} = \frac{C}{\text{BM Produk} \times t} \times \frac{H}{E}$$

Ket: C = konsentrasi produk

H = volume total

E = volume enzim

t = menit

#### 3.5.10. Analisis Data

Data yang dihasilkan dalam penelitian ini berupa data kualitatif dan kuantitatif. Penelitian kualitatif disajikan secara deskriptif meliputi karakteristik mikroskopik dan makroskopis dari masing-masing isolate. Sedangkan data kuantitatif diperoleh aktivitas enzim kitinase dilakukan analisa menggunakan analisa Two Way ANOVA.

## **BAB IV**

### **HASIL DAN PEMBAHASAN**

Penelitian ini yang dilakukan mengenai Isolasi Bakteri Kitinolitik dari Lumpur Mangrove Beejay Bakau Resort dan Uji Aktivitas Enzim Kitinase dengan Variasi Suhu Inkubasi. Penelitian bertujuan untuk mengeksplorasi potensi bakteri yang dapat menghasilkan enzim kitinase yang berguna dalam proses degradasi kitin. Penelitian ini diawali dengan mengisolasi bakteri kitinolitik dari lumpur tanaman Mangrove Beejay Bakay Resort dan menguji kemampuan bakteri dalam memproduksi enzim kitinase untuk mendegradasi kitin. Langkah selanjutnya adalah memproduksi enzim kitinase dari isolat bakteri kitinolitik dan menguji aktivitas enzim kitinase dengan variasi suhu.

#### **4.1. Pembuatan Koloidal Kitin**

Koloidal kitin digunakan sebagai substrat yang akan didegradasi oleh enzim kitinase. Kitin diisolasi dari cangkang udang yang dikeringkan dan dihaluskan. Monreal and Reese (1969), kitin yang baik adalah kitin yang diisolasi dari cangkang udang dibandingkan dengan kitin yang berasal dari tumbuhan seperti jamur. Pembuatan koloidal kitin melalui tahap 2 tahapan yaitu demineralisasi dan deproteinasi. Cangkang udang yang didapatkan dihaluskan dengan menggunakan mortar. Cangkang udang sebanyak 5 gram ditambahkan dengan HCl 1 M 50 mL. Penambahan HCl ini berguna untuk menghilangkan mineral yang terkandung dalam cangkang udang. Asam kuat akan mengikat kalsium yang terkandung dalam cangkang. Arif dkk, (2013) melaporkan bahwa mineral terbanyak yang terkandung dalam cangkang udang sebanyak 30-50% berat kering adalah  $\text{CaCO}_3$  dan 5-10% adalah  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ . Gambar 4.1

menunjukkan proses demineralisasi dalam pembuatan kitin. Hasil deproteinasi dan demineralisasi cangkang udang berupa kitin yang telah di mess dan dikeringkan (lampiran 5.6).



Gambar 4.1. Reaksi demineralisasi (Kurniasih; 2011)

Pemilihan HCl sebagai asam yang digunakan pada tahap demineralisasi karena HCl adalah bahan yang paling praktis dan mudah untuk digunakan. Selain itu menurut Arif *dkk*, (2013) HCl memiliki keefektifan untuk melarutkan kalsium 10% lebih besar dibandingkan dengan asam kuat lain seperti H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> dalam proses demineralisasi. Tahapan kedua yaitu tahap deproteinasi dengan menggunakan 3,5% NaOH. Tahap deproteinasi ini berfungsi untuk menghilangkan protein-protein yang berikatan dalam cangkang udang. Kitin memiliki rantai ikatan hidrogen yang sangat kuat dengan gugus NH di satu rantai dan gugus C=O di rantai yang lain secara berdekatan. Sehingga untuk melemahkan ikatan hidrogennya, kitin dibuat dalam bentuk koloidal dengan cara mereaksikan kitin dengan 37% HCl untuk melemahkan ikatan hydrogen dan ditambahkan dengan aquades dingin. Kemudian kitin dicuci dengan aquades hingga pH netral dan dikeringkan dengan oven pada suhu 60°C. Rendemen koloidal kitin yang didapatkan sebesar 50% pada Lampiran 5.6.

#### 4.2. Isolasi dan Seleksi Bakteri Kitinolitik

Isolasi bakteri dari lumpur mangrove dilakukan untuk mendapatkan bakteri yang memiliki potensi untuk mendegradasi kitin. Sampel tanah berasal dari tanah mangrove BeeJay Bakau Resort Kota Probolinggo. Sampel tanah

ditempatkan di dalam wadah sampel tertutup dalam keadaan dingin. Sampel tanah yang telah diambil, dilarutkan di dalam larutan fisiologis (0.85% NaCl) dan sampel larutan diencerkan hingga  $10^{-9}$ . Tiga pengenceran terakhir dimasukkan kedalam cawan petri steril yang sudah diisi dengan media isolasi selektif bakteri kitinolitik dengan metode pour plate kemudian diinkubasi selama 48 jam. Media selektif bakteri mengandung campuran koloidal kitin yang diisolasi dari cangkang udang. Kitin digunakan sebagai substrat yang akan didegradasi oleh bakteri kitinolitik. Kemudian diamati morfologi bakteri yang tumbuh. Morfologi yang diamati yaitu warna, bentuk, elevasi dan tepian koloni. Bakteri selektif hasil isolasi dimurnikan menggunakan metode streak kuadran dan diinkubasi lagi selama 48 jam.

Hasil isolasi dan seleksi bakteri kitinolitik terdapat 5 isolat bakteri yang berhasil diisolasi dari tanah mangrove Beejay Bakau Resort. Dua isolat memiliki aktivitas kitinolitik sedangkan untuk ketiga isolat lainnya tidak memiliki aktivitas kitinolitik. Kelima hasil isolat dipilih untuk dilakukan uji kualitatif kemampuan bakteri kitinolitik dalam mendegradasi kitin. Karakter dari kelima isolat tersebut berada pada Tabel 4.1. Kamil, *et al.*(2007) melaporkan isolat bakteri kitinolitik yang diisolasi dari tanah tanaman rizosfer yang berasal dari Mesir memiliki karakter morfologi berwarna putih, bentuk koloni yang tidak beraturan, memiliki elevasi yang rata dan tepian koloni dengan lekukan yang jelas (Lobate). Nurdin *dkk*, (2016) juga melaporkan bakteri kitinolitik yang berasal dari tanah Taman Nasional Bukit Duabelas memiliki karakter morfologi koloni berbentuk putaran, berwarna putih, bentuk sel batang.

Tabel 4.1. Karakter makroskopis isolat bakteri asal lumpur Mangrove Beejay Bakau Resort

No	Kode Isolat	Morfologi bakteri			
		Warna	Bentuk	Elevasi	Tepian Koloni
1	A	Putih	Bulat	Flat	Lobate
2	B	Kuning	Bulat	Convex	Entire
3	C	Orange	Bulat	Datar	Entire
4	D	Putih	Bulat	Flat	Lobate
5	E	Kuning	Bulat	Flat	Lobate

Keterangan (Pelczar and Chan., 2010):

Elevasi (permukaan): Convex (bentuk kubah), Raised (sedikit menonjol), Flat (datar)

Tepian koloni: Entire (sangat rata), Lobate (lekukan yang jelas)

#### 4.3. Uji Bakteri Kitinolitik secara Kualitatif

Isolasi dan seleksi bakteri kitinolitik menggunakan media selektif yang mengandung kitin. Kitin digunakan sebagai substrat yang akan didegradasi oleh bakteri yang menghasilkan enzim kitinase. Media bakteri adalah tempat perkembangan bakteri yang mengandung nutrisi yang diperlukan bakteri tersebut untuk hidup. Menurut Herdyastatik *dkk*, (2009) kitin banyak digunakan sebagai media campuran untuk mengisolasi bakteri penghasil enzim endo-kitinase. Kitin digunakan sebagai sumber karbon yang digunakan untuk menginduksi aktivitas kitinolitik. Kedua isolat yang telah didapat menunjukkan adanya aktivitas kitinolitik setelah diinkubasi selama 7 hari. Aktivitas kitinolitik ditandai dengan adanya zona bening di sekitar sel bakteri. Kemudian hasil seleksi divisualisasikan dengan menggunakan larutan 0,1% *congo red* (Gambar 4.2). Larutan *congo red* membuat hasil degradasi menjadi lebih jelas dilihat. *Congo Red* membentuk ikatan



hidrogen dengan kitin (Gambar 4.3), sehingga cawan menjadi terlihat lebih jelas. Sedangkan, kitin yang terdegradasi menunjukkan zona bening yang berarti monomer N-asetil glukosamin tidak membentuk ikatan dengan *congo red*. Aktivitas kitinolitik terjadi karena induksi enzim kitinase oleh media yang mengandung kitin. Sehingga enzim tersebut mendegradasi oligomer kitin menjadi monomernya dan hasil degradasi karena adanya induksi tersebut membuat media tampak lebih jernih, terutama di sekitar koloni (*Chen and Lee, 1994*). Zona bening yang terbentuk karena adanya pemutusan ikatan  $\beta$  1,4 homopolimer N-asetil glukosamin pada kitin oleh kitinase menjadi monomer N-asetil glukosamin (Imanda, 2015). Pemutusan ikatan rantai kitin terdapat pada Gambar 4.4.

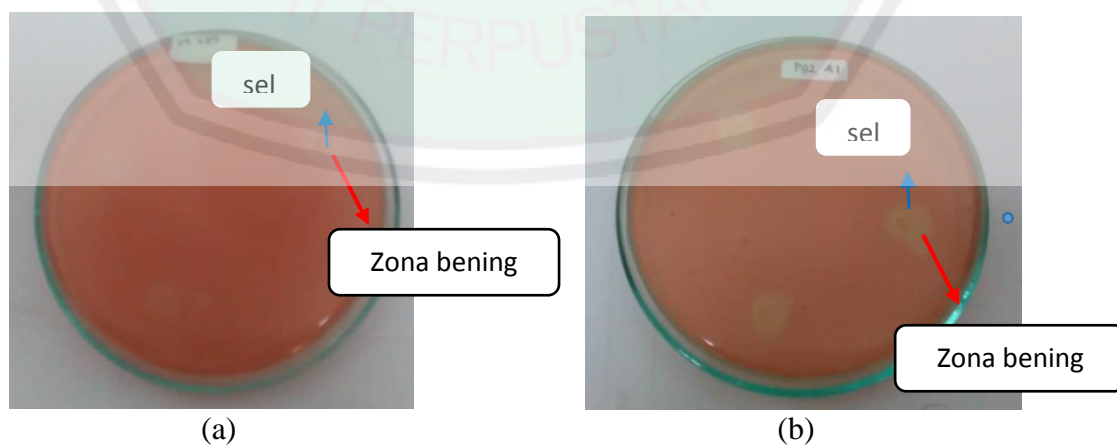
Uji Kualitatif bakteri kitinolitik diukur dengan menggunakan indeks Kitinolitik. Uji Kualitatif bakteri kitinase dilakukan dengan menggunakan pewarna 0,1% *congo red* (Suprpto, 2014). Indeks kitinolitik merupakan perbandingan antara zona bening dengan diameter koloni. (Suryadi, 2013).

$$\text{Indeks Kitinolitik} = \frac{\text{diameter zona bening}}{\text{diameter koloni}}$$

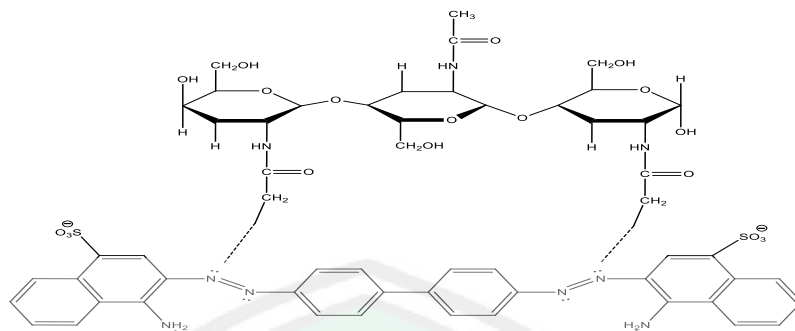
Hasil uji kualitatif bakteri kitinolitik dari kelima isolat yang berhasil diisolasi hanya 2 isolat yang memiliki aktivitas kitinolitik. Ketiga diantaranya tidak memiliki aktivitas kitinolitik yang ditandai dengan tidak adanya zona bening pada isolat yang telah diberikan larutan *congo red* (Lampiran 5.2). Hasil zona bening yang terbentuk berada Tabel 4.2.

