

UJI AKTIVITAS PROTEOLITIK MIKROBA DARI IMBAH CANGKANG UDANG PADA PROSES PEMBUATAN CHITIN

Oleh : Nida Sopiah¹ dan Teguh Prayudi²

Abstrak

Dalam penelitian ini telah dilakukan uji aktivitas proteolitik mikroba pada proses pembuatan chitin yang menggunakan bahan baku limbah cangkang rajungan. Bakteri proteolitik yang digunakan berasal dari hasil isolasi bakteri yang terdapat pada pembusukan limbah cangkang udang.

Dari hasil analisa yang dilakukan terhadap kultur cair hasil fermentasi yang mengandung serbuk cangkang rajungan diketahui bahwa koloni bakteri berasal dari limbah cangkang udang mempunyai aktivitas enzim sebesar 0,006 U (Unit/ml/menit), dengan kemampuan menurunkan kadar protein (deproteinasi) sebesar 31,90%.

Hasil penelitian ini diharapkan dapat dijadikan dasar proses pembuatan chitin dari limbah cangkang rajungan secara biologis, yang dipandang sebagai proses yang lebih ramah lingkungan dibandingkan dengan proses secara kimiawi.

Katakunci : chitin, Cangkang udang, Cangkan rajungan, Aktivitas proteolitik bakteri

1. PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Penguasaan teknologi di bidang pemanfaatan-penggunaan kembali (*reuse*) dan penggunaan ulang kedalam bentuk lain (*recycle*) dapat meningkatkan nilai ekonomi suatu limbah. Salah satu limbah yang dapat ditingkatkan nilai ekonominya adalah cangkang *crustaceae*. Cangkang *crustaceae* ini mengandung senyawa chitin, dimana derivat chitin ini mempunyai kemampuan aktivitas yang beragam dan berpotensi sebagai bahan baku substitusi impor.

Sebagai negara maritim, Indonesia memiliki potensi sumber daya kelautan yang sangat berlimbah, termasuk potensi hasil perikanan dari jenis *crustaceae* ini.

Rajungan merupakan salah satu jenis *crustaceae* yang dalam proses produksinya banyak menghasilkan produk samping yang belum terolah (*spent resources*), yang saat ini cenderung dianggap sebagai limbah yang berpotensi mencemari lingkungan sekitarnya, terutama pencemaran bau yang tidak sedap dan pencemaran lingkungan perairan (kandungan BOD₅, COD dan TSS perairan disekitar pabrik cukup tinggi).

Sebagai salah satu andalan komoditas ekspor Indonesia, rajungan pada umumnya diekspor ke Jepang, Uni Eropa dan Amerika Serikat dalam bentuk rajungan beku tanpa kepala dan kulit, sehingga menyisakan hasil samping produksi yang berupa kepala, kulit, ekor maupun kaki rajungan yang umumnya sebesar 25-50 % dari berat basah.

Melalui pendekatan teknologi yang tepat, potensi hasil samping ini dapat diolah lebih lanjut menjadi senyawa Polisakarida (*polysaccharide*), dimana didalamnya termasuk Chitin yang apabila diolah lebih lanjut menghasilkan chitosan dan glucosamin. Ketiga produk ini mempunyai sifat mudah terurai dan tidak mempunyai sifat beracun, sehingga sangat ramah terhadap lingkungan.

Proses pembuatan chitin dari limbah cangkang rajungan ini, pada umumnya banyak dilakukan melalui proses kimiawi. Metode ini telah banyak digunakan oleh para peneliti sebelumnya⁽¹⁾, Hong K. No⁽²⁾ dan Fereidoon S.⁽³⁾, dimana metode yang dikembangkan oleh masing-masing memiliki kekurangan dan kelebihan. Pada penelitian sebelumnya, peneliti dkk.⁽⁴⁾ juga telah mengembangkan metoda pembuatan chitin secara kimiawi, yang meliputi proses

¹ Staf peneliti pada Balai Teknologi Lingkungan, Badan Pengkajian dan Penerapan Teknologi

² Ajun Peneliti Muda pada Pusat Pengkajian dan Penerapan Teknologi Lingkungan, BPPT.

deproteinisasi dan demineralisasi untuk memperoleh kondisi optimum pembuatan chitin dari limbah rajungan.

