

Exploration and Characterization of Chitinolytic Bacteria from Leachate, Shrimp Pond Water and Rhizosphere Roots

Aisyah^{1*}, Zia Nurfauziah¹, Adila Nursidik¹, Anasi Faisal Sukiyas¹, Diva Tari Asina Munthe¹, Gilang Vaza Benatar¹

¹Program Studi Agroteknologi, Fakultas Pertanian, Universitas Siliwangi, Kota Tasikmalaya, Indonesia;

Article History

Received : September 22th, 2023

Revised : October 18th, 2023

Accepted : October 24th, 2023

*Corresponding Author:

Aisyah,

Program Studi Agroteknologi,
Fakultas Pertanian, Universitas
Siliwangi, Kota Tasikmalaya,
Indonesia;

Email:

nengaisyah233@gmail.com

Abstract: Chitinase enzymes are enzymes that can hydrolyze chitin polymers into chitin oligosaccharides or N-acetylglucosamine synergistically and sequentially. This enzyme is naturally produced by bacteria, fungi, plants, and animals. The magnitude of the potential possessed by chitinolytic bacteria with their living environment spread in various sources, does not rule out the possibility of isolating chitinolytic bacteria from leachate water, shrimp pond water, and rhizosphere root soil. This study aims to isolate and identify the morphology of chitinolytic bacterial colonies obtained from the exploration results. The research was conducted with the exploration method and then analyzed descriptively. The results of the study obtained 22 isolates of chitinolytic bacteria from the exploration results with 11 isolates with the code TAC is an isolate from the roots of chili soil, 8 isolates with the code ALT comes from leachate water, and 3 isolates from shrimp ponds coded TUC. The results of morphological observations of bacterial colonies obtained the cell shape of the bacterial colonies were 17 cocci and only 5 were bacilli. Isolates are mostly white with milky white and bone white color and 7 isolates with red and yellow color variations. The results of gram staining showed 10 bacterial isolates were gram negative and 12 isolates were positive with bacterial cell shape mostly cocci.

Keywords: Chitinolytic bacteria, isolation, morphology bacteria.

Pendahuluan

Enzim kitinase merupakan enzim yang mampu menghidrolisis polimer kitin menjadi kitin oligosakarida atau N-asetilglukosamin secara sinergis dan berurutan. Enzim ini diproduksi secara alami oleh bakteri, cendawan, tanaman, dan hewan (Wibowo *et al.*, 2017). Bakteri kitinolitik menjadi salah satu kelompok mikroorganisme yang dapat menghasilkan enzim kitinase. Penelitian Ruma *et al.*, (2020), bakteri kitinolitik mampu mengdegradasi kitin menjadi turunannya melalui mekanisme enzimatik dengan memanfaatkan kitin sebagai sumber karbon. Kitin merupakan polisakarida struktural mudah terdegradasi dan tidak beracun dengan kitinase sebagai pendegradasi kitin. Kitinase berpotensi dimanfaatkan sebagai agen pengendali hayati terhadap jamur patogen maupun serangan hama.

This article is licensed under a [Creative Commons Attribution 4.0 International License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

Bakteri kitinolitik yang telah diketahui bisa menghasilkan enzim kitinase diantaranya yaitu *Bacillus cereus* (Karina *et al.*, 2020), *Stenotrophomonas rhizophila* (Reyes-Perez *et al.* 2019), *Streptomyces griseus*, *Paenibacillus ehimensi*, *Paenibacillus elgii*, *Pseudomonas fluorescens* (Anees *et al.*, 2019), dan *Pseudomonas aeruginosa* (Karina *et al.*, 2020). Penelitian mengenai isolasi bakteri kitinolitik telah banyak di upayakan di Indonesia diantaranya terdapat penelitian Ruma, Refli and Suwardi (2020) mengisolasi bakteri kitinolitik dari limbah udang vaname, (Wibowo *et al.*, 2017) berhasil mengisolasi bakteri penghasil kitinase asal tanah TNBD dan perkebunan kelapa sawit, dan (Purkan *et al.*, 2014) melakukan eksplorasi bakteri kitinolitik dari sampah organik. Umumnya mikroba penghasil kitinase dapat diisolasi dari lingkungan ekstrim yang mengandung biomassa kitin, seperti air