Kode Isolat	Indeks Kitinolitik
A	0,65
B	0,6
C	-
D	-
E	-

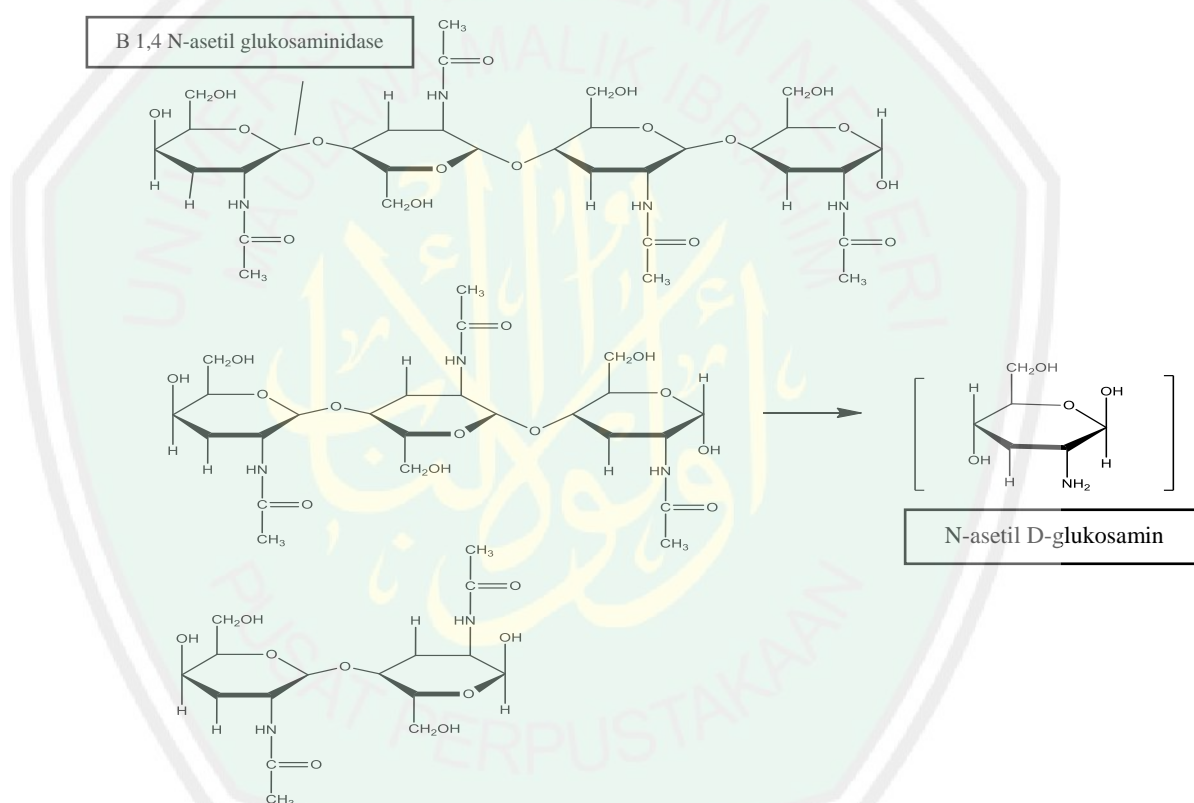
Hasil uji menunjukkan bahwa isolat bakteri A memiliki indeks kitinolitik lebih besar dibandingkan dengan isolat bakteri B. Besar kecilnya zona bening yang terbentuk tergantung banyaknya substrat yang dapat didegradasi oleh enzim kitinase. Substrat kitin didegradasi oleh enzim kitinase menjadi N-asetil glukosamin. Semakin besar zona bening yang terbentuk semakin besar pula aktivitas kitinolitik yang dihasilkan oleh bakteri (Suprpto, 2014). Hasil penelitian lebih kecil dibandingkan dengan (Suryadi, 2013) dapat menghasilkan zona bening sebesar 1,035. Hal ini dimungkinkan karena kemampuan bakteri dalam mendegradasi kitin berbeda-beda pada setiap jenisnya.



Gambar 4.2. Zona bening hasil uji kualitatif bakteri kitinolitik



Gambar 4.3. Ikatan hidrogen antara *congo red* dengan kitin



Gambar 4.4. Mekanisme kerja enzim kitinase (Pratiwi, *dkk.* 2015)

Gambar 4.4 menunjukkan proses kerja enzim kitinase memutus rantai ikatan  $\beta$  1,4 menjadi bentuk oligomernya. Kemudian rantai diputus kembali sehingga terbentuk monomer N-asetil glukosamin. Uji kualitatif ini menguatkan bahwa bakteri yang diisolasi adalah bakteri kitinolitik yang dapat menghasilkan zona bening hasil degradasi kitin. (Kamil *et al*, 2007). Kemudian dilakukan uji

katalase, uji gram dan uji endospore pada bakteri kitinolitik hasil identifikasi kualitatif.

#### 4.4. Karakterisasi Mikroskopis Bakteri Kitinolitik

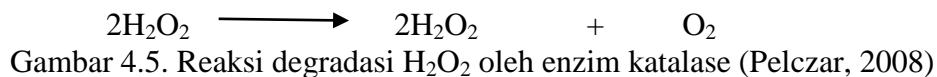
##### 4.4.1. Uji Katalase Bakteri Kitinolitik

Uji Katalase dilakukan untuk mengetahui kemampuan bakteri dalam mereduksi efek toksik dari larutan hidrogen peroksida yang ditambahkan. Terbentuknya gelembung menunjukkan bahwa bakteri bersifat aerobik (memiliki aktivitas katalase (Lay, 1994). menunjukkan kedua bakteri hasil kualitatif positif memiliki aktivitas katalase. Hasil uji ditandai dengan adanya gelembung yang muncul ketika ditetaskan dengan larutan 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Menurut Kamil, *etc.* (2007) menjelaskan bahwa *Bacillus thuringiensis* memiliki aktivitas katalase. Penelitian ini menunjukkan (Tabel 4.3) semua isolat bakteri menghasilkan gelembung yang berarti positif memiliki kemampuan mengubah hidrogen peroksida menjadi air

4.3. Tabel hasil uji katalase bakteri kitinolitik

Isolat	Hasil Uji Katalase
A	+
B	+

Tabel 4.3. menunjukkan bahwa semua isolat mampu mengkatalisis larutan 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> atau bersifat aerob. Sebaliknya, apabila bakteri tersebut tidak menghasilkan gelembung maka bakteri tersebut tidak memiliki aktivitas katalisis larutan hidrogen peroksida atau dapat dikatakan bakteri tersebut bersifat anaerobik. Hidrogen peroksida diuraikan menjadi air dan oksigen. Reaksi yang ditimbulkan yaitu



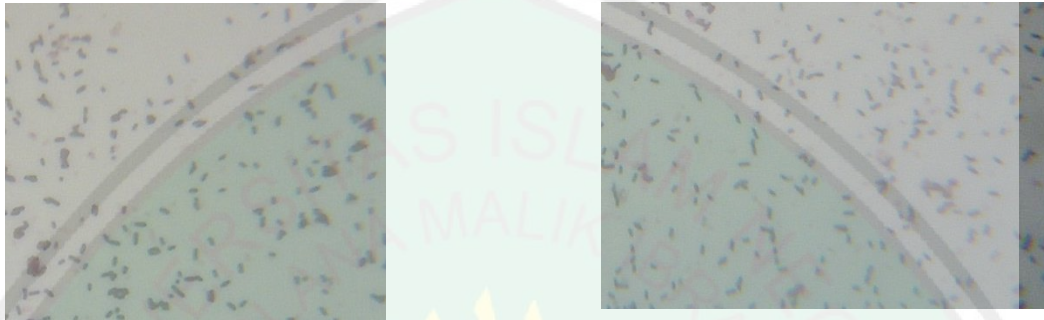
Bakteri biasanya mampu memproduksi anion superoksida (O<sup>2-</sup>) dengan adanya oksigen. Bakteri dapat mempertahankan hidup dari toksisitas anion superoksida karena adanya enzim dismutase superoksida yang dapat diubah menjadi hydrogen peroksida (Volk and Wheeler, 1988). Hidrogen peroksida yang bersifat racun untuk sel bakteri diubah menjadi air dan oksigen oleh bakteri dengan kemampuannya memproduksi enzim katalase, dimana oksigen hasil katalisis digunakan bakteri untuk proses respirasi sel.

#### 4.4.2. Uji Pewarnaan Gram

Uji Pewarnaan Gram berfungsi untuk menentukan karakter dinding sel bakteri Gram positif atau Gram negatif pada bakteri. Perbedaan struktur bakteri Gram positif dengan Gram negatif terletak pada peptidoglikan yang ada pada dinding sel. Bakteri Gram positif memiliki dinding sel yang lebih tebal dibandingkan dengan bakteri Gram negatif sehingga bakteri Gram positif dapat mempertahankan warna ungu yang berasal dari Kristal violet ketika ditambahkan dengan dekolorisasi (alkohol 96%). Hasil pewarnaan Gram menunjukkan bahwa kedua isolat bakteri A dan B memiliki karakteristik Gram positif (berwarna biru). Hasil pewarnaan Gram dari kedua isolat berada pada Tabel 4.4. Sifat bakteri Gram positif dapat dilihat melalui Gambar 4.6. Sifat Gram kedua isolat ini dikuatkan dengan hasil penelitian Nurdin, *et al.* (2014) dan Kamil, *et al.* (2007) isolat bakteri Gram positif dan termasuk dalam kelompok *Bacillus sp.*

Tabel 4.4. Hasil pewarnaan Gram

Kode Isolat	Gram	Ciri-ciri Sel	Ukuran Sel ( $\mu\text{m}$ )
A	+	Batang Pendek	2,62
B	+	Batang Pendek	2,66

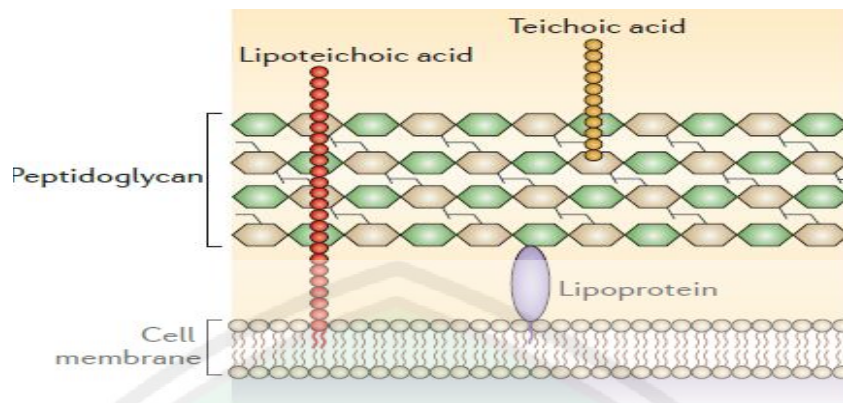


(a)

(b)

Gambar 4.6. Hasil pewarnaan (a) isolat A dan (b) isolat B

Sifat Gram positif disebabkan karena dinding sel bakteri yang tersusun oleh peptidoglikan satu lapis (molyer) dan tebal. Black (2005) menjelaskan bahwa dinding sel bakteri Gram positif berkisar antara 15-80 nm dan tersusun dari peptidoglikan yang berupa asam tunggal dan lebih dari 50% berat kering sedangkan pada bakteri Gram negatif dinding sel bakteri sangat tipis. Bakteri Gram negatif memiliki beberapa lapisan saja dan tebalnya hanya berkisar antara 11-15 nm dan memiliki 10% peptidoglikan dari berat kering.



Gambar 4.7. Struktur Sel bakteri Gram positif (Brown *et al*, 2015)

Kedua bakteri baik Gram positif maupun bakteri Gram negatif akan sama-sama menghasilkan warna ungu ketika ditambahkan dengan Kristal violet. Namun, pada bakteri Gram positif yang diserap lebih banyak dibandingkan dengan Gram negatif. Karena pada bakteri Gram positif dinding sel lebih tebal antara 15-80 nm (Black, 2005) sehingga dapat menyerap dan mengikat Kristal violet lebih banyak. Secara umum, bakteri akan mengikat pewarna sederhana karena sitoplasma yang bersifat basofil (suka basa).

Warna ungu yang terjadi setelah sel diberikan reagen Kristal violet pada sel bakteri Gram positif dan bakteri Gram negatif. Namun, pada bakteri Gram positif warna ungu semakin kuat karena setelah penambahan reagen iodine yang berfungsi sebagai penguat warna warna ungu semakin terikat pada dinding peptidoglikan bakteri Gram positif yang tebalnya antara 15-80 nm (Black, 2005). Tebalnya dinding sel bakteri gram positif menyebabkan semakin banyak Kristal violet yang terikat pada dinding sel dan reagen iodine yang terikat pada polisakarida peptidoglikan membuat warna ungu menjadi lebih pekat. Sedangkan pada bakteri Gram negatif, warna ungu yang ada pada dinding sel akan luruh ketika reagen iodine ditambahkan karena dinding sel mengandung peptidoglikan

yang tipis dan menyebabkan permeabilitas menjadi lebih besar dan warna ungu menjadi hilang. Bakteri Gram negatif mengandung kadar lipid yang lebih tinggi sehingga lipid akan mudah larut ketika penambahan alkohol dan membuat pori-pori membran sel menjadi lebih besar (Strohl *et al*, 2001). Ketebalan dinding sel yang sangat besar (berkisar antara 15-80 nm) pada bakteri Gram positif menyebabkan ikatan antara dinding sel dengan reagen kristal violet sangat besar ketika penambahan reagen iodin yang memperkuat warna ungunya. Sehingga, ketika ditambahkan alkohol sebagai dekolorisasi reagen kristal violet dan reagen iodin yang luntur hanya sedikit.

Penambahan safranin sebagai reagen terakhir yang mendeskripsikan karakteristik mikroskopis bakteri menjadi sangat penting. Safranin berfungsi sebagai pewarna terakhir yang ditambahkan pada sel bakteri. Bakteri Gram positif yang sebelumnya berwarna ungu ketika ditambahkan safranin warna ungu yang ada tidak hilang dan masih tetap terikat pada dinding sel karena jumlah kristal violet dan kristal iodin yang memperkuat warna ungu sudah menetap dalam dinding sel bakteri. Sehingga ikatan ionik antara dinding sel dengan kristal violet hanya sedikit yang digantikan oleh safranin ketika dilakukan penambahan menggunakan reagen tersebut. Sedangkan pada bakteri Gram negatif dengan dinding sel yang lebih tipis (berkisar antara 8-15 nm) membuat pewarnaan safranin lebih menetap dibandingkan dengan pewarna kristal violet dan membuat warna dinding sel terlihat merah. Hal ini dikarenakan warna kristal violet sebelumnya sudah diluruhkan dengan menggunakan alkohol, sehingga tidak ada ikatan yang terjadi antara kristal violet dengan dinding sel bakteri Gram negatif (Presscott *et al*, 1999).