Namun dalam perkembangannya, produk chitin maupun chitosan yang diperoleh melalui proses kimiawi ini mempunyai banyak kelemahan. Salah satu kelemahannya adalah nilai berat molekul yang diperoleh sangat rendah, mengingat proses ini terutama menggunakan basa kuat (NaOH) untuk proses deproteinisasi dan asam kuat (HCl) untuk proses demineralisasi. Penggunaan kedua bahan kimia ini telah diketahui dapat menyebabkan putusannya ikatan polimer pada senyawa chitin sehingga nilai BM yang diperoleh sangat rendah.

Perkembangan ilmu bioteknologi telah menempatkan penggunaan enzim (dalam hal ini mikroba) sebagai salah satu alternatif untuk mengatasi kelemahan tersebut. Dengan proses enzimasi ini dimungkinkan dapat diperoleh chitin dengan BM lebih besar dari 800.000.

Enzim protease merupakan salah satu enzim yang biasa digunakan untuk proses deproteinisasi didalam bidang bioteknologi. Enzim protease dapat dihasilkan oleh mikroba-mikroba secara intraseluler maupun ekstraseluler.

Dalam proses pembuatan chitin secara biologis, penggunaan mikroba telah dilaporkan oleh beberapa peneliti seperti Shimahara et al.⁽⁵⁾ yang memanfaatkan bakteri *Proteolitik pseudomonas maltophilia* LC 102 untuk deproteinisasi cangkang udang (*Penaeus japonicus*); dan Santoso⁽⁶⁾ dengan memanfaatkan enzim Actinase E dari *Streptomyces griseus* untuk deproteinisasi udang *Penaeus merguensis*.

Di alam, populasi mikroba merupakan populasi campuran dari berbagai mikroorganisme atau disebut juga biakan campuran. Untuk mendapat mikroba tertentu terlebih dahulu perlu dilakukan proses pembiakan, identifikasi dan isolasi mikroba yang diperlukan. Dalam melaksanakan tahapan-tahapan proses ini, beberapa faktor perlu mendapatkan perhatian khusus seperti faktor-faktor yang mempengaruhi pertumbuhan bakteri (seperti Nitrogen, karbon, vitamin, pH, suhu dll.), dan juga faktor yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri itu sendiri.

Untuk mengisolasi mikroba proteolitik yang diperlukan pada pembuatan chitin dari cangkang rajungan, penulis dkk.⁽⁷⁾, telah mencoba mengisolasi dan mengidentifikasi mikroba proteolitik yang terdapat di dalam

hasil pembusukan cangkang rajungan. Namun pada penelitian tersebut, aktivitas proteolitik mikroba yang diperoleh masih sangat rendah untuk dapat digunakan pada proses pembuatan chitin.

Dengan mempertimbangkan bahwa cangkang udang memiliki komponen (nutrien) yang hampir sama dengan nutrien didalam cangkang rajungan, dan juga memiliki potensi sebagai salah satu media tempat tumbuh berkembangnya berbagai mikroba termasuk mikroba proteolitik, maka dalam penelitian ini dicoba untuk mengisolasi bakteri proteolitik di dalam limbah tersebut.

1.2. Tujuan Penelitian

Penelitian ini dilakukan dengan tujuan untuk menguji aktivitas proteolitik mikroba yang diperoleh dari hasil pembusukan cangkang udang sebagai sumber enzim pada proses pembuatan chitin.

1.3. Sasaran Penelitian

Sasaran penelitian ini adalah dihasilkannya mikroba proteolitik yang dapat digunakan pada proses pembuatan chitin dari limbah cangkang rajungan.

