

CHITINOLYTIC BACTERY ACTIVITY ISOLATED FROM THE MUD FIELDS

Nuniek Herdyastuti^{1*}, Sari Edi Cahyaningrum¹, Tri Joko Raharjo², Mudasir², dan Sabirin Matsjeh²

¹ Department of Chemistry, Surabaya State University, Jl. Ketintang Surabaya 60231

² Department of Chemistry, Gadjah Mada University, Sekip Utara Yogyakarta, 55281

* E-mail: nherdyastuti@yahoo.com

ABSTRACT

A chitinolytic microorganism had been isolated from mud fields in Ketintang Surabaya area by using a minimal media containing 0.4% colloidal chitin. Activity assay is based on released N-acetyl-glucosamine which reacted with 3,5 dinitrosalicylic acid. Mud fields produce 63 bacterial isolates with chitinase activity (TNH1 – TNH63 isolates). The highest activity was shown by TNH11 isolate with specific activity 1.27 U/mg. TNH11 isolates was Gram negative, rod-cocoid cell, has a colony of yellow, round shape, convex elevation, flat margin and the colony diameter 3–5 mm.

Key words: Chitin, colloidal chitin, chitinolytic microorganism, mud fields

PENGANTAR

Mikroorganisme kitinolitik adalah mikroorganisme yang dapat mendegradasi kitin dengan menggunakan enzim kitinase. Mikroorganisme ini dapat diperoleh dari tanah atau dari lingkungan air seperti laut, danau, kolam, limbah udang, dan sebagainya. Selain lingkungan mesofil, mikroorganisme kitinolitik juga telah berhasil diisolasi dari lingkungan termofilik seperti sumber air panas, daerah geotermal, dan lain-lain. Mikroorganisme penghasil kitinase masih belum banyak diketahui baik tentang jumlah, diversitas maupun fungsi kitinase yang dihasilkan, meskipun kitin merupakan salah satu polimer yang melimpah di alam.

Beberapa mikroorganisme kitinolitik dari berbagai sumber telah berhasil diisolasi dan dikarakterisasi. Donderski dan Brzezinska (2003) berhasil mengisolasi bakteri kitinolitik dari Danau Jeziorak pada permukaan air dan lapisan bawah sedimen di antaranya *Pseudomonas* sp., *Alcaligenes denitrificans*, *Agrobacterium* sp., *Aeromonas hydrophila* yang mendegradasi kitin dan memanfaatkan N-asetil-glukosamin sebagai sumber karbon. Upaya eksplorasi kitinase telah banyak dilakukan untuk mendapatkan jenis-jenis mikroorganisme yang dapat menghasilkan kitinase dari tanah (Al Ahmadi *et al.*, 2008; Chern *et al.*, 2004; Shanmugaiah *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2010). Bakteri kitinolitik dari lumpur sawah di lingkungan kampus UNESA belum dikaji secara mendalam. Keberadaan kitin pada jamur ataupun insekta yang ada pada tanah sawah memungkinkan untuk mendapatkan bakteri kitinolitik dengan aktivitas kitinase yang tinggi.

Mikroorganisme penghasil kitinase dapat diperoleh dari sumbernya dengan cara menumbuhkan dalam media yang mengandung kitin. Kitin banyak digunakan sebagai

substrat pada media fermentasi untuk uji enzim *endo tipe-kitinase*. Aktivitas kitinolitik diinduksi dalam media pertumbuhan strain dengan keberadaan kitin sebagai sumber karbon (Chernin *et al.*, 1998). Variasi terhadap 19 komponen media seleksi yang mengandung kitin telah dilakukan dengan menggunakan isolat *Pantoea dispersa* yang diperoleh dari laut Bhavnagar, India untuk memproduksi kitinase secara optimal (Gohel *et al.*, 2006). Mikroorganisme kitinolitik dapat diseleksi keberadaannya dengan mendegradasi media agar kitin yang dapat dideteksi dengan adanya halo transparan di sekitar koloni bakteri (Krauss *et al.*, 2000). Dalam dua dekade terakhir banyak dikaji peran enzim kitinase sebagai antijamur. Kitinase banyak dimanfaatkan sebagai agen biokontrol terutama bagi tanaman yang terserang infeksi jamur dengan cara mendegradasi komponen utama dinding sel jamur, dengan menghasilkan produk yang ramah lingkungan dibandingkan penggunaan zat kimia. Sebagai contoh, *Trichoderma* banyak digunakan sebagai antijamur yang efektif terhadap serangan *Rhizoctonia solani* pada tanaman kapas atau *Fusarium* pada tanaman strawberi, dan tidak toksik terhadap tanaman pada konsentrasi tinggi (Wang dan Chang, 2007).

