



Tugas Akhir - SB141510

PRAPRODUKSI KITIN DEASETILASE OLEH BAKTERI SAMPAH PERIKANAN

**RISCHA JAYANTY
1511100025**

**Dosen Pembimbing:
Dr. techn. Endry Nugroho Prasetyo , MT.**

**Jurusan Biologi
Fakultas Matematika Dan Ilmu Pengetahuan Alam
Institut Teknologi Sepuluh Nopember
Surabaya 2015**



Final Project - SB141510

PREPRODUCTION CHITIN DEACETYLASE FROM FISHERIES WASTE BACTERIA

**RISCHA JAYANTY
1511100025**

**Advisor Lecturer:
Dr. techn. Endry Nugroho Prasetyo , MT.**

**Biology Department
Mathematic and Natural Science Faculty
Sepuluh Nopember Institute of Technology
Surabaya 2015**

LEMBAR PENGESAHAN

PRAPRODUKSI KITIN DEASETILASE OLEH BAKTERI SAMPAH PERIKANAN

TUGAS AKHIR

Diajukan Untuk Memenuhi Salah Satu Syarat Memperoleh Gelar
Sarjana Sains
Pada
Jurusan S-1 Biologi
Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Institut Teknologi Sepuluh Nopember

Oleh:

RISCHA JAYANTY
NRP. 1511 100 025

Disetujui oleh Pembimbing Tugas Akhir

Dr. techn. Endry Nugroho P, M. T..... (Pembimbing)

Surabaya, 27 Juli 2015

Mengetahui,
Ketua Jurusan Biologi



Dr. rer. nat. Ir. Maya Shovitri, M.Si
NIP. 19690907 199803 2 001

PRAPRODUKSI KITIN DEASETILASE OLEH BAKTERI SAMPAH PERIKANAN

Nama Mahasiswa : Rischa Jayanty
NRP : 1511100025
Jurusan : Biologi
Dosen Pembimbing : Dr. techn. Endry Nugroho P, MT.

Abstrak

Kitin keberadaannya melimpah, mudah didapat, dan merupakan polimer alam terbarukan kedua setelah selulosa yang manfaatnya terbatas, tetapi hasil deasetilasi kitin yaitu kitosan memiliki banyak manfaat dan aplikasi. Metode kimiawi dalam memproduksi kitosan membutuhkan energi yang besar, tidak ramah lingkungan, dan hasil yang kurang seragam. Solusi alternatif adalah menggunakan bakteri kitinolitik yang mampu menghasilkan kitin deasetilase untuk menghasilkan kitosan dengan kualitas yang lebih baik karena enzim bersifat selektif dan tidak merusak struktur rantai kitosan.

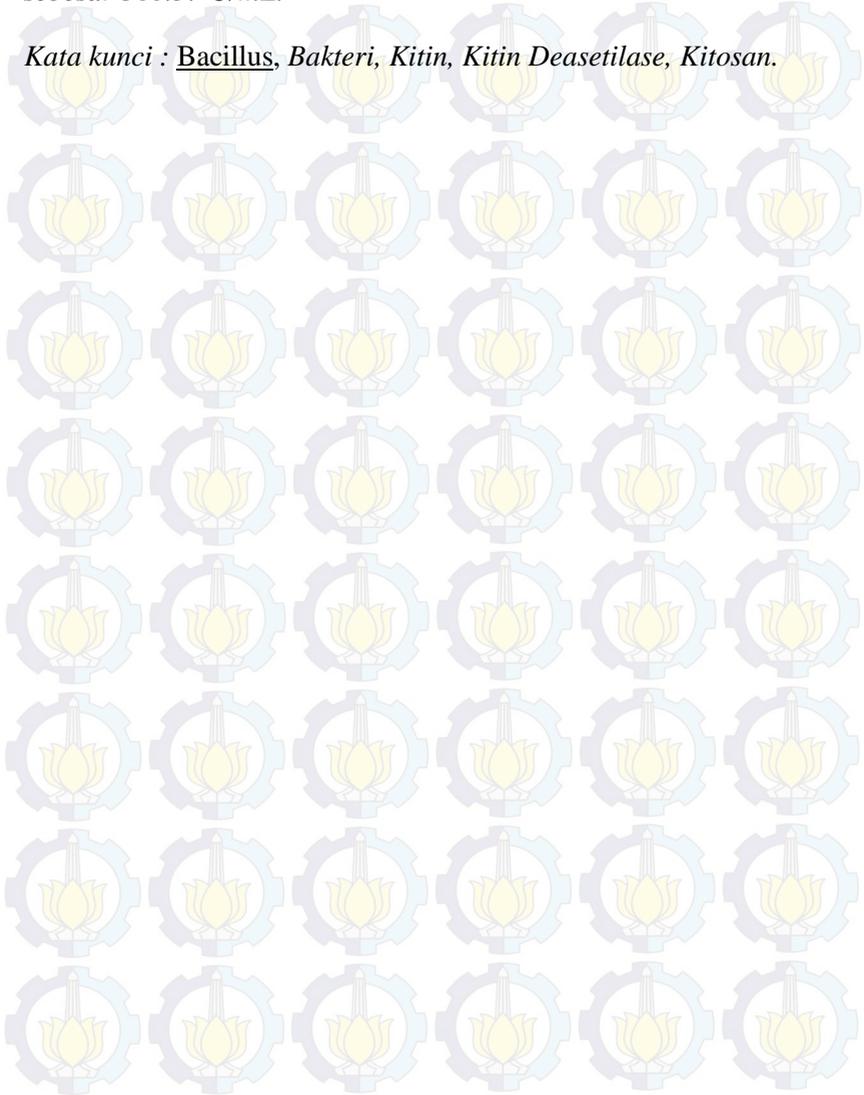
Keberadaan kitin pada sampah perikanan berpotensi adanya bakteri pendegradasi kitin yang menghasilkan kitin deasetilase. Skrining eksplorasi bakteri penghasil kitin deasetilase terutama isolat-isolat yang diperoleh dari sampah perikanan masih sangat sedikit. Dalam penelitian ini dilakukan isolasi, karakterisasi, dan identifikasi bakteri dari sampah perikanan Kenjeran.

Isolat murni bakteri diidentifikasi berdasarkan karakter biokimia menurut Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. Isolat bakteri yang berhasil diisolasi kemudian di skrining aktivitas degradasi kitin pada medium selektif kitin agar dengan melihat zona bening yang dihasilkan, kemudian diuji aktivitas kitin deasetilase dengan metode Tokuyasu et al. (1996).

Hasil penelitian ini diperoleh 13 isolat bakteri. Empat isolat bakteri diantaranya menghasilkan zona bening yaitu Bacillus B3, Bacillus B5, Bacillus B6 dan Bacillus B12. Aktivitas

kitin deasetilase tertinggi dihasilkan oleh isolat Bacillus B3 sebesar 360.37 U/mL.

Kata kunci : Bacillus, Bakteri, Kitin, Kitin Deasetilase, Kitosan.



PREPRODUCTION CHITIN DEACETYLASE FROM FISHERIES WASTE BACTERIA

Name : Rischa Jayanty
NRP : 1511100025
Department : Biologi
Advisor Lecturer : Dr. techn. Endry Nugroho P, MT.

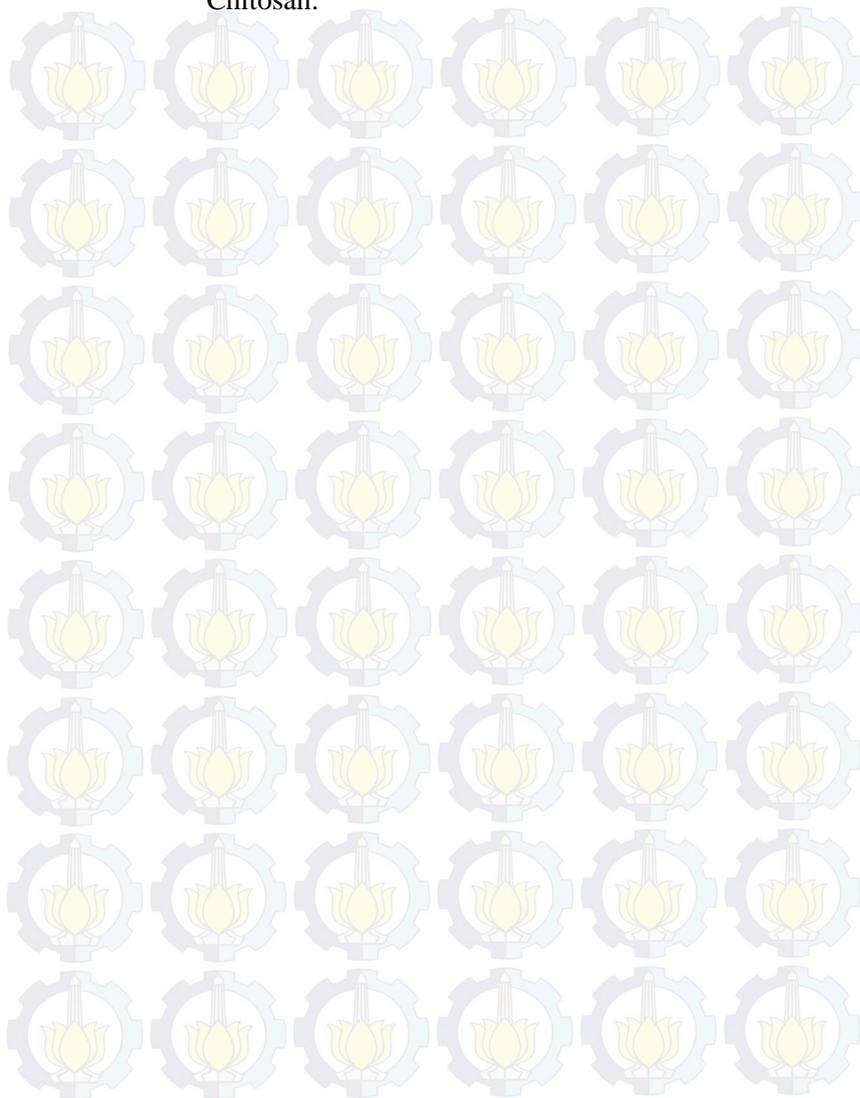
Abstract

Chitin is abundant, easily obtained, and is the second renewable natural polymer after cellulose which has limited benefits. However the product of chitin deacetylase, chitosan, has many benefits and applications. So far, chemical methods which had been used to produce chitosan require much energy, non eco-friendly, and the results are less uniform. Chitinolytic microbes which capable producing chitin deacetylase can be the alternative solution. Chitin deacetylase can produce chitosan with better quality since the enzyme is selective and not damaging the structure of chitosan chains.

Fisheries waste contains chitin polymer is potential for bacteria that can produce chitin deacetylase. The aim of this study is to explore chitin deacetylase-producing bacteria from fisheries waste. The pure colonies bacteria were identified by biochemical character according to Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. Isolates of bacteria that had been degrading chitin was screened by observing the of the clear zone chitin selective agar media. Then chitin deacetylase activity was tested by Tokuyasu's method.

This study was able to isolate 13 strains of bacteria from fisheries waste. Four of the bacterial strains designated as *Bacillus* B3, *Bacillus* B5, *Bacillus* B6 and *Bacillus* B14 showed clear zone when grown in chitin medium. Highest chitin deacetylase activity was shown by *Bacillus* B3 which was 360.37 U/mL.

Key word : *Bacillus*, Bacteria, Chitin, Chitin deacetylase, Chitosan.



KATA PENGANTAR

Assalamu`alaikum Wr. Wb

Alhamdulillah, puji syukur kehadirat Allah SWT serta junjungan kita, Nabi Muhammad SAW atas segala rahmat serta hidayah-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan tugas akhir yang berjudul **Praproduksi Kitin Deasetilase oleh Bakteri Sampah Perikanan**. Dalam penyusunan Tugas Akhir ini penulis tentunya telah mendapat banyak masukan, motivasi, saran dan bimbingan dari berbagai pihak yang sangat berguna dan bermanfaat. Oleh karena itu dengan rendah hati penulis ucapkan terima kasih kepada :

1. Ibu Dr. rer.nat. Maya Shovitri, M.Si. sebagai Ketua Jurusan Biologi FMIPA ITS.
2. Bapak Dr. techn. Endry Nugroho Prasetyo, MT selaku dosen pembimbing Tugas Akhir untuk dorongan, ilmu, bimbingan dan semangatnya,
3. Ayah Imam Suwono, Ibu Sutini, kakak Dhiah Aryana dan adik Yuda Indra Pratiwi atas segala doa restu, kasih sayang dan semangatnya,
4. Ibu Dr. Enny Zulaika, S.Si., M.P dan Ibu Wirdhatul Muslihatin, S.Si., M.Si selaku dosen penguji atas saran dan bimbingannya. Serta kepada Ibu Maharani Pertiwi Koentjoro, S.Si., M. Biotech yang telah memberi masukan berupa judul dan bimbingannya.
5. Ibu Dini Ermavitalini, S.Si, M.Si selaku dosen wali yang telah mengawal dan membimbing saya selama 4 tahun di jurusan Biologi ITS.
6. Bapak/Ibu dosen serta karyawan jurusan Biologi ITS atas segala ilmu, kasih sayang, motivasi serta doanya.
7. Keluarga besar angkatan 2011 *Scylla serrata* Biologi ITS dan Paguyuban Beasiswa Karya Salemba Empat ITS.
8. Keluarga *Biomaterial and Enzyme Research Group* (Shabrina, Mayang, Risanda, Qintan, Citra, Nivi, Qorip, dan Laras) atas segala semangat, doa dan kerja kerasnya.

9. Rekan-rekan yang tidak dapat disebutkan satu per satu yang turut berperan dalam terwujudnya Tugas Akhir ini. Semoga Allah SWT membalas kebaikan teman-teman sekalian

Penulis menyadari masih banyak kekurangan, namun besar harapan untuk kedepannya penelitian ini tidak berhenti disini saja tetapi dapat bermanfaat bagi penulis khususnya dan masyarakat pada umumnya.

Wassalamu`alaikum Wr. Wb.

Surabaya, 27 Juli 2015

Rischa Jayanty

DAFTAR ISI

Halaman

HALAMAN JUDUL	i
LEMBAR PENGESAHAN	v
ABSTRAK	vii
<i>ABSTRACT</i>	ix
KATA PENGANTAR	xi
DAFTAR ISI	xiii
DAFTAR GAMBAR	xv
DAFTAR TABEL	xvii
DAFTAR LAMPIRAN	xix
BAB I PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Permasalahan	2
1.3 Batasan Masalah	2
1.4 Tujuan	3
1.5 Manfaat	3
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 Profil Kenjeran	5
2.2 Bakteri	6
2.2.1 Fase Adaptasi (Lag)	7
2.2.2 Fase logaritma (Eksponensial)	7
2.2.3 Fase Stasioner	7
2.2.4 Fase Kematian	7
2.3 Karakterisasi dan Identifikasi Bakteri	8
2.3.1 Pewarnaan	9
2.3.2 Fermentasi Karbohidrat	11
2.3.3 Katalase	13
2.3.4 Uji Kebutuhan oksigen	14
2.4 Kitin	15
2.5 Kitin Deasetilase	16

BAB III METODOLOGI

3.1 Waktu dan Tempat Kegiatan	19
3.2 Alat, Bahan, dan Cara Kerja	19
3.2.1 Pengambilan Sampel	19
3.2.2 Isolasi Bakteri	19
3.2.3 Purifikasi Bakteri	20
3.2.4 Skrining Aktivitas Degradasi Kitin	21
3.2.5 Karakterisasi Bakteri	22
3.2.5.1 Karakterisasi Morfologi	22
3.2.5.2 Karakterisasi Biokimia	24
3.2.6 Identifikasi Bakteri	26
3.2.7 Pembuatan Enzim Kasar	26
3.2.8 Uji Aktivitas Kitin Deasetilase	26
3.3 Rancangan Percobaan dan Analisa Data	27

BAB IV HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

4.1 Isolasi, Purifikasi dan Karakterisasi Makroskopis Bakteri dari sampah Perikanan	29
4.2 Karakterisasi Mikroskopis dan Biokimia Bakteri dari sampah perikanan	31
4.3 Identifikasi Bakteri Sampah Perikanan	39
4.4 Skrining Aktivitas degradasi Kitin	39
4.5 Aktivitas Kitin Deasetilase	41

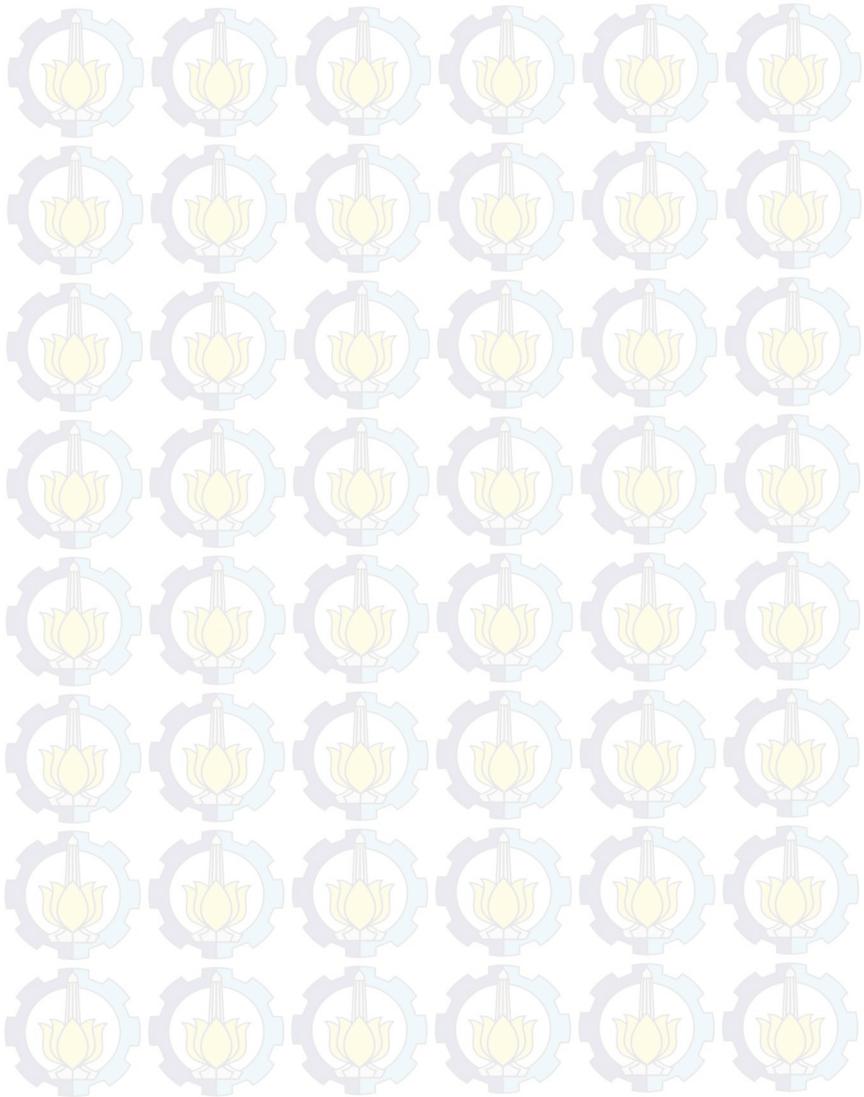
BAB V HASIL KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan	43
5.2 Saran	43