2. METODA PENELITIAN

2.1. Bahan dan Peralatan

a. Mikroorganisme

Mikroorganisme yang digunakan dalam penelitian ini berasal dari hasil skrining dan isolasi mikroba yang terdapat dalam limbah cangkang udang hasil pembusukan selama 3 minggu.

b. Medium

Untuk skrining dan isolasi bakteri, dalam penelitian ini digunakan 2 jenis medium, yaitu medium padat dan medium cair.

Medium padat digunakan untuk skrining bakteri protease dengan melihat kemampuan tumbuh dan zona hidrolisisnya. Untuk menyeleksi jenis bakteri protease yang tumbuh pada medium padat digunakan protein dari cangkang rajungan atau cangkang udang sebagai sumber Nitrogen.

Medium padat 1 meliputi komposisi per liter sebagai berikut : 15 g bacto agar, 5 g serbuk cangkang rajungan, 6 g K₂HPO₄, 3 g KH₂PO₄, 0,01 g MgSO₄ · 7H₂O, 0,05 g CaCl₂·2H₂O,

0,01 g $\text{MnSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,001 g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,001 g $\text{ZnSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 1 g Tri Na-sitrat, dan 6 g glukosa.

Medium padat 2 merupakan medium pertumbuhan untuk bakteri heterotroph dengan mengganti $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ dengan serbuk cangkang rajungan sebagai sumber nitrogennya⁽⁸⁾. Komposisi medium padat 2 dalam 1 liter terdiri dari : 15 g bacto agar, 5 g serbuk cangkang rajungan, 5 g glukosa, 5 g NaCl, 0,2 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1 g K_2HPO_4 , 1 g KH_2PO_4 .

Medium padat 3 dalam 1 liter terdiri dari: 15 g bacto agar, 5 g serbuk cangkang rajungan, 5 g ekstrak ragi, 10 g NaCl, 6 g K_2HPO_4 , 3 g KH_2PO_4 , 0,01 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,05 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,01 g $\text{MnSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,001 g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,001 g $\text{ZnSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, dan 6 g glukosa.

Medium padat 4 dalam 1 liter terdiri dari : 15 g bacto agar, 5 g serbuk cangkang rajungan, 6 g glukosa, 10 g NaCl, 1 g K_2HPO_4 , 1 g KH_2PO_4 .

Medium padat 5 dalam 1 liter terdiri dari : 15 g bacto agar, 5 g serbuk cangkang rajungan, 5 g glukosa, 5 g NaCl, 1 g K_2HPO_4 , 1 g KH_2PO_4 .

Medium padat 6 dalam 1 liter terdiri dari : 15 g bacto agar, 5 g serbuk cangkang udang, 5 g glukosa, 5 g NaCl, 0,2 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1 g K_2HPO_4 , 1 g KH_2PO_4 .

Medium padat 7 dalam 1 liter terdiri dari : 15 g bacto agar, 5 g serbuk cangkang udang dan 5 g glukosa,

Medium padat 8 dalam 1 liter terdiri dari : 15 g bacto agar, 5 g serbuk cangkang rajungan dan 5 g glukosa.

Medium cair digunakan untuk perbanyakkan bakteri protease. Medium ini mempunyai komposisi sebagai berikut: 5 g serbuk rajungan, 5 g glukosa, 5 g NaCl, 0,2 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1 g K_2HPO_4 , 1 g KH_2PO_4 .

(Semua medium disterilisasi pada tekanan 1,5 Atm pada suhu 121°C selama 15 menit).

Larutan Bradford : Dilarutkan sebanyak 100 mg Coomasi Brilliant Blue G-250 dalam 50 ml etanol 95%, kemudian ditambahkan 100 ml asam fosfat 85% selanjutnya diencerkan sampai 1 liter.