BAHAN DAN CARA KERJA

Bahan-bahan yang digunakan adalah Bacto agar (Difco), *bacto-tripton*, *yeast extract*, kitin yang diisolasi dari kulit udang. Bahan kimia dengan kemurnian p.a: 3,5-asam dinitrosalisilat (SIGMA), N-asetil-glukosamin (SIGMA). Peralatan yang digunakan adalah spektrofotometer UV-Vis (Shimadzu, 1700), sentrifuse dingin (Kokusan H-103 Series), inkubator (Mettler), *autoclave*, *shaker*, mikropipet, dan peralatan gelas.

Isolasi Mikroorganisme dari Lumpur Sawah

Sampel lumpur sawah disuspensikan dengan air steril dan dicampur sampai homogen, kemudian suspensi diinokulasikan ke dalam media umum untuk bakteri (*Luria Bertany*) cair yang terdiri atas: *bacto-triptone*, *yeast extract*, dan NaCl. Media cair yang mengandung suspensi dikocok dengan *shaker* pada kecepatan 120 rpm selama 18–20 jam pada suhu kamar. Sebanyak 50 µL kultur ditumbuhkan pada media padat dan diinkubasi pada suhu kamar selama 18–20 jam untuk mendapatkan koloni tunggal.

Persiapan Substrat Kitin Koloidal

Kitin diisolasi dari cangkang udang windu yang telah dikeringkan dan dihaluskan kemudian dilanjutkan dengan proses isolasi menggunakan metode Acosta, *et al.* (1993). Proses isolasi kitin terdiri atas dua tahap, yaitu deproteinasi dan demineralisasi. Cangkang udang sebanyak 90 gram dipanaskan dengan 900 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 akuades sampai netral. Sebanyak 60 gram residu hasil deproteinasi ditambahkan dengan 900 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 HCl pekat (37%), dan diendapkan sebagai suspensi koloid dengan penambahan air dingin. Suspensi disaring dan residu dicuci dengan aquades sampai pH netral kemudian dikeringkan dengan oven. Proses ini memberikan *recovery* ± 85%.

Seleksi Mikroorganisme Penghasil Kitinase dari Lumpur Sawah

Seleksi mikroorganisme penghasil kitinase dapat dilakukan pada media padat atau media cair minimal yang mengandung kitin. Isolat dimasukkan dalam media yang mengandung 0,4% kitin koloidal dan campuran garam mineral K₂HPO₄ 0,7 g; KH₂PO₄ 0,3 g; MgSO₄·5H₂O 0,5 g; FeSO₄·7H₂O 0,01 g; MnCl₂ 0,001 g; kemudian dilarutkan dalam 1 liter air, dan diukur sampai pH 7. Kultur cair diinkubasi selama 20 jam dan dikocok dengan kecepatan 120 rpm pada suhu kamar. Kultur cair masing-masing koloni disentrifugasi pada 4000 rpm selama 15 menit, suhu 4° C. Supernatan yang diperoleh diuji aktivitasnya dengan metode Monreal dan Reese (1969). Pembentukan halo transparan dilakukan dengan menumbuhkan setiap isolat

pada media padat selektif yang mengandung 0,4% kitin dan diinkubasi pada suhu kamar selama 7 sampai 10 hari (Folders *et al.*, 2001; Bollag *et al.*, 1996).