DAFTAR PUSTAKA	45
LAMPIRAN	55
BIODATA PENULIS	65

DAFTAR GAMBAR

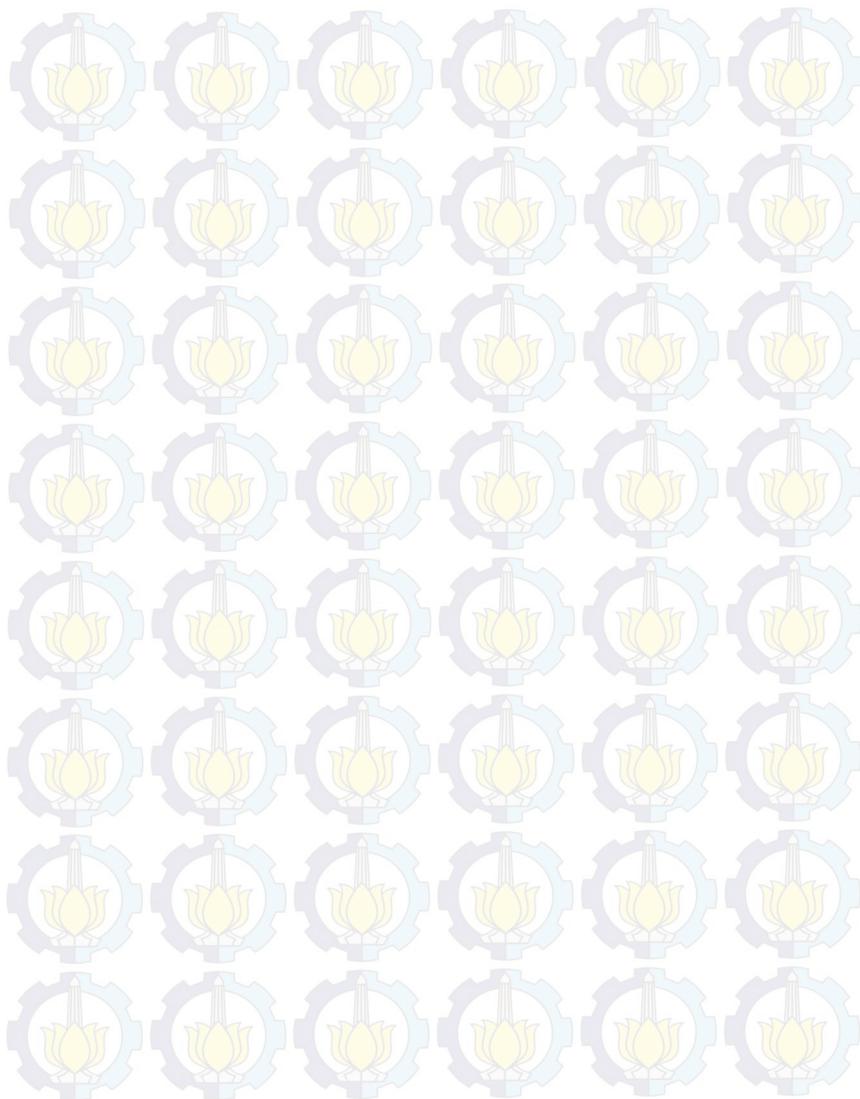
	Halaman
2.1	Peta Lokasi kenjeran, Surabaya..... 5
2.2	Struktur Dinding Sel Bakteri Gram Positif dan Gram Negatif 10
2.3	Reaksi Enzim Peroksidase dan Katalase..... 14
2.4	Pertumbuhan Bakteri Berdasarkan Kebutuhan Oksigen..... 15
2.5	Struktur Selulosa dan Struktur Kitin..... 16
2.6	Deasetilasi Kitin Menjadi Kitosan..... 17
4.1	Hasil Isolasi bakteri Sampah Perikanan Metode Pengenceran Bertingkat. 30
4.2	Hasil Pengamatan Pewarnaan Gram Bakteri Sampah Perikanan..... 32
4.3	Hasil Pengamatan Pewarnaan Endospora Bakteri Sampah Perikanan..... 33
4.4	Hasil Pengamatan Uji Katalase Bakteri Sampah Perikanan..... 35
4.5	Hasil Pengamatan Uji Oksidase Bakteri Sampah Perikanan..... 36
4.6	Zona bening hasil degradasi kitin..... 40



DAFTAR TABEL

					
4.1	Hasil Pengamatan Koloni Bakteri.....				Halaman 30
					
					
					
					
					
					
					
					

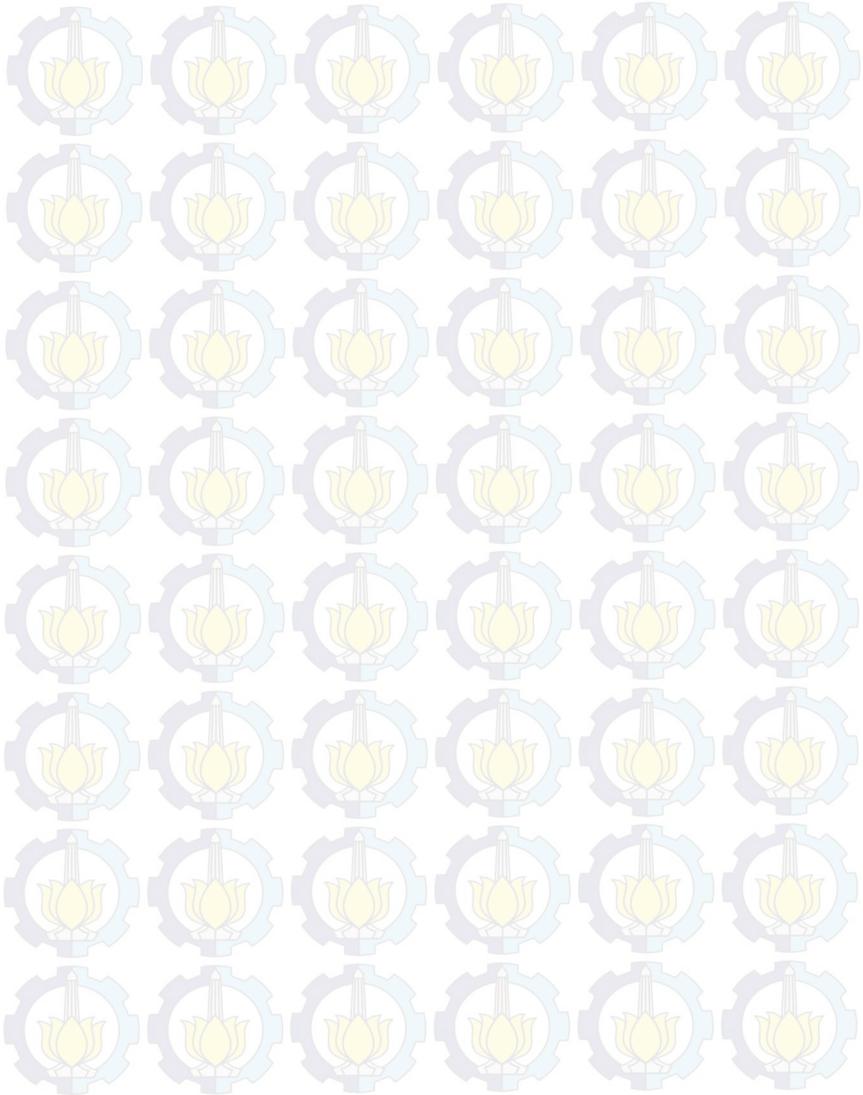
“Halaman ini sengaja dikosongkan”



DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1. Garis Besar Metode Kerja.....	55
Lampiran 2. Pembuatan Medium Kultur dan Uji ...	56
Lampiran 3. Morfologi Koloni Bakteri Sampah Perikanan.....	59
Lampiran 4. Hasil Karakterisasi Mikroskopis dan Biokimia Bakteri Sampah Perikanan..	60
Lampiran 5. Bagan alir Identifikasi Bakteri <i>Bergey's Manual of Determinative Bacteriology</i>	61
Lampiran 6. Kurva Standar Glukosamin	64

“Halaman ini sengaja dikosongkan”



BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Kitin adalah polisakarida heterogen linear dari N-asetil-D-glukosamin dan D-glukosamin (Ravi, 2000; Synowiecki & Al-Khateeb, 2003; Tharanathan & Kittur, 2003; Dutta *et al.*, 2004; Kurita, 2006; Pillai *et al.*, 2009; Domard, 2011). Kitin keberadaannya melimpah, mudah didapat, dan merupakan polimer alam terbaru kedua setelah selulosa (Sandford, 1989 ; Ravi, 2000; Patil *et al.*, 2000). Kitin merupakan biopolimer yang terdapat pada invertebrata, insekta, diatom laut, alga, fungi dan yeast (Synowiecki & Al-Khateeb, 2003).

Kitin merupakan bahan yang tidak larut dan masih terbatas manfaatnya dalam industri (Muzzarelli, 1996; Somashekar & Joseph 1996; Shahidi *et al.*, 1999; Tsigos *et al.*, 2000). Hasil deasetilasi dari kitin yang disebut kitosan memiliki banyak aplikasi dalam makanan, farmasi, bioteknologi, kosmetik, tekstil, pengolahan air limbah dan pertanian (Shahidi *et al.*, 1999; Gryn timer *et al.*, 2003; Kato *et al.*, 2003; Senel & McClure, 2004; De Jin *et al.*, 2005; Kim & Mendis, 2006; Gortari & Hours, 2008; El Hadrami *et al.*, 2010; Park & Kim, 2010; Portes *et al.*, 2009; Ramírez *et al.*, 2010; Rangel-Mendez *et al.*, 2010; Limam *et al.*, 2011; Muzzarelli *et al.*, 2012; Raja *et al.*, 2012).

Kitosan selama ini diproduksi melalui deasetilasi kitin secara kimiawi (Tsigos & Bouriotis 1995). Konversi kitin menjadi kitosan secara kimiawi memiliki banyak kekurangan diantaranya mengkonsumsi banyak energi dan kitosan yang dihasilkan memiliki bobot molekul yang beragam dan memiliki sifat fisik dan kimia tidak seragam sehingga sulit untuk diaplikasikan (Kaur *et al.*, 2012; Sugita *et al.*, 2009). Penggunaan metode enzimatik dalam konversi kitin menjadi kitosan menghasilkan kualitas yang lebih baik, karena sifat enzim yang selektif dan tidak merusak struktur rantai kitosan (Khanafari *et al.*, 2008).

Kitin deasetilase adalah enzim yang diproduksi oleh yeast, kapang (*mold*), bakteri dan juga di beberapa spesies serangga (Kashyap, *et.al.*, 2014; Vincy *et al.*, 2014). Sampah perikanan adalah sisa-sisa tulang, duri, sisik, cangkang *Crustacea*, cangkang *Invertebrata* yang merupakan sumber dari polimer kitin (Arbia *et.al.*, 2011). Keberadaan kitin pada sampah perikanan memungkinkan tingginya populasi bakteri pendegradasi kitin, oleh karena itu eksplorasi bakteri penghasil kitin deasetilase pada sampah perikanan sangat diperlukan. Sehingga dalam penelitian ini dilakukan seleksi bakteri penghasil kitin deasetilase yang berpotensi mengubah kitin menjadi kitosan.

1.2 Rumusan Permasalahan

Konversi kitin menjadi kitosan sangatlah memungkinkan secara enzimatik. Bakteri lokal penghasil kitin deasetilase selama ini diisolasi dari lingkungan yaitu tanah dan air. Eksplorasi bakteri lokal penghasil kitin deasetilase pada sampah perikanan masih sangat sedikit sehingga dalam penelitian ini dirumuskan permasalahan berapa besar kemampuan bakteri hasil seleksi dari sampah perikanan dalam praproduksi kitin deasetilase.

1.3 Batasan Masalah

Batasan masalah dalam penelitian ini adalah :

1. Mikroba yang diisolasi merupakan bakteri yang berpotensi menghasilkan enzim kitin deasetilase.
2. Mikroba di isolasi dari sampah perikanan yang terdapat di Kenjeran, Surabaya pada koordinat S: 07°13'397" dan E: 112°47'242".
3. Isolat bakteri yang berhasil diisolasi diidentifikasi hingga tingkat genus berdasarkan karakter biokimia menurut *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*.

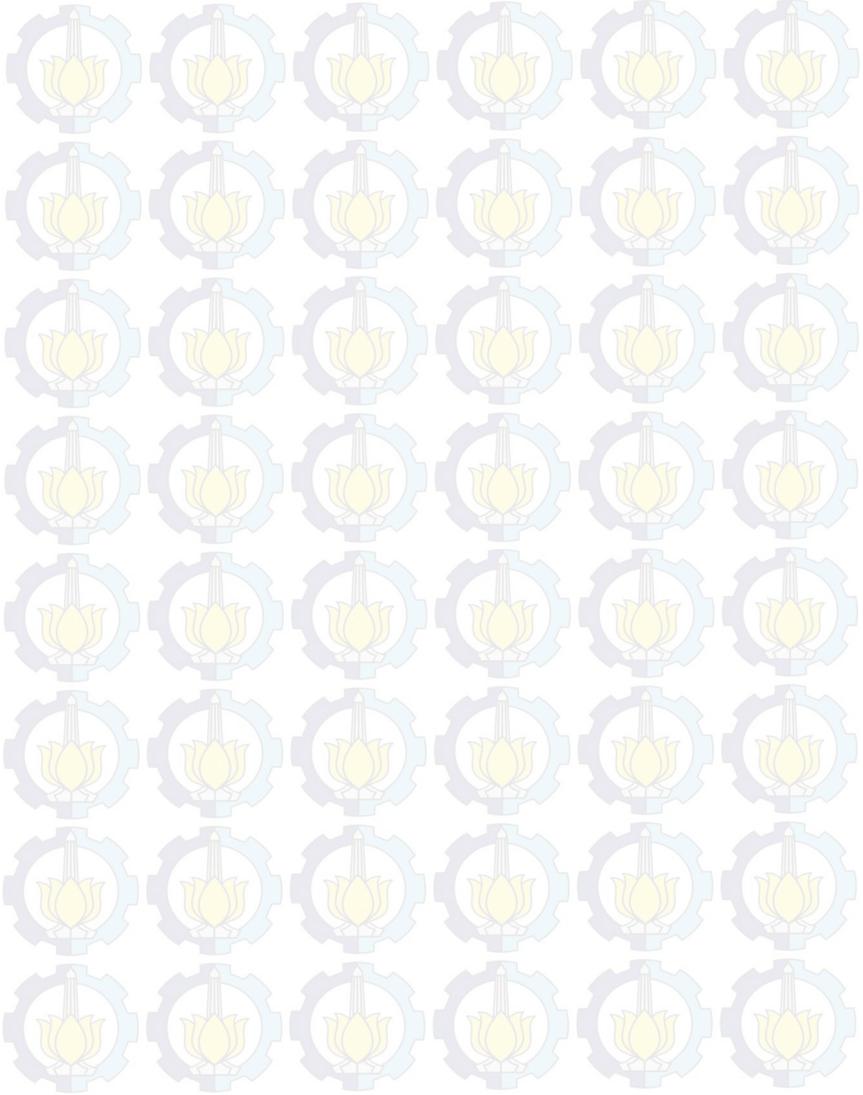
1.4 Tujuan

Tujuan pada penelitian ini adalah untuk menghasilkan isolat bakteri yang berpotensi memproduksi kitin deasetilase dari sampah perikanan.

1.5. Manfaat

Manfaat dari penelitian ini adalah sumber informasi mengenai bakteri pada sampah perikanan yang berpotensi memproduksi kitin deasetilase yang selanjutnya dapat dimanfaatkan sebagai agen penghasil kitin deasetilase yang mampu mengkonversi kitin menjadi kitosan.

“Halaman ini sengaja dikosongkan”



BAB II TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Profil Kenjeran

Secara geografis Kota Surabaya berada di $7^{\circ}9'$ - $7^{\circ}21'$ Lintang Selatan dan $112^{\circ}36'$ - $112^{\circ}57''$ Bujur Timur.



Gambar 2.1 Peta Lokasi kenjeran, Surabaya.

Surabaya terletak di tepi selat Madura sehingga berkarakteristik sebagai kota pesisir. Kenjeran terletak di bagian Timur Laut kota Surabaya. Perairan Kenjeran dan sekitarnya memiliki luas sebesar 4.375 Ha dan memiliki pengembangan kegiatan sebagai wisata pantai, kawasan niaga, kawasan penangkapan dan budidaya ikan, perumahan pesisir kampung nelayan. Sebagai daerah pesisir, mata pencaharian utama masyarakat kenjeran umumnya adalah sebagai nelayan dan pembudidaya ikan tambak. Nelayan Kenjeran banyak berkontribusi dalam melakukan penangkapan ikan laut. Hasil penangkapan ikan oleh nelayan Kenjeran dijual berupa ikan yang segar dan yang telah diolah. Semakin banyaknya jumlah penangkapan ikan maka semakin banyak pula menghasilkan sampah perikanan (Anonim, 2015).

Sampah adalah segala sesuatu yang tidak lagi dikehendaki oleh yang memiliki dan bersifat padat. Sementara didalam Naskah Akademis Rancangan Undang-undang Persampahan disebutkan sampah adalah sisa suatu usaha dan atau kegiatan

yang berwujud padat atau semi padat berupa zat organik atau anorganik bersifat dapat terurai maupun tidak dapat terurai yang dianggap sudah tidak berguna lagi dan dibuang ke lingkungan (Slamet, 2002). Sampah Perikanan adalah sampah yang berasal dari sampah non domestik. Sampah perikanan adalah sisa-sisa perikanan yang dibuang ke lingkungan (Sastrawijaya, 2000). Sampah perikanan berupa sisa-sisa perikanan yaitu tulang, duri, sisik, cangkang kerang, cangkang kepiting, cangkang udang, dan lain-lain. Selama ini pemanfaatan sampah perikanan hanya sebagai pupuk dan bahan dalam pembuatan kerajinan (Arbia *et.al.*, 2013).

2.2 Bakteri

Bakteri adalah mikroorganisme dari golongan prokariotik yang tidak mempunyai selubung nukleus, sehingga kromosomnya berada di sitoplasma. Dinding sel bakteri tersusun dari peptidoglikan yaitu gabungan protein dan polisakarida. Ketebalan peptidoglikan membagi bakteri menjadi bakteri gram positif dengan peptidoglikan yang tebal dan bakteri gram negatif dengan peptidoglikan yang tipis (Irianto, 2007). Bakteri yang menghasilkan enzim kitin deasetilase diantaranya adalah dari genus *Bacillus*, *Vibrio*, *Streptococcus*, *Proteus*, *Alcaligenes*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Micrococcus*, *Pseudomonas* (Tsigos *et al.*, 2000: Kaur *et al.*, 2012)

Mikroorganisme mempunyai kebutuhan dasar untuk pertumbuhan yaitu air, sumber karbon, energi, nitrogen, mineral, dan faktor fisik pertumbuhan. Kebutuhan nutrisi dapat dipenuhi dalam pembuatan media yang digunakan. Faktor fisik pertumbuhan seperti pH, suhu, cahaya, waktu dan oksigen dapat dikontrol selama pertumbuhan. Pertumbuhan bakteri dicirikan dengan peningkatan jumlah sel baik ukuran, berat maupun volume sel tunggal atau koloni. Pengukuran jumlah sel dapat dilakukan dengan mengukur berat kering sel atau menghitung jumlah koloni sel setelah ditumbuhkan pada media padat. Metode tidak langsung juga dapat digunakan dengan cara mengukur

kerapatan sel berdasarkan tingkat kekeruhannya dengan spektrofotometer (Irianto, 2007). Pada pertumbuhannya, bakteri memiliki empat fase yang disebut dengan fase adaptasi (lag), fase logaritma, fase stasioner, dan fase kematian (Madigan *et al.*, 2012).

2.2.1 Fase Adaptasi (Lag)

Fase adaptasi terjadi ketika populasi mikroba baru saja dimasukkan ke dalam suatu media buatan. Pertumbuhan biasanya tidak segera dimulai, tetapi perlu beberapa tenggang waktu agar bakteri beradaptasi dengan lingkungan yang baru. Apabila pertumbuhan dilakukan pada kultur yang sama dengan keadaan asli mikroba tersebut, maka fase lag tidak akan nampak dan pertumbuhan eksponensial akan terjadi lebih awal (Madigan *et al.*, 2012).

2.2.2 Fase Logaritma (Eksponensial)

Fase logaritma adalah periode dimana populasi secara aktif tumbuh dengan kecepatan konstan. Populasi ini berasal dari pembelahan biner bakteri, keadaan ini menyebabkan populasi menjadi dua kali lipat dengan kecepatan yang sama. Pada fase ini aktivitas metabolik juga berjalan secara konstan. Sehingga jumlah bakteri yang membelah lebih banyak daripada jumlah bakteri yang mati (Lim, 1998).