#### 4.4.3. Uji Endospora

Uji endospora dilakukan untuk mengetahui kemampuan bakteri dalam menghasilkan spora. Spora akan berwarna hijau ketika dilihat dengan mikroskop sedangkan sel vegetatif akan berwarna merah. Uji spora menggunakan reagen malachite green yang khusus digunakan untuk pewarnaan endospora dan inokulum yang diambil adalah inokulum yang telah berumur 3 hari. Volk and Wheeler, (1998) menjelaskan dalam bukunya bahwa endospore terbentuk ketika fase stasioner, maka dari itu pengujian endospore dilakukan setelah dilakukan peremajaan selama 3 hari.

Hasil penelitian ini diketahui bahwa bakteri kitinolitik hasil isolasi dari lumpur mangrove keduanya positif memiliki kemampuan dalam menghasilkan spora. Hal ini sesuai dengan pernyataan Waluyo, (2007) yang menjelaskan bahwa kebanyakan bakteri penghasil spora adalah bakteri yang berasal dari tanah.



Gambar 4.8. Hasil pewarnaan pada bakteri kitinolitik (a) isolat A dan (b) isolat B

Gambar 4.8. menunjukkan bahwa kedua isolat positif memiliki kemampuan menghasilkan endospora yang ditunjukkan dengan warna hijau pada

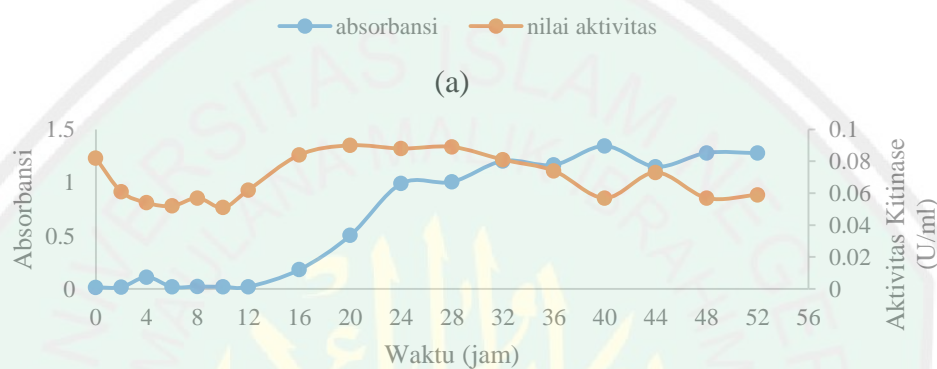
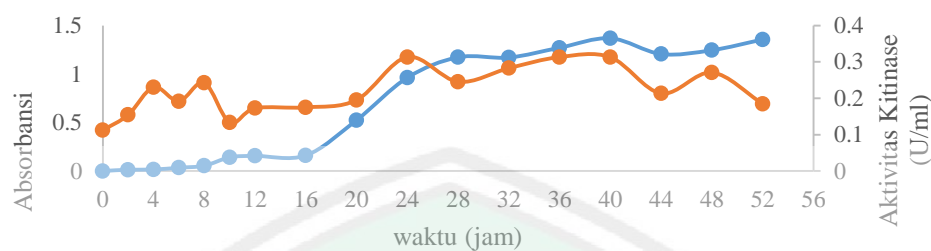
endospora dan merah pada sel vegetatifnya. Endospora sangat tahan terhadap bahan kimia. Maka dari itu tidak semua pewarna bakteri dapat mewarnai endospora karena dinding endospora yang impermiabel. Sehingga pewarna sulit masuk kedalam dinding endopora. Namun, zat warna masih dapat diserap dengan menggunakan pemanasan. Proses pemanasan ini menyebabkan lapisan terluar endospora mengembang sehingga pewarna dapat masuk dan mewarnai endospore (Lay, 1994). Melalui semua pengujian mikroskopis bakteri menurut *Bergey's Manual Book*, (1957) kedua isolat tersebut dikategorikan sebagai bakteri *Bacillus sp* (Tabel 4.5).

Tabel 4.5. Karakter Bakteri <i>Bacillus sp</i>	
Pengujian	Karakter <i>Bacillus sp</i>
Bentuk	Berbentuk batang
Uji Endospora	Memiliki endospora yang berbentuk gelondong atau tongkat
Uji Pewarnaan Gram	Gram positif, ada beberapa spesies bersifat gram negative
Uji katalase	Positif

Sumber: *Bergey's Manual Book*, 1957

#### 4.5. Kurva Pertumbuhan Bakteri Kitinolitik

Kurva pertumbuhan bakteri digunakan sebagai penggambaran *life cycle* bakteri. Dimulai pada fasa adaptasi hingga fasa kematian bakteri. Kurva pertumbuhan diukur dengan menggunakan nilai OD (*Optical Density*) bakteri menggunakan spektrofotometer *UV-Vis*. Fasa kehidupan bakteri terdapat empat bagian yaitu fasa lag (adaptasi), fasa logaritmik (pertumbuhan), fasa stasioner dan fasa kematian.



Gambar 4.9. Kurva pertumbuhan bakteri kitinolitik (a) Isolat A dan (b) Isolat B

Fasa lag (adaptasi) ditandai dengan pertumbuhan bakteri yang masih sedikit. Hal ini dikarenakan inokulum masih membutuhkan waktu untuk penyesuaian, pembesaran dan mensintesis selnya. Selain itu sel belum membelah secara maksimum dan populasi masih sangat jarang sehingga sel dapat terlarut (Talaro, 2005). Hasil penelitian ini fasa lag Isolat B berada pada jam ke 0-12 sedangkan Isolat A mengalami fasa lag dari jam ke 0-16. Fasa ini ditandai dengan bentuk kurva yang masih landau yang ditandai dengan serapan yang masih rendah. Purkan, *dkk.* (2014) melaporkan bahwa fasa lag bakteri kitinolitik yang diisolasi dari sampah organik berada pada jam 0-2. Nurdin, *etc.* (2016) melaporkan bahwa bakteri kitinolitik yang diisolasi dari tanah Taman Nasional

Bukit Duabelas memiliki fase lag pada jam ke 0-3. Perbedaan ini dimungkinkan karena fasa hidup bakteri dalam fasa lag berbeda-beda tergantung pada populasi bakteri yang ada (Talaro, 2005).

Fasa kedua setelah fasa logaritmik dimana fasa pertumbuhan sel sangat tinggi. Fasa ini akan terus berlanjut selama jumlah nutrisi dalam media masih sangat mencukupi untuk bakteri berkembang lebih banyak (Talaro, 2005). Fasa ini ditandai dengan kenaikan garis secara gradual dan terus naik. Isolat B memiliki fasa logaritmik terjadi antara jam 16-24 sedangkan untuk isolat A mengalami fasa logaritmik dari jam ke 14-20. Berbeda dengan Purkan dkk, (2014) yang mengalami fasa log pada jam ke 4-12 dan Nurdin, etc. (2016) yang mengalami fasa lag pada jam ke 3-6. Enzim kitinase adalah enzim inducibel (Herdyastutik, 2014) yang dihasilkan dalam fasa logaritmik. Aktivitas optimum enzim kitinase berada pada jam ke 24 untuk isolat A dengan aktivitas sebesar 0,314 U/ml dan isolat B pada jam ke 20 dengan aktivitas sebesar 0,09 U/ml. Karena pada fasa tersebut aktivitas metabolisme sel berada pada tahap optimum dan aktif sehingga dapat menghasilkan senyawa metabolit yang maksimal (purkan, 2014).

Fasa selanjutnya yang dilalui adalah fasa stasioner, dimana pada fasa ini jumlah bakteri yang tumbuh sama dengan jumlah bakteri yang mati. Sehingga pertumbuhan bakteri relatif lebih stasioner atau tetap bahkan berhenti. Hal ini disebabkan karena jumlah nutrisi dan oksigen yang ada semakin berkurang, selain itu adanya asam organik yang dihasilkan atau bahan kimia lain yang ada dalam media pertumbuhan (Talaro, 2005). Fasa stasioner Isolat B terjadi pada jam ke 24-40. Sedangkan pada isolat A terjadi pada jam ke 28-40. Pada fasa ini jumlah nutrisi dalam media pertumbuhan semakin sedikit dan menyebabkan jumlah

bakteri yang tumbuh dan yang mati berjumlah sama. Berbeda dengan Nurdin, *etc.* (2016) mengalami fasa stasioner pada jam ke 6-30 dan Purkan, *dkk.* (2014) mengalami fasa stasioner pada jam ke 12-24. Perbedaan ini dimungkinkan karena kemampuan optimum bakteri berbeda-beda dalam memproduksi enzim kitinase.

Fasa keempat pada pertumbuhan bakteri adalah fasa kematian bakteri. Dimana pada fasa ini nutrisi dalam media pertumbuhan telah habis sehingga bakteri tidak bisa tumbuh dan memulai fasa kematian. Fasa kematian bergantung pada resistensi spesies terhadap toksisitas media pertumbuhan (Talaro, 2005). Sehingga pertumbuhan bakteri tidak terjadi atau pertumbuhan bakteri lebih lambat bila dibandingkan dengan fasa stasionernya. Pada kedua sampel mengalami fasa kematian pada jam ke 40 yang ditandai dengan menurunnya kurva bakteri.

#### **4.6. Uji Aktivitas Enzim Kitinase**

Pengujian aktivitas kitinase menggunakan metode Kalorimetri dengan spektrofotometer uv-vis. Uji aktivitas dilakukan dengan variasi suhu untuk mencari suhu optimum yang dapat digunakan bakteri dalam menghasilkan enzim kitinase dengan aktivitas tertinggi. Variasi suhu dilakukan dengan rentang 30°-50°C. Uji aktivitas menunjukkan adanya aktivitas optimum pada suhu 45°C pada kedua isolate bakteri kitinolitik. Hasil aktivitas kitinase bakteri A dan B berada dalam Tabel 4.7

Kenaikan suhu menyebabkan terbentuknya ikatan antara substrat dengan enzim akan semakin cepat (Poedjiadi, 1994), sehingga setiap kenaikan suhu berbanding lurus dengan kenaikan aktivitas enzim. Notasi a pada Tabel 4.6 menunjukkan adanya perbedaan nilai. Perbedaan nilai yang signifikan dinotasikan

dengan notasi c pada suhu 45°C. Penelitian ini menunjukkan bahwa bakteri kitinolitik dapat menghasilkan enzim kitinase yang memiliki aktivitas optimum pada suhu tinggi. Menurut (Pescott *et al.*, 2005) bakteri termofilik dapat hidup pada suhu yang berkisar antara 45°C atau lebih dan suhu optimum bakteri kitinolitik berada pada suhu 65°C. Suhu 30°C belum menunjukkan kenaikan aktivitas enzim kitinase karena pada suhu 30°C enzim kitinase belum mencapai suhu optimum enzim untuk bekerja, sedangkan pada suhu 50°C aktivitas enzim menurun sangat drastis dikarenakan enzim menurun akibat enzim yang mulai terdenaturasi pada suhu tinggi sehingga merusak sisi aktif enzim yang terdiri dari protein (Poedjiadi, 1994).

Tabel 4.6. Hasil aktivitas kitinase dengan variasi suhu

Isolat Bakteri	Suhu (°C)	Aktivitas Kitinase (U/ml)*
A	30°	0,0408 <sup>a</sup>
	35°	0,0782 <sup>b</sup>
	40°	0,0772 <sup>b</sup>
	45°	0,0934 <sup>c</sup>
	50°	0,0492 <sup>a</sup>
B	30°	0,0330 <sup>a</sup>
	35°	0,0946 <sup>b</sup>
	40°	0,1038 <sup>b</sup>
	45°	0,1705 <sup>c</sup>
	50°	0,0457 <sup>a</sup>

\* adanya huruf yang berbeda menunjukkan adanya perbedaan nilai pada Uji Tukey

Tabel 4.6. menunjukkan bahwa pada suhu 45°C bakteri dapat menghasilkan aktivitas sebesar 0,1705 U/ml untuk isolat bakteri B dan aktivitas untuk isolat bakteri A sebesar 0,0934 U/ml. Karakterisasi suhu ini dilakukan untuk mengetahui aktivitas optimum bakteri. Nurdin, *et al.* (2016) melaporkan enzim kitinase dari bakteri kitinolitik asal Tanah Taman Nasional Duabelas jambi memiliki aktivitas optimum pada suhu 45°C dengan aktivitas 1,15 U/ml. Vincy, *et al.* (2014) melaporkan enzim kitinase dari bakteri kitinolitik asal tambak memiliki suhu optimum 45°C dengan aktivitas 0,08 U/ml. Isolat A memiliki aktivitas yang lebih kecil dibandingkan dengan isolat B karena kemampuan degradasi isolat A yang lebih rendah.

Variasi suhu pada penelitian ini menunjukkan bahwa suhu berpengaruh terhadap aktivitas suhu yang ditandai dengan nilai signifikansi (Lampiran 6) uji TwoWay ANOVA sebesar 0,000 dimana hasil tersebut menolak H<sub>0</sub> ( $\alpha < 0,05$ ). Dua isolat juga berpengaruh signifikan terhadap aktivitas kitinase (Lampiran 6) dengan nilai  $\alpha = 0,001$  ( $< 0,05$ ). Perbedaan suhu yang paling signifikan terdapat dalam Tabel Homogenous (Lampiran 6) dimana nilai suhu 45°C adalah 0,1319.