© 2023 The Author(s). This article is open access.

tercemar, lingkungan tanah, sampah, cangkang dan kulit binatang serta tumbuhan (Purkan *et al.*, 2014). Isolasi bakteri kitinolitik hasil eksplorasi dapat dilakukan dengan memindahkan bakteri kitinolitik tersebut ke dalam media buatan.

Besarnya potensi yang dimiliki oleh bakteri kitinolitik dengan lingkungan tempat hidupnya yang tersebar diberbagai sumber, tidak menutup kemungkinan untuk mengisolasi bakteri kitinolitik dari air lindi, air tambak udang, dan tanah perakaran rhizosper. Aktivitas bakteri kitinolitik ditandai dengan terbentuknya zona bening disekitar koloni kemudian untuk mengetahui karakteristik dari bakteri kitinolitik dilakukan identifikasi morfologi dari koloni. Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi dan melakukan identifikasi morfologi koloni bakteri kitinolitik yang diperoleh dari hasil eksplorasi.

Bahan dan Metode

Waktu dan tempat pelaksanaan

Penelitian ini dilaksanakan di laboratorium Mikrobiologi, Fakultas Pertanian, Tasikmalaya. Eksplorasi dilakukan di tiga lokasi lahan Fakultas Pertanian (Universitas Siliwangi), tambak udang Cikalong (Kabupaten Tasikmalaya), dan air lindi TPA Ciangir (Kota Tasikmalaya).

Alat dan bahan

Alat-alat yang digunakan yaitu cawan petri, gelas ukur, gelas beaker, tabung reaksi, rak tabung reaksi, tabung *centrifuge*, tabung erlenmeyer, gelas objek, cover glass, pipet tetes, jamur ose, timbangan analitik, pembakar bunsen, botol semprot, batang magnet stirrer, mikroskop, autoklaf, *Laminar Air Flow* (LAF), *hotplate stirrer*, *Centrifuge*. Bahan-bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah bakteri kitinolitik (diisolasi dari tanah perakaran cabai, air lindi, dan air tambak udang), akuades, HCl, NaOH, K_2HPO_4 , $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, yeast extract, pepton, bacto tripton, NaCl, $(NH_4)_2SO_4$, koloidal kitin, *Potato Dextrose Agar* (PDA), indikator *bromcresol purple* (BCP), alkohol, lugol, safranin, dan kristal violet.

Prosedur riset

Isolasi bakteri kitinolitik

Bakteri kitinolitik diisolasi sesuai prosedur yang dilakukan oleh Wibowo *et al.*, (2017) yaitu dengan melakukan pengenceran berseri terhadap sampel tanah perakaran cabai,

air lindi, dan air tambak udang. Kemudian hasil pengenceran ditumbuhkan pada media agar kitin selama 48 jam. Setiap koloni dari bakteri yang berbeda dimurnikan pada medium agar kitin sebagai biakan tunggal dengan metode gores lalu diinkubasi selama 48 jam.

Karakterisasi isolat bakteri kitinolitik

Karakterisasi terdiri dari pengamatan morfologi koloni meliputi warna, bentuk, elevasi, dan tepian koloni. Pewarnaan gram dilakukan dengan menggunakan pewarnaan violet, lugol, dan safranin sebagaimana yang dilakukan oleh (Ruma *et al.*, 2020).

Uji aktivitas kitinase

Isolat bakteri kitinolitik ditumbuhkan pada media agar kitin yang telah ditambahkan indikator *bromcresol purple* (BCP) 0,1%. Indikator BCP bertujuan untuk memperjelas pembentukan zona bening di sekitar koloni disertai dengan perubahan pH media yang ditandai dengan perubahan warna indikator BCP yaitu dari warna kuning (pH asam) menjadi ungu (pH basa) yang menunjukkan adanya aktivitas kitinase.