2.2.3 Fase Stasioner

Pada fase stasioner terjadi kompetisi antara bakteri untuk memperoleh nutrisi dari media untuk tetap hidup. Pada fase ini, pembelahan sel tetap terjadi, tetapi jumlah sel yang membelah seimbang dengan sel yang mati, sehingga jumlah sel terlihat stabil (Lim, 1998).

2.2.3 Fase Kematian

Fase kematian adalah masa dimana jumlah sel yang mati lebih banyak daripada sel yang membelah, sehingga pada kurva

pertumbuhan akan menunjukkan garis menurun. Fase ini dipengaruhi oleh kondisi lingkungan, komposisi media dan produksi sekunder suatu metabolisme (Lim, 1998).

2.3 Karakterisasi dan Identifikasi Bakteri

Isolat bakteri yang didapatkan dapat dikarakterisasi dengan analisa fenotipik, genotipik, dan filogenetik. Analisa fenotipik dapat dilakukan dengan mengamati morfologi, metabolisme, fisiologi, dan karakter kimia sel (Suwanto, 1994). Karakter morfologi bakteri dilakukan dengan pengamatan koloni dan bentuk sel bakteri. Bentuk koloni bakteri digunakan sebagai salah satu karakteristik bakteri, karena bentuknya yang bermacam-macam ketika koloni dilihat dari atas, permukaan koloni dari samping dan tepi koloni dari atas. Morfologi bakteri dapat dikelompokkan ke dalam tiga golongan, yaitu basil, kokus dan spiral. Basil adalah bakteri yang mempunyai bentuk tongkat pendek atau batang kecil dan silindris. Basil dibagi menjadi beberapa kelompok yaitu monobasil (basil yang hidup menyendiri atau tidak berkelompok), diplobasil (bila koloni terdiri dari dua basil) dan streptobasil (bila koloni berbentuk rantai). Kokus adalah bakteri yang mempunyai bentuk bulat seperti bola-bola kecil. Kokus dibagi menjadi beberapa kelompok yaitu monokokus (kokus yang hidup menyendiri atau tunggal), diplokokus (bila koloni terdiri dari dua kokus) dan stapilokokus (bila koloni kokus membentuk untaian seperti buah anggur), streptokokus (bila koloni berbentuk seperti rantai), sarsina (bila koloni bakteri mengelompok serupa kubus) dan tetrakokus (koloni yang terdiri dari empat kokus). Spiril merupakan bakteri yang berbentuk bengkok seperti spiral. Golongan ini merupakan yang paling kecil jika dibandingkan dengan golongan basil dan kokus (Waluyo, 2008).

Uji biokimia merupakan salah satu analisa fenotipik berdasarkan produk suatu metabolisme. Penentuan suatu spesies memerlukan kumpulan data dari berbagai pengujian yang antara lain terdiri dari uji biokimia dan morfologi sel (Lay, 1994).

Beberapa uji biokimia yang biasa dilakukan dalam skala laboratorium adalah pewarnaan Gram, endospora, dan tahan asam, fermentasi karbohidrat, katalase, Kebutuhan oksigen, uji motilitas, TSIA.

2.3.1 Pewarnaan

Ada tiga macam prosedur pewarnaan, yaitu pewarnaan sederhana (*simple stain*), pewarnaan diferensial (*differential stain*), dan pewarnaan khusus (*special stain*). Pada pewarnaan sederhana hanya digunakan satu macam pewarna dan bertujuan mewarnai seluruh sel mikroorganisme sehingga bentuk seluler dan struktur dasarnya dapat terlihat (Waluyo, 2008).

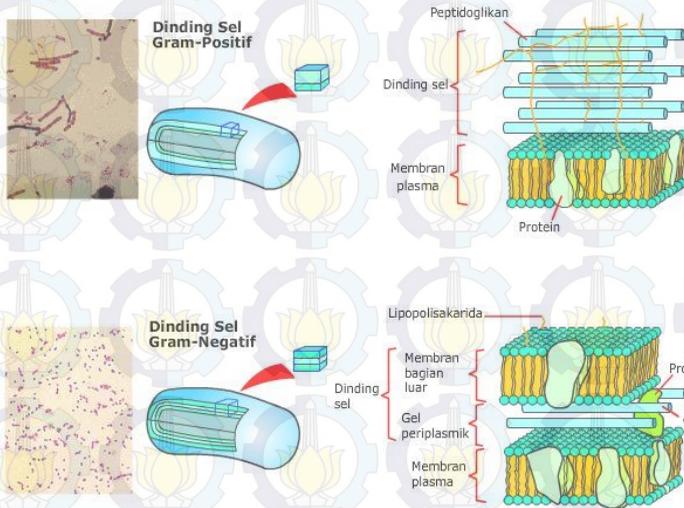
Pewarnaan Gram

Pewarnaan Gram diambil dari nama Christian Gram yaitu ilmuwan dan fisikawan yang berasal dari Denmark (1853-1938), digunakan secara luas dalam pewarnaan bakteri. Dari pewarnaan Gram, bakteri dibagi menjadi 2 kelompok, yaitu Gram positif dan Gram negatif. Dasar pembagian bakteri Gram positif dan Gram negatif berdasarkan ketebalan peptidoglikan pada dinding sel bakteri (Gambar 2.2) (Harley & Prescott, 2002).

Bakteri Gram positif memiliki peptidoglikan sebanyak 30 lapisan lebih tebal dari bakteri Gram negatif, karena memiliki lapisan peptidoglikan yang tebal, maka Gram positif mempertahankan pengikatan zat warna Kristal violet-iodium pada proses pewarnaan pertama dan tidak melepaskannya pada proses pencucian dengan alcohol-aseton, sehingga Gram positif akan berwarna ungu. Sebaliknya Gram negatif berwarna merah muda karena lapisan peptidoglikan yang lebih tipis dan tidak dapat mengikat pewarna pertama dan hanya dapat mempertahankan pewarna kedua yaitu safranin yang berwarna merah (Lay, 1994).

Pewarnaan Gram memberikan hasil yang baik bila digunakan biakan segar yang berumur 24-48 jam. Bila digunakan biakan tua banyak sel mengalami kerusakan pada dinding selnya. Kerusakan pada dinding sel ini menyebabkan zat warna dapat

keluar sewaktu dicuci dengan alkohol. Ini menyebabkan bakteri Gram positif dengan dinding sel yang rusak tidak lagi dapat mempertahankan kompleks warna Kristal violet-iodium sehingga terlihat sebagai gram negatif (Lay, 1994).



Gambar 2.2 Struktur Dinding Sel Bakteri Gram positif dan Gram Negatif (Case, 1999).

Pewarnaan Endospora

Spora pada bakteri merupakan struktur bertahan terhadap kondisi ekstrim yang tidak menguntungkan bagi pertumbuhan bakteri. Spora yang dibentuk oleh bakteri tertentu untuk mengatasi kondisi tersebut. Contoh bakteri yang memiliki endospora adalah *Bacillus*, *Clostridium*, *Thermoactinomyces*, dan *Sporosarcina*. Endospora ini berfungsi untuk reproduksi (Lay, 1994). Sporulasi bakteri tidak terjadi ketika sel membelah secara eksponensial, tapi terjadi ketika pertumbuhan berhenti karena habisnya nutrisi utama (Harley & Prescott, 2002).

Endospora mengandung sedikit sitoplasma, materi genetik, dan ribosom. Dinding endospora yang tebal tersusun atas protein dan menyebabkan endospora tahan terhadap kekeringan, radiasi cahaya, suhu tinggi, zat kimia dan untuk melindungi DNA. Jika endospora jatuh pada lingkungan yang sesuai akan tumbuh menjadi sel bakteri yang aktif. Endospora bakteri dapat dormansi selama lebih dari 50 tahun. Endospora berbentuk bola atau elips dengan ukuran lebih kecil atau lebih besar dari bakteri. Letak endospora dapat berada di tengah, subterminal atau ujung (Harley & Prescott, 2002).

Pewarnaan Tahan Asam

Beberapa bakteri tidak terwarnai dengan pewarnaan Gram, misalnya *Mycobacterium*, karena dinding selnya mengandung banyak lipid, sehingga digunakan pewarnaan tahan asam untuk mengidentifikasinya. Pewarnaan tahan asam atau *Ziehl Neelsen Acid-Fast* dikembangkan oleh Franz Ziehl, seorang bakteriologi Jerman, dan Friedrich Neelsen, ahli patologi Jerman di akhir tahun 1800. Pada pewarnaan ini sel bakteri akan berwarna merah muda tetapi sel jaringan akan berwarna hijau. Mikroorganisme tahan asam akan terwarnai *carbolfuchsin* dengan pemanasan. Mikroorganisme tahan asam yang telah terwarnai *carbolfuchsin* setelah dicuci dengan alcohol asam, warnanya akan tetap merah muda karena dinding sel dari mikroorganisme tahan asam kaya akan lipid mycolic. Sedangkan mikroorganisme tidak tahan asam warnanya akan berubah berwarna biru setelah diberi pewarna *Methylene blue* (Harley & Prescott, 2002).

2.3.2 Fermentasi Karbohidrat

Organisme kemoorganotrof mendapatkan energi dengan dua mekanisme yaitu fermentasi dan respirasi. Organisme kemoorganotrof adalah organisme yang menghasilkan energi dari bahan organik. Fermentasi adalah dekomposisi glukosa secara anaerob menjadi alkohol, senyawa asam organik, dan gas CO₂. Pada proses fermentasi terjadi keseimbangan antara reaksi

oksidasi-reduksi, dimana beberapa atom elektron donor tereduksi dan atom lain mengalami oksidasi. Pada proses ini energi dibentuk dalam fosforilasi tingkat substrat (Madigan *et al.*, 2012). Energi yang dihasilkan dari fermentasi relatif lebih sedikit (2 ATP) dibandingkan energi dari respirasi aerob (36 ATP). Kemampuan mikroorganisme untuk memfermentasi karbohidrat dan tipe produk sangat bermanfaat untuk identifikasi (Irianto, 2007).

Menurut Madigan *et al.*, (2012) fermentasi dibagi dalam 3 tahap, setiap tahap menggunakan enzim spesifik, yaitu :

1. Tahap pertama adalah glikolisis. Pada proses ini terjadi proses oksidasi dan reduksi. Pada glikolisis, satu molekul glukosa dirubah menjadi dua molekul asam piruvat dengan proses sebagai berikut :



Reaksi ini disempurnakan dengan perubahan dua molekul NAD^+ menjadi NADH dan perubahan dua molekul ADP menjadi dua molekul ATP.

2. Tahap kedua, terjadi reaksi reduksi-oksidasi. Piruvat diubah menjadi asetaldehida dan karbondioksida oleh enzim *pyruvat dekarboksilase* dengan proses sebagai berikut :



3. Tahap ketiga adalah fermentasi, dimana NADH melepaskan elektron (e^-) menjadi NAD^+ . Elektron tersebut kemudian ditangkap oleh molekul asetaldehid. Selain menangkap e^- juga menangkap ion H^+ untuk berubah menjadi etanol dengan proses sebagai berikut :



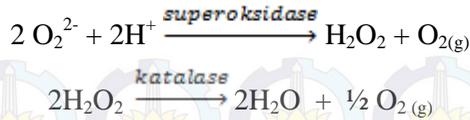
Dalam uji fermentasi karbohidrat yang biasanya digunakan adalah glukosa, laktosa dan manitol. Glukosa akan diubah menjadi alkohol dan karbondioksida, laktosa menjadi galaktosa dan glukosa. Beberapa mikroorganisme seperti *Escherichia coli*, dapat menggunakan laktosa sebagai sumber karbon. Enzim

esensial yang berperan adalah galaktosidase yang menghidrolisis laktosa menjadi galaktosa dan glukosa (Harley & Prescott, 2002).

Untuk menentukan adanya fermentasi, dilaboratorium digunakan media kaldu karbohidrat. Kaldu karbohidrat yang digunakan mengandung 0,5-1% karbohidrat. Selain karbohidrat ke dalam media ditambahkan juga ekstrak daging dan pepton sebagai sumber nitrogen, vitamin dan mineral. Bakteri yang ditumbuhkan dalam media biakan cair karbohidrat, akan mengalami fermentasi dan menghasilkan asam. Asam yang dihasilkan akan menurunkan pH media kultur. Untuk mendeteksi ada tidaknya penurunan pH maka digunakan indikator. Indikator yang sering digunakan ialah *fenol red*. Bila terjadi penurunan pH maka akan terjadi perubahan warna menjadi warna kuning. Pembentukan gas dapat ditentukan dengan menggunakan tabung Durham. Tabung Durham digunakan bila hanya ingin mengetahui ada tidaknya gas yang terbentuk tanpa harus mengetahui jumlah gas yang terbentuk dan jenis gas yang terbentuk. Bila terbentuk gas, maka gas akan masuk ke dalam tabung Durham dan mendesak cairan dalam tabung Durham. Gas yang terbentuk terlihat sebagai gelembung udara yang terperangkap dalam tabung Durham. Setelah diinkubasi diamati perubahan warna dan pembentukan gas dalam tabung Durham (Lay, 1994).

2.3.3 Katalase

Hidrogen peroksida (H_2O_2) adalah produk antara pada proses respirasi aerob. Hidrogen peroksida bersifat toksik terhadap sel karena dapat menginaktivasi beberapa enzim dalam sel, sehingga mikroorganisme aerob harus segera menguraikannya. Katalase dan peroksidase adalah enzim yang berperan dalam penguraian hidrogen peroksida. Katalase mengubah hidrogen peroksida menjadi air dan O_2 , sedangkan penguraian oleh peroksidase tidak dihasilkan oksigen (Gambar 2.3) (Lay, 1994).



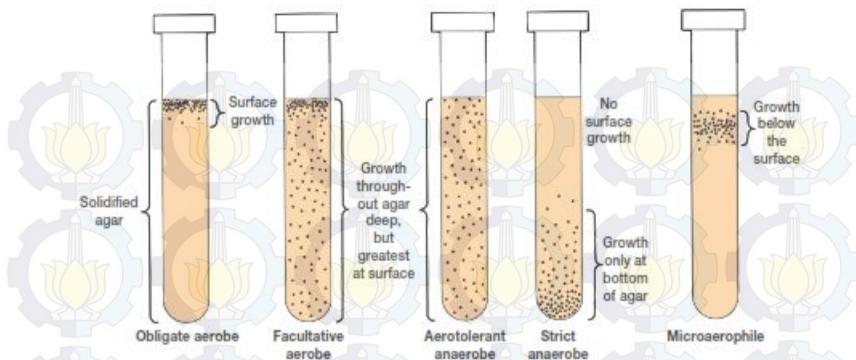
Gambar 2.3 Reaksi Enzim Peroksidase dan Katalase (Harley & Prescott, 2002)

Uji katalase berguna dalam identifikasi kelompok bakteri tertentu. Pada bakteri yang terbentuk kokus, uji katalase digunakan untuk membedakan *Staphylococcus* dan *Streptococcus*. Kelompok *Streptococcus* bersifat katalase negatif, sedangkan *Staphylococcus* bersifat katalase positif (Lay, 1994).

2.3.4 Uji Kebutuhan Oksigen (Thioglikolat)

Salah satu faktor lingkungan yang sangat sensitif bagi bakteri dan mikroorganisme lainnya adalah adanya oksigen. Berdasarkan kebutuhan oksigen, bakteri di bedakan menjadi bakteri aerob obligat adalah bakteri yang dapat hidup bila tersedia oksigen. Anaerob fakultatif adalah bakteri akan hidup bila tersedia oksigen atau tidak tersedia oksigen, tapi akan tumbuh lebih baik dengan tidak tersedia oksigen. Anaerob obligat adalah bakteri yang dapat hidup bila tidak tersedia oksigen. Anaerob Aerotolerant adalah bakteri yang memerlukan sedikit oksigen untuk pertumbuhan yang baik (Harley & Prescott, 2002).

Media thioglikolat agar di tambahkan dengan isolat bakteri dan mencampurnya secara menyeluruh tanpa mengaerasi. Pertumbuhan bakteri dalam media ditandai oleh kekeruhan media. Kekeruhan pada bagian permukaan media menunjukkan pertumbuhan bakteri aerob. Kekeruhan pada bagian dasar media menunjukkan pertumbuhan bakteri anaerob. Kekeruhan pada bagian bawah permukaan media menunjukkan pertumbuhan bakteri *microaerophile* (Gambar 2.4) (Harley & Prescott, 2002).



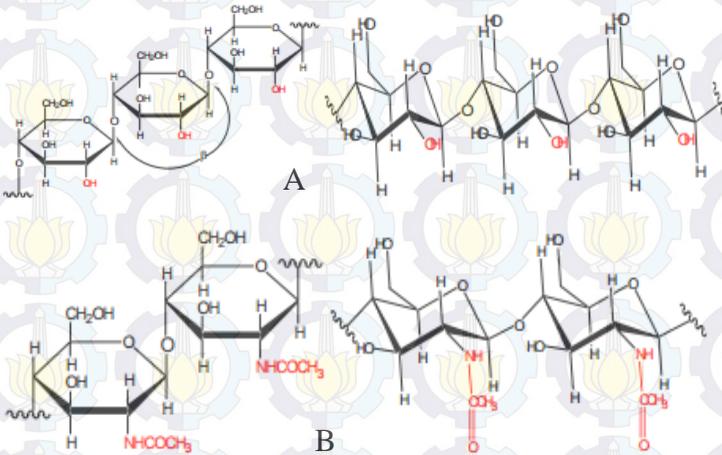
Gambar 2.4 Pertumbuhan Bakteri Berdasarkan Kebutuhan Oksigen (Harley & Prescott, 2002).

2.4 Kitin

Kitin merupakan biopolimer alam paling melimpah kedua setelah selulosa. Senyawa kitin atau ((1-4)-N-asetil-D-glukosamin) dapat dipertimbangkan sebagai suatu senyawa turunan selulosa (Kaur, *et al.*, 2012). Perbedaan antara kitin dengan selulosa adalah gugus hidroksil yang terikat pada atom karbon nomor dua digantikan oleh gugus asetamida (NHCOCH_3), sehingga kitin menjadi sebuah polimer berunit N-asetilglukosamin (Gambar 2.5) (Fernandez *et al.*, 1982). Dimana gugus hidroksil pada atom C kedua digantikan oleh gugus asetamido (Gambar 2.9) (Pujiastuti, 2001). Kitin terdapat pada invertebrata laut, serangga, jamur dan yeast (khamir). Kitin dan turunannya memiliki nilai ekonomi yang tinggi karena memiliki banyak manfaat dalam aktivitas biologi dan aplikasi agrokimia. Kitin tidak larut dalam air atau sebagian besar pelarut organik (Kaur, *et al.*, 2012).

Kitin yang telah dihilangkan gugus asetilnya melalui proses deasetilasi disebut kitosan. Kitosan (2-asetamida-deoksi-D-glukosa) memiliki gugus amina bebas yang membuat polimer ini bersifat polikationik, sehingga polimer ini potensial untuk

diaplikasikan dalam pengolahan limbah, obat-obatan, pengolahan makanan dan bioteknologi (Savant & Torres, 2000). Kitosan tidak larut dalam pelarut alkali karena adanya gugus amina (Fernandez *et al.*, 1982).



Keterangan : A.Struktur Selulosa, B.Struktur Kitin

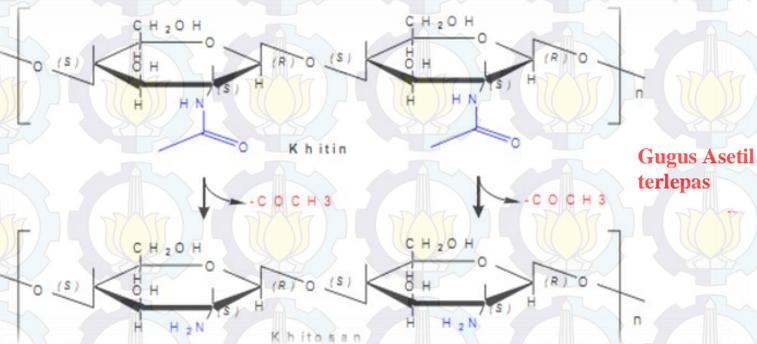
Gambar 2.5 Struktur Selulosa dan Struktur Kitin (Kusumaningsih *et al.*, 2004).