#### 4.7. Hikmah Penelitian

Allah berfirman dalam Al Qur'an Surat Ali Imran Ayat 190-191.

إِنَّ فِي خَلْقِ السَّمُوتِ وَالْأَرْضِ وَاخْتِلَافِ اللَّيْلِ وَالنَّهَارِ لَآيَاتٍ لِّأُولِي الْأَلْبَابِ (١٩٠) الَّذِينَ يَذْكُرُونَ اللَّهَ قِيَمًا وَقُعُودًا وَعَلَىٰ جُنُوبِهِمْ وَيَتَفَكَّرُونَ فِي خَلْقِ السَّمُوتِ وَالْأَرْضِ رَبَّنَا مَا خَلَقْتَ هَذَا بَطْلًا تُسَبِّحُكَ فَقِنَا عَذَابَ النَّارِ (١٩١)

“190. Sesungguhnya dalam penciptaan langit dan bumi, dan silih bergantinya malam dan siang terdapat tanda-tanda bagi orang-orang yang berakal. 191. (yaitu) orang-orang yang mengingat Allah sambil berdiri atau duduk atau dalam keadan berbaring dan mereka memikirkan tentang penciptaan langit dan bumi (seraya berkata): "Ya Tuhan kami, tiadalah Engkau menciptakan ini dengan sia-sia, Maha Suci Engkau, maka peliharalah kami dari siksa neraka”

Allah SWT menciptakan alam dengan sumber dayanya yang melimpah dan memiliki kemanfaatan untuk manusia, termasuk di dalamnya adalah kekayaan yang dimiliki oleh ekosistem mangrove. Mangrove menjadi habitat bagi beberapa jenis kepiting dan crustacea, dimana kedua hewan laut tersebut bermanfaat bagi manusia. Selain untuk dikonsumsi, cangkang dari kedua hewan laut ini mengandung kitin yang bisa dimanfaatkan sebagai substrat enzim kitinase. Kitin tersebut diubah menjadi bentuk monomernya yang dapat dimanfaatkan dalam bidang kesehatan dan pertanian (Pratiwi, 2015).

Ciptaan Allah lainnya yang menjadi manfaat untuk manusia adalah bakteri. Bakteri juga terdapat dalam ekosistem mangrove. Allah SWT menciptakan bakteri dengan ukuran yang sangat kecil. Walaupun ukurannya sangat kecil namun kemanfaatan yang dimiliki oleh bakteri sangat besar. Bakteri berperan dalam proses degradasi jasad-jasad renik maupun polimer limbah alam yang melimpah. Sehingga dari hasil degradasi bakteri tersebut dapat menjadi sesuatu yang berguna dan dapat dimanfaatkan kembali.

Bakteri dapat mendegradasi jasad renik ataupun polimer alam dengan bantuan enzim yang diproduksinya. Bakteri adalah makhluk Allah yang sangat kecil (Volk and Wheeler, 1993) dan bisa memproduksi enzim untuk keseimbangan kehidupan manusia. Enzim ini bertugas dalam degradasi limbah kitin yang ada di alam. Allah menciptakan limbah dan Allah juga menciptakan enzim yang digunakan untuk mendegradasi limbah tersebut. Allah tidak menciptakan semua yang ada di dunia untuk hal yang sia-sia.

Ayat رَّبَّنَا مَا خَلَقْتَ هَذَا بَاطِلًا *“Ya Rabb kami tidaklah Engkau ciptakan ini dengan sia-sia”*. Penggalan ayat tersebut menyebutkan bahwa Allah tidak



menciptakan sesuatu dengan sia-sia begitu juga dengan bakteri penghasil enzim ini. Enzim kitinase dapat berkerja dalam keadaan yang optimum. Salah satu faktor yang menyebabkan enzim bekerja secara optimum adalah suhu. Suhu yang optimum dapat mempercepat laju aktivitas enzim (Poedjiadi,1994). Pada penelitian ini suhu optimum yang dimiliki oleh kedua isolat bakteri yang berhasil diisolasi adalah pada suhu 45°C. Pada suhu tersebut aktivitas yang dihasilkan bakteri adalah sebesar 0,1705 U/ml untuk isolat B dan 0,0934 U/ml untuk isolat A.



## **BAB V**

### **PENUTUP**

#### **5.1. Kesimpulan**

Kesimpulan yang dapat diambil dari penelitian ini adalah

1. Penelitian ini berhasil mengisolasi lima bakteri dari lumpur mangrove Beejay Bakau Resort. Dua isolat bakteri memiliki aktivitas kitinolitik terbesar dengan karakter mikroskopis Gram positif, memiliki endospora dan memiliki aktivitas katalase. Kedua isolat termasuk kedalam kelompok bakteri *Bacillus sp.*
2. Suhu optimum enzim dari kedua isolat berada pada suhu 45°C dengan aktivitas isolat B sebesar 0,1705 U/ml dan untuk isolat A sebesar 0,0934 U/ml.

#### **5.2. Saran**

Saran yang dapat dilakukan untuk penelitian ini adalah

1. Penelitian selanjutnya dapat diteruskan dengan karakterisasi enzim dengan variabel pH, konsentrasi enzim, konsentrasi substrat dan inhibitor.
2. Adanya penambahan produksi enzim kitinase dengan memperbesar konsentrasi enzim, konsentrasi substrat atau penambahan inhibitor yang menyebabkan produksi enzim meningkat.
3. Adanya penelitian lanjutan yang berfungsi untuk mengidentifikasi spesies bakteri kitinolitik dengan metode elektroforesis.
4. Penyamaan OD ketika produksi enzim kitinase

## DAFTAR PUSTAKA

- Adney, B dan Baker, J. 2008. Measurement of Cellulase Activities-Laboratory Analytical Procedur (LAP). Technical Report.
- Al Qurthubi, S. I. 2008. Tafsir Al Qurthubi. Jakarta; Pustaka Al Azzam
- Annamalai,N. dan Rajeswari, M.V. 2011. Purification and Characterization of Chitinase from *Alcaligenes faecalis* AU02 by Utilizing Marine Waste and It's Antioxidant Activity. Journal Springer. Vol. 61:801-807.
- Annamalai,N; Giji, S; Arumugam, M. and Balasubramanian, T. 2010. Purification and Characterization of Chitinase from *Micrococcus sp.*Ag84 Isolate from Marine Environment. African Journal of Microbiology Research. ISSN: 1996-0808.Vol. 4. No. 24. Pp.2822-2827
- Arif, A.R; Ischaidar dan Nasir, H. 2013. Isolasi Kitin dari Limbah Udang Putih (*Penaeus merguensis*) secara Enzimatis. Jurnal Seminar Nasional Kimia Jurusan Kimia Universitas Hasanuddin
- Bassler, B.L; Yu, C; Lee, Y.C. and Roseman, S. 1991. Chitin Utilization by Marine Bacteria Degradation and Catabolism of Chitin Oligosaccharides by *Vibrio furnishii*. Journal Biological Chemistry. Vol. 266. No.36.
- Black, J.G. 2005. Microbiology: Principle and Exploration Sixth Edition An Introduction to Taxonomy Bacteria. John Willey and Sons Inc.
- Brown, L.; Wolf, J.M.; Rosales, R.P. and Casadevali, A. 2015. Trough the Wall: Extraceluller Visicles in Gram-positif Bavteria Mycobacteria and Fungi. Nature Review Microbiology IOP Published
- Buchanan,R.E. dan Gibbons, N.E. 2003. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. The William & Wilkins Company Baltimore.USA.
- Cahyani, L. 2013. Pemanfaatan Tepung Cangkang Udang Sebagai Media Produksi Kitinase Oleh Bakteri Kitinolitik Isolat 26 [Skripsi]. Jember: Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Negeri Jember.
- Campbell, L; Jun dan William O.B. 1951. A Study of Chitin Decomposing Microorganism of Marine Origin. Texas;University of Texas
- Chaiharn,M. dan Lumyong, S. 2012. Solid State Cultivation of *Bacillus thuringiensis* R 176 with Shrimps Shells and Rice Straw As a Substrate for Chitinase Production. Journal Springer. Vol.(63):443-450.

- Chen, J.P. dan Lee, M.S. 1994. Simultaneous Production and Partition of Chitinase During Growth of *Serratia marcescens* In An Aqueous System Two Phase. *Biotechnology Technique*. Vol. 8 No.11. pp.783-788.
- Cohen-Kupiec, R dan I. Chet. 1998. The Molecular Biology of Chitin Digestion. *Curr Opin Biotechnol*.9: 270-7
- Cowan,S.T. 2004. *Manual for the Identification of Medical Bacteria*. Cambridge University Press. London.
- Darmawan, E; Mulyaningsih, S dan Firdaus, F. 2007. Karakteristik Khitosan yang Dihasilkan dari Limbah Kulit Udang dan Daya Hambatnya terhadap Pertumbuhan *Candida albicans*. *LOGIKA*. Vol.4: 207-213.
- Das, S; Lyla, P.S dan Khan, S.A. 2006. Marine Microbial Diversity and Ecology: Importance ad Future Perspective. *General Article*. Vol. 90 No.10.
- Day R.A. dan Underwood, J.D.A. 2002. *Analitik Kimia Kuantitatif*. Jakarta: Erlangga
- Deepthi, M K; Sudhakar, M S dan Devamma, M N. 2012. Isolation and Screening of *Streptomyces sp* from Coringa Mangrove Soils for Enzyme Production and Antimicrobial Activity. *International Journal of Pharmaceutical, Chemical and Biological Science*. ISSN 2249-9504. Vol. 2 No.1.
- Effendy.2013. *Perspektif Baru Kimia Koordinasi Jilid 1 Edisi 2*. Malang: Indonesian Academic Publishing
- Fardiaz, S. 2002. *Mikrobiologi Pangan 1*. Jakarta: PT Gramedia Pustaka Utama,
- Felix, F; Nugroho,T.T; Silalahi, S. dan Octavia, Y. 2011. Skrining Bakteri *Vibrio sp* Asli Indonesia Sebagai Penyebab Penyakit Udang Berbasis Tehnik 16S Ribosomal DNA. *Jurnal Ilmu Teknologi Kelautan Tropis*. Vol.3. No.2.
- Fernandez, M.P; Juelita, U; Correa and Cabib, E. 1982. Activation of Chitin Synthetase In Permeabilized Cells Of A *Saccharomyces Cerevisiae* Mutant Lacking Proteinase B. *Journal Bacteriology PP*.Vol.17: 204-217.
- Fukamizo, T. 2000. *Chitinolytic Enzyme: Catalysis, Substrat Binding and Their Application*. Bentham Science Publishers Ltd.
- Funke B.R, Tortora G.J dan Case C.L. 2004. *Microbiology: an introduction (edisi ke-8th ed.)*. San Francisco: Benjamin Cummings
- Ghufron, H. 2012. *Ekosistem Mangrove: Potensi, Fungsi, dan Pengelolaan*. Jakarta: Rineka Cipta.

- Gooday, G.W. 1990. The Ecology of Chitin Degradation. In *Advances In Microbial Ecology*. pp. 387-430.
- Gooday, GW. 1994. Physiology of Microbial Degradation of Chitin and Chitosan. in Ratledge C, editor. *Biochemistry of microbial degradation*. Publ.p: 279-312.
- Haran, S; Schickler, H; Oppenheim, A and Chet, I. 1995. New Components of The Chitinolytic System of *Trichoderma harzianum*. *Mycology Research*. Vol.9: 225-227.
- Herdyastuti, N.; Raharjo, T.J.; Mudasir and Matsjeh, S. 2009. Chitinase and Chitinolytic Microorganism: Isolation, Characterization and Potential. *Journal Chem Jurusan Kimia Universitas Negeri Surabaya*. Vol.9 No.1.
- Herdyastutik, *dkk.* 2010. Chitinolytic Bactery Activity Isolated From The Mud Fields. *Berkas Penelitian Hayati*. Vol. 15 No. 107-111.
- Hidayat, N. 2008. *Mikrobiologi Industri*. Yogyakarta; Penerbit Andi
- Hiraga, *et al.* 2014. Isolation and Characterization of Chitinase from a Flake-Chitin Degrading Marine Bacterium *Aeromonas hydrophila* H-2330. ISSN:0916-8451.
- Hirano, S; Nakahira, T; Nakagawa, M. dan Kim, S.K. 1999. The Preparation and Applications of Functional Fibers From Crab Shell Chitin. *Journal of Biotechnology*. Vol.70: 373-380.
- Holt, J. G. 1994. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* , 8th. Philadelphia : Williams dan Wilkins.
- Ibnu Katsir. 2007. *Tafsir Ibnu Katsir*. Surabaya; Pustaka Imam Syafii
- Ikegami, *et al.* 2000. Solution Structure of the Chitin-binding Domain of *Bacillus circulans* W1-12 Chitinase A1. *Journal of Biological Chemistry*. Vol. 275.No.18.
- Kaban, J. 2009. *Modifikasi Kimia dari Kitosan dan Aplikasi Produk Yang Dihasilkan*. Medan: Universitas Sumatera Utara
- Kamil, A; Rizk, M; Saleh, M dan Moustofa S. 2007. Isolation and Identification of Rizhosphere Soil Chitinolytic Bacteria and their Potential in Antifungal Biocontrol. *Global Jurnal of Molecular Science*. ISSN 1990-9241. Vol.2 No.2.
- Kurniasih, Mardiyah dan Kartika, D. 2011. Sintesis dan Karakterisasi Fisika-Kimia Kitosan. *Jurnal Inovasi Jurusan MIPA Unoversitas Soedirman*. Vol.5 No.1.