Parameter penelitian

Parameter penelitian ini yaitu jumlah isolat bakteri yang ditemukan, ukuran koloni bakteri, bentuk, elevasi, margin, bentuk sel dan identifikasi bakteri gram negatif-positif dari bakteri kitinolitik.

Analisis data

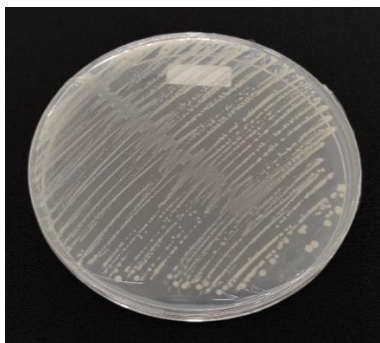
Penelitian dilakukan dengan analisis secara deskripsi morfologi bakteri kitinolitik yang ditampilkan dalam tabel dan gambar.

Hasil dan Pembahasan

Isolasi dan pemurnian bakteri kitinolitik

Bakteri kitinolitik hasil isolasi penelitian ini diperoleh dari tiga sampel yaitu tanah perakaran cabai, air lindi, dan air tambak udang. Seluruh sampel kemudian di tumbuhkan pada media agar kitin (0,5% koloidal kitin, 0,1-gram K_2HPO_4 , 0,01-gram $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,05-gram ekstrak khamir, 0,1 gram pepton, 0,1 gram bacto tripton, 0,1 gram NaCl, 1 gram agar, dan 0,1 gram $(NH_4)_2SO_4$, sehingga diperoleh 24 isolat. Sampel tanah perakaran cabai diperoleh 11 isolat bakteri. Sebelas isolat bakteri tersebut diberi kode TAC1-TAC11. Sampel air lindi

diperoleh 8 isolat bakteri yang diberi kode ALT1-ALT8. Terakhir sampel air tambak udang diperoleh 5 isolat bakteri yang diberi kode TUC1-TUC5, isolat bakteri dipilih berdasarkan perbedaan warna dan ukuran koloni bakteri. Isolasi bakteri merupakan suatu proses pengambilan mikroba dari lingkungan alamnya kemudian ditumbuhkan menjadi biakan murni dalam suatu medium buatan (Sabbathini *et al.* 2017). Gambar 1 menunjukkan salah satu isolat bakteri hasil isolasi.



Gambar 1. Hasil isolasi bakteri kitinolitik

Bakteri yang berhasil di isolasi kemudian dilakukan pemurnian pada media agar kitin sehingga diperoleh isolat tunggal atau hanya terdapat satu jenis bakteri yang merupakan biakan murni. Pemurnian isolat bakteri pada penelitian ini dilakukan 3 kali. Isolat bakteri hasil pemurnian diperoleh terdapat koloni bakteri yang memiliki kesamaan yaitu TUC2, TUC4, dan TUC5, sehingga ketiga kode isolat tersebut menjadi TUC2. Maka total isolat bakteri setelah pemurnian yaitu 22 isolat. Tabel 1 menunjukkan kode dan asal isolat bakteri hasil isolasi.

Tabel 1. Kode dan asal isolat

Sampel	Kode	Asal Isolat	Jumlah Isolat
Tanah akar cabai	TAC	Kota	11
		Tasikmalaya	
Air lindi	ALT	Kota	8
		Tasikmalaya	
Air Tambak Udang	TUC	Kabupaten Tasikmalaya	3

Karakterisasi isolat bakteri kitinolitik

Identifikasi isolat bakteri hasil eksplorasi yang berjumlah 22 isolat di lakukan berdasarkan karakter morfologinya secara makroskopis dan mikroskopis. Secara makroskopis identifikasi yaitu dengan melihat bentuk, elevasi, margin, ukuran, warna, dan permukaan dari isolat

bakteri. Sedangkan pengamatan mikroskopis dilakukan dengan metode pewarnaan gram. Hasil identifikasi morfologi koloni bakteri kitinolitik dilihat pada tabel 2.