2.5 Kitin Deasetilase

Kitin deasetilase adalah enzim yang mengkatalisis reaksi kimia hidrolisis grup Acetamido-N-asetil-D-glukosamin dalam kitin. Enzim ini merupakan enzim yang menghidrolisis ikatan C-N dan ikatan peptida dalam amida linier. Kitin deasetilase telah dilaporkan terdapat pada beberapa mikroorganisme seperti jamur, yeast, bakteri dan juga di beberapa spesies serangga (Kashyap, *et al.*, 2014).

Proses degradasi kitin merupakan suatu proses reaksi enzimatik yang berlangsung dalam dua jalur. Jalur pertama melibatkan enzim kitnase yang menghidrolisis kitin secara acak

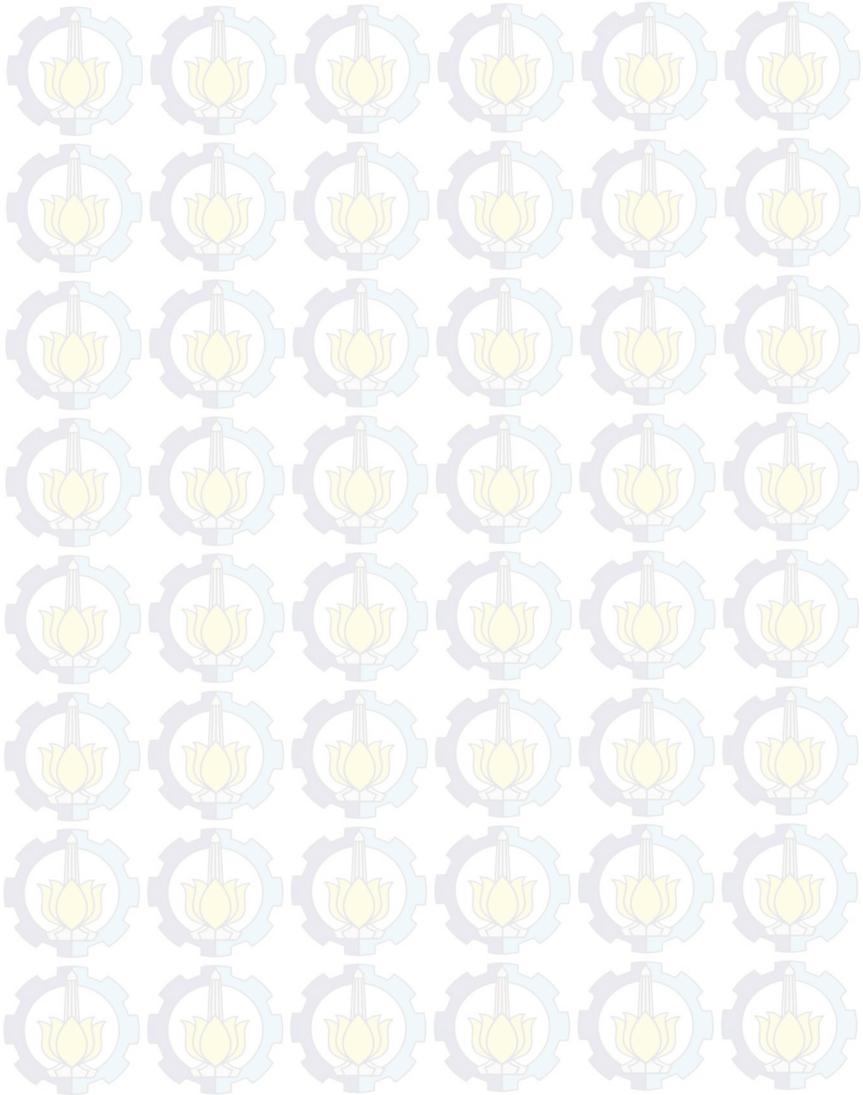
pada ikatan 1,4-glikosida. Menjadi oligosakarida hingga disakarida. Kemudian pada jalur lain melibatkan enzim kitin deasetilase yang dapat mengkonversi kitin menjadi kitosan (Natsir, 2002). Kitin deasetilase menghilangkan gugus asetil dari kitin menghasilkan kitosan (Gambar 2.6). Pada dasarnya deasetilasi secara enzimatik bersifat selektif dan tidak merusak struktur rantai kitosan, sehingga menghasilkan kitosan dengan karakteristik yang lebih seragam agar dapat memperluas bidang aplikasinya (Sugita, 2009).



Gambar 2.6 Deasetilasi Kitin Menjadi Kitosan (Hayashi & Mikio, 2002).

Kitin deasetilase pertama kali diidentifikasi dan dimurnikan dari jamur *Mucor rouxii*. Kitin deasetilase dari jamur telah dipelajari dan lebih berlimpah daripada yang terdapat pada serangga dan dari bakteri laut. Berdasarkan tempatnya kitin deasetilase telah dibagi dalam dua subkelompok: intraseluler kitin deasetilase dan ekstraseluler kitin deasetilase. Intraseluler kitin deasetilase disekresikan ke periplasma dan ditemukan dalam *Mucor rouxii* dan *Aspergillus coerulea*. Ekstraseluler kitin deasetilase disekresikan ke medium kultur dan ditemukan pada *C.lindemuthianum* dan *A.nidulans* (Kashyap, *et.al.*, 2014).

“Halaman ini sengaja dikosongkan”



BAB III METODOLOGI

3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilaksanakan pada bulan Maret 2015 hingga Juli 2015 di Laboratorium Mikrobiologi dan Bioteknologi, Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Pengetahuan Alam, Institut Teknologi Sepuluh Nopember.

3.2 Alat, Bahan, dan Cara Kerja

3.2.1 Pengambilan Sampel

Sampel adalah sampah perikanan yang telah terdegradasi dari Kenjeran pada koordinat S: 07°13'397" dan E: 112°47'242". Sampel diambil dari 5 titik dengan metode komposit. Sampel digunakan sebagai sumber inokulum. Sampel diambil dan dimasukkan ke botol steril.

3.2.2 Isolasi Bakteri

Bakteri diisolasi dari sampel sampah perikanan Kenjeran, Surabaya menggunakan metode pengenceran bertingkat (*serial dilution*) dan metode sebar (*spread plate*) secara aseptis. Satu gram sampel sampah perikanan dimasukkan dalam tabung reaksi berisi 9 ml akuades steril. Sampel kemudian dihomogenkan dengan cara tabung reaksi di goncangkan kuat sebanyak 25 kali dengan posisi lengan bertumpu pada bangku dan di gerakkan membentuk busur secara dua arah. Tahap ini merupakan pengenceran 10^{-1} , selanjutnya diambil 1 ml larutan dari pengenceran 10^{-1} , dimasukkan ke dalam tabung reaksi lain yang berisi 9 ml akuades steril dan dihomogenkan kembali. Tahap ini merupakan pengenceran 10^{-2} , kemudian 0.1 ml larutan dari pengenceran 10^{-2} diambil, dimasukkan ke dalam tabung reaksi lain yang berisi 9.9 ml akuades steril, dan dihomogenkan kembali. Tahap ini merupakan pengenceran 10^{-4} . Perlakuan ini dilakukan kembali sehingga didapatkan pengenceran 10^{-6} (Harley &

Prescott, 2002). Sebanyak 3 tetes larutan dari pengenceran 10^{-2} , 10^{-4} dan 10^{-6} masing-masing diambil dan diteteskan pada medium minimal Srinivasan (2000) yang telah dimodifikasi (Toharisman & Suhartono, 2008). Dengan metode sebar, inokulum kemudian diratakan dengan batang *dry galski* steril (Harley & Prescott, 2002). Kultur biakan bakteri kemudian diinkubasi selama 24-48 jam pada suhu ruang.

3.2.3 Purifikasi Bakteri

Koloni yang tumbuh selanjutnya dipurifikasi sampai diperoleh isolat bakteri murni. Koloni diseleksi berdasarkan perbedaan karakter koloni dan pigmentasi dengan pengamatan makroskopik. Koloni bakteri hasil seleksi dimurnikan dengan metode gores (*streak plate*) (Madigan *et al.*, 2012). Satu koloni isolat bakteri diambil secara aseptis dengan jarum ose dan diinokulasikan ke permukaan medium minimal Srinivasan (2000) dengan metode 16 goresan dan diinkubasi selama 24-48 jam pada suhu ruang. Pemindahan koloni isolat dilakukan sebanyak 3 kali tahapan.

Untuk mengetahui telah didapatkan isolat murni atau belum dilakukan pengamatan bentuk sel secara mikroskopis yaitu satu tetes akuades diteteskan ke ujung tengah kaca objek. Satu ose bakteri digoreskan ke ujung tengah kaca objek yang berisi tetesan akuades lalu ditarik memanjang pada kaca objek membentuk pola zigzag sampai ujung berlawanan. Preparat dilewatkan di atas api bunsen sampai akuades kering (preparat ulas). Preparat ulas ditambahkan satu atau dua tetes dengan *negrosin* atau *methylen blue* lalu diratakan dengan gelas objek yang lain. Pengamatan sel bakteri dilakukan di bawah mikroskop pada perbesaran 1000x dengan bantuan satu tetes minyak imersi. Isolat murni diamati dengan mikroskop sebagai satu jenis bentuk bakteri berdasarkan bentuk sel bakteri (Harley & Prescott, 2002).

Isolat yang memiliki bentuk sel yang sama selanjutnya dilakukan pewarnaan gram. Satu tetes akuades diteteskan ke

ujung tengah kaca objek. Satu ose bakteri digoreskan ke ujung tengah kaca objek yang berisi tetesan akuades lalu ditarik memanjang pada kaca objek membentuk pola zigzag sampai ujung berlawanan. Preparat dilewatkan di atas api bunsen sampai akuades kering (preparat ulas). Preparat ulas ditetesi 2-3 tetes larutan kristal violet, didiamkan selama 20 detik lalu dicuci dibawah air mengalir dan dikeringanginkan. 2-3 tetes larutan iodin ditetaskan di atas permukaan preparat, didiamkan selama 1 menit lalu dicuci di bawah air mengalir dan dikeringanginkan. Larutan ethil alkohol ditetaskan di atas lapisan permukaan preparat sampai kristal violet tercuci, kemudian dicuci di bawah air mengalir dan dikeringanginkan. Larutan safranin ditetaskan di atas permukaan kaca objek, didiamkan selama 20 detik, kemudian dicuci di bawah air mengalir dan dikeringanginkan. Preparat ulas ditutup dengan gelas penutup, kemudian diamati di bawah mikroskop pada perbesaran 1000x dengan bantuan minyak imersi (Harley & Prescott, 2002). Isolat murni adalah isolat yang hanya terdiri dari satu spesies, dimana dalam satu koloni terdiri dari satu bentuk sel yang sama dan memiliki warna yang sama dalam uji pewarnaan gram (Irianto, 2007).

3.2.4 Skrining Aktivitas Degradasi Kitin

Bakteri penghasil enzim kitinolitik dilakukan pengamatan zona bening disekitar koloni (Patil, 2000). Bakteri yang telah murni diinokulasikan ke medium selektif dalam cawan petri, kemudian bakteri diinkubasi pada suhu ruang selama 3-5 hari. Isolat yang membentuk zona bening selanjutnya di uji aktivitas kitin deasetilase (Kaur *et al.*, 2012).

3.2.5 Karakterisasi Bakteri

3.2.5.1 Karakterisasi morfologi

Karakterisasi morfologi bakteri dilakukan pengamatan mikroskopis dan makroskopis. pengamatan makroskopik dilakukan dengan mengamati bentuk pertumbuhan koloni bakteri

yang tumbuh di permukaan media padat. Parameter koloni meliputi :

- a. Bentuk koloni (dilihat dari atas) : berupa titik-titik, bulat, berbenang, tak teratur, serupa akar, serupa kumaran.
- b. Permukaan koloni (dilihat dari samping) : rata, timbul-datar, melengkung, membukit, serupa kawah.
- c. Tepi koloni (dilihat dari atas) : utuh, berombak, berbelah, bergerigi, berbenang, keriting.
- d. Warna koloni : keputih-putihan, kelabu, kekuning-kuningan atau hampir bening.

(Harley & Prescott, 2002)

Dilanjutkan dengan pengamatan mikroskopis untuk mengetahui bentuk sel, tipe dinding sel, ketahanan isolat terhadap keasaman dan ada tidaknya endospora pada isolat.

Pewarnaan gram. Satu tetes akuades diteteskan ke ujung tengah kaca objek. Satu ose bakteri digoreskan ke ujung tengah kaca objek yang berisi tetesan akuades lalu ditarik memanjang pada kaca objek membentuk pola zigzag sampai ujung berlawanan. Preparat dilewatkan di atas api bunsen sampai akuades kering (preparat ulas). Preparat ulas ditetesi 2-3 tetes larutan kristal violet, didiamkan selama 20 detik lalu dicuci dibawah air mengalir dan dikeringanginkan. 2-3 tetes larutan iodin diteteskan di atas permukaan preparat, didiamkan selama 1 menit lalu dicuci di bawah air mengalir dan dikeringanginkan. Larutan ethil alkohol diteteskan di atas lapisan permukaan preparat sampai kristal violet tercuci, kemudian dicuci di bawah air mengalir dan dikeringanginkan. Larutan safranin diteteskan di atas permukaan kaca objek, didiamkan selama 20 detik, kemudian dicuci di bawah air mengalir dan dikeringanginkan. Preparat ulas ditutup dengan gelas penutup, kemudian diamati di bawah mikroskop pada perbesaran 1000x dengan bantuan minyak imersi (Harley & Prescott, 2002).

Pewarnaan tahan asam. Satu tetes akuades diteteskan ke ujung tengah kaca objek. Satu ose bakteri digoreskan ke ujung tengah kaca objek yang berisi tetesan akuades lalu ditarik memanjang pada kaca objek membentuk pola zigzag sampai ujung berlawanan. Preparat dilewatkan di atas api bunsen sampai aquades kering (preparat ulas). Preparat ulas ditempatkan pada rak pewarnaan. Preparat ditambahkan karbol fuksin selama 5 menit, kemudian dibilas dengan akuades. Preparat dibilas kembali dengan alkohol selama 15 detik, selanjutnya dibilas dengan akuades dan dikeringkan. Preparat ditambahi *methylen blue* selama 2 menit dan dibilas kembali dengan aquades. Preparat ditutup dengan gelas penutup lalu diamati di bawah mikroskop perbesaran 1000x dengan bantuan minyak imersi. Bakteri positif bersifat tahan asam ketika nampak berwarna merah dibawah pengamatan mikroskop (Harley & Prescott, 2002).

Pewarnaan endospora. Satu tetes akuades diteteskan ke ujung tengah kaca objek. Satu ose bakteri digoreskan ke ujung tengah kaca objek yang berisi tetesan aquades lalu ditarik memanjang pada kaca objek membentuk pola zigzag sampai ujung berlawanan. Preparat dilewatkan di atas api bunsen sampai aquades kering (preparat ulas). Preparat ulas ditempatkan pada rak pewarnaan dan ditutup dengan kertas saring. Zat warna hijau malakit diteteskan ke permukaan kertas saring secara merata lalu dipanaskan selama 5 menit dan didinginkan. Setelah dingin, kertas saring dibuang lalu preparat dibilas dengan air yang mengalir dan dikeringanginkan. Preparat ulas diwarnai dengan safranin selama 1 menit lalu dibilas dengan air yang mengalir dan dikeringanginkan. Preparat ditutup dengan gelas penutup kemudian diamati di bawah mikroskop perbesaran 1000x dengan bantuan minyak imersi (Harley & Prescott, 2002).

3.2.5.2 Karakterisasi Biokimia

Bakteri selanjutnya diidentifikasi dan diuji karakter biokimianya secara bertahap menurut bagan alir dikotomi

berdasarkan *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. Uji biokimia yang dilakukan meliputi uji motilitas, uji fermentasi karbohidrat, uji kebutuhan oksigen, uji katalase, uji indol, uji MR-VP, uji simon sitrat dan uji urease.

Uji TSIA. Uji motilitas bakteri digunakan medium TSIA (*Triple Sugar Iron Agar*) miring pada tabung reaksi dengan cara isolat bakteri diambil menggunakan jarum tanam tajam secara aseptis dan ditusukkan pada medium TSIA padat, kemudian dilakukan streak pada permukaan medium kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Bakteri motil positif ditandai dengan pertumbuhan bakteri yang terlihat melebar dan semakin menyempit ke arah dasar tabung reaksi mengikuti arah tusukan jarum. Apabila bakteri non-motil, pertumbuhan bakteri hanya terlihat pada daerah tusukan jarum. TSIA juga digunakan untuk uji fermentasi glukosa, laktosa, sukrosa, dan H₂S. Pengamatan hasil fermentasi dilihat dari perubahan warna medium dari merah menjadi kuning, sedangkan hasil H₂S dilihat dari perubahan medium menjadi hitam (Cappucino & Sherman, 2001; Harley & Prescott, 2002).

Uji Kebutuhan Oksigen (Thioglikolat). Media *thioglycollate* di tambahkan ke dalam tabung reaksi dan di autoklaf pada suhu 121°C tekanan 1.5 atm selama 15 menit, selanjutnya tabung reaksi yang berisi media langsung dipindahkan ke dalam *waterbath* berisi air yang telah diatur suhunya 50°C untuk mencegah pematatan agar. Satu ose isolat bakteri berumur 24 jam diinokulasikan ke dalam media secara aseptis. Tabung reaksi divortex agar bakteri tersebar merata di dalam media. Setelah diinkubasi selama 48 jam pada suhu 37°C, pola pertumbuhan isolat bakteri diamati. Apabila isolat bakteri hanya tumbuh di permukaan media, maka isolat adalah aerob obligat. Apabila isolat bakteri tumbuh di sepanjang kolom media, tetapi pertumbuhan terpekat pada permukaan media maka isolat adalah anaerob fakultatif. Apabila isolat bakteri tumbuh merata di sepanjang kolom media, maka isolat adalah anaerob aerotoleran.

Apabila isolat bakteri hanya tumbuh di bawah permukaan media, tapi tidak sampai sepanjang kolom tabung reaksi, maka isolat adalah mikroaerofilik. Apabila isolat bakteri hanya tumbuh merata di dasar tabung reaksi, maka isolat adalah anaerob (Cappucino & Sherman, 2001; Harley & Prescott, 2002).

Fermentasi Karbohidrat. Karbohidrat yang digunakan adalah glukosa, laktosa dan manitol. Media fermentasi adalah 1% glukosa, 0.1 % laktosa dan 0.1% manitol, yang masing-masing dilarutkan dalam 100 ml media cair pepton water yang mengandung 1 ml *bromthymol blue* 0.1%. Selanjutnya 3 ml media fermentasi dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang telah berisi tabung Durham yang terbalik. Satu ose isolat bakteri diinokulasikan ke dalam media fermentasi secara aseptis dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Fermentasi akan mengubah karbohidrat menjadi asam organik dan beberapa bakteri ada yang menghasilkan CO₂. Tes positif ditandai dengan terbentuknya warna kuning sebagai indikator bahwa pH media menjadi asam karena terlarutnya asam organik dalam media. Pembentukan CO₂ ditandai dengan adanya gas dalam tabung Durham. Tes negatif ditandai dengan warna biru (Cappuccino & Sherman, 2001)

Uji Katalase. Satu ose bakteri digoreskan secara aseptis ke kaca objek kemudian satu tetes H₂O₂ 3% diteteskan ke permukaan kaca objek. Hasil positif ditandai dengan timbulnya gas atau terbentuknya gelembung udara di sekitar goresan bakteri (Cappuccino & Sherman, 2001; Harley & Prescott, 2002).

Uji Oksidase. Satu ose bakteri digoreskan secara aseptis ke permukaan kertas saring steril, kemudian satu tetes *BBL™ Oxidase Reagent Dropper* tepat pada goresan isolate bakteri. Hasil positif ditandai dengan terbentuknya warna biru atau ungu gelap pada kertas saring beberapa detik setelah reagen dicampurkan dengan goresan isolat bakteri. Hasil negatif oksidase ditandai dengan terbentuknya warna ungu cerah atau merah muda pada kertas saring beberapa detik setelah reagen dicampurkan

timbulnya gas atau terbentuknya gelembung udara di sekitar goresan bakteri (MacFaddin, 1972).