Penentuan Aktivitas Enzim Kitinase

Aktivitas enzim ditentukan berdasarkan jumlah gula reduksi yang dilepaskan dan diukur secara kolorimetri dengan metode Monreal dan Reese (1969). Sebanyak 2 ml larutan kitin 1,25% (b/v) dilarutkan dalam 200 mM buffer kalium fosfat diaduk dengan pengaduk magnet dan ditambahkan 0,5 ml larutan enzim. Kemudian diinkubasi selama 2 jam pada suhu kamar. Setelah 2 jam tabung ditempatkan ke dalam air mendidih selama 5 menit dan didinginkan pada suhu kamar. Suspensi disentrifugasi selama 10 menit pada kecepatan 4000 rpm kemudian diambil 1,5 ml supernatan dan disentrifugasi kembali 10 menit pada kecepatan 10000 rpm. Sebanyak 1 ml supernatan pada tabung sampel ditambahkan 2 ml air deionisasi dan 1,5 ml reagen pewarna yang mengandung 5,3 M larutan Natrium kalium tartrat dan Asam 3,5 Dinitrosalisilat 96 mM. Campuran dipanaskan dalam air mendidih selama 5 menit setelah dingin diukur serapannya dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 540 nm. Untuk menentukan jumlah N-asetil glukosamin yang dilepaskan digunakan N-asetil glukosamin sebagai standar.

Penentuan Kadar Protein

Kadar protein ditentukan dengan menggunakan metode Lowry dan sebagai standar digunakan Bovine serum albumin (Bollag, 1996).

HASIL

Isolasi Mikroorganisma dari Lumpur Sawah

Pada penelitian ini contoh tanah yang dipergunakan berasal dari lumpur sawah di sekitar Kampus UNESA Ketintang, Surabaya. Tanah sawah dalam keadaan kering dengan pH 7,1 diambil dari lima titik dengan jumlah sama. Melalui beberapa kali pengkayaan pada media cair, kultur ditumbuhkan pada media padat dan diperoleh pengenceran 10⁻⁵. Pada kultur tersebut dilakukan pewarnaan, hasilnya menunjukkan bahwa isolat yang diperoleh dari lumpur sawah masih merupakan campuran. Diduga kultur yang diperoleh merupakan bakteri, sel sebagian besar berbentuk batang dan juga ditemukan bentuk *coccus*, hasil pewarnaan masih menunjukkan campuran Gram positif dan Gram negatif seperti pada Gambar 1. Berdasarkan morfologi koloni pada media padat diperoleh 63 isolat dan diberi kode TNH1 sampai TNH63.

Seleksi Mikroorganisme Penghasil Kitinase dari Lumpur Sawah

Enam puluh tiga isolat yang telah diperoleh dari tanah sawah ditumbuhkan pada media yang mengandung 0,4% kitin koloidal dan diuji aktivitas kitinase, menunjukkan bahwa semua isolat memberikan hasil yang positif. Hasil uji aktivitas dan kadar protein ditunjukkan seperti pada Gambar 2 sampai 5.

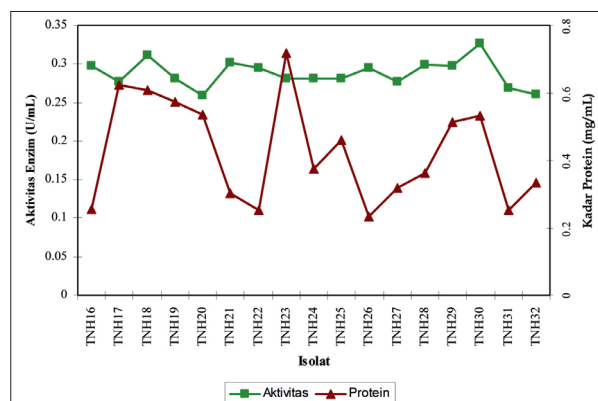
Isolat TNH11 dengan aktivitas kitinase tertinggi telah dilakukan uji morfologi dan pewarnaan seperti pada Gambar 5. TNH11 merupakan bakteri Gram negatif dengan bentuk sel batang – kokoid.



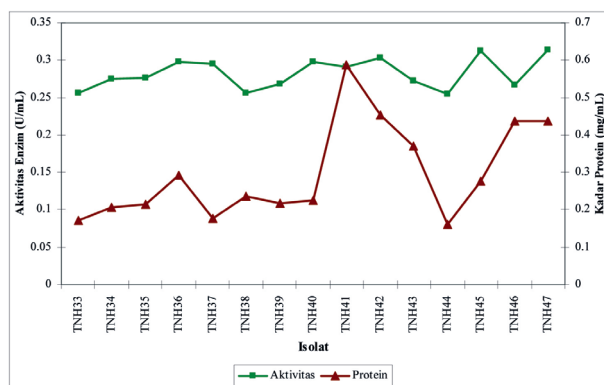
Gambar 1. Morfologi sel isolat bakteri dari lumpur sawah dengan pengecatan pewarnaan: (1) bakteri Gram positif berbentuk batang, (2) bakteri Gram negatif berbentuk batang