Tabel 2. Memperlihatkan pengamatan morfologi koloni bakteri kitinolitik hasil eksplorasi, yang mana hasil pengamatan kebanyakan bakteri memiliki bentuk sel kokus yaitu 17 isolat dan 5 isolat basil dengan permukaan hampir keseluruhan koloni mengkilap. Warna bakteri yang diperoleh untuk isolat TAC yang dari tanah perakaran lebih banyak warna putih susu yaitu 6 isolat, 3 isolat putih tulang, dan 2 isolat bakteri berwarna tidak berwarna atau bening. Isolat dari air lindi (ALT) warna koloni bakteri yang diperoleh terdapat 2 isolat berwarna putih tulang, 1 putih susu dan putih keungunan, kemudian 3 isolat bakteri berwarna kuning kunyit dan 1 isolat berwarna kuning pudar, dimana dapat dilihat lebih banyak bakteri dengan variasi warna kuning. Sedangkan, warna koloni 3 isolat bakteri yang diperoleh dari air kawasan tambak udang (TUC) memiliki variasi warna merah muda, putih tulang, dan putih susu.

Hasil pengamatan morfologi isolat koloni bakteri maka diperoleh seluruh isolat bakteri memiliki bentuk sel yang pada umumnya kokus dengan warna isolat bakteri kebanyakan putih susu. Penelitian yang dilakukan oleh Fitri and Yasmin (2011) memiliki hasil yang sama bahwa warna koloni bakteri yang diperoleh dari sampel kawasan perairan tambak diantaranya memiliki warna putih susu. Hasil yang sama diperoleh dari penelitian Nurdin *et al.*, (2016) yang mengisolasi bakteri kitinolitik dari tanah dan diperoleh warna isolat bakteri berwarna putih dengan hanya satu isolat berwarna merah.

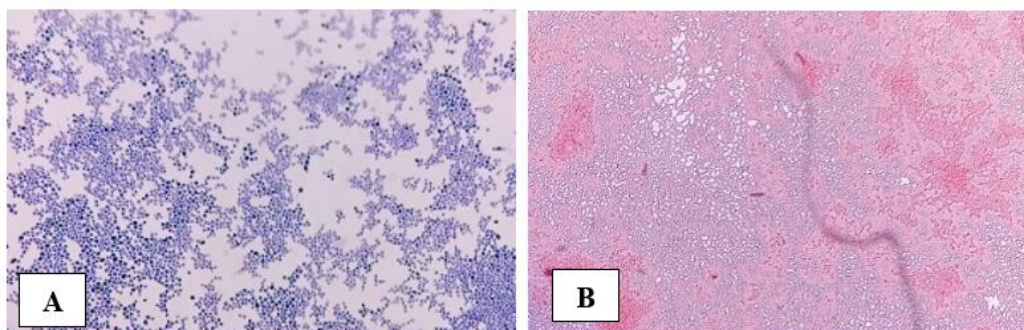
Pengamatan pewarnaan gram menunjukkan 10 isolat bakteri kitinolitik bersifat gram negatif dengan bentuk sel kokus dan hanya satu isolat gram negatif yang berbentuk basil. 12 isolat lainnya bersifat gram positif dengan bentuk sel kokus dan basil. Hal ini menunjukkan sifat gram pada isolat bakteri memiliki jumlah yang tidak berbeda. Penelitian Nurdi *et al.*, (2016) menunjukkan hal serupa dimana isolat bakteri yang diperoleh memiliki sifat gram positif dan negatif dalam jumlah yang tidak berbeda. Hasil isolasi bakteri kitinolitik yang dilakukan oleh (Suryanto & Munir, 2006) diantaranya banyak isolat bakteri dengan sifat gram yang negatif.