Stok Bovine Serum Albumin (BSA) : Sebanyak 0,01 gram BSA ditambah 5 ml aquadest selanjutnya ditambahkan 1 tetes NaOH 0,1 M, kocok secara perlahan sampai BSA larut sempurna selanjutnya ditambah dengan aquadest sampai volumenya menjadi 10 ml ([BSA] = 1000 ppm).

c. Bahan baku

Bahan baku yang digunakan dalam penelitian ini adalah cangkang rajungan yang diperoleh dari industri pengolahan rajungan yang sudah mengalami proses perebusan dan pengeringan dengan sinar matahari. Cangkang rajungan dengan kadar air $\leq 5\%$ selanjutnya dihancurkan dengan alat penghancur (*blender*) sampai menjadi serbuk halus.

d. Peralatan

Peralatan laboratorium yang digunakan adalah alat gelas meliputi cawan petri, labu erlenmeyer, labu ukur, gelas ukur, pipet ukur, pipet volumetrik, *autoclave*, *centrifuge*, *hot plate*, inkubator, *laminar air flow*, mikroskop, neraca analitis oven, pH meter, *rotatory shaker incubator*, shaking waterbath, spektrofotometer UV-Vis, dan vortex.

2.2. Tata Kerja

a. Optimalisasi kondisi medium pertumbuhan.

Untuk memperoleh kondisi yang optimal, dalam penelitian ini dilakukan uji pengaruh pengenceran dan pengaruh suhu terhadap pertumbuhan bakteri.

b. Pengaruh suhu terhadap aktivitas enzim proteolitik.

Disamping pengujian optimalisasi kondisi medium pertumbuhan, juga dilakukan pengujian pengaruh suhu terhadap aktivitas enzim proteolitik.

c. Pengaruh medium terhadap pertumbuhan koloni bakteri.

Isolasi bakteri protease dilakukan berdasarkan langkah-langkah sebagai berikut:

- 1) Cairan yang berasal dari seeding bakteri dari cangkang udang yang telah dibusukkan selama 15 hari, diencerkan sebesar 10^6 kali, dan kemudian diinokulasikan pada 8 (delapan) media tumbuh (media padat) yang telah disterilisasi terlebih dahulu dan dilakukan secara aseptis. Selanjutnya media ini

diinkubasi pada suhu 37°C dan pertumbuhannya dipantau pada 24 dan 48 jam. (Dari penelitian ini diharapkan diperoleh medium padat yang cocok bagi pertumbuhan bakteri).

- 2) Koloni bakteri yang tumbuh pada medium yang memberikan zona bening (zona hidrolisis) di daerah sekitar mikroba tumbuh, dipindahkan ke medium yang sesuai dengan pertumbuhannya secara aseptis di atas cawan petri menggunakan kawat ose, selanjutnya diinkubasikan pada suhu 37°C selama 48 jam.
- 3) Dari cawan-cawan tersebut, satu koloni yang terpisah dipindahkan ke cawan petri yang baru yang telah disterilisasi dan diinokulasikan kembali secara aseptis, kemudian diinkubasikan pada suhu 37°C selama 48 jam. Koloni yang tumbuh diharapkan berasal dari satu spora, yang selanjutnya digunakan dalam aklimatisasi pada kultur cair,
- 4) Aklimatisasi biakan bakteri protease pada media kultur cair, dilakukan dengan cara memindahkan koloni mikroba yang memberikan zona bening di daerah sekitar mikroba tumbuh kemudian dipindahkan sebanyak 2 ose ke media kultur cair, yang sebelumnya telah disterilisasi dengan *autoclave* pada suhu 121°C selama 15 menit, dan inokulum diinkubasi pada *rotatory shaker incubator* pada suhu 37°C selama 48 jam.

d. Isolasi dan Identifikasi isolat

Isolat yang diperoleh dengan metode *Streak-plate* diidentifikasi dengan mengamati morfologi isolat yang meliputi bentuk koloni tunggal, warna dan pewarnaan gram.

e. Pengukuran Deproteinasi Pada Kultur Cair

Kemampuan deproteinasi mikroba proteolitik dilakukan dengan mengukur kemampuan aktivitas proteolitiknya dalam menghidrolisis protein pada cangkang rajungan dengan menggunakan metode Bradford untuk analisis protein pada panjang gelombang 595 nm.