- Kusmiati dan Agustini N.W.S. 2010. Pemanfaatan Limbah Onggok untuk Produksi Asam Sitrat dengan Penambahan Mineral Fe dan Mg pada Substrat Menggunakan Kapang *Trichoderma Sp* dan *Aspergillus Niger*. Seminar Nasional Biologi.
- Lay, B.W. 1994. Analisis Mikroba di Laboratorium. Jakarta; PT Gradindo Persada
- Matsumoto, K. S. 2006. Fungal Chitinases. Journal of Agricultural and Food Biotechnology. ISBN: 81-7736-269-0. Vol.7: 289-304.
- Mawarda, P.C; Triana, R. dan Nasrudin . 2011. Fungsionalisasi Limbah Cangkang Udang Untuk Meningkatkan Kandungan Kalsium Susu Kedelai Sebagai Penambah Gizi Masyarakat [Skripsi]. Bogor: Institut Pertanian Bogor.
- Nasran, S; Ariyani F dan Indriati N. 2003. Produksi Kitinase dan Kitin Deasetilase dari *Vibrio harveyi*. Jurnal Penelitian Perikanan Indonesia. Vol.9: 167-174.
- Noviendri, D; Fawzya, Y.N dan Chasanah Ekowati. 2008. Karakteristik dan Sifat Kinetika Enzim Kitinase dari Isolat Bakteri T5a1 Asal Terasi. Balai Besar Riset Pengolahan Produk dan Bioteknologi Kelautan. Vol.3 No.2.
- Nurdin, G.M.; Mubarik, N.R. dan Sudirman,L.I. 2016. Selection of Chitinolytic Bacteria As Biological Control of *Collethotricum capsici*. Malaysian Journal of Microbiology. Vol.12.No.1.
- Patil, R.S; Ghormade, V and Despande, M.V. 2000. Chitinolytic Enzymes: an Exploration. Journal Enzyme and Microbial Technology.Vol.26: 473-483.
- Pelczar, M.J. dan Chan, E.C.S. 2008. Dasar-dasar Mikrobiologi. Jakarta; UI Press
- Pelczar, M.J. dan Chan, E.C.S. 2010. Dasar-dasar Mikrobiologi. Jakarta; UI Press
- Poedjiadi, A dan Supriyanti F.M.T. 2012. Dasar-dasar Biokimia. Depok: Penebit Universitas Indonesia
- Pratiwi R.S; Susanto, T.E; Wardhani, Y.A.K dan Sutrisno, A. 2015. Enzim Kitinase dan Aplikasi di Bidang Industri: Kajian Pustaka. Jurnal Pangan dan Agroindustri. Vol.3 No.3.
- Prescott, L.M. 2003. Microbiology. New York; Mc Graw Hill.
- Prescott, L.M.; John, P.H. and Donald, A.K. 2005. Microbiology Sixth Edition. New York; Mc Graw-Hill

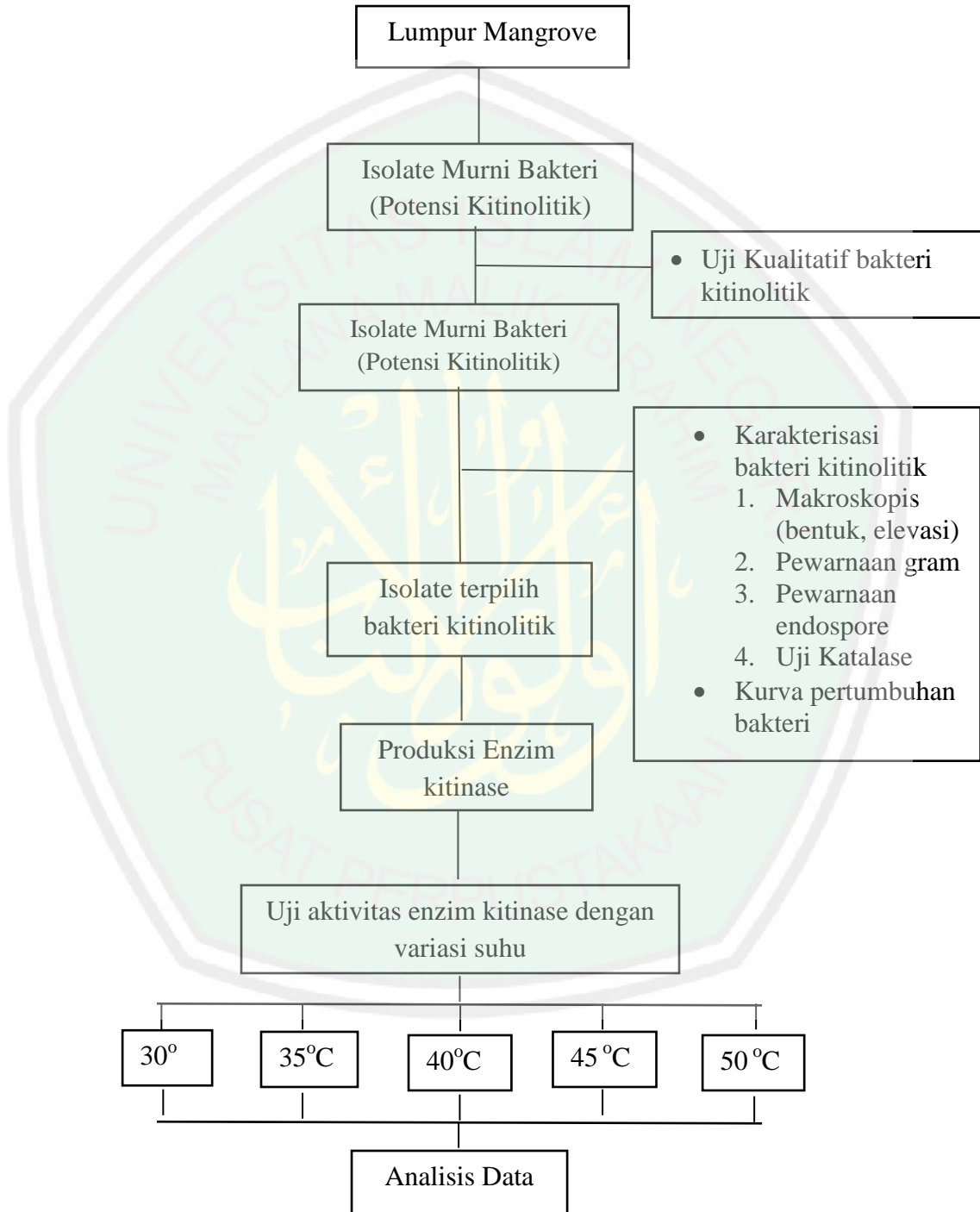
- Prescott, S.C. and C.G. Dunns.1999. *Industrial Microbiology*. Wesport CONsticut: The AVI Publishing Co.Inc
- Purkan; Azizah, B; Baktir, A dan Sumarsih, S. 2014. Eksplorasi Bakteri Kitinolitik dari Sampah Organik : Isolasi dan Karakterisasi Enzim Kitinase. Vol.9 No.2.
- Purwani, E.Y *dkk.* 2002. Studi Pendahuluan Enzim Kitinase Ekstraseluler Yang Dihasilkan Oleh Isolat Bakteri Asal Manado. *Jurnal Teknologi Dan Industri Pangan*. Vol.13: 111-117.
- Purwani, E.Y; Suhartono, M.T; Rukayadi, Y; Hwang, J.K. dan Pyun, Y.R.2004. Characteristic of Thermostable Chitinase Enzymes from The Indonesian *Bacillus sp.*1326. *Enzyme and Microbial Journal*. Vol. 35.No. 147-153.
- Raharini, A.O; Kawuri, R. dan Khalimi, K. 2012. Penggunaan *Streptomyces sp* Sebagai Biokontrol Penyakit Layu Pada Tanaman Cabai Merah (*Capsicum annum L.*) yang Disebabkan Oleh *Fusarium oxysporum f.sp. capsici*. ISSN: 2088-155x.
- Rahayu, S; Fredy, T; Maggy, T.S; Hwang, J.K dan Pyur, Y.R. 1999. Eksplorasi Bakteri Termofilik Penghasil Enzim Kitinase Asal Indonesia. *Prosiding Seminar Hasil-Hasil Penelitian Bidang Ilmu Hayat*.
- Sahoo, K. dan Dhal, N.K. 2008. Potential Microbial Diversity in Mangrove Ecosystem: A Review. Vol. 38. No.2.
- Sashiwa, *et al.* 2002. Production of N-Acetyl glucosamine from  $\alpha$ -chitin by Crude Enzymes from *Aeromonas hydrophila* H-2330. *Carbohydrate Research*. Vol.337: 761-763.
- Setia, I.N dan Suharjo. 2015. Diversitas dan Uji Potensi Bakteri Kitinolitik dari Limbah Udang. *Jurnal Biotropika*. Jurusan Biologi Universitas Brawijaya Vol. 3 No.2.
- Setyahadi, S; Bunassor, T.K dan Hendarsyah, D. 2006. Karakterisasi kitin Deasetilase Termotabil Isolat Bakteri Asal Pancuran Tujuh Batu Raden Jawa Tengah. Vol. 17 No.1.
- Setyawan, A.D; Susilowati, A dan Sutarno. 2002. Biodiversitas Genetik, Spesies, dan Ekosistem Mangrove di Jawa. Surakarta: Jurusan Biologi FMIPA UNS
- Silham, A. 2007. Production and Characterization of the Recombinant Wheat Chitinase Wch1 and Generation of Chitin-Specific Antibodies [Disertation]. Jerman; Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule

- Spalding M; Kainuma M; dan Collins, L. 2010. World Atlas of Mangroves. A collaborative project of ITTO, ISME, FAO, UNEP-WCMC, UNESCO-MAB, UNU-INWEH and TNC. London (UK): Earthscan, London. 319 pp.
- Stivil, A. L; Nichadain, S. N; Moore, J. A dan Kirchman, D.L. 1997. Chitin Degradation Proteins Produced By The Marine Bacterium *Vibrio harveyii* Growing On Different Of Chitin. Applied and Environmental Microbiology. Vol.63: 408-413.
- Strohl, William. A. Rouse, H. and Fisher, B.D. 2001. Lippincott's Illustrated Reviews: Microbiology. USA. Lippincott William & Wilkins
- Subandi. 2010. Mikrobiologi Perkembangan, Kajian dan Pengamatan dalam Perspektif Islam. Bandung; PT. Remaja Rosdakarya
- Sulistyowati, H. 2009. Biodiversitas Mangrove di Cagar Alam Pulau Sempu. Jurnal Saintek Universitas Negeri Jember. Vol. 8 No.1.
- Sumar, H. 1994. Kimia Analisis Farmasi. Jakarta: UI Press
- Suprpto, H.; Sudarno. Dan Tito, I.M. 2014. Isolasi dan Identifikasi Bakteri Kitinolitik yang Terdapat Pada Cangkang Lobster Air Tawar. Jurnal Ilmu Perikanan dan Kelautan. . ISSN: 2083-5842
- Suryadi, Y.; Priyatno, T.P.; Samudra, I.M.; Susilowati, D.N.; Lawati, N. dan Kustaman, E. 2013. Pemurnian Parsial dan Karakterisasi Kitinase Asal Jamur Entomopatogen *Beauveria bassiana* Isolat BB200109. Vol.9 No.2. Jurnal AgroBiogen. Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi.
- Suryanto, D. dan Munir, E. 2006. Potensi Pemanfaatan Isolat Bakteri Kitinolitik Lokal untuk Pengendalian Hayati Jamur. Prosiding Seminar Hasil Penelitian USU. Sumatera Utara: Universitas Sumatera Utara
- Suyono, Y. dan Salahudin, F. 2011. Identifikasi dan Karakterisasi Bakteri *Pseudomonas* Pada Tanah yang Terindikasi Logam. Jurnal Biopropal Industri. ISSN: 2089-0877.
- Talaro, K.P. 2005. Foundation in Microbiology. New York; Mc Graw Hills Companies Inc.
- Toharisman, A. 2007. Peluang Pemanfaatan Enzim Kitinase Di Industri Gula. P3GI.
- Tronsmo, A and Harman, G.E. 1993. Detection and Qualification of N-acetyl- $\beta$ -D-glucosaminidase, Chitobiosidase and Endochitinase in Solution and on Gels. Vol. 208 No. 74-79.