Tabel 2. Hasil pengamatan morfologi bakteri kitinolitik

No	Isolat	Bentuk	Elevasi	Margin	Ukuran	Warna	Permukaan	Gram	Bentuk Sel
1	TAC1	Circular	Flat	Curled	Small	Putih susu	Mengkilap	Positif	kokus
2	TAC2	Circular	Raised	Erose	Small	Putih susu	Mengkilap	Positif	Basil
3	TAC3	Circular	Convex	Entire	Punctiform	Putih tulang	Mengkilap	Negatif	Basil
4	TAC4	Circular	Raised	Entire	Small	Putih susu	Mengkilap	Positif	kokus
5	TAC5	Circular	Flat	Entire	Punctiform	Putih tulang	Mengkilap	Negatif	kokus
6	TAC6	Circular	Flat	Undulate	Small	Putih susu	Mengkilap	positif	kokus
7	TAC7	Circular	Flat	Entire	Small	Putih susu	Mengkilap	Negatif	kokus
8	TAC8	Rhizoid	Flat	Lobate	Moderate	Putih tulang	Mengkilap	Negatif	kokus
9	TAC9	Filamentous	Convex	Filamentous	Small	Putih susu	Mengkilap	Negatif	kokus
10	TAC10	Circular	Flat	Entire	Punctiform	Bening	Tidak mengkilap	Negatif	kokus
11	TAC11	Circular	Flat	Entire	Punctiform	Bening	Mengkilap	Negatif	kokus
12	ALT1	circular	Raised	Entire	Small	Kuning kunyit	Mengkilap	Negatif	kokus
13	ALT2	circular	Raised	Entire	Punctiform	Putih tulang	Mengkilap	Positif	Kokus
14	ALT3	Circular	Flat	Entire	Punctiform	Putih tulang	Mengkilap	Positif	Kokus
15	ALT4	Circular	Raised	Entire	Punctiform	Putih susu	Mengkilap	Positif	kokus
16	ALT5	Circular	Raised	Entire	Moderate	Kuning kunyit	Mengkilap	Positif	Basil
17	ALT6	Circular	Raised	Entire	Moderate	Kuning Pudar	Mengkilap	Positif	Basil
18	ALT7	Circular	Raised	Entire	Punctiform	Putih Keunguan	Mengkilap	Negatif	Basil
19	ALT8	Circular	Raised	Entire	Moderate	Kuning kunyit	Mengkilap	Positif	kokus
20	TUC1	Circular	Raised	Entire	Punctiform	Merah muda	Mengkilap	Positif	kokus
21	TUC2	Circular	Convex	Entire	Small	Putih tulang	Mengkilap	Positif	Kokus
22	TUC3	Circular	Raised	Entire	Punctiform	Putih susu	Mengkilap	Negatif	Kokus

Pewarnaan gram bertujuan untuk mengetahui sifat gram dari bakteri kitinolitik. Isolat bakteri yang bersifat gram negatif ditunjukkan dengan warna hasil pengujian berwarna merah, sedangkan hasil pengujian bakteri yang berwarna ungu menunjukkan gram positif. Perbedaan struktur dinding sel pada bakteri kitinolitik hasil eksplorasi menyebabkan

perbedaan hasil warna pada bakteri hasil pengujian gram. Bakteri dengan gram positif memiliki peptidoglikan yang tebal pada struktur dinding sel nya, sedangkan bakteri dengan gram negatif struktur dinding sel nya memiliki kandungan lipid yang tinggi (Ihsan et al., 2020). Hasil pewarnaan bakteri diantaranya dapat dilihat pada gambar 2.