3.2.6 Identifikasi Bakteri

Identifikasi bakteri dilakukan hingga tingkat genus. Bakteri diidentifikasi berdasarkan *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*.

3.2.7 Pembuatan Enzim Kasar (*Crude Enzym*)

Enzim Kitin deasetilase diperoleh dengan cara fermentasi cair yang ditambahkan substrat sumber kitin pada medium fermentasi. Sumber kitin dalam medium fermentasi berasal dari kitin komersial. Komposisi medium fermentasi yaitu 0.5 gr kitin, 0.2 gr *yeast ekstrak*, 0.2 gr ammonium sulfat ((NH₄)₂SO₄), 0.1 gr KH₂PO₄, 0.1 gr *tryptone*, 0.01gr MgSO₄.7H₂O dalam 1 liter akuades.

3.2.8 Uji Aktivitas Kitin Deasetilase

Aktivitas kitin deasetilase diukur menggunakan metode modifikasi Tokuyasu *et al* (1996) dengan kurva standar glukosamin yang memiliki persamaan $y = ax + b$. y adalah nilai konsentrasi glukosamin. x adalah nilai absorbansi glukosamin. Larutan digesti yang terdiri dari 3 ml enzim, 8 mg kitin dan 1 ml buffer diinkubasi selama 30 menit pada suhu 50°C, kemudian aktivitas enzim diterminasi dengan penambahan asam setat 33% sebanyak 200µl. Untuk pengontrolan, penambahan enzim dilakukan sesaat setelah penambahan asam asetat. Setelah digesti, konsentrasi residu glukosamin yang terbentuk dari reaksi deaminasi dihitung berdasarkan oksidasi menggunakan NaNO₂, mengikuti metode spektrofotometrik menggunakan indol HCl sesuai dengan Dische dan Borenfreund (1950) yang telah dimodifikasi sebagai berikut : larutan digesti dipipet sebanyak 200 µl ditambahkan 200 µl asam asetat 33% dan 200 µl NaNO₂ 5%. Larutan divorteks dan dibiarkan selama 10 menit pada suhu

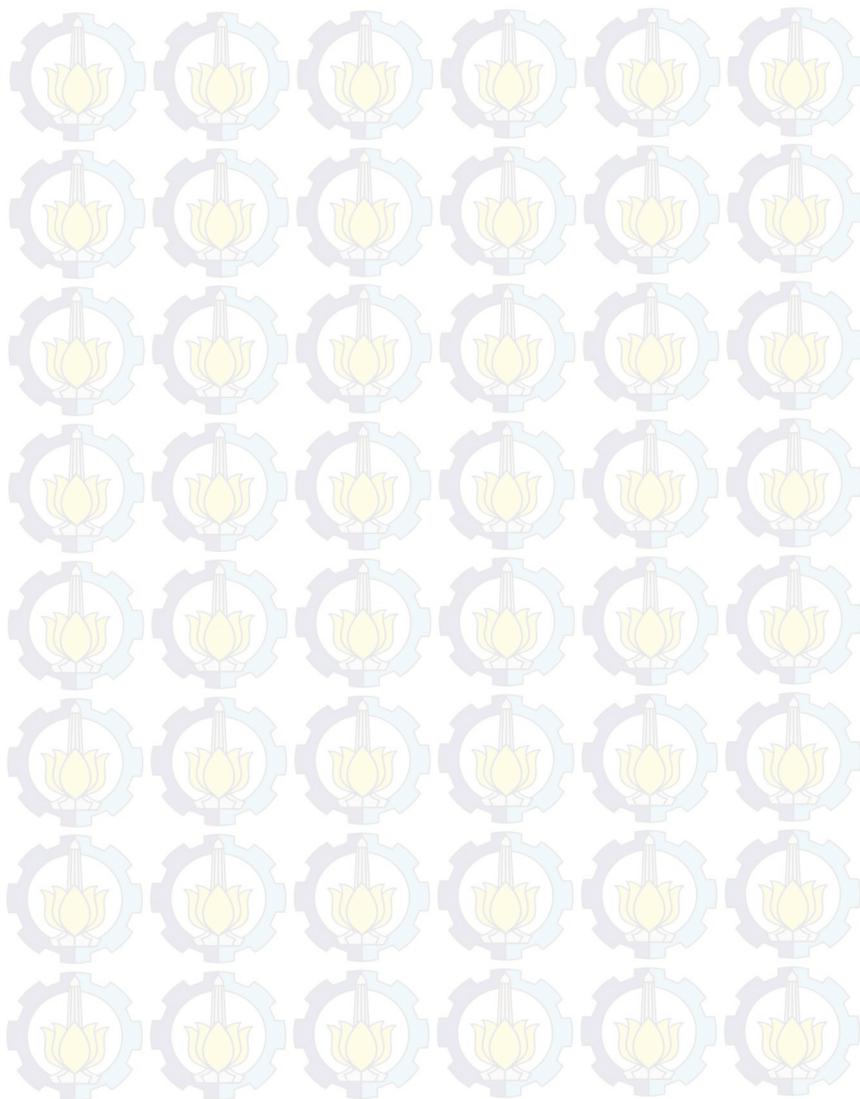
ruang. Ditambahkan 500 μl asam askorbat 0,1 mM dan digoyang selama 30 menit pada suhu ruang. Selanjutnya ditambahkan 800 μl HCl 5% dan 80 μl indol 1% dalam etanol. Campuran reaksi ini dididihkan dalam air mendidih selama 5 menit hingga terbentuk warna merah kejinggaan. Larutan kemudian didinginkan, selanjutnya ditambah etanol absolut 800 μl dan divortek. Konsentrasi glukosamin yang terbentuk diketahui melalui reaksi warna coklat kemerahan yang terjadi dan diukur pada λ 492 nm.

Aktivitas kitin deasetilase diukur dalam satuan unit. Satu unit aktifitas enzim dinyatakan sebagai jumlah enzim yang memproduksi 1 mM residu glukosamin permenit. Standar yang digunakan adalah konsentrasi glukosamin pada 1 mg/ 1mL.

3.3 Rancangan Penelitian dan Analisa Data

Rancangan dan analisa data yang digunakan dalam penelitian ini adalah deskriptif. Analisis data dilakukan dengan pengamatan morfologi isolat bakteri makroskopik dan pengamatan mikroskopik. Isolat bakteri dikarakterisasi biokimia dan diidentifikasi berdasarkan karakter biokimia menurut *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*.

“Halaman Ini Sengaja Dikosongkan”



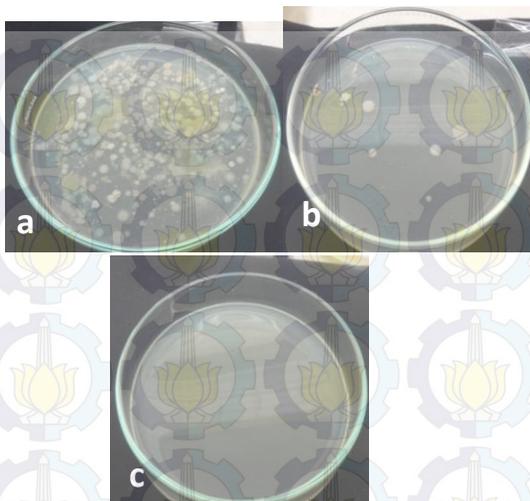
BAB IV

HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

4.1 Isolasi, Purifikasi dan Karakterisasi Makroskopis Bakteri dari Sampah Perikanan.

Isolasi bakteri penghasil kitin deasetilase dari sampah perikanan Kenjeran diawali dengan pengambilan sampel secara komposit dari 5 titik berbeda pada sampah perikanan. Sampel perikanan dipilih berdasarkan pengamatan visual yang menampilkan kondisi telah terdegradasi. Sampah kemudian dimasukkan kedalam botol steril, dimasukkan dalam *cool box* dan dibawa ke Laboratorium Mikrobiologi dan Bioteknologi, Biologi, ITS, kemudian diencerkan dengan metode pengenceran bertingkat 10^{-2} , 10^{-4} dan 10^{-6} . Sampel hasil pengenceran diinokulasikan dengan metode sebar ke medium kitin agar Srinivasan (2000). Metode sebar digunakan untuk memisahkan kumpulan dari dua atau lebih bakteri menjadi koloni tunggal. Metode sebar memiliki kelebihan yakni koloni tersebar merata di permukaan medium sehingga memudahkan untuk subkultur isolat (Harley & Prescott, 2002). Bakteri diinokulasikan di medium kitin agar sebagai medium minimal dalam seleksi bakteri kitinolitik. Komponen dalam medium tersebut terdapat kitin sebesar 1% sebagai sumber karbon bakteri kitinolitik, sehingga yang mampu hidup adalah bakteri yang dapat menggunakan kitin sebagai sumber karbon (Gambar 4.1) (Toharisman & Suhartono, 2008).

Koloni bakteri yang tumbuh kemudian dihitung dengan metode *total plate count* (TPC) dalam satuan *colony forming unit* (CFU) (Tabel 4.1). Prinsip dari metode ini adalah bila sel mikroba yang masih hidup ditumbuhkan pada medium, maka mikroba tersebut akan berkembang biak dan membentuk koloni yang dapat dilihat langsung, dan kemudian dihitung tanpa menggunakan mikroskop. Berikut ini data dan hasil pengamatan yang dilakukan pada metode *total plate count* (TPC).



Keterangan a: 10^{-2} , b: 10^{-4} , c: 10^{-6} .

Gambar 4.1 Hasil Isolasi bakteri Sampah Perikanan Metode Pengenceran Bertingkat.

Tabel 4.1 Hasil Pengamatan Koloni Bakteri.

	Jumlah koloni		Jumlah bakteri (CFU/mL)
	10^{-2}	10^{-4}	
TBUD		25	TSUD $2,5 \times 10^6$

Keterangan: TBUD : terlalu banyak untuk dihitung.

TSUD : terlalu sedikit untuk dihitung.

Jumlah koloni bakteri yang didapatkan pada isolasi ini adalah sebesar $2,5 \times 10^6$. Berdasarkan bentuk koloni dan warna koloni didapatkan 13 isolat bakteri. Sebanyak 13 isolat hasil seleksi koloni yang tumbuh berdasarkan karakter makroskopis yang beragam kemudian dimurnikan dengan metode gores 16. Hasil pengamatan karakter makroskopis adalah koloni isolat sebagian besar berbentuk bulat dan tidak beraturan (Lampiran 3).

Pemurnian dilakukan secara berulang minimal sebanyak 5 kali pemindahan sampai diperoleh isolat murni. Isolat yang murni ditandai dengan pengamatan morfologi koloni sel, yaitu memiliki bentuk koloni maupun sel yang seragam (Irianto, 2007).

Pengamatan morfologi sel, dilakukan dengan pewarnaan *methylene blue* dan pewarnaan Gram untuk mengamati karakter bentuk sel dan Gram masing-masing isolat. Pewarnaan Gram positif ditandai dengan sel yang terwarnai ungu yang mempertahankan pengikatan zat warna *crystal violet* pada proses pewarnaan pertama dan tidak melepaskannya pada proses pencucian dengan alkohol. Sebaliknya Gram negatif sel terwarnai merah muda karena lapisan peptidoglikan yang lebih tipis dan tidak dapat mengikat pewarna pertama dan hanya dapat mempertahankan pewarna kedua yaitu safranin yang berwarna merah (Lay, 1994; Harley & Prescott, 2002). Hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa isolat B1, B2, B3, B4, B5, B6, B9 dan B12 adalah Gram positif batang, sedangkan isolat B7, B8, B13 adalah Gram positif bulat. Isolat B10 dan B11 adalah Gram negatif bulat (Gambar 4.2) (Lampiran 4).

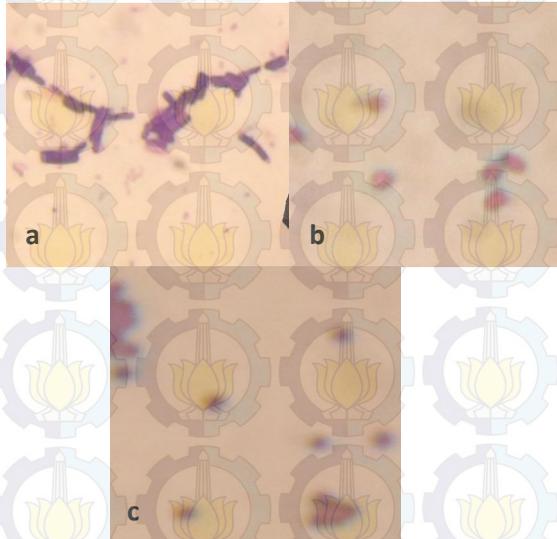
4.2 Karakterisasi Mikroskopis dan Biokimia Bakteri dari Sampah Perikanan

Karakterisasi mikroskopis yang dilakukan dalam penelitian ini adalah bentuk pewarnaan endospora, pewarnaan tahan asam. Sedangkan karakterisasi biokimia yang dilakukan dalam penelitian ini adalah uji katalase, oksidase, kebutuhan oksigen, fermentasi karbohidrat, dan *Triple Sugar Iron Agar* (TSIA).

Pewarnaan endospora

Secara struktur, endospora berbeda dengan sel vegetatif, sehingga pewarnaan endospora dilakukan untuk mengetahui adanya spora bebas atau spora yang terbentuk di dalam sel vegetatif (Madigan *et al.*, 2012). Kebanyakan sel vegetatif terwarnai dengan pewarna sederhana, tetapi endospora memiliki mantel yang mencegah masuknya pewarna sehingga mantel

tersebut harus dihilangkan atau dilonggarkan terlebih dahulu oleh panas, bahan kimia (asam), sinar ultraviolet, atau secara mekanik. Metode yang sering digunakan pewarnaan endospora dengan pewarna diferensial (Lechtman *et al.*, 1965).



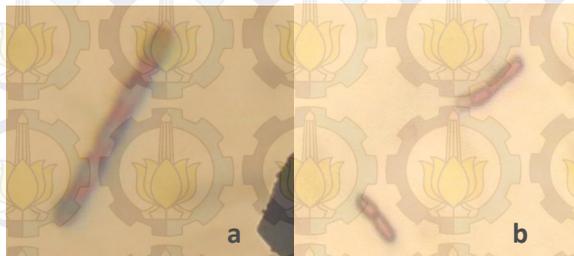
Keterangan : a: Isolat B4 gram positif batang, b: Isolat B11 gram negatif bulat, c: Isolat B8 gram positif bulat.

Gambar 4.2 Hasil Pengamatan Pewarnaan Gram Bakteri Sampah Perikanan.

Spora pada bakteri merupakan struktur bertahan terhadap kondisi ekstrim yang tidak menguntungkan bagi pertumbuhan bakteri (Lay, 1994). Sporulasi pada bakteri tidak terjadi ketika sel membelah secara eksponensial, tetapi terjadi ketika pertumbuhan berhenti karena habisnya nutrisi utama (Harley & Prescott, 2002). Prinsip dari pewarnaan endospora adalah pemanasan yang dilakukan mengembangkan lapisan luar spora sehingga zat warna utama *malachite green* dapat masuk ke dalam spora sehingga berwarna hijau (Lechtman *et al.*, 1965; Leboffe & Pierce, 2002).

Kemudian melalui pendinginan, warna utama akan terperangkap di dalam spora (Gerhardt *et al.*, 1981). Dengan pencucian, zat warna utama yang ada pada sel vegetatif akan terlepas sehingga pada saat pewarnaan kedua (safranin), sel vegetatif terwarnai merah (Lechtman *et al.*, 1965; Leboffe and Pierce, 2002).

Pewarnaan endospora dilakukan pada isolat Gram positif batang yaitu isolat B1, B2, B3, B4, B5, B6, B9, B12. Bakteri yang dapat membentuk endospora biasanya terdapat pada bakteri Gram positif seperti *Bacillus*, *Clostridium*, *Thermoactinomyces*, dan *Sporosarcina*. Hasilnya adalah isolat B1, B2, B3, B4, B5, B6, B9 dan B12 sel terwarnai merah dan spora terwarnai hijau yang berarti positif endospora, sedangkan isolat B4 dan B9 tidak ada yang terwarnai hijau dan hanya terwarnai merah yang berarti negatif endospora (Gambar 4.3) (Lampiran 4).



Keterangan : a: Isolat B1 positif endospora, b: Isolat B4 negatif endospora.

Gambar 4.3 Hasil Pengamatan Pewarnaan Endospora Bakteri Sampah Perikanan.

Pewarnaan tahan asam

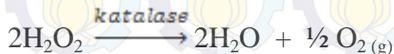
Pewarnaan tahan asam merupakan pewarnaan diferensial untuk menunjukkan karakteristik tahan asam bakteri. Beberapa bakteri tidak terwarnai dengan pewarnaan Gram, misalnya *Mycobacterium* karena dinding selnya mengandung asam mycolic sehingga dinding sel memiliki banyak lipid (Delisle & Tomalty, 2002; Mayberry, 2002; Harley & Prescott, 2002; Shoeb, 2005).

Bakteri tahan asam akan terwarnai *carbolfuchsin* dengan pemanasan. Mikroorganisme tahan asam yang telah terwarnai *carbolfuchsin* setelah dicuci dengan alkohol yang mengandung asam, warnanya akan tetap merah. Sedangkan bakteri tidak tahan asam warnanya akan berubah berwarna biru setelah diberi pewarna *methylene blue* (Mayberry, 2002; Harley & Prescott, 2002).

Pewarnaan tahan asam dilakukan pada isolat batang yaitu isolat B1, B2, B3, B4, B5, B6, B9, B12. Hal ini dikarenakan bakteri tahan asam biasanya terdapat pada bakteri batang seperti *Mycobacterium*, dan *Narcodia* (Shoeb, 2005). Hasilnya adalah semua sel isolat terwarnai biru yang berarti tidak tahan asam (Lampiran 4).

Uji katalase

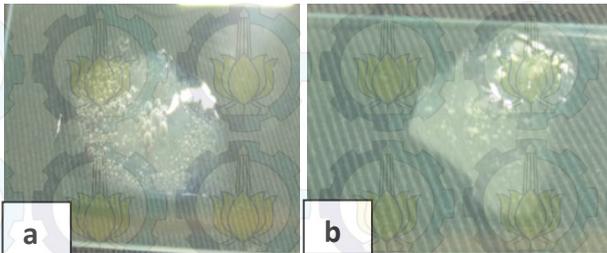
Uji katalase dilakukan untuk mendeteksi adanya enzim katalase pada suatu bakteri. Hidrogen peroksida (H_2O_2) adalah produk antara pada proses respirasi aerob. Hidrogen peroksida bersifat toksik terhadap sel karena dapat menginaktivasi beberapa enzim dalam sel, sehingga mikroorganisme aerob harus segera menguraikannya. Katalase adalah enzim yang berperan dalam penguraian hidrogen peroksida. Katalase mengubah hidrogen peroksida menjadi air (H_2O) dan oksigen (O_2) (Harley & Prescott, 2002). Reaksi tersebut dapat dituliskan sebagai berikut :



(Harley & Prescott, 2002).

Uji katalase pada bakteri yang berbentuk bulat digunakan untuk membedakan *Staphylococcus* dan *Streptococcus*. Kelompok *Streptococcus* bersifat katalase negatif, sedangkan *Staphylococcus* bersifat katalase positif (Lay, 1994). Bakteri yang menghasilkan katalase adalah bakteri yang menghasilkan gelembung udara disekitar koloni (Lay, 1994; Harley & Prescott,

2002). Hasil dari uji katalase adalah B1, B2, B3, B4, B5, B6, B7, B8, B9, B10, B12 dan B13 menunjukkan positif katalase yang ditandai dengan terbentuknya gelembung udara beberapa detik setelah bakteri dicampurkan dengan H_2O_2 3%. Gelembung udara tersebut merupakan oksigen hasil penguraian H_2O_2 3% oleh katalase. Sedangkan uji katalase B11 menunjukkan negatif katalase yang ditandai dengan tidak terbentuknya gelembung udara beberapa detik setelah bakteri dicampurkan dengan H_2O_2 3% (Gambar 4.4) (Lampiran 4).