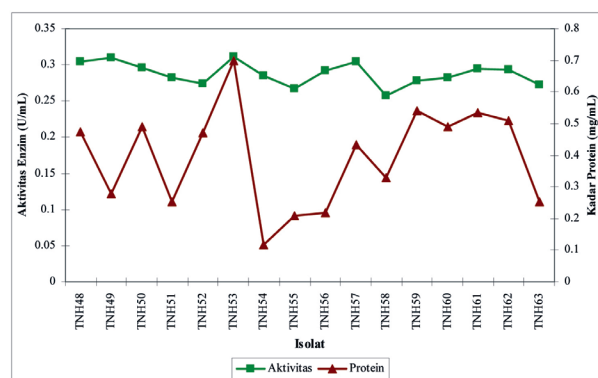
Gambar 2. Hasil uji aktivitas kitinase dan kadar protein pada isolat TNH1 – TNH15 yang diperoleh dari lumpur sawah. Isolat ditumbuhkan pada media minimal yang mengandung 0,4% kitin koloidal dan diinkubasi selama 20 jam pada suhu kamar.



Gambar 3. Hasil uji aktivitas kitinase dan kadar protein pada isolat TNH16 – TNH32 yang diperoleh dari lumpur sawah. Isolat ditumbuhkan pada media minimal yang mengandung 0,4% kitin koloidal dan diinkubasi selama 20 jam pada suhu kamar.



Gambar 4. Hasil uji aktivitas kitinase dan kadar protein pada isolat TNH33 – TNH47 yang diperoleh dari lumpur sawah. Isolat ditumbuhkan pada media minimal yang mengandung 0,4% kitin koloidal dan diinkubasi selama 20 jam pada suhu kamar.



Gambar 5. Hasil uji aktivitas kitinase dan kadar protein pada isolat TNH48 – TNH63 yang diperoleh dari lumpur sawah. Isolat ditumbuhkan pada media minimal yang mengandung 0,4% kitin koloidal dan diinkubasi selama 20 jam pada suhu kamar.

PEMBAHASAN

Penguraian kitin secara biologi dapat dilakukan dengan bantuan enzim yang disebut kitinase, yang dapat dihasilkan oleh bakteri, *Actinomycetes*, jamur, *yeast*, dan tumbuhan (Brzezinska *et al.*, 2007). Selain perairan, tanah adalah sumber nutrisi dan mineral bagi mikroorganisme, di mana terdapat hubungan dan interaksi antara mikroorganisme yang sangat kompleks. Diperkirakan 1 gram tanah mengandung 10^9 bakteri dengan kemungkinan 4000–7000 spesies yang berbeda (Dubey *et al.*, 2006). Tanah benar-benar sebagai sumber mikroorganisme dan gen untuk mendegradasi atau mentransformasi bermacam-macam senyawa organik dengan menggunakan enzim yang spesifik untuk melakukan biotransformasi tersebut (Sajidan *et al.*, 2004). Sebagian besar mikroorganisme tanah dan air adalah pendegradasi kitin yang baik dan beberapa mikroorganisme dapat memanfaatkan kitin sebagai sumber karbon dan nitrogen.

Ekstrak kasar dari isolat lumpur sawah yang telah ditumbuhkan pada media yang mengandung 0,4% kitin koloidal diuji aktivitas kitinasenya menunjukkan bahwa 63 isolat tersebut mempunyai aktivitas kitinolitik. Metode konvensional yang menggunakan kitin koloidal sebagai substrat ditemukan sangat efektif untuk menentukan aktivitas kitinase. *Enterobacter* sp. *NRG4* menunjukkan aktivitas tinggi terhadap kitin *swollen*, kitin koloidal, kitin yang diregenerasi dan glikol kitin dibandingkan dengan serbuk kitin (Dahiya *et al.*, 2005). Hal ini dikarenakan kitin dengan perlakuan asam menyebabkan komponen lemak dan protein dikeluarkan dari kitin sehingga memudahkan hidrolisis enzim (Suraini *et al.*, 2008). Nilai aktivitas dari 63 isolat berkisar