Dalam metode ini digunakan pereaksi Coomassie Brilliant Blue untuk mengukur kandungan protein, melalui reaksi pembentukan senyawa kompleks antara Coomassie Brilliant Blue dengan protein yang berwarna biru dengan absorpsi maksimum pada panjang gelombang 595 nm.

Pembentukan senyawa kompleks ini berlangsung sangat cepat (2-5 menit), dan mempunyai waktu kestabilan yang cukup panjang (1 jam). Sebagai protein standar, digunakan Bovine dengan range konsentrasi antara 0 – 150 ppm.

f. Uji Aktivitas Proteolitik Mikroba

Pengukuran aktivitas protease dilakukan dengan menggunakan modifikasi metode Amano. Prinsip kerja metode ini adalah hidrolisis kasein oleh enzim protease menjadi peptida dan asam-asam amino⁽⁹⁾. Langkah-langkah pengujian aktivitas proteolitik mikroba adalah sebagai berikut :

1) Pembuatan sample

Media kultur kocok hasil fermentasi disentrifugasi selama 3 menit dengan kecepatan 15.000 rpm. Sebanyak 0,5 ml filtrat selanjutnya dimasukkan kedalam tabung reaksi dan ditambahkan 0,5 ml kasein dan diinkubasi pada 37°C selama 30 menit dalam penangas air yang bergoyang. Larutan yang telah diinkubasi ditambahkan 1 ml TCA dan disentrifugasi selama 3 menit dengan kecepatan 15.000 rpm, dan hasil sentrifus dipipet sebanyak 0,5 ml dan ditambahkan 2,5 ml Na₂CO₃ 2% dan 0,5 ml larutan yang mengandung folin ciosalteau (1:4) dalam tabung reaksi, diinkubasi kembali pada 37°C selama 15 menit, dan akan terbentuk warna biru keungu-unguan yang kemudian diukur absorbansinya dengan spektrofotometer UV – Vis pada panjang gelombang 660 nm.

2) Preparasi blanko

Media kultur kocok hasil fermentasi disentrifugasi selama 3 menit dengan kecepatan 15.000 rpm. Sebanyak 0,5 ml filtrat dimasukkan kedalam tabung reaksi dan ditambahkan 1 ml TCA dan diinkubasi pada 37°C selama 30 menit dalam penangas air yang bergoyang. Larutan yang telah diinkubasi ditambahkan 0,5 ml kasein dan disentrifugasi selama 3 menit dengan kecepatan 15.000 rpm. Hasil sentrifugasi dipipet 0,5 ml dan ditambahkan 2,5 ml Na₂CO₃ 2% dan 0,5 ml larutan yang mengandung folin ciosalteau (1:4) dalam tabung reaksi, diinkubasi kembali pada 37°C selama 15 menit, dan akan terbentuk warna biru keungu-unguan yang kemudian diukur absorbansinya dengan spektrofotometer UV – Vis pada panjang gelombang 660 nm.

Aktivitas enzim protease dinyatakan dalam satuan U (unit) yaitu jumlah enzim yang dibutuhkan untuk menghasilkan 1 μ g tirosin pada suhu 37⁰C, selama 15 menit.

3) Perhitungan

$$\text{Aktivitas enzim (U).} = \frac{(A_s - A_b) \times D}{T}$$

Dimana :

- Satuan aktivitas enzim adalah U (unit/ml/menit).
- A_s adalah absorban sample
- A_b adalah absorban blanko
- T adalah waktu yang diperlukan untuk menghasilkan warna pada tahap akhir setelah penambahan larutan folin

4) Standar aktivitas enzim protease

Standar aktivitas enzim digunakan tirosin sebagai standar dengan larutan stok tirosin dibuat sebesar 250 ppm (6,25 mg tirosin dalam 25 ml), selanjutnya dibuat deret standar 0, 25, 50, 75, 100, 125 dan 150 ppm.