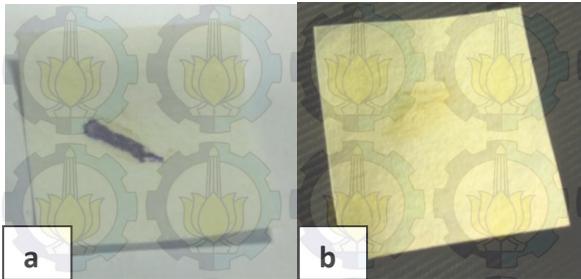
Keterangan : a: Isolat B1 positif katalase, b: Isolat B11 negatif katalase.

Gambar 4.4 Hasil Pengamatan Uji Katalase Bakteri Sampah Perikanan.

Uji oksidase

Uji oksidase merupakan reaksi biokimia untuk menguji adanya enzim sitokrom oksidase. Bakteri yang memiliki enzim sitokrom oksidase merubah reagen tanpa warna dalam keadaan tereduksi menjadi berwarna saat teroksidasi (Gaby & Free, 1958; Gerhardt *et al.*, 1981; Lui & Jurtschuk, 1986). Pada tahap akhir respirasi, bakteri melibatkan serangkaian komponen yang disebut sistem rantai transfer elektron. Tahap akhir dalam sistem rantai melibatkan sitokrom oksidase yang mengkatalisis reaksi oksidasi sitokrom *c* untuk mereduksi oksigen menjadi air (MacFaddin, 1972).

Uji oksidase menggunakan *BBL™ Oxidase Reagent Dropper* yang mengandung tetra-metil-*p*-fenilenediamin dihidroklorida sebagai donor elektron buatan untuk sitokrom *c* (Gaby & Free, 1958; Alexander & Strete, 2001; York *et al.*, 2004). Uji dilakukan dengan meneteskan reagen pada isolat bakteri yang telah dipindahkan ke kertas saring. Ketika reagen teroksidasi oleh sitokrom *c*, maka akan berubah warna menjadi biru atau ungu tua (Gordon & McLeod, 1928; Lui & Jurtschuk, 1986). Hasil dari uji oksidase adalah B1, B2, B10 dan B11 menunjukkan positif oksidase yang ditandai dengan terbentuknya warna biru atau ungu gelap pada kertas saring beberapa detik setelah reagen dicampurkan dengan goresan isolat bakteri, sedangkan B3, B4, B5, B6, B7, B8, B9, B12 dan B13 menunjukkan negatif oksidase (Gambar 4.5) (Lampiran 4). Negatif oksidase ditandai dengan terbentuknya warna ungu cerah atau merah muda pada kertas saring beberapa detik setelah reagen dicampurkan dengan goresan isolat bakteri (MacFaddin, 1972).



Keterangan : a: Isolat B1 positif oksidase, b: Isolat B3 negatif oksidase.

Gambar 4.5 Hasil Pengamatan Uji Oksidase Bakteri Sampah Perikanan.

Kebutuhan oksigen

Salah satu faktor lingkungan yang sangat sensitif bagi bakteri dan mikroorganisme lainnya adalah konsumsi oksigen. Uji kebutuhan oksigen untuk mengetahui pertumbuhan bakteri

berdasarkan ketersediaan oksigen yaitu bakteri aerob obligat, fakultatif aerob, anaerob aerotoleran, anaerob obligat atau mikroaerofilik (Harley & Prescott, 2002). Uji kebutuhan oksigen menggunakan medium *broth* thioglikolat. Pertumbuhan bakteri dalam media ditandai oleh kekeruhan media. Kekeruhan pada bagian permukaan media menunjukkan pertumbuhan bakteri aerob. Hasil uji kebutuhan oksigen menunjukkan bahwa semua isolat bakteri adalah aerob ditandai oleh kekeruhan pada permukaan medium (Lampiran 4). Bakteri aerob hanya dapat membentuk ATP bila terdapat oksigen (Harley & Prescott, 2002).

Fermentasi karbohidrat

Uji fermentasi karbohidrat dilakukan untuk mendeteksi kemampuan bakteri dalam menfermentasi suatu karbohidrat spesifik. Pola fermentasi dapat digunakan untuk membedakan suatu kelompok atau spesies bakteri (MacFaddin, 2000; Mahon *et al.*, 2011). Selama proses fermentasi, substrat organik berfungsi sebagai akseptor elektron terakhir (Hugh & Leifson, 1953; Stanier *et al.*, 1963; MacFaddin, 2000). Hasil fermentasi karbohidrat adalah asam atau asam dengan gas tergantung organisme yang terlibat dalam reaksi fermentasi. Hasil akhir fermentasi umumnya adalah asam laktat, asam format, asam asetat, asam butirat, butil alkohol, aseton, etil alkohol, karbon dioksida, dan hidrogen (Stanier *et al.*, 1963; Mahon *et al.*, 2011).

Fermentasi karbohidrat yang dilakukan pada penelitian ini adalah glukosa, laktosa dan manitol. Uji fermentasi karbohidrat menggunakan *bromothymol blue* sebagai indikator pH, dimana indikator positif terjadinya fermentasi adalah perubahan warna medium menjadi kuning karena perubahan pH menjadi asam akibat terbentuknya asam organik hasil fermentasi. Indikator negatif adalah tidak ada perubahan warna medium yaitu berwarna hijau (Harley & Prescott, 2002). Hasil dari fermentasi glukosa adalah seluruh isolat menunjukkan positif dapat memfermentasi glukosa. Hasil dari fermentasi laktosa adalah seluruh isolat menunjukkan negatif, isolat tidak dapat

memfermentasi laktosa kecuali isolat B7, B8, B9, B10 dan B12. Hasil dari fermentasi manitol adalah seluruh isolat menunjukkan negatif, tidak dapat memfermentasi manitol kecuali isolat B1, B2, B7, B9, B10, dan B12 (Lampiran 4).

Uji Triple Sugar Iron Agar (TSIA)

TSIA adalah medium diferensial digunakan dalam uji TSIA untuk menentukan fermentasi karbohidrat (laktosa, glukosa dan sukrosa) dan produksi hydrogen sulfide (H_2S). TSIA mengandung tiga karbohidrat: glukosa (0,1%), sukrosa (1%), dan laktosa (1%). Selain ketiga karbohidrat tersebut, medium juga mengandung ekstrak daging, ekstrak ragi dan pepton sebagai sumber nitrogen, vitamin dan mineral. Indikator pH dalam medium adalah *phenol red* (Hajna, 1945; MacFaddin, 2000). Prinsip dari uji ini adalah fermentasi karbohidrat akan menghasilkan asam yang menyebabkan penurunan pH dideteksi oleh pH indikator dalam medium dan mengubah warna medium menjadi kuning. Warna merah menunjukkan pH basa dari pepton. Sodium thiosulfat dalam medium dapat direduksi oleh bakteri tertentu menjadi hidrogen sulfida (H_2S). Hidrogen sulfida akan bereaksi dengan ion Fe^{3+} dalam medium menghasilkan sulfida besi (FeS) berupa endapan hitam (MacFaddin, 2000; Harley & Prescott, 2002).

Berdasarkan uji TSIA, isolat bakteri dapat dikelompokkan menjadi tiga kelompok, yaitu:

1. Pemfermentasi glukosa ditandai dengan warna kuning di bagian bawah medium sedangkan bagian miring masih berwarna merah (K/A) yaitu terdapat pada isolat B1, B2, B3, B4, B5, B6, B8 dan B13 (Lampiran 4). Warna tersebut akibat beberapa jam setelah bakteri diinokulasi, bakteri menggunakan glukosa dalam proses metabolismenya dengan cepat dan menghasilkan warna kuning pada bagian miring dan bawah medium (A/A). Setelah 18 jam, persediaan glukosa dalam medium menjadi terbatas, sedangkan bakteri yang diinokulasi tidak dapat mengkonsumsi sukrosa atau pun laktosa, maka bakteri mulai mengkonsumsi pepton

Konsumsi pepton menghasilkan produk ammonia (NH_3) dan mengubah pH medium menjadi basa sehingga warna medium menjadi merah (Hajna, 1945; MacFaddin, 2000).

2. Pemfermentasi glukosa, sukrosa, dan laktosa ditandai dengan warna kuning di seluruh bagian medium (A/A) yaitu terdapat pada isolat B7, B9, B10, B11 dan B12 (Lampiran 4). Warna kuning pada seluruh bagian medium karena bakteri dengan cepat mengkonsumsi glukosa. Setelah glukosa habis, maka sukrosa dan laktosa dalam medium mulai dikonsumsi dan menghasilkan asam. Sehingga warna bagian miring dan bawah medium tetap kuning setelah 24 jam (Hajna, 1945; MacFaddin, 2000).
3. Pemfermentasi glukosa dan produser H_2S ditandai dengan K/A dan terbentuknya endapan hitam pada medium, tidak terdapat pada semua isolat.

4.3 Identifikasi Bakteri Sampah perikanan

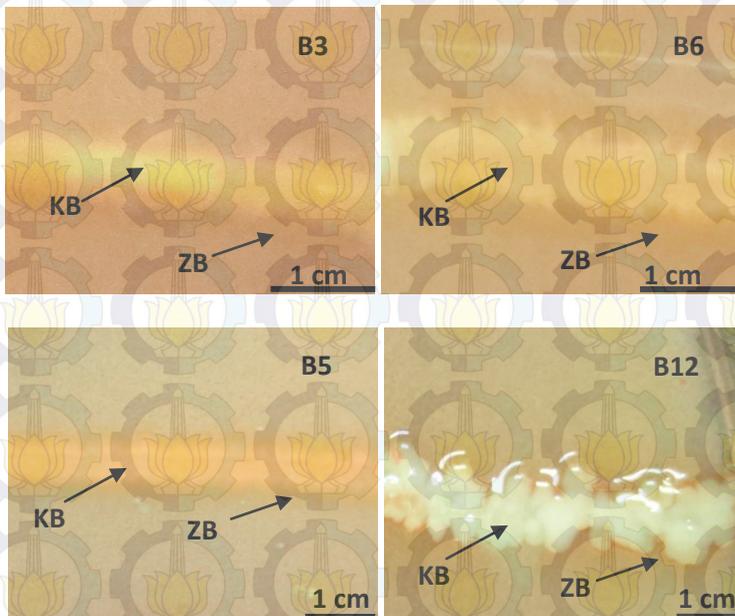
Bakteri selanjutnya diidentifikasi berdasarkan karakter morfologi dan biokimia menurut bagan alir dikotomi *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 13 isolat bakteri sampah perikanan teridentifikasi menurut bagan alir hingga tingkat genus, yaitu terdiri dari genus *Bacillus*, *Neisseria*, *Staphylococcus*, dan *Corynebacterium*, *Micrococcus* (Lampiran 5).

4.4 Skrining Aktivitas Degradasi Kitin

Skrining degradasi kitin untuk mengetahui kemampuan isolat bakteri hasil isolasi dalam mendegradasi kitin. Isolat ditumbuhkan dalam medium kitin agar sebagai sumber karbon, isolat yang diduga menghasilkan enzim kitinolitik akan menghasilkan zona bening disekitar koloni (Gambar 4.6) (Kaur, *et al.*, 2012). Zona bening terbentuk karena terjadinya pemutusan ikatan β -1, 4 homopolimer N-asetilglukosamin pada kitin oleh enzim kitinolitik menjadi monomer N-asetilglukosamin. Besarnya zona bening yang dihasilkan berbanding lurus dengan jumlah monomer N-asetilglukosamin dari proses hidrolisis kitin.

Semakin besar jumlah monomer N-asetilglukosamin yang dihasilkan maka semakin besar zona bening yang terbentuk di sekitar koloni (Susi, 2002; Muharni, 2009).

Dari 13 isolat yang berhasil diisolasi, setelah ditumbuhkan dalam medium kitin agar dan diinkubasi selama 5 hari, terdapat 4 isolat yang mampu menghasilkan zona bening yaitu isolat *Bacillus* B3, *Bacillus* B5, *Bacillus* B6 dan *Bacillus* B12. Zona bening yang dihasilkan diperjelas dengan pewarnaan menggunakan *Congo Red* 0.1% dan dicuci dengan larutan NaCl 1M (Devasea & Muraleedharan, 2012).

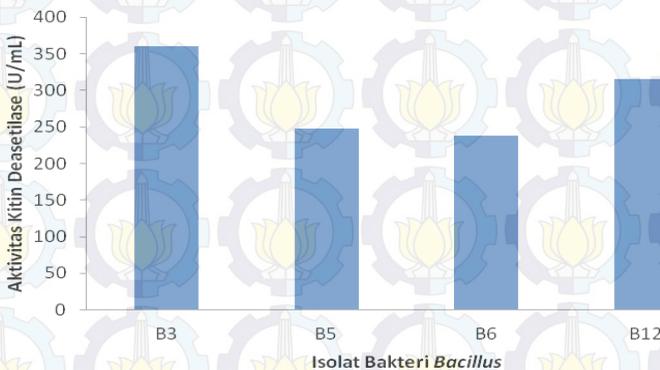


Keterangan: KB : koloni bakteri, ZB : zona bening.

Gambar 4.6 Zona bening hasil degradasi kitin.

4.5 Aktivitas Kitin Deasetilase

Setelah dilakukan skrining degradasi kitin, isolat yang menghasilkan zona bening selanjutnya dilakukan uji aktivitas kitin deasetilase sebagai uji konfirmasi bahwa isolat yang menghasilkan zona bening mampu menghasilkan kitin deasetilase. Enzim kasar kitin deasetilase didapatkan dengan cara fermentasi cair substrat kitin pada medium fermentasi. Umumnya, enzim pendegradasi kitin diproduksi secara ekstraselular. Enzim ini dikeluarkan oleh sel dan berada pada medium, kemudian dilakukan sentrifugasi. Mengingat enzim ini bersifat mudah terdegradasi maka proses sentrifugasi ekstrak kasar enzim tersebut dilakukan pada suhu rendah (4°C) (Natsir, 2002). Aktivitas kitin deasetilase diukur menggunakan kurva standar glukosamin dengan persamaan $y = 832.64x + 16.515$, dan nilai $R^2 = 0.9938$. Hasil aktivitas kitin deasetilase pada tiap isolat dapat diamati pada Gambar 4.7.



Gambar 4.7 Hasil Aktivitas Kitin Deasetilase

Pada Gambar 4.7 dapat dilihat bahwa hasil aktivitas kitin deasetilase tertinggi dihasilkan oleh isolate *Bacillus* B3 yaitu sebesar 360.37 U/mL. Sebaliknya, aktivitas kitin deasetilase terendah dihasilkan oleh isolat *Bacillus* B6 yaitu sebesar 237.47

U/mL. Sedangkan isolat *Bacillus* B5 memiliki aktivitas kitin deasetilase sebesar 247.80 U/mL dan isolat *Bacillus* B12 sebesar 315.41 U/mL. Kitin deasetilase adalah enzim yang mengkatalisis reaksi kimia hidrolisis grup Acetamido-N-asetil-D-glukosamin dalam kitin. Besarnya nilai aktivitas kitin deasetilase dari masing-masing isolat merupakan nilai 2,5-hexose anhydride yang terwarnai indol hasil reaksi substrat kitin yang ikatan C-N dan ikatan peptida dalam amida liniernya terhidrolisis oleh enzim kitin deasetilase (Natsir, 2002; Kashyap, *et.al.*, 2014). Isolat *Bacillus* B3 merupakan isolat yang menghasilkan nilai glukosamin tertinggi bila dibandingkan isolat *Bacillus* B5, *Bacillus* B6 dan *Bacillus* B12 dilihat dari aktivitas kitin deasetilasena.

Bacillus adalah bakteri berbentuk batang, Gram positif, katalase positif, menghasilkan endospora. Genus *Bacillus* dapat tumbuh dengan baik di berbagai macam sumber karbon. Salah satu sumber karbon yang dapat digunakan yaitu kitin (Madigan *et al.*, 2012). Hal tersebut menunjukkan bahwa bakteri *Bacillus* berpotensi memiliki kemampuan menghasilkan kitin deasetilase.

Kemampuan *Bacillus* dalam menghasilkan kitin deasetilase juga telah dilaporkan dalam beberapa penelitian yaitu *Bacillus* sp. asidofilik yang berhasil diisolasi dari kawah Kamojang, Jawa Barat, *B. stearothermophilus* dari Langoan, Sulawesi Utara dan *B. thermoleovorans* LW-4-11 dari Sulawesi Selatan (Toharisman & Suhartono, 2008). *Bacillus* sp. PT2-3 dari Pancuran Tujuh Baturaden, Jawa Tengah juga telah berhasil diisolasi dan telah teruji menghasilkan kitin deasetilase (Setyahadi *et al.*, 2006).

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

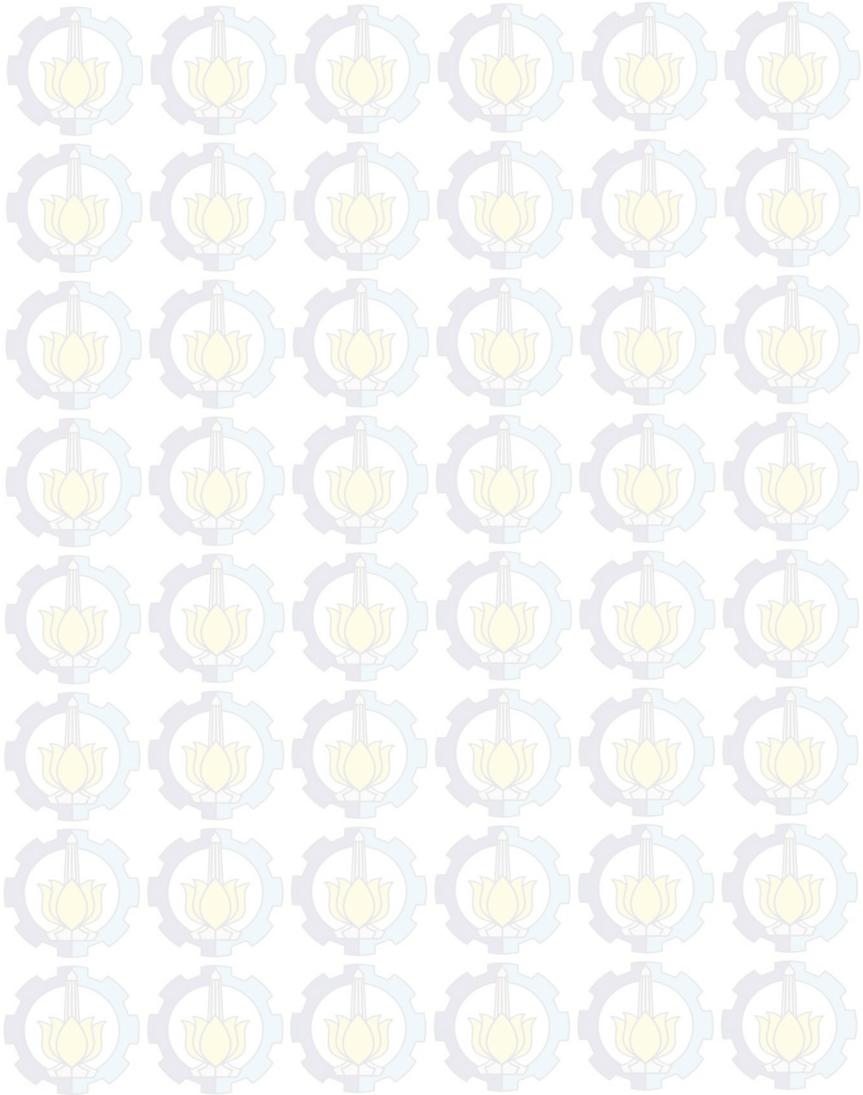
5.1. Kesimpulan

Bakteri sampah perikanan yang berhasil diisolasi dan berpotensi menghasilkan kitin deasetilase adalah *Bacillus* B3, *Bacillus* B5, *Bacillus* B6 dan *Bacillus* B12. Aktivitas kitin deasetilase tertinggi dihasilkan oleh *Bacillus* B3 sebesar 360,37 U/mL.