## LAMPIRAN

### Lampiran 1. Metode Penelitian



### 3.5.1. Preparasi Alat dan Bahan

Alat (untuk Isolasi Bakteri)

- Disterilisasi dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit

Hasil

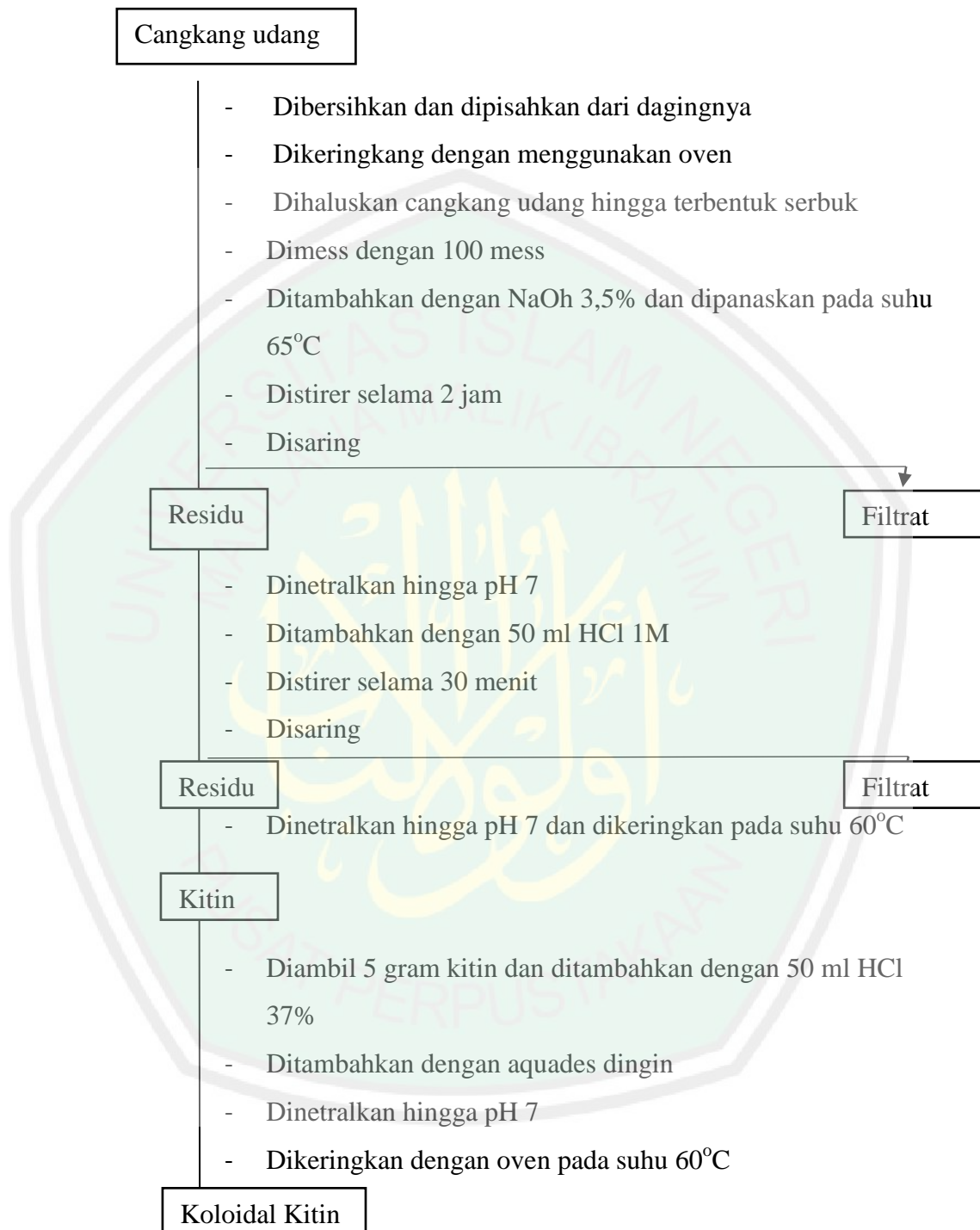
Lumpur mangrove

- Diambil lumpur tanah dari hutan bakau
- Ditempatkan dalam wadah yang telah disterilisasi

Lumpur



### 3.5.2. Koloidal Kitin



### 3.5.3. Pembuatan Media

#### 3.5.3.1. Pembuatan Media Isolasi Bakteri

0,5% koloidal kitin; 0.1%  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 0.02%  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ; 0.1% yeast ekstrak dan 1.5% agar

- Dimasukkan ke dalam labu takar 150 mL
- Ditambahkan 150 mL aquades
- Diaduk hingga homogeny
- Dimasukkan sebanyak 15 mL pada cawan petri

Hasil

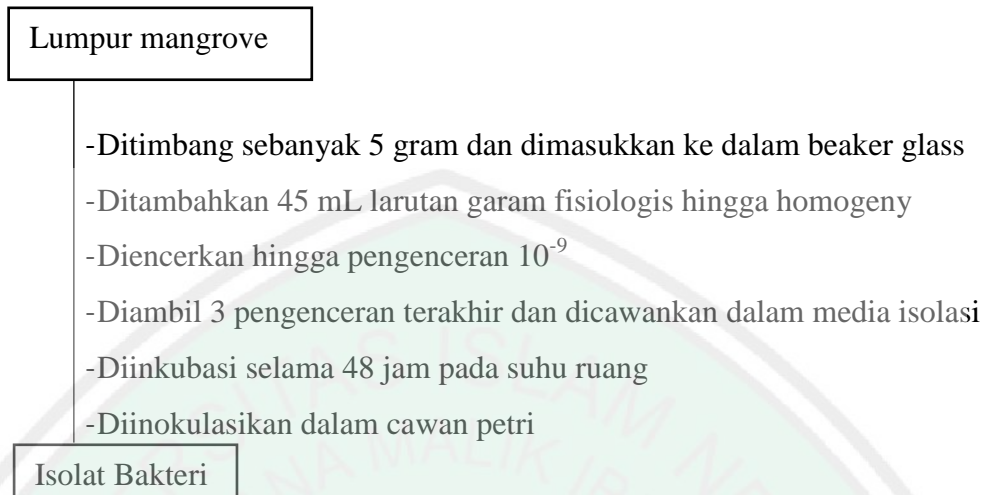
#### 3.5.3.2. Pembuatan Media Kultur Bakteri

1% pepton; 0.5% yeast ekstrak 0,1%  $\text{NaCl}$ ; 0.1%  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ; 0.05%  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 0.001%  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 0.001%  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  dan masing-masing 0.0001%  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{MnSO}_4 \cdot n\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

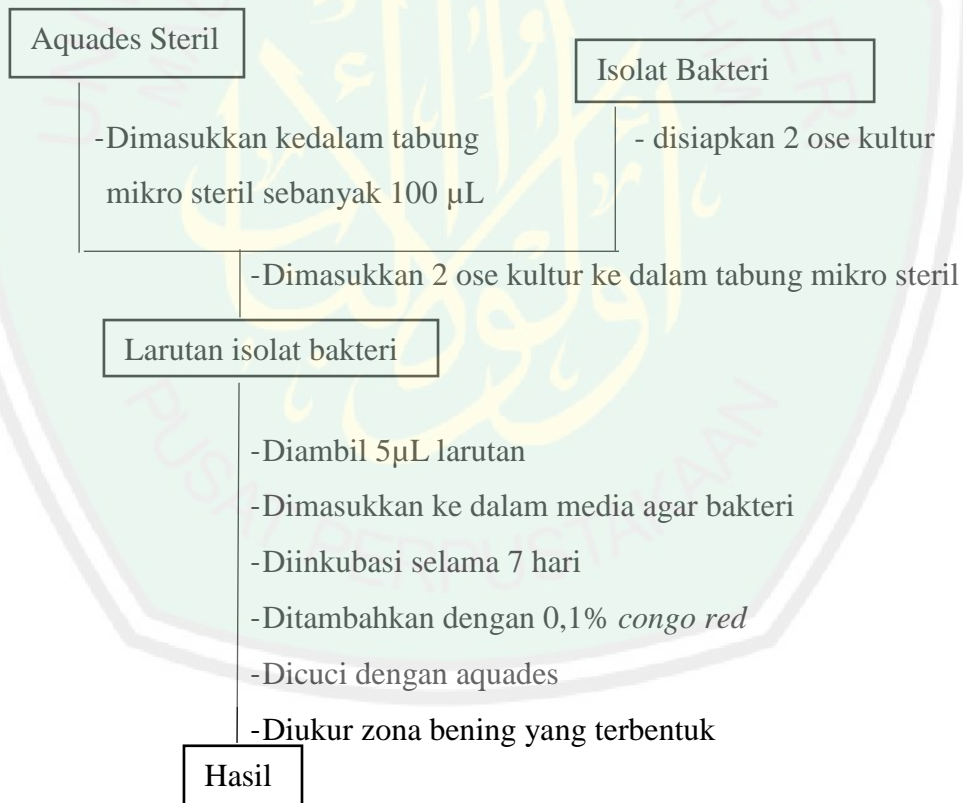
- Dimasukkan ke dalam labu takar 100 mL
- Ditambahkan aquades 100 mL
- Diaduk hingga homogeny
- Dimasukkan ke dalam tabung reaksi

Hasil

### 3.5.4. Isolasi dan Seleksi Bakteri Kitinolitik



### 3.5.5. Uji Bakteri Secara Kualitatif



### 3.5.6. Karakterisasi Bakteri Kitinolitik

#### 3.5.6.1. Identifikasi Makroskopis Bakteri

##### Isolat Terpilih Bakteri Kitinolitik

- Diamati bentuk, elevasi, tepian koloni dan motilitas isolat bakteri

Hasil

#### 3.5.6.2. Uji Katalase

##### Biakan Murni Bakteri Kitinolitik

- Diambil secara aseptis dengan jarum ose
- Disuspensikan dengan aquades steril
- Ditetesi dengan larutan 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>
- Diamati perubahannya

Hasil

#### 3.5.6.3. Pewarnaan Endospora

##### Biakan Murni Bakteri

- Diambil secara aseptis dengan jarum ose
- Disuspensikan dengan aquades steril
- Difiksasi diatas api Bunsen
- Ditetesi dengan malachite green
- Dicuci dengan air mengalir
- Ditetesi dengan safranin dan didiamkan selama 30 detik
- Dicuci dengan air mengalir dan dikeringkan
- Diamati dengan mikroskop

Hasil

### 3.5.6.4. Pewarnaan Gram

#### Biakan murni bakteri

- Diambil secara aseptis dengan jarum ose
- Ditetesi dengan aquades dan difiksasi diatas api
- Ditetesi dengan Pewarnaan Kristal violet dan didiamkan selama 1 menit
- Dicuci dengan air mengalir
- Ditetesi lugol dan didiamkan selama 1 menit
- Dicuci dengan air mengalir
- Ditetesi dengan alcohol 96% dan dibiarkan selama 10-20 detik
- Dicuci dengan air mengalir
- Ditetesi safranin dan dibiarkan selama 20-30 detik
- Ditambahkan minyak emersi dan diamati dengan mikroskop

#### Hasil

### 3.5.7. Pembuatan Kurva pertumbuhan

#### Koloni bakteri terpilih

- Diambil isolate terpilih dan dimasukkan ke dalam 20 mL media cair
- Diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C dan digoyag dengan kecepatan 150 rpm
- Diambil 1% kultur dan dipindahkan ke dalam 20 mL media cair dan diinkubasi dalam keadaan yang sama
- Diambil 3 ml dan diukur nilai OD dengan spektrofotometer *uv-vis*, tahap ini dilakukan dengan selang waktu 2 jam

#### Hasil

### 3.5.8. Produksi Kitinase

#### Inokulum bakteri

- Diambil 2,5 mL inokulum bakteri
- Diinokulasikan dalam 22,5 mL media cair kitin
- Diinkubasi pada suhu ruang selama 24 jam
- Disentrifugasi dingin pada suhu 4°C dengan kecepatan 8000 rpm selama 10 menit

#### Hasil

### 3.5.9. Uji Aktivitas Kitinase

#### 3.5.9.1. Pembuatan Kurva Standar

N-asetil glukosamin 0,1;0,2;0,3;0,4; dan 0,5 mg/ml

- Dipipet 0,5 ml dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi
- Ditambahkan dengan 0,75 ml reagen DNS
- Dihomogenkan dengan vortex
- Dipanaskan dalam air mendidih selama 5 menit
- Ditambahkan 0,75 mL K-Na Tartrat
- Dihomogenkan
- Diukur dengan spektrofotometer dengan panjang gelombang 540nm

#### Hasil



### 3.5.9.2. Pengujian Aktivitas Kitinase dengan Variasi Suhu

#### Ekstrak kasar kitinase

- Diambil 0,5 ml dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi
- Ditambahkan 1 ml substrat koloidal dan diinkubasi selama 2 jam dengan variasi suhu 30°C, 35°C, 40°C, 45°C dan 50°C
- Ditambahkan kalium tartrat dan asam 3,5-diitrosalisilat
- Dipanaskan dalam air mendidih selama 5 menit
- didinginkan
- Diukur absorbansinya pada panjang gelombang 540 nm

#### Hasil

## Lampiran 2. Preparasi Larutan

### 1. Pembuatan Larutan Garam 0,85% NaCl.

Konsentrasi 0.85 % sama dengan 0,85 g NaCl dalam 100 mL aquades. Jadi, untuk membuat larutan 0,85% NaCl adalah ditimbang sebanyak 0,85 g serbuk NaCl dengan neraca analitik, dimasukkan dalam beaker glass 50 mL untuk dilarutkan dengan 10 mL aquades. Dilakukan pengadukan dengan spatula sampai larut sempurna. Setelah larut, dipindahkan dalam labu takar 100 mL dan ditanda bataskan dengan pelarut aquades. Dikocok hingga homogen.