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

a. Optimalisasi kondisi medium pertumbuhan

Untuk memperoleh kondisi optimal isolasi bakteri, telah dilakukan penelitian pengaruh pengenceran terhadap pertumbuhan bakteri. Hasil penelitian menunjukkan bahwa skrining bakteri dari cairan limbah cangkang udang yang telah dibusukkan selama 15 hari diperoleh data bahwa pada pengenceran 10⁵ merupakan pengenceran yang optimum bagi inokulasi koloni bakteri limbah cangkang udang. Sedangkan pada pengenceran 10⁴, pertumbuhan koloni bakteri terlalu rapat, dan sebaliknya pada pengenceran 10⁶ pertumbuhan ini terlalu jarang.

Selanjutnya dari hasil pengujian pengaruh temperatur terhadap pertumbuhan koloni bakteri, diketahui bahwa pertumbuhan koloni bakteri pada suhu 37 °C jauh lebih baik dibandingkan pertumbuhan pada suhu kamar (27 °C).

b. Pengaruh suhu terhadap aktivitas enzim proteolitik

Pengujian pengaruh suhu terhadap aktivitas enzim proteolitik, memberikan hasil pengamatan bahwa pada suhu 37⁰C, disekitar tempat tumbuh koloni bakteri tampak terlihat

ada zona bening yang menunjukkan bahwa koloni bakteri ini mengeluarkan enzim ekstraseluler yang dapat menghidrolisis ikatan peptida pada protein. Sedangkan pada suhu kamar (27⁰C) zona bening ini tidak tampak.

Hasil ini menunjukkan bahwa terdapat hubungan antara suhu optimum dengan aktivitas maksimum dari enzim. Semakin naik suhu lingkungan, aktivitas enzim akan meningkat sampai aktivitas optimumnya tercapai⁽⁸⁾. Pada umumnya semakin tinggi suhu maka akan semakin naik laju reaksi kimia, baik yang menggunakan katalisis maupun yang tidak menggunakan katalisis oleh enzim. Hal ini akan berlangsung sampai dicapai suhu optimum yang tertentu. Pada suhu yang lebih tinggi lagi, akan terjadi kerusakan kerusakan struktur enzim, sehingga enzim tidak dapat berfungsi lagi sebagai katalisator.

Kemampuan enzim mengikat substrat juga ditentukan oleh struktur tersier enzim yang berperan penting dalam membentuk ruang tiga dimensi pada sisi aktif. Struktur tersier ini dipengaruhi antara lain oleh suhu.

Kenaikan suhu menyebabkan bertambahnya energi kinetik molekul-molekul enzim yang akan mempercepat gerak vibrasi, translasi dan rotasi enzim dan substrat sehingga memperbesar peluang keduanya untuk saling bereaksi. Apabila suhu optimum terlewati maka konformasi enzim mengalami perubahan sehingga menjadi tidak aktif dan tidak berfungsi sebagaimana mestinya. Pada suhu tinggi substrat dapat juga mengalami perubahan konformasi, sehingga akan menyebabkan sulitnya terjadi reaksi dengan sisi aktifnya.⁽¹⁰⁾

Sedangkan menurut Devlin⁽¹¹⁾, peningkatan suhu disekitar enzim, dapat menyebabkan ikatan hidrogen pada struktur molekul enzim terikat lemah pada rantai polipeptida, sehingga terjadi perenggangan ikatan sebelum terjadi pemutusan ikatan hidrogen ini. Putusnya satu ikatan hidrogen ini akan memudahkan putusnya ikatan-ikatan hidrogen lainnya sehingga struktur enzim akan berubah, yang selanjutnya akan mengakibatkan menurunnya aktivitas enzim.

c. Pengaruh medium terhadap pertumbuhan koloni bakteri.