5.2. Saran

Aktivitas kitin deasetilase tertinggi oleh *Bacillus* B3 (360,37 U/mL) dalam penelitian ini merupakan karakter awal penting agar dalam penelitian selanjutnya dilakukan produksi enzim yang lebih besar dalam bioreaktor terkontrol.

“Halaman Ini Sengaja Dikosongkan”



DAFTAR PUSTAKA

Alexander, S. K., and D. Strete. 2001. **Microbiology: A Photographic Atlas for The Laboratory**. San Francisco: Benjamin Cummings.

Anonim. 2015. Badan Lingkungan Hidup Kota Surabaya. <http://lh.surabaya.go.id/> > [9 Januari 2015].

Arbia, W., L. Arbia, L. Adour and A. Amrane. 2013. Chitin Extraction from Crustacean Shells Using Biological Methods-A Review. Chitin Recovery Using Biological Methods, Food Technology. **Biotechnology** 51(1): 12–25.

Cappucino, J.G. and N. Sherman. 2001. **Microbiology: A Laboratory Manual. Second Edition**. State University of New York: The Benjamin Cummings Publishing Company. Rockland Community College.

Case, C 1999. **Microbial Fermentation : Changed the Course of Human History**. National Health Museum.

De Jin, R., J.W Suh, R.D. Park, Y.W Kim, H.B Krishnan, and K.Y Kim. 2005. Effect of Chitin Compost and Broth on Biological Control of *Meloidogyne incognita* on tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). **Nematology** 7 (1) :125-132.

Delisle, G., and L. Tomalty. 2002. **Mycobacterium Tuberculosis**. Washington, DC: MicrobeLibrary, American Society for Microbiology.

Domard, A. 2011. A Perspective on 30 Years Research on Chitin and Chitosan. **Carbohydrates Polymers** 84 (2) : 696-703.

Dutta, P.K. J. Dutta, and V.S. Tripathi. 2004. Chitin and chitosan: Chemistry, Properties and Applications. **Journal of Scientific and Industrial Research** 63(1): 20-31.

El Hadrami, A., L.R Adam, I. El Hadrami, and F. Daayf. 2010. Chitosan In Plant Protection. **Marine Drugs** 8 (4): 968-987.

Fernandez, M.P, U. Juelita, and C.B. Correa. 1982. Activation of Chitin Synthetase in Permeabilized Cells of a *Saccharomyces cerevisiae* Mutant Lacking Proteinase B. **Journal Bacteriology** 152 (3) : 1255-1264.

Gaby, W. L., and L. Free. 1958. Differential Diagnosis of *Pseudomonas*-like Microorganisms in the Clinical Laboratory. **Journal Bacteriology**. 76:442–444.

Gerhardt, P. Murray, R. G. E. Costilow, R. N. E.W. Nester, A. Wood W, N.R. Krieg, and G. B. Phillips. 1981. **Manual and Methods for General Bacteriology**. Washington DC : ASM Press.

Gordon, J., and J. W. McLeod. 1928. The Practical Application Of The Direct Oxidase Reaction In Bacteriology. **J. Pathol. Bacteriol.** 31:185–190.

Gortari, M.C., and R.A Hours. 2008. Fungal Chitinases and Their Biological Role In The Antagonism Onto Nematode Eggs. A Review. **Mycological Progress** 7 (4) 221-238.

Gryndler, M., J. Jansa, H. Hrselová, I. Chvátalová, and M. Vosátka. 2003. Chitin Stimulates Development and Sporulation of Arbuscular Mycorrhizal Fungi. **Applied Soil Ecology** 22 (3) 283-287.

Hajna, A. A. 1945. Triple-Sugar Iron Agar Medium For The Identification Of The Intestinal Group Of Bacteria. **J. Bacteriol.** 49:516-517.

Harley, J.P., and L. M. Prescott. 2002. **Laboratory Exercises in Microbiology, Fifth Edition.** United of States America: The McGraw Hill Companies.

Hayashi, K., and I. Mikio. 2002. Antidiabetic Action of Low Molecular Weight Chitosan in Genetically Obese Diabetic KK-Ay Mice. **Biol. Pharm** 25(2) : 188-192.

Hugh, R., and E. Leifson. 1953. The Taxonomic Significance of Fermentative Versus Oxidative Metabolism of Carbohydrates by Various Gram Negative Bacteria. **J. Bacteriol.** 66:24–26.

Irianto, K. 2007. **Mikrobiologi Menguak Dunia, Jilid 1.** Bandung: Yrama Widya.

Kashyap, S. R., N. Garg. 2014. Isolation, Production, Quantitative Assay and Optimization of Chitin deacetylase from Yeast. **Scholars Academic Journal of Biosciences** 5 (1): 43-47

Kato, Y., H. Onishi, and Y. Machida. 2003. Application of Chitin and Chitosan Derivatives in The Pharmaceutical Field. **Current Pharmaceutical Biotechnology** 4(5) 303-309.

Kaur, K., V. Dattajirao, V. Shrivastava, and U. Bhardwaj. 2012. Isolation and Characterization of Chitosan-Producing Bacteria from Beaches of Chennai, India. **Enzyme Research** 20 (12).

Khanafari A, R. Marandi, S. Sanatei. 2008. Recovery of Chitin and Chitosan from Shrimp Waste by Chemical and Microbial Method. Iran. **Journal Environ. Health Sci. Eng.** 5(1): 19-24.

Kim, S.K., and E. Mendis. 2006. Bioactive Compounds from Marine Processing by Products. **Food Research International** 39(4) : 383-393.

Kurita, K. 2006. Chitin and chitosan: Functional Biopolymers from Marine Crustaceans. **Marine Biotechnology** 8 (3) : 203-226.

Kusumaningsih, T., V. Suryanti, W.Permana. 2004. karakterisasi kitosan hasil deasetilasi kitin cangkang kerang hijau (*Mytilus viridis*, L). **Jurnal Alchemy** 3 (1) : 63-73.

Lay, W.B. 1994. **Analisa Mikroba di Laboratorium, Edisi 1**. Jakarta: PT. Raja Grafindo Persada.

Leboffe, M. J. and B.E. Pierce. 2002. **Microbiology A Laboratory Theory and Application**. Morton Publishing Company.

Lechtman, M. D., J. W., Bartholomew, A. Phillips, and M. Russo. 1965. Rapid Methods of Staining Bacterial Spores at Room Temperature. **Journal Bacteriology** 89: 848–854.

Lim, D. 1998. **Microbiology 2nd Edition**. United of States America: McGraw Hill Companies.

Limam, Z., S. Selmi, S. Sadok, and A. El Abed. 2011. Extraction and Characterization of Chitin and Chitosan From Crustacean By-Products: Biological and Physicochemical Properties. **African Journal of Biotechnology** 10 (4) 640-647.

Lui, J.-K., and P. Jurtshuk. 1986. N,N,N'-N'-tetramethyl-p-phenylenediamine-dependent Cytochrome Oxidase Analyses of *Bacillus* Species. **Int. Journal. Syst. Bacteriol.** 36:38–46.

MacFaddin, J. 1972. **Biochemical Tests for The Identification of Medical Bacteria**. Williams and Wilkins Company, Baltimore, MD.

MacFaddin JF. 2000. **Biochemical Tests For Identification Of Medical Bacteria, 3rd Ed.** Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins.

Madigan M.T, J.M Martinko, T. D Brock. 2012. **Brock Biology of Microorganisms**. New Jersey: Pearson Prentice Hall.

Mahon, C.R., D.C. Lehman, and G. Manuselis. 2011. **Textbook Of Diagnostic Microbiology, 4th Ed.** Philadelphia, PA: W. B. Saunders Co.

Mayberry, W. 2002. **Acid-fast Staining Tutorial**. Washington, DC: MicrobeLibrary, American Society for Microbiology.

Muharni. 2009. Isolasi dan Identifikasi Bakteri penghasil Kitinase dari sumber Air Panas Danau Ranau Sumatera Selatan. **Jurnal penelitian Sains** 09 : 12-15

Muzzarelli, R.A.A. 1996. **Chitosan-based Dietary Foods. Carbohydr. Polym.** 29: 309- 316.

Muzzarelli, R.A.A., J. Boudrant, D. Meyer, N. Manno, M. Demarchis, and M.G Paoletti. 2012. Current Views on Fungal Chitin/Chitosan, Human Chitinases, Food Preservation, Glucans, Pectins and Inulin: A Tribute to Henri Braconnot, Precursor of The Carbohydrate Polymers Science, On The Chitin Bicentennial. **Carbohydrate Polymers** 87 (2) 995-1012.

Natsir, H. 2002. Eksplorasi Mikroba Asidofilik Penghasil Enzim Pendeградasi Kitin. **Marina Chimica Actahal** 3(1) : 3-6

Park, B.K. and M.M. Kim. 2010. Applications of Chitin and Its Derivatives in Biological Medicine. **International Journal Of Molecular Sciences** 11(12) : 5152-5164.

Patil, R.S., V. Ghormade, and M.V. Deshpande. 2000. **Chitinolytic Enzymes: An Exploration Enzyme and Microbial Technology** 26: 473-483.

Pillai, C.K.S., W. Paul, and C.P. Sharma. 2009. Chitin and Chitosan Polymers: Chemistry, Solubility and Fiber Formation. **Progress in Polymer Science** 34 (7) 641-678.

Portes, E., C. Gardrat, A. Castellan, and V. Coma. 2009. Environmentally Friendly Films Based on Chitosan and Tetrahydrocurcuminoid Derivatives Exhibiting Antibacterial and Antioxidative Properties. **Carbohydrate Polymers** 76 (4) 578-584.

Pujiastuti, P. 2001. Kajian Transformasi khitin menjadi khitosan secara kimiawi dan enzimatik. **Prosiding seminar Nasional**. Jurusan Kimia. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Negeri Surakarta.

Raja, R., C. Chellaram, and A.A John. 2012. Antibacterial Properties of Chitin From Shell Wastes. **Indian Journal of Innovations and Developments** 1(8) :7-10.

Ramírez, M.A., A.T Rodríguez, L. Alfonso, and C. Peniche. 2010. Chitin and Its Derivatives as Biopolymers with Potential Agricultural Applications. **Application Biotechnology** 27 (4) 270-276.

Rangel-Mendez, J.R., V.A Escobar-Barrios, and J.L Davila-Rodriguez. 2010. Chitin Based Biocomposites for Removal

Contaminants from Water: A Case Study of Fluoride Adsorption. In: Elnashar, M. Ed. **Biopolymers** : 163-180.

Ravi Kumar, M.N.V. 2000. A Review of Chitin and Chitosan Applications. **Reactive & Functional Polymers** 46(1) : 1-27.

Sandford, P.A. 1989. Chitosan: Commercial Uses and Potential Applications. **Chitin and Chitosan. Elsevier Applied Science.** London.

Sastrawijaya, A. T. 2000. **Pencemaran Lingkungan.** Jakarta: Rineka Cipta.

Savant, V.D., and J.A. Torres. 2000. Chitosan-Based Coagulating Agents for Treatment of Cheddar Chees Whey. **Biotechnology** 16: 1091-1097

Senel, S., and S.J. McClure. 2004. Potential Applications of Chitosan in Veterinary Medicine. **Advances Drug Delivery Reviews** 56 (10) 1467-1480.

Setyahadi, S., T.K. Bunasor, dan D. Hendarsyah. 2006. Karakterisasi Kitin Deasetilase Termotabil Isolat Bakteri Asal Pancuran Tujuh Baturaden, Jawa Tengah. **Jurnal Teknol. dan Industri Pangan**, Vol.XVII No. 1 Th. 2006.

Shahidi, F.J., K.V. Arachchi, and J. You-Jin. 1999. **Food Applications of Chitin and Chitosan. Trends Food Sci. & Technol.** 10: 37-51.

Shoeb, H. 2005. **Acid-fast (Ziehl-Neelsen) Stain.** Washington, DC. MicrobeLibrary, American Society for Microbiology.

Slamet, J. S. 2002. **Kesehatan Lingkungan.** Yogyakarta: Gadjah Mada Universty Press.

Somashekar, D., and R. Joseph. 1996. Chitinases -Properties and Applications: A Review. **Biores. Technol** 55: 35 – 45.

Sugita, P., S. Ahmad, W. Tuti, W. Dwi. 2009. **Kitosan Sumber Biomaterial Masa Depan**. Bogor: IPB Press.

Susi. 2002. Isolasi Kitinase dari *Scleroderma columnae* dan *Trichoderma harzianum*. **Jurnal Ilmu Dasar**3 (1) : 30 - 35

Stanier RY, Doudoroff M, Adelberg EA. 1963. **The Microbial World, 2nd Ed**. Prentice-Hall, Englewood Cliffs, NJ.

Suwanto, A. 1994. Pulsed-field Gel Electrophoresis: A Revolution in Microbial Genetics. **AsPac Journal Molecular Biology. Biotechnol** : 78-85.

Synowiecki, J. and N.A. Al-Khateeb. 2003. Production, Properties, and Some New Applications Of Chitin and Its Derivatives. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition** 43 (2): 145-171.

Tharanathan, R.N., and F.S. Kittur. 2003. Chitin - The Undisputed Biomolecule of Great Potential. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition** 43 (1) 61-87.

Toharisman, A., and M.T. Suhartono. 2008. **Partial Purification and Characterization of Chitin Deacetylase Produced by *Bacillus thermoleovorans* LW-4-11**. Pusat Penelitian Bioteknologi IPB. Bogor

Tsigos I., and V. Bouriotis. 1995. Purification and Characterization of Chitin Deacetylase from *Collectotrichum Lindemuthianum*. **The Journal of Biological Chemistry** 270: 26286-26291.

Tsigos, I., A. Martinou, D. Kafetzopoulos, and V. Bouriotis. 2000. Chitin Deacetylases: New, Versatile Tools in Biotechnology. **Trends Biotechnol.** 18 (7): 305-312.

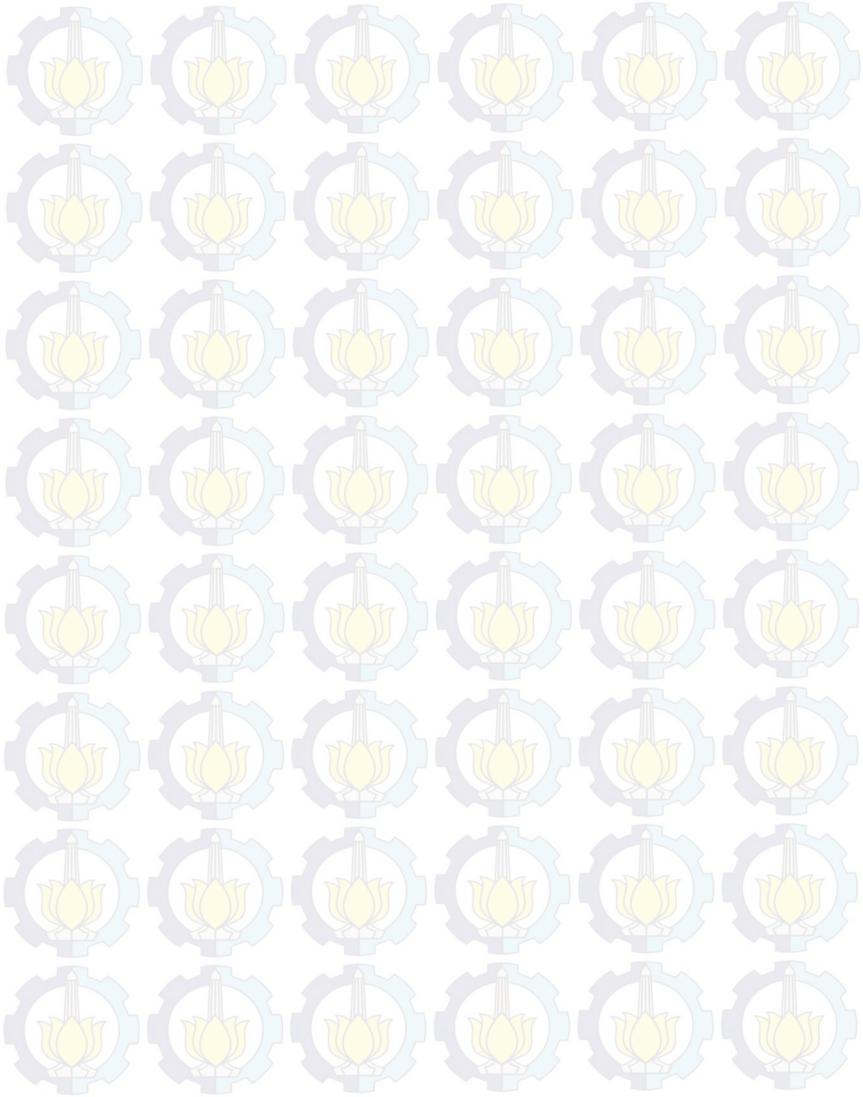
Vincy, M., V. Shoba, S. Viveka, T. M. Vijaya, and G. J. B. Rani. Isolation and Characterization of Chitinase from Bacteria of Shrimp Pond. **European Journal of Experimental Biology** 4(3):78-82.

Waites, M.J., N.L. Morgan, J.S. Rockey, and G. Higton. 2001. **Industrial Microbiology: An Introduction.** United of States America: Blackwell Scientific Publications. California.

Waluyo L. 2008. **Teknik dan Metode Dasar dalam Mikrobiologi.** Malang: Universitas Muhammadiyah Malang Press.

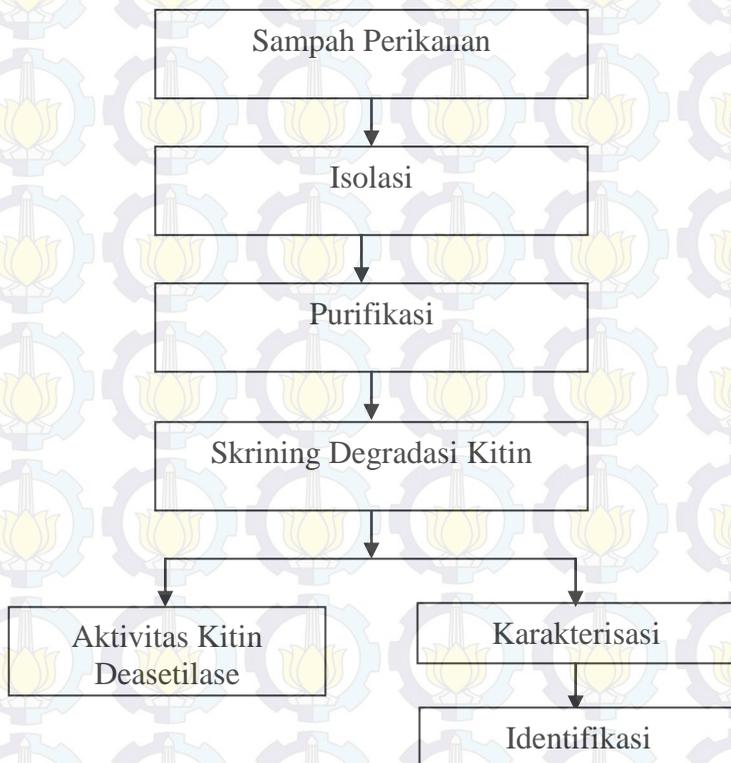
York, M. K., M.M. Taylor, J. Hardy, and M. Henry. 2004. **Biochemical Tests for The Identification of Aerobic Bacteria, Clinical Microbiology Procedures Handbook, 2nd Ed.** Washington DC: ASM Press.

“Halaman ini sengaja dikosongkan”



LAMPIRAN

Lampiran 1. Garis Besar Metode kerja



Lampiran 2. Pembuatan Medium Kultur dan Uji

A. Medium minimal kitin agar Srinivasan (2000) yang telah dimodifikasi.

Yeast ekstrak	: 10 gram
(NH ₄) ₂ SO ₄	: 4 gram
KH ₂ PO ₄	: 0,15 gram
Kitin	: 0,1 gram
Agar	: 20 gram
Akuades	: 1 liter

Media padat minimal Srinivasan (2000) digunakan sebagai media kultur bakteri. Media dibuat dengan melarutkan 10 gram yeast ekstrak, 4 gram (NH₄)₂SO₄, 0,15 gram KH₂PO₄, 100 mg kitin, 20 gram agar dalam 1 liter akuades di gelas Erlenmeyer setelah larut ditutup kapas lemak, selanjutnya disterilisasi dengan autoklaf selama 15 menit pada suhu 121°C dan tekanan 1,5 atm.