Gambar 5. Hasil pewarnaan Isolat TNH11 dengan aktivitas kitinase tertinggi yang diperoleh dari lumpur sawah. Diduga bahwa isolat TNH11 merupakan bakteri Gram negatif, diduga merupakan kelompok genus *Burkholderia pseudomallei* dengan bentuk sel batang – kokoid.

antara 0,25 sampai 0,33 U/ml. Isolat TNH11 menunjukkan aktivitas tertinggi yaitu 0,33 U/ml dengan kadar protein 0,26 mg/ml sehingga mempunyai aktivitas spesifik 1,26 U/mg. Nilai aktivitas spesifik ekstrak kasar isolat TNH11 tersebut lebih besar bila dibandingkan dengan *Trichoderma viride* TNJ63 yang mempunyai aktivitas spesifik 0,142 U/mg (Nugroho *dkk.*, 2003), *Aeromonas schubertii* 0,47 U/mg (Guo *et al.*, 2004) atau *Pseudomonas aeruginosa* K-187 dengan aktivitas spesifik 0,15 U/mg (Wang dan Chang, 1997). Tetapi lebih kecil bila dibandingkan dengan aktivitas spesifik dari *Vibrio* sp. 98CJ11027 sebesar 1,3 U/mg (Park *et al.*, 2000).

Aktivitas kitinase dapat diuji secara kualitatif dengan penentuan halo transparan atau "Clear zone" yang ada di sekitar pertumbuhan koloni pada media agar kitin koloidal. Prosedur tersebut memerlukan waktu inkubasi yang cukup lama, yaitu sekitar 5–6 hari dan relatif sedikit sensitif sebab visualisasi *clear zone* sangat kecil. Metode yang lebih sensitif dan cepat untuk seleksi mikroorganisme kitinolitik adalah dengan menambahkan *M2R calcofluor* putih pada media agar kitin (Vaidya *et al.*, 2003). Hal ini juga terlihat pada isolat yang ditumbuhkan pada media agar yang mengandung kitin, *clear zone* di sekitar koloni sangat tipis dan sulit terlihat dengan dokumentasi foto. Meskipun isolat tidak menunjukkan *clear zone*, tetapi isolat mempunyai aktivitas kitinolitik yang dibuktikan dengan uji aktivitas secara kolorimetri pada ekstrak kasar (Gambar 1–4). Hasil tersebut menunjukkan bahwa TNH11 menunjukkan aktivitas kitinase lebih tinggi dibandingkan isolat lainnya. Meskipun aktivitas kitinase TNH11 hampir sama dengan TNH30 tetapi TNH11 menunjukkan aktivitas spesifik yang lebih besar, yaitu 1,27 U/mg.

Isolat TNH11 mempunyai karakteristik mikroskopis: berbentuk batang–kokoid dan merupakan bakteri Gram negatif. Mempunyai karakteristik koloni: berwarna kuning, bentuk bulat, elevasi konveks, margin rata, diameter koloni 3–5 mm. Hasil uji morfologi dan fisiologi terhadap isolat TNH11 diduga bahwa isolat tersebut merupakan kelompok *Burkholderia pseudomallei* dengan *percent probability* 99,9%.

UCAPAN TERIMA KASIH

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

KEPUSTAKAAN

Acosta N, Jimenez C, Borau V, dan Heras A, 1993. Extraction and characterization of chitin from crustaceans, *Biomass. Bioenerg.*, 5: 53.