Dari hasil penelitian yang dilakukan terhadap 8 jenis medium yang berbeda diperoleh pola pertumbuhan koloni bakteri yang berbeda seperti yang tampak pada tabel 1.1.

Dari hasil penelitian tersebut dapat diketahui secara umum, koloni bakteri yang berasal dari hasil pembusukan limbah cangkang udang ini dapat tumbuh pada medium-medium yang diteliti, kecuali pada medium 4. Namun demikian, dari pertumbuhan koloni-koloni bakteri ini diketahui bahwa koloni bakteri yang dapat membentuk zona hidrolisis hanya terjadi pada medium padat 2, dengan sifat pertumbuhan koloni yang cukup cepat.

Tabel 1.1. Pengaruh Medium Terhadap Pertumbuhan Koloni Bakteri.

Medium Padat	Pertumbuhan Koloni	Zona Hidrolisis
M 1	Lambat	Tidak terbentuk
M 2	Cepat	Terbentuk
M 3	Cepat	Tidak terbentuk
M 4	Tidak ada	Tidak terbentuk
M 5	Lambat	Tidak terbentuk
M 6	Cepat	Tidak terbentuk
M 7	Lambat	Tidak terbentuk
M 8	Cepat	Tidak terbentuk

Koloni bakteri yang memberikan zona hidrolisis ini selanjutnya diinokulasikan beberapa kali kedalam petri yang telah disterilkan (pada tekanan 1,5 Atm, suhu 121 °C, selama 15 menit) dan diinkubasikan (pada suhu 37 °C selama 48 jam), sampai terbentuk koloni-koloni yang terpisah satu sama lainnya.

d. Isolasi dan Identifikasi isolat

Koloni-koloni yang diperoleh dari hasil inokulasi dan inkubasi di tas, selanjutnya masing-masing di isolasi dan diidentifikasi.

Hasil pengamatan menunjukkan bahwa secara umum hasil isolasi koloni bakteri ini memberikan bentuk koloni yang cenderung membentuk bulatan-bulatan besar. Hasil pengujian pewarnaan dengan metilen blue, diketahui bahwa koloni bakteri yang mempunyai aktivitas protease adalah bakteri bacillus (berbentuk batang).

e. Pengukuran Deproteinasi Pada Kultur Cair

Hasil pengukuran protein sebelum dan sesudah hasil fermentasi pada berbagai kultur cair diketahui bahwa isolat yang diperoleh dari limbah udang ini mempunyai kemampuan menurunkan kadar protein dalam kultur cair. Hasil pengukuran kandungan protein ini

menunjukkan bahwa untuk inokulasi selama 48 jam pada suhu 37°C, isolat ini dapat menurunkan protein sebesar 31,90%.

Penurunan ini menunjukkan bahwa telah terjadi hidrolisis substrat protein oleh isolat bakteri melalui pembentukan enzim protease melalui pemutusan ikatan peptida pada senyawa protein.

f. Uji Aktivitas Proteolitik Mikroba

Hasil analisis kultur cair hasil fermentasi menunjukkan bahwa koloni bakteri dari limbah cangkang udang ini mempunyai aktivitas enzim sekitar 0,006U (unit/ml/menit). Nilai aktivitas enzim ini masih relatif rendah untuk dapat diterapkan didalam proses pembuatan chitin. Oleh karena itu, penelitian masih perlu dilakukan optimalisasi terhadap parameter-parameter yang digunakan guna meningkatkan aktivitas enzim ini.