B. Medium TSIA (*Triple Sugar Iron Agar*)

TSIA	: 65 gram
Akuades	: 1 liter

Media TSIA (*Triple Sugar Iron Agar*) digunakan sebagai media uji motilitas bakteri. Media dibuat dengan melarutkan 65 gram medium TSIA dalam 1 liter akuades di gelas Erlenmeyer setelah larut kemudian dipindahkan ke dalam tabung reaksi. Pada masing-masing tabung reaksi diisi 5 ml medium TSIA dan ditutup kapas lemak, selanjutnya disterilisasi dengan autoklaf selama 15 menit pada suhu 121°C dan tekanan 1,5 atm.

C. Medium *Thioglycollate*

<i>Thioglycollate</i>	: 3 gram
Agar	: 3 gram
Akuades	: 1 liter

Media *thioglycollate* digunakan sebagai media uji kebutuhan oksigen bakteri. Media dibuat dengan melarutkan 30 gram

thioglycollate dan 3 gram agar dalam 1 liter akuades di gelas Erlenmeyer dan diaduk di atas pemanas sampai agar terlarut. Penambahan agar 3 gram untuk membuat media menjadi semi padat, selanjutnya gelas Erlenmeyer ditutup kapas lemak dan aluminium foil. Selanjutnya disterilisasi dengan autoklaf selama 15 menit pada suhu 121°C dan tekanan 1,5 atm

D. Medium selektif skrining aktivitas degradasi enzim kitinolitik

Kitin	:10 gram
NaNO ₃	:2 gram
K ₂ HPO ₄	:1 gram
KH ₂ PO ₄	:1 gram
MgSO ₄	:0,5 gram
P dan N	:0,5 gram
Agar	:20 gram
Akuades	: 1 liter

Media dibuat dengan melarutkan 10 gram kitin, 2 gram NaNO₃, 1 gram K₂HPO₄, 1 gram KH₂PO₄, 0,5 gram MgSO₄, 0,5 gram P dan N, 20 gram agar dalam 1 liter akuades di gelas Erlenmeyer . Setelah larut gelas Erlenmeyer ditutup kapas lemak, selanjutnya disterilisasi dengan autoklaf selama 15 menit pada suhu 121°C dan tekanan 1,5 atm.

E. Medium Fermentasi Glukosa

Pepton water	: 100 ml
Glukosa	: 1 gram
BTB	: 0,1 gram
Akuades	: 1 liter

Media dibuat dengan melarutkan 100 ml pepton water, 1 gram glukosa, 0,1 gram BTB dalam 1 liter akuades di gelas Erlenmeyer . Setelah larut, 3 ml media fermentasi dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan ditutup kapas lemak, selanjutnya disterilisasi dengan autoklaf selama 15 menit pada suhu 121°C dan tekanan 1,5 atm.

F. Medium Fermentasi Laktosa

Pepton water	: 100 ml
Laktosa	: 1 gram
BTB	: 0,1 gram
Akuades	: 1 liter

Media dibuat dengan melarutkan 100 ml pepton water, 1 gram laktosa, 0,1 gram BTB dalam 1 liter akuades di gelas Erlenmeyer . Setelah larut, 3 ml media fermentasi dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan ditutup kapas lemak, selanjutnya disterilisasi dengan autoklaf selama 15 menit pada suhu 121°C dan tekanan 1,5 atm.

G. Medium Fermentasi Manitol

Pepton water	: 100 ml
Manitol	: 1 gram
BTB	: 0,1 gram
Akuades	: 1 liter

Media dibuat dengan melarutkan 100 ml pepton water, 1 gram manitol, 0,1 gram BTB dalam 1 liter akuades di gelas Erlenmeyer . Setelah larut, 3 ml media fermentasi dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan ditutup kapas lemak, selanjutnya disterilisasi dengan autoklaf selama 15 menit pada suhu 121°C dan tekanan 1,5 atm.

Lampiran 3. Morfologi Koloni Bakteri Sampah Perikanan

Kode Isolat	Bentuk	Tepi	Elevasi	Warna
B1	Tidak beraturan	Berombak	Umbonate	Putih susu
B2	Bulat	Berombak	Datar	Putih transparan
B3	Bulat	Rata	Cembung	Putih keruh
B4	Bulat	Berombak	Menonjol	Putih
B5	Bulat	berombak	Menonjol	Putih
B6	Bulat	berombak	Menonjol	Putih kekuningan
B7	Bulat	Rata	Cembung	Kuning
B8	Bulat	Rata	Cembung	Kuning
B9	Bulat	Rata	Menonjol	Putih kekuningan
B10	Bulat	Berombak	Umbonate	Putih susu
B11	Bulat	Berombak	Umbonate	Putih susu
B12	Tidak beraturan	Berombak	Menonjol	Putih susu
B13	Bulat	Rata	Cembung	Putih kekuningan

**Lampiran 4. Hasil Karakterisasi Mikroskopis dan Biokimia
Bakteri Sampah Perikanan.**

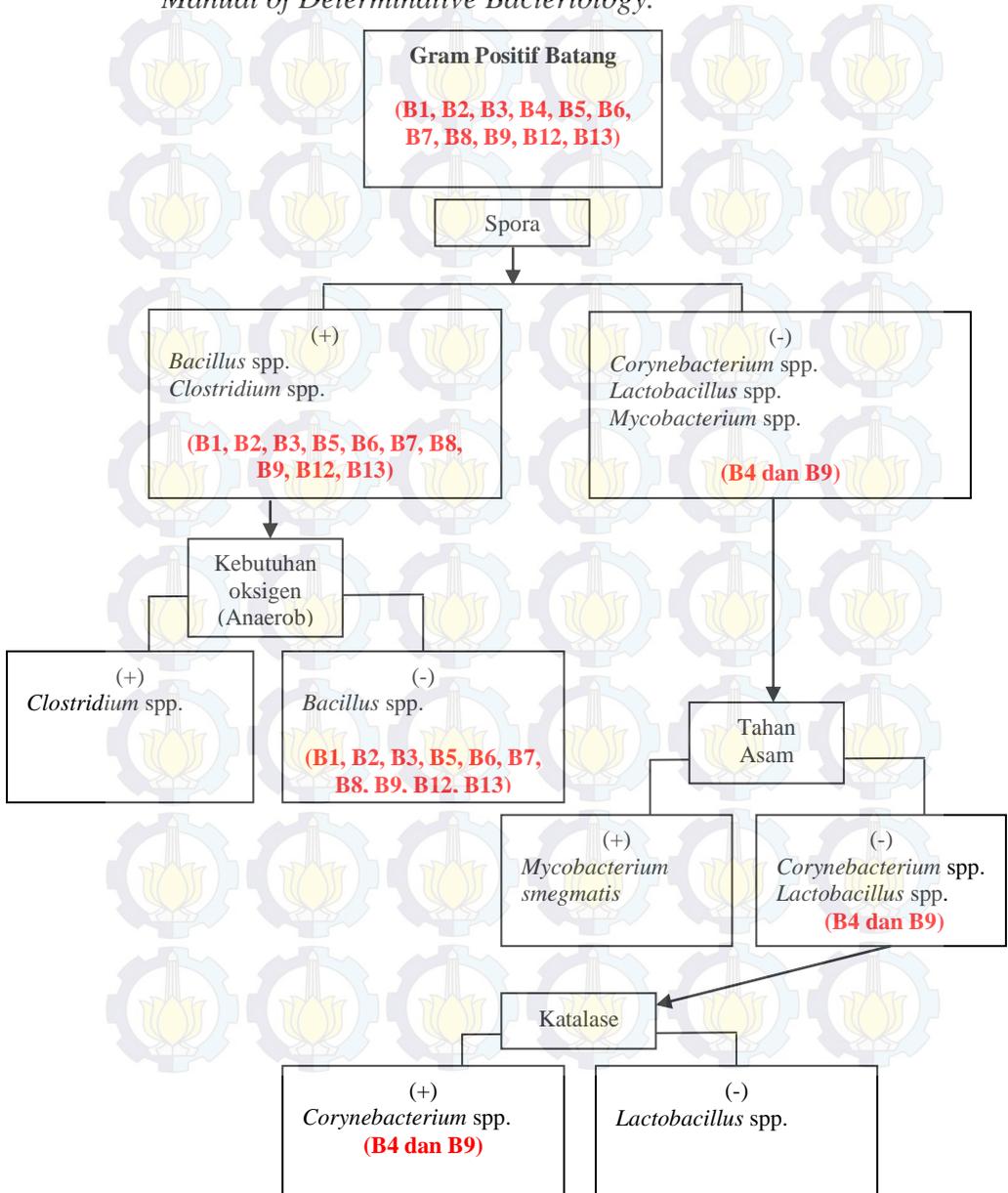
Kode Isolat	Bentuk Sel	Gram	Endospora	Tahan Asam	Oksidase	Katalase	F. Glukosa	F. Laktosa	F. Manitol	Motilitas	H ₂ S	Kebutuhan Oksigen	Genus Isolat
B1	Batang	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-	Aerob	<i>Bacillus</i>
B2	Batang	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-	Aerob	<i>Bacillus</i>
B3	Batang	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	Aerob	<i>Bacillus</i>
B4	Batang	+	-	-	-	+	+	-	-	+	-	Aerob	<i>Corynebacterium</i>
B5	Batang	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	Aerob	<i>Bacillus</i>
B6	Batang	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	Aerob	<i>Bacillus</i>
B7	Bulat	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	Aerob	<i>Staphylococcus</i>
B8	Bulat	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	Aerob	<i>Staphylococcus</i>
B9	Batang	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	Aerob	<i>Corynebacterium</i>
B10	Bulat	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	Aerob	<i>Neisseria</i>
B11	Bulat	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	Aerob	<i>Neisseria</i>
B12	Batang	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	Aerob	<i>Bacillus</i>
B13	Bulat	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	Aerob	<i>Micrococcus</i>

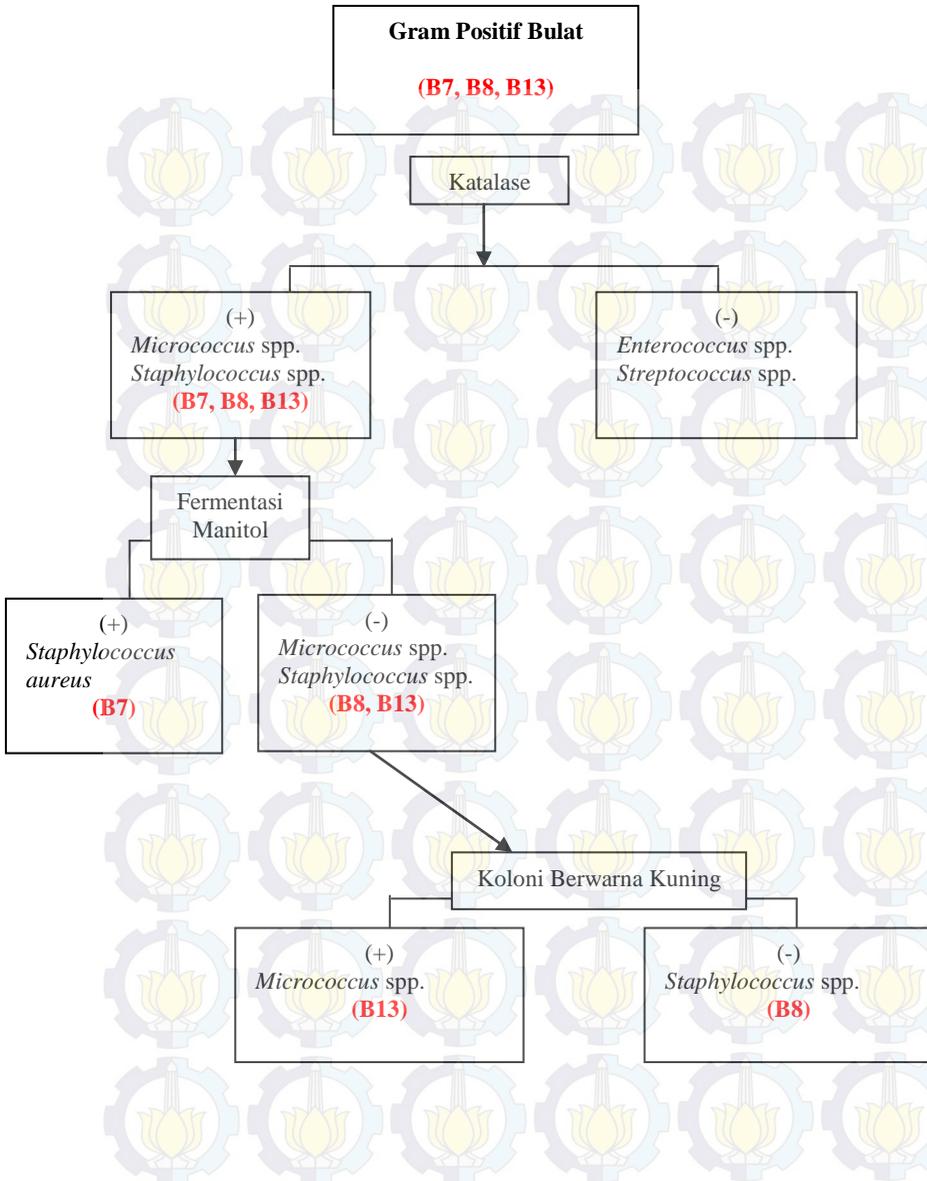
Keterangan : (+) = Positif

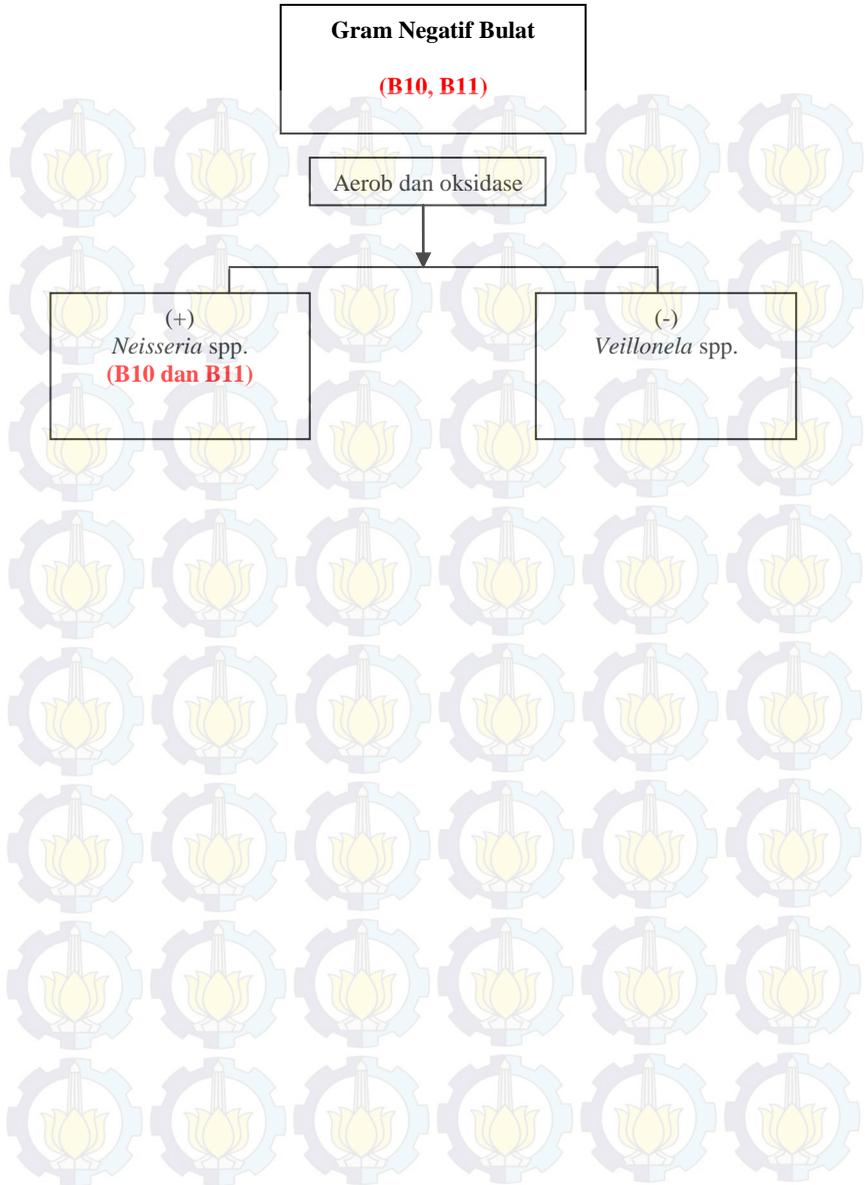
(-) = Negatif

() = Uji tidak dilakukan

Lampiran 5. Bagan alir Identifikasi Bakteri *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*.

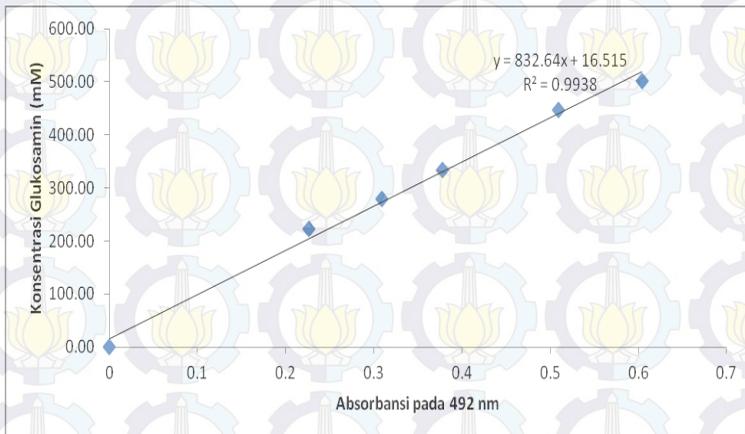






Lampiran 6. Kurva Standar Glukosamin.

Konsentrasi Glukosamin (mM/ml)	Absorbansi ($\lambda = 492 \text{ nm}$)
0,00	0
223,25	0,226
279,06	0,309
334,88	0,378
446,50	0,509
502,32	0,604



BIODATA PENULIS



Penulis dilahirkan di Ngawi, 8 Agustus 1992. Memulai pendidikan dasar di SDN Legundi 2 Karangjati, Ngawi. Setelah lulus, ia memulai jenjang menengah pertama di SMPN 2 Ngawi. Di SMP ini ketertarikan mengenai sains terutama Biologi mulai terlihat. Setelah lulus SMP ia memulai jenjang menengah keatas di SMA Darul 'Ulum Jombang. Disini pengetahuannya mengenai dunia biologi semakin terlihat, ketertarikannya pada dunia biologi semakin terasah. Dan mulai mengikuti olimpiade Biologi. Setelah lulus SMA, Perempuan yang gemar menari tradisional ini akhirnya melanjutkan di Jurusan Biologi, FMIPA, Institut Teknologi Sepuluh Nopember Surabaya. Ketertarikannya pada dunia biologi mendorongnya untuk berpartisipasi menjadi panitia di *International Biological Olimpiade Conference* . Selain itu, untuk mengasah ilmu bioekologi sampling dan agar dapat mengaplikasikannya secara langsung, penulis juga menjadi salah satu anggota Surveyor Laboratorium Ekologi, Jurusan Biologi ITS. Selain tertarik dengan dunia biologi, penulis juga mengikuti beberapa organisasi di Institut yaitu sebagai Kepala Departemen Kesejahteraan Mahasiswa Himpunan Biologi ITS periode 2013-2014. Bendahara Umum Unit Kegiatan Tari dan Karawitan ITS periode 2013-2014. Dan anggota organisasi Pecinta Manuk, Biologi, ITS.