Gambar 2. Pewarnaan Gram bakteri kitinolitik
 Keterangan: Bakteri gram positif (a) dan bakteri gram negatif (b)

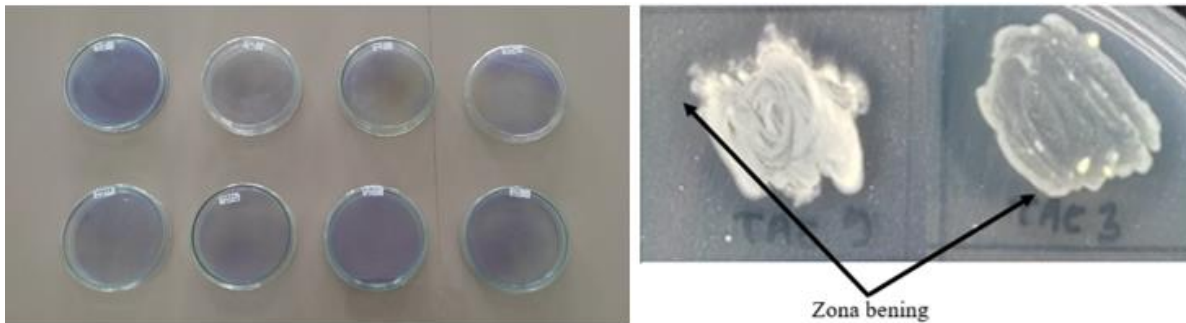
Uji aktivitas kitinase

Pengujian aktivitas kitinase pada bakteri kitinolitik bertujuan untuk mengetahui kemampuan dari setiap isolat bakteri yang diperoleh dalam mengeluarkan enzim kitinase

dan memastikan bahwa isolat bakteri hasil isolasi merupakan bakteri kitinolitik yang ditandai terbentuknya zona bening disekitar koloni bakteri. Aktivitas kitinase pada bakteri ditandai dengan perubahan warna indikator BCP

0,1% dari warna kuning menjadi ungu (Syahfitri et al., 2018). Pengamatan aktivitas kitinase dilakukan pada hari ke dua setelah pengujian

dimana hasil menunjukkan adanya perubahan warna pada semua isolat bakteri hasil eksplorasi dari warna kuning menjadi ungu (Gambar 3).



Gambar 3. Hasil uji aktivitas kitinase

Kesimpulan

Isolat bakteri kitinolitik diperoleh sebanyak 22 isolat hasil eksplorasi dengan 11 isolat dengan kode TAC merupakan isolat dari perakaran tanah cabai, 8 isolat dengan kode ALT berasal dari air lindi, dan 3 isolat dari tambak udang berkode TUC. Hasil pengamatan morfologi koloni bakteri diperoleh bentuk sel koloni bakteri yang kokus berjumlah 17 dan hanya 5 yang basil. Isolat sebagian besar berwarna putih dengan warna putih susu dan putih tulang dan 7 isolat dengan variasi warna merah dan kuning. Hasil pewarnaan gram menunjukkan 10 isolat bakteri bersifat gram negatif dan 12 isolat bersifat positif dengan bentuk sel bakteri kebanyakan kokus.

Ucapan Terima Kasih

Terima kasih untuk Jenderal Pendidikan Tinggi, Riset, dan Teknologi (Ditjen Diktiristik) dan Direktorat Pembelajaran dan Kemahasiswaan (Belmawa) yang telah mengadakan program PKM-RE sehingga artikel ilmiah ini dapat terfasilitasi dengan baik dan orang-orang yang membantu selama penelitian berlangsung.

Referensi

Anees, Muhammad, Muhammad Abid, Shafiq Ur Rehman, Nadeem Ahmed, Muhammad Ashraf, Lixin Zhang, & Kil Yong Kim. (2019). "Antifungal Activity of Various Chitinolytic Bacteria against *Colletotrichum* in Pepper." *Plant Protection Science* 55 (2): 109–15. DOI: <https://doi.org/10.17221/72/2018-PPS>.

Fitri, Lenni, & Yekki Yasmin (2011). "Isolation and Observation of Morphology of Chitinolytic Bacteria Colony." *Jurnal Ilmiah Pendidikan Biologi* 3 (2): 20–25.