4. KESIMPULAN DAN SARAN

4.1. Kesimpulan

Dari hasil pembahasan di atas dapat ditarik beberapa kesimpulan sebagai berikut:

1. Faktor pengenceran dalam skrining mikroba dapat mempengaruhi rapat/tidaknya pertumbuhan koloni bakteri pada medium inokulasi yang akan mempengaruhi proses isolasi bakteri selanjutnya. Skrining mikroba yang dilakukan terhadap limbah yang berasal dari limbah cangkang udang, inokulasi optimum dilakukan pada pengenceran 10^5 .
2. Pada suhu 37°C, pertumbuhan koloni bakteri menunjukkan zona hidrolisis disekitar tempat tumbuh koloni, sedangkan pada suhu 27°C, pertumbuhan koloni bakteri relatif lambat dan tidak terjadi zona hidrolisis di sekitar tempat tumbuh bakteri.
3. Selain pada pertumbuhan bakteri, suhu juga berpengaruh terhadap aktivitas enzim, dimana pada suhu tampak pada suhu 37°C dihasilkan zona bening yang mengidentifikasi terbentuknya enzim ekstraseluler yang dapat menghidrolisis ikatan peptida pada protein. Hal ini tidak tampak pada suhu 27°C.
4. Isolat yang dihasilkan dari isolasi bakteri dari limbah cangkang udang diperoleh isolat yang berbentuk batang (bacillus).

5. Pada suhu 37°C, isolat hasil isolasi dari limbah cangkang udang mempunyai kemampuan menurunkan kadar protein (deproteinasi) pada kultur cair 31,90%.
6. Analisis kultur cair hasil fermentasi diperoleh bahwa koloni bakteri yang berasal dari limbah cangkang udang mempunyai aktivitas enzim sekitar 0,006U (unit/ml/menit).
8. Pelczar, M.J.Jr., and E.C.S. Chan, 1981, *Elements of Microbiology*, International Student Edition, McGraw-Hill. Inc.
9. Novo, 1981, *Novo's Handbook of Practical Biotechnology*, Novo, Denmark.
10. Suhartono, M.T., 1989, *Enzim dan Bioteknologi*, PAU-Bioteknologi IPB.
11. Devlin, R.M., 1978, *Plant Physiology Part III*, East West Press. PVI Int., New Delhi.

4.2. Saran

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut yang meliputi kemungkinan isolasi bakteri proteolitik dari sumber lain, penentuan kondisi optimum untuk meningkatkan aktivitas bakteri, serta upaya pemurnian enzim yang diperoleh dari isolat bakteri.

DAFTAR PUSTAKA

1. Knorr, Dietrich, 1983, *Dye Binding Properties of Chitin and Chitosan*, Journal of Food Science, Vol. 43.
2. No, hong K., 1989, *Isolation and Characterization of Chitin from Crowfish Shell Waste*, Journal of Agriculture Food Chemistry.
3. Murzzarelli, R.A.A., 1985, *New Derivative of Chitin and Chitosan, New Developments in Industrial Polysaccharides*, Gordon and Beach Science Publishing, New York.
4. Teguh Prayudi dan Joko Prayitno Susanto, 2001, *Pengaruh Ukuran Partikel Chitosan Pada Proses Degradasi Limbah Cair Tekstil*, Jurnal Teknologi Lingkungan, Vol. 2 Nomor 3, BPPT, Jakarta.
5. Shimahara, K., Takiguchi, K., Kitamura, K. and Okada, O., 1984, *Chemical Composition And Some Properties of Crustacean Chitin, Prepared Use of Proteolytic of Pseudomonas Maltophilia LC-102. In Chitin, Chitosan and Related Enzymes*, p. 239, Zikakis, J.P. (ed). Academic Press, Inc., Orlando, San Diego, New York.
6. Santoso, U., 1990, *Studi tentang chitin cangkang udang (Penaeus merguensis) I : Isolasi menggunakan Actinase E dan EDTA*, Agritech 10 (3).
7. Nida Sopiah dan Joko Prayitno Susanto, 2002, *Jurnal Sains dan Teknologi Indonesia*, Vol. 3, Nomor 5, BPPT, Jakarta.