### 2. Pembuatan Media Isolasi dan Kultur

Perhitungan pembuatan media isolasi dan kultur:

$$\% (b/v) = \frac{\text{massa komponen (g)}}{\text{massa campuran (mL)}}$$

Media isolasi dibuat dengan volume total 150mL:

- a. 0,5% Koloidal Kitin

$$0.5\% = \frac{\text{massa komponen (g)}}{150 \text{ mL}}$$

$$M = \frac{0,5 \times 150 \text{ mL}}{150} = 0,75 \text{ gram}$$

- b. 0,1% MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O

$$M = \frac{0,1 \times 150 \text{ mL}}{150} = 0,15 \text{ gram}$$

- c. 0,02% K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

$$M = \frac{0,02 \times 150 \text{ mL}}{150} = 0,03 \text{ gram}$$

d. 0,1% yeast ekstrak  

$$M = \frac{0,1 \times 150 \text{ mL}}{150} = 0,15 \text{ gram}$$

e. 1,5% agar  

$$M = \frac{1,5 \times 150 \text{ mL}}{150} = 2,25 \text{ gram}$$

Media Kultur dibuat dengan volume total 100mL

a. 0,4% Koloidal Kitin  

$$M = \frac{0,4 \times 100 \text{ mL}}{100} = 0,4 \text{ gram}$$

b. 0,5% yeast ekstrak  

$$M = \frac{0,5 \times 100 \text{ mL}}{100} = 0,5 \text{ gram}$$

c. 0,1% NaCl  

$$M = \frac{0,1 \times 100 \text{ mL}}{100} = 0,1 \text{ gram}$$

d. 1% pepton  

$$M = \frac{1 \times 100 \text{ mL}}{100} = 1 \text{ gram}$$

e. 0,1%  $\text{K}_2\text{HPO}_4$   

$$M = \frac{0,1 \times 100 \text{ mL}}{100} = 0,1 \text{ gram}$$

f. 0,05%  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$   

$$M = \frac{0,05 \times 100 \text{ mL}}{100} = 0,05 \text{ gram}$$

g. 0,001%  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  dan  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$   

$$M = \frac{0,001 \times 100 \text{ mL}}{100} = 0,001 \text{ gram}$$

h. 0,0001%  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{MnSO}_4 \cdot n\text{H}_2\text{O}$  dan  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$   

$$M = \frac{0,0001 \times 100 \text{ mL}}{100} = 0,0001 \text{ gram}$$

Media isolasi dibuat dengan mencampurkan bahan 0,75 gram koloidal kitin, 0,15 gram  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,03 gram  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0,15 gram yeast ekstrak dan 2,25 gram agar dimasukkan ke erlenmeyer 150 mL dan ditambahkan dengan 150 mL aquades menggunakan gelas ukur. larutan dihomogenkan.

Media kultur bakteri dibuat dengan komposisi 0,4 gram koloidal kitin, 0,5 gram yeast ekstrak, 0,1 gram  $\text{NaCl}$ , 1 gram pepton, 0,1 gram  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0,05 gram  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,001 gram  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  dan  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,0001 gram  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{MnSO}_4 \cdot n\text{H}_2\text{O}$  dan  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  dimasukkan ke dalam Erlenmeyer 100 ml dan ditambahkan dengan 100 ml aquades dengan menggunakan gelas ukur. Kemudian larutan dihomogenkan.

### 3. Larutan 3,5-dinitrosalisilat

Larutan DNS dibuat dengan komposisi 1 gram asam dinitrosalisilat, 0,2 gram fenol, 0,05 gram sodium sulfat dan 1 gram natrium hidroksida. Semua bahan dilarutkan dengan aquades dalam labu takar 100 mL dan ditanda bataskan. Larutan disimpan dalam botol gelap pada suhu dingin.

### 4. Pembuatan Reagen K-Na Tartrat

Sebanyak 4 gram K-Na Tartrat ditimbang dan dilarutkan dalam 10 ml aquades. Kemudian dihomogenkan dengan *magnetic stirrer*. Setelah itu dimasukkan dalam labu takar 10 ml dan disimpan dalam wadah gelap dan suhu dingin.

### 5. Pengenceran Isolasi

$$\frac{5 \text{ gram tanah}}{45 \text{ ml } 0,85\% \text{ Nacl steril}} = 0,1 \text{ gr/ml}$$

$$\frac{10^{-1} \text{ gr/ml}}{9 \text{ ml } 0,85\% \text{ Nacl steril}} = 10^{-2} \text{ gr/ml}$$

- $10^{-3} \text{ gr/ml}$
- $10^{-4} \text{ gr/ml}$
- $10^{-5} \text{ gr/ml}$
- $10^{-6} \text{ gr/ml}$
- $10^{-7} \text{ gr/ml}$
- $10^{-8} \text{ gr/ml}$
- $10^{-9} \text{ gr/ml}$

#### 6. Pembuatan Larutan standart N-asetil glukosamin

Cara membuat larutan stok standart N-asetil glukosamin 1000 ppm

$$1000 \text{ ppm} = \frac{0,01 \text{ g}}{10 \text{ ml}} = 1000 \text{ ppm}$$

Untuk membuat larutan standart 1 mg/ml diperlukan 10 mg N-asetil glukosamin dilarutkan kedalam aquades dan ditanda bataskan dalam labutakar 5ml. Kemudian dibuat larutan dengan variasi konsentrasi 0,1;0,2;0,3;0,4 dan 0,5 mg/ml dengan menggunakan rumus pengenceran sebagai berikut:

- a. Konsentrasi 0,1 mg/ml (100 ppm)

$$V1 \times M1 = V2 \times M2$$

$$V1 \times 1 \text{ mg/ml} = 5 \text{ ml} \times 0,1 \text{ mg/ml}$$

$$V1 = 0,5 \text{ ml}$$

- b. Konsentrasi 0,2 mg/ml (200 ppm)

$$V1 \times M1 = V2 \times M2$$

$$V1 \times 1 \text{ mg/ml} = 5 \text{ ml} \times 0,2 \text{ mg/ml}$$

$$V1 = 1 \text{ ml}$$

- c. Konsentrasi 0,3 mg/ml (300 ppm)

$$V1 \times M1 = V2 \times M2$$

$$V1 \times 1 \text{ mg/ml} = 5 \text{ ml} \times 0,3 \text{ mg/ml}$$

$$V1 = 1,5 \text{ ml}$$

d. Konsentrasi 0,4 mg/ml (400 ppm)

$$V_1 \times M_1 = V_2 \times M_2$$

$$V_1 \times 1 \text{ mg/ml} = 5 \text{ ml} \times 0,4 \text{ mg/ml}$$

$$V_1 = 2 \text{ ml}$$

e. Konsentrasi 0,5 mg/ml (500 ppm)

$$V_1 \times M_1 = V_2 \times M_2$$

$$V_1 \times 1 \text{ mg/ml} = 5 \text{ ml} \times 0,5 \text{ mg/ml}$$

$$V_1 = 2,5 \text{ ml}$$



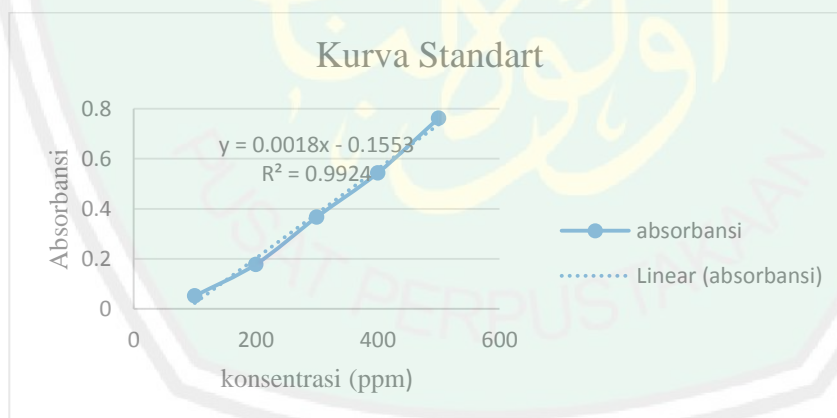
### Lampiran 3. Menentukan Kurva Standart Larutan N-asetil Glukosamin

Kurva standart larutan N-asetil glukosamin

Tabel L.3.8. Data Absorbansi Larutan N-asetil glukosamin pada  $\lambda$  540 nm

Konsentrasi (ppm)	Absorbansi
100	0,0518
200	0,1778
300	0,3666
400	0,5427
500	0,7618

Gambar L.3.8. Grafik Kurva Standart N-asetil glukosamin



**Lampiran 4. Pengukuran Absorbansi dan Aktivitas Ekstrak Kasar Kitinase  
dengan variasi suhu**

Tabel L.4.1 Nilai Absorbansi Ekstrak Kasar Kitinase dengan variasi suhu

Isolat	Suhu (°C)	Ulangan	Absorbansi	Aktivitas Kitinase (U/ml)	Rata-rata (U/ml)
B	30°	1	0,0393	0,0325	0,0030
		2	0,0388	0,0324	
		3	0,0491	0,0342	
	35°	1	0,3809	0,0897	0,0946
		2	0,3506	0,0847	
		3	0,4974	0,1092	
	40°	1	0,3123	0,0782	0,1038
		2	0,4881	0,1077	
		3	0,5951	0,1256	
	45°	1	0,8726	0,215	0,1705
		2	0,7647	0,154	
		3	0,6963	0,1425	
	50°	1	0,1282	0,04746	0,0457
		2	0,0574	0,0564	
		3	0,0447	0,0334	
A	30°	1	0,0914	0,0413	0,0408
		2	0,08905	0,0409	
		3	0,08485	0,0402	
	35°	1	0,034415	0,0863	0,0782
		2	0,2596	0,0694	
		3	0,31495	0,0787	
	40°	1	0,3211	0,0797	0,0772
		2	0,3094	0,0778	
		3	0,28865	0,0743	
	45°	1	0,4457	0,1006	0,0934
		2	0,35605	0,0856	
		3	0,40625	0,0940	
	50°	1	0,128	0,04743	0,0492
		2	0,1305	0,0478	
		3	0,15855	0,0525	



#### L.4.9. 2 Menentukan Aktivitas Ekstrak Kasar Kitinase

Pengukuran aktivitas kitinase dapat dilakukan dengan menggunakan persamaan kurva standart n-asetil glukosamin sebagai berikut.

Persamaan kurva standart

Diketahui:  $y = ax + b$

$$y = 0,0018x - 0,1553$$

$$x = (y + 0,1553) / 0,0018$$

misal absorbansi kitinase ekstrak kasar adalah 0,0393

$$y + 0,1553 = 0,0018x$$

$$\frac{y + 0,1553}{0,0018} = x$$

$$\frac{0,0393 + 0,1553}{0,0018} = x$$

$$108,111 = x$$

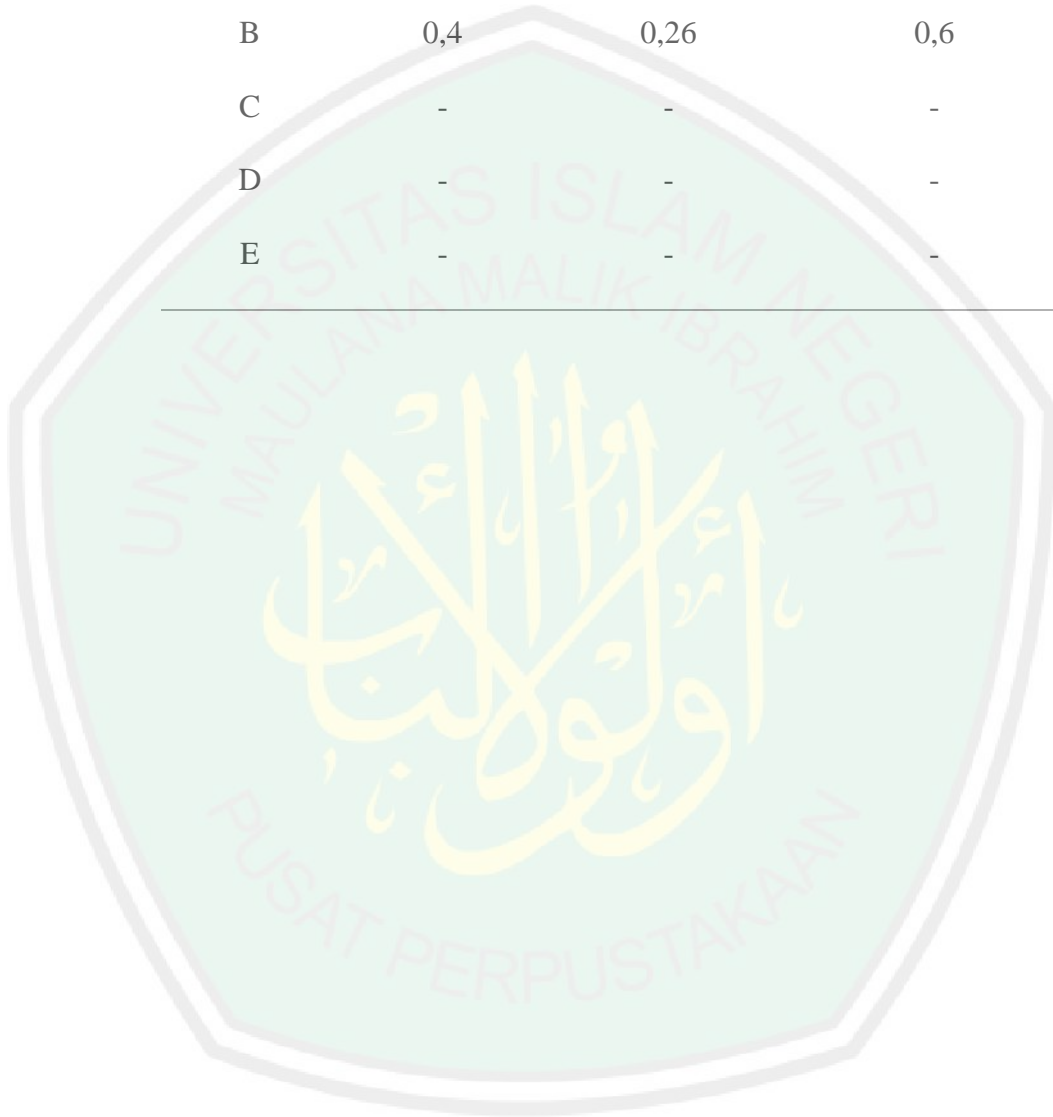
Sehingga konsentrasi n-asetil glukosamin adalah 108,111 ppm

$$\begin{aligned} \text{Aktivitas ekstrak kasar kitinolitik} &= \frac{108.111 \text{ ppm}}{221,21 \text{ g/mol} \times 60 \text{ menit}} \times \frac{2 \text{ ml}}{0,5 \text{ ml}} \\ &= 0,0325 \text{ U/ml} \end{aligned}$$

Satu unit aktivitas kitinase dinyatakan dengan banyaknya unit mol n-asetil glukosamin yang dihasilkan oleh 0,5 ml ekstrak kasar kitinase per menit pada kondisi tertentu, sehingga aktivitasnya diperoleh adalah 0,0325 U/ml.