Ihsan, Yudi Nurul, Kalysta Fellatami, Rega Permana, Yeni Mulyani, & Tri Dewi K Pribadi. (2020). "Analisis Bakteri Pereduksi Konsentrasi Logam Timbal Pb(Ch3coo)2 Menggunakan Gen 16S Rrna." *Jurnal Kelautan: Indonesian Journal of Marine Science and Technology* 13 (2): 151–62. DOI: <https://doi.org/10.21107/jk.v13i2.7285>.

Karina, Nava, Ahmad Roekhan, Cindy Diah, Ayu Fitriana, Qurata Aini, & U B Forest. (2020). "Potensi Bakteri Hutan UB Sebagai Bakteri Kitinolitik Untuk Menghambat Penyakit Antraknosa Pada Cabai Rawit" 7 (1): 41–52. DOI: <https://doi.org/10.21776/ub.rjls.2020.007.01.5>

Nurdin, Gaby Maulida, Nisa Rachmania Mubarik, & Lisdar Idwan Sudirman. (2016). "Selection of Chitinolytic Bacteria as Biological Control of *Colletotrichum Capsici*." *Malaysian Journal of Microbiology* 12 (1): 35–42.

Purkan, Badi'atul Azizah, Afaf Baktir, & Sri Sumarsih (2014). "Eksplorasi Bakteri Kitinolitik Dari Sampah Organik : Isolasi Dan Karakterisasi Enzim Kitinase Exploration Of Chitinolytic Bacteria From Organic Waste: Isolation And Characterization Of Chitinase Enzyme Purkan". 9 (2): 139. DOI: <https://doaj.org/article/ade1fc2c867b432d8941451644d002d6>.

Reyes-Perez, J. J., L. G. Hernandez-Montiel, S. Vero, J. C. Noa-Carranza, E. E.

- Quiñones-Aguilar, and G. Rincón-Enríquez. (2019). “Postharvest Biocontrol of *Colletotrichum Gloeosporioides* on Mango Using the Marine Bacterium *Stenotrophomonas Rhizophila* and Its Possible Mechanisms of Action.” *Journal of Food Science and Technology* 56 (11): 4992–99. DOI: <https://doi.org/10.1007/s13197-019-03971-8>.
- Ruma, Maria T L, Refli, & Ernestus Suwardi. (2020). “Kitinolitik Pada Limbah Udang Vaname (*Litopenaeus Vannamei*).” *Jurnal Biotropikal Sains* 17 (2): 14–23.
- Sabbathini, Gabriela Christy, Sri Pujiyanto, Wijanarka, & Puspita Lisdiyanti (2017). “Isolasi dan Identifikasi Bakteri Genus *Sphingomonas* Dari Daun Padi (*Oryza Sativa*) di Area Persawahan Cibinong.” *Jurnal Akademika Biologi* 6 (1): 59–64. URL: <https://ejournal3.undip.ac.id/index.php/biologi/article/view/19523>.
- Syahfitri, Dian, Nisa Rachmania Mubarik, & Lisdar A Manaf (2018). “Penggunaan Bakteri Kitinolitik Sebagai Pengendali Hayati *Colletotrichum Capsici* Pada Tanaman Cabai.” *Jurnal Fitopatologi Indonesia* 14 (4): 120. DOI: <https://doi.org/10.14692/jfi.14.4.120>.
- Suryanto, D., & Munir, E. (2006). Potensi Pemanfaatan Isolat Bakteri Kitinolitik Lokal Untuk Pengendalian Hayati Jamur. Prosiding Seminar Hasil-Hasil Penelitian USU, 15-25. URL: <https://dupakdosen.usu.ac.id/bitstream/handle/123456789/16063/08E00544.pdf?sequence=3>
- Wibowo, Risky Hadi, Nisa Rachmania Mubarik, Iman Rusmana, & Maggy Thenawidjaya. (2017). “Penapisan Dan Identifikasi Bakteri Kitinolitik Penghambat Pertumbuhan *Ganoderma Boninense* in Vitro.” *Jurnal Fitopatologi Indonesia* 13 (3): 105–11. DOI: <https://doi.org/10.14692/jfi.13.3.105>