- Al Ahmadi KJ, Yazdi MT, Najafi MF, Shahverdi AR, Faramarzi MA, Zarrini G, dan Behravan J, 2008. Optimization of medium and cultivation condition for chitinase production by the newly isolated: *Aeromonas* sp., *Biotechnol.*, 7: 266–72.
- Bollag MD, Rozycki MD, Edelstein SJ, 1996. *Protein Methods*, 2nd edition. John Wiley & Sons, Inc., New York.
- Brzezinska MS, Porczyk EK, Donderski W, 2007. *International Journal of Oceanography and Hydrobiology*, XXXVI (3): 101–11.
- Chern LL, Stackebrandt, Fen Lee, Ling Lee, Kuan Chen, and Mei Fu, 2004, *Chitinibacter taiwanensis* Gen.nov., a Chitin-degrading Aerob from Soil in Taiwan, *Int.J.Syst.Evol. Microbiol.*, 54: 1387–91.
- Chernin LS, Winson MK, Thompson JM, 1998. Chitinolytic Activity in *Chromobacterium violaceum*: Substrat analysis and regulation by quorum sensing, *Journal of Bacteriology*, 180 (17).
- Dahiya N, Tewari, dan Hoondai, 2005. Chitinase from *Enterobacter* sp. NRG4: Its Purification, Characterization and Reaction Pattern, *Electronic J. Biotechnol.*, 8: 134–45.
- Donderski W dan Brzezinska MS, 2003. The Utilization of N-Acetyl glucosamine and Chitin as Sources of Carbon and Nitrogen by Planctonic and Benthic Bacteria in Lake Jeziorak, *Polish Journal of Environmental Studies*, 12: 685–92.
- Dubey SK, Tripathi AK, dan Upadhyay SN, 2006. Exploration of Soil Bacterial Communities for Their Potential as Biosource, *Biosource Technology*, 97: 2217–24.
- Folders Jindra, Algra Jon, Roelofs Marc S, dan Bitter Wilbert, 2001. Characterization of *Pseudomonas aeruginosa* Chitinase a Gradually Secreted Protein, *J. of Bacteriol.*, 183(24).
- Gohel V, *et al.*, 2006. Stastical Screenings of Medium Components for The Production of Chitinase by The Marine Isolate *Pantoe dispersa*, *Biochem. Engin. J.*, 28: 50–6.
- Guo SH, Chen JK, dan Lee WC, 2004. Purification and Characterization of Extracellular Chitinase From *Aeromonas schubertii*, *Enzyme and Microbial Technology*, 35: 550–6.
- Hsu SC dan Lockwood JL, 1975. Powdreed Chitin Agar As a Selective Medium for Enumeration of Actinomycetes in Water and Soil, *Appl. Microbiol.*, 29: 422–6.
- Krauss Ulrike and Bustamante Elkin, 2000. *Isolation of Native Fungal and Bacterial Antagonists Against Plant Deseases*.
- Shanmugaiah V, Mathivanan N, Balasubramanian N, dan Manoharan PT, 2008. Optimization of cultural conditions for production of chitinase by *Bacillus laterosporous* MML2270 isolated from rice rhizosphere soil, *Afric. J. Biotechnol.*, 7: 2562–8.
- Monreal J and Reese ET, 1969, The Chitinase of *Serratia marcescens*, *Can. J. Microbiol.*, 15: 689–96.
- Nugroho TT, Ali M, Ginting C, Wahyuningsih, Dahliaty A, Devi S, dan Sukmarisa Y, 2003, Isolasi dan Karakterisasi Sebagian Kitinase *Trichoderma viride* TNJ63, *Jurnal Natur Indonesia*, 5: 101–6.
- Park SH, Lee JH, dan Lee HK, 2000. Purification and Characterization of Chitinase from Marine Bacterium, *Vibrio* sp 98CJ11027, *J. Microbiol.*, 38: 224–9.
- Sajidan A, Farouk A, Greiner R, Jungblut P, Muller EC, dan Borris R, 2004. Molecular and Physiological Characterization of a 3-Phytase From Soil *Bacterium Klebsiella* sp ASRI, *Appl. Microbiol. Biotech.*, 65: 10–8.
- Suraini AA, Sin TL, Alitheen N, Shahab N, dan Kamaruddin K, 2008. Microbial Degradation of Chitin Materials by *Trichoderma virens* UKM1, *J. Biol. Sci.*, 8: 52–9.
- Vaidya RJ, Macmil SLA, Vyas PR, dan Chhatpar HS, 2003. The novel Method for Isolating Chitinolytic Bacteria and its Application in Screening for Hyperchitinase Producing Mutant of *Alcaligenes xylosoxydans*, *J. Appl. Microbiol.*, 36: 129–34.
- Wang SL dan Chang WT, 1997. Purification and Characterization of Two Bifunctional Chitinases/Lysozymes Extracellularly Produced by *Pseudomonas aeruginosa* K-187 in a Shrimp and Crab Shell Powder Medium, *Appl. Environ. Microbiol.*, 380–6.
- Wang SL, Bo-Shyun L, Liang TW, Wang CL, Pei-Chen W, dan Je-Ruei L, 2010. Purification and Characterization of Chitinase from a New Species Strain *Pseudomonas* sp. TKU008, *J. Microbiol. Biotechnol.*, 20: 1001–5.

Reviewer: **Prof. Ir. Triwibowo Yuwono, Ph.D**