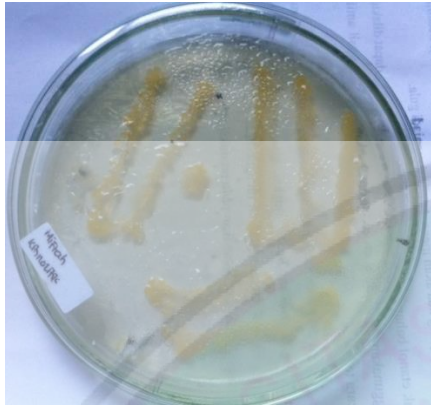
## L.4.2. Zona Bening

<b>Kode Isolat</b>	<b>Diameter Koloni</b>	<b>Zona Bening</b>	<b>Indeks Kitinolitik</b>
A	0,43	0,26	0,65
B	0,4	0,26	0,6
C	-	-	-
D	-	-	-
E	-	-	-

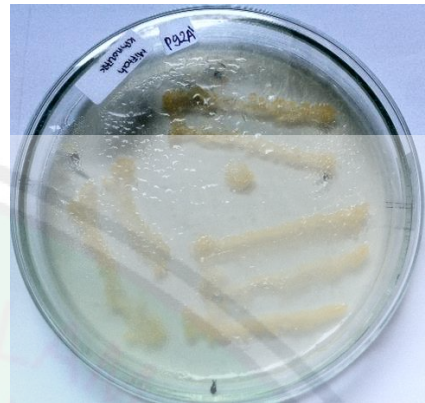


## Lampiran 5. Dokumentasi

### L.5.1. Hasil Isolasi Bakteri Kitinolitik



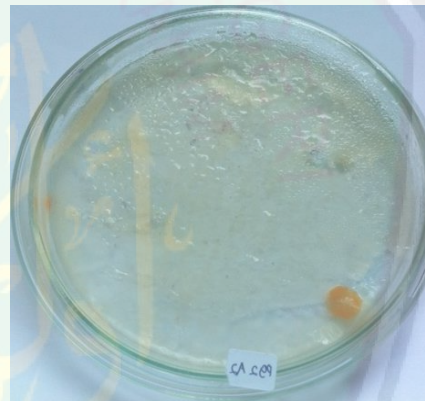
Hasil isolate B



Hasil isolat E

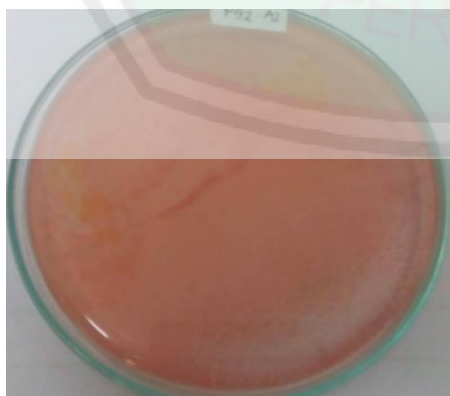


Hasil isolat A



Hasil isolat C

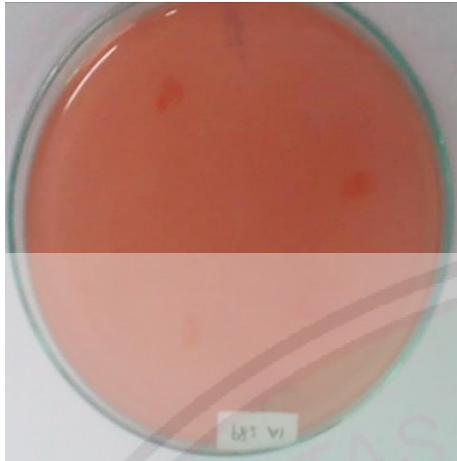
### L.5.2. Hasil Uji Kualitatif Bakteri Kitinolitik



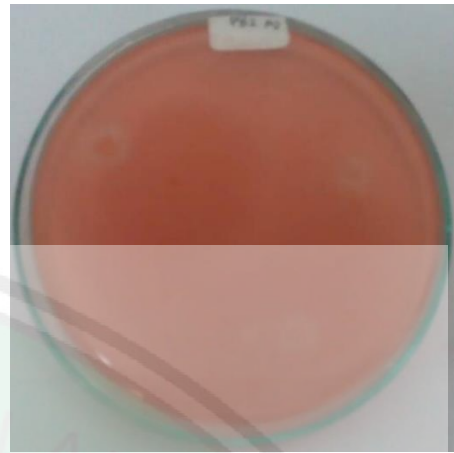
Hasil Isolat D



Hasil Isolat E



Hasil Uji Kualitatif C

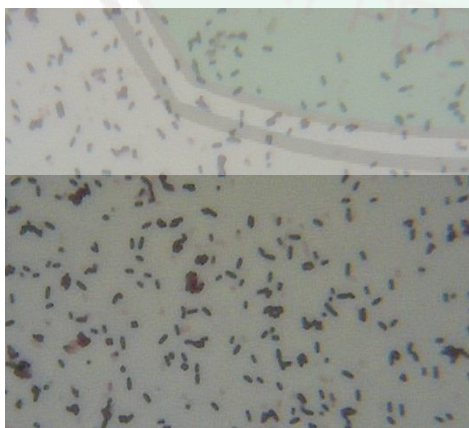


Hasil Uji Kualitatif Isolat B

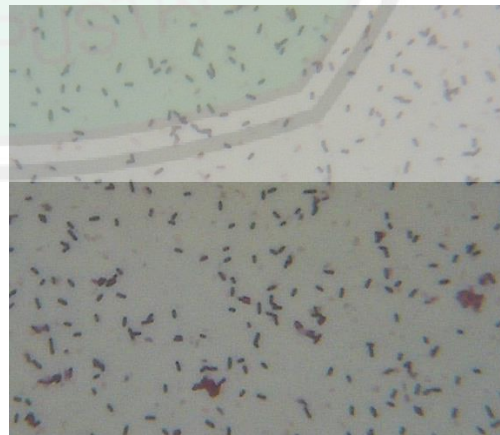


Hasil Uji Kualitatif Isolat A

#### L.5.3. Hasil Uji Pewarnaan Gram

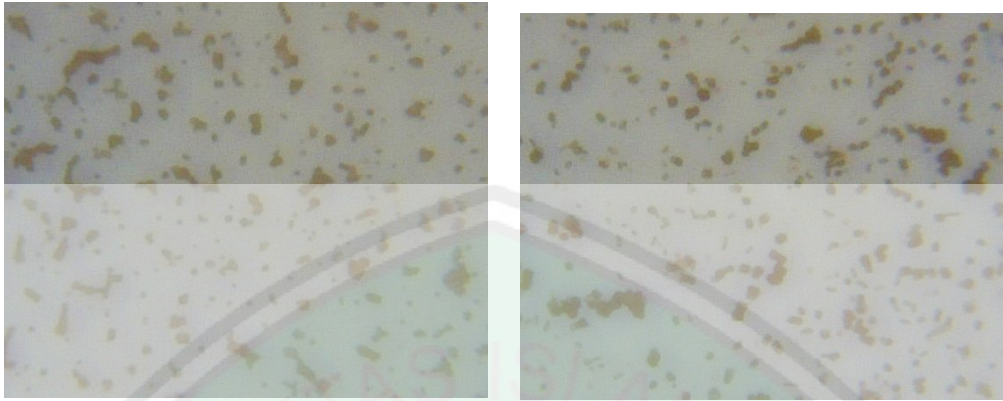


Hasil Pewarnaan Gram Isolat B



Hasil pewarnaan gram isolate A

#### L.5.4. Hasil Uji Endospora



Hasil Pewarnaan Endospora A

Hasil Pewarnaan Endospora B

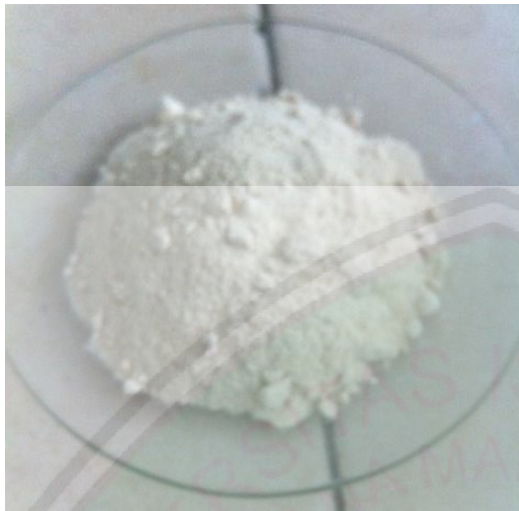
#### L.5.5. Hasil Uji Katalase



Hasil Uji Katalase Isolat A

Hasil Isolasi Katalase B

L.5.6. Kitin dan Koloidal Kitin



Kitin



Pembuatan Koloidal Kitin



Koloidal kitin

### L.5.7. Kurva Pertumbuhan



kurva pertumbuhan



media kurva pertumbuhan

### L.5.8. Uji Aktivitas Kitinase



Aktivitas Kitinase



standart N-asetil glukosamin

## Lampiran 6. Statistik Two Way ANOVA

### Univariate Analysis of Variance

[DataSet0]

#### Warnings

Post hoc tests are not performed for isolat because there are fewer than three groups.

#### Between-Subjects Factors

		N
isolat	1	15
	2	15
suhu	1	6
	2	6
	3	6
	4	6
	5	6

#### Descriptive Statistics

Dependent Variable: aktivitas\_kitinase

isolat	Suhu	Mean	Std. Deviation	N
1	1	.040800	.0005568	3
	2	.078133	.0084642	3
	3	.077267	.0027392	3
	4	.093400	.0075180	3
	5	.049243	.0028264	3
	Total	.067769	.0208108	15
2	1	.033033	.0010116	3
	2	.094533	.0129454	3
	3	.103833	.0239354	3
	4	.170500	.0389647	3



5	.045753	.0115946	3
Total	.089531	.0537657	15
Total 1	.036917	.0043162	6
2	.086333	.0132808	6
3	.090550	.0210689	6
4	.131950	.0491246	6
5	.047498	.0077861	6
Total	.078650	.0415583	30

### Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable:aktivitas\_kitinase

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	.038 <sup>a</sup>	5	.008	15.214	.000
Intercept	.186	1	.186	370.778	.000
isolat	.004	1	.004	7.097	.014
suhu	.035	4	.009	17.244	.000
Error	.012	24	.001		
Total	.236	30			
Corrected Total	.050	29			

a. R Squared = ,760 (Adjusted R Squared = ,710)

### Estimated Marginal Means

#### 1. isolat

Dependent Variable:aktivitas\_kitinase

isolat	Mean	Std. Error	95% Confidence Interval	
			Lower Bound	Upper Bound
1	.068	.006	.056	.080
2	.090	.006	.078	.101

#### 2. suhu

Dependent Variable:aktivitas\_kitinase

suhu	Mean	Std. Error	95% Confidence Interval	
			Lower Bound	Upper Bound
1	.037	.009	.018	.056
2	.086	.009	.067	.105
3	.091	.009	.072	.109
4	.132	.009	.113	.151
5	.047	.009	.029	.066

**Post Hoc Tests**

suhu

**Multiple Comparisons**

aktivitas\_kitinase

Tukey HSD

(I) suhu	(J) suhu	Mean Difference (I- J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
1	2	-.049417*	.0129164	.007	-.087469	-.011365
	3	-.053633*	.0129164	.003	-.091685	-.015581
	4	-.095033*	.0129164	.000	-.133085	-.056981
	5	-.010582	.0129164	.922	-.048634	.027470
2	1	.049417*	.0129164	.007	.011365	.087469
	3	-.004217	.0129164	.997	-.042269	.033835
	4	-.045617*	.0129164	.013	-.083669	-.007565
	5	.038835*	.0129164	.044	.000783	.076887
3	1	.053633*	.0129164	.003	.015581	.091685
	2	.004217	.0129164	.997	-.033835	.042269
	4	-.041400*	.0129164	.028	-.079452	-.003348

	5	.043052*	.0129164	.021	.005000	.081104
4	1	.095033*	.0129164	.000	.056981	.133085
	2	.045617*	.0129164	.013	.007565	.083669
	3	.041400*	.0129164	.028	.003348	.079452
	5	.084452*	.0129164	.000	.046400	.122504
5	1	.010582	.0129164	.922	-.027470	.048634
	2	-.038835*	.0129164	.044	-.076887	-.000783
	3	-.043052*	.0129164	.021	-.081104	-.005000
	4	-.084452*	.0129164	.000	-.122504	-.046400

Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = ,001.

\*. The mean difference is significant at the ,05 level.

### Homogeneous Subsets

#### aktivitas\_kitinase

Tukey HSD

Suhu (°C)	N	Subset		
		A	b	c
30	6	.036917		
50	6	.047498		
35	6		.086333	
40	6		.090550	
45	6			.131950
Sig.		.922	.997	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = ,001.

