

**SKRINING DAN IDENTIFIKASI BAKTERI
PENGHASIL ENZIM KITINASE DARI AIR LAUT DI
PERAIRAN PANTAI PONDOK BALI**

Penelitian Mandiri

Tina Rostinawati, M.Si, Apt



**FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS PADJADJARAN
JATINANGOR
2008**

ABSTRAK

Enzim kitinase merupakan suatu enzim yang dapat mendegradasi atau melisis kitin. Kitin merupakan suatu komponen penyusun dari sebagian dinding sel jamur. Infeksi jamur biasanya diatasi dengan pemberian obat-obatan antijamur namun saat ini telah terjadi peningkatan kasus resistensi terhadap obat-obatan antijamur. Salah satunya pada jamur *Candida albicans* yang dilaporkan telah resisten terhadap beberapa macam obat golongan azol. Berdasarkan latar belakang tersebut maka diperlukan suatu alternatif obat antijamur. Telah dilakukan skrining dan identifikasi bakteri penghasil enzim kitinase dari air laut di perairan Pantai Pondok Bali, yang diambil dari tiga tempat yang berbeda yaitu jarak 300 m, 600 m, dan 900 m dihitung dari garis pantai. Pengujian aktivitas enzim kitinase ini dilakukan dengan menggunakan metode difusi agar secara induksi langsung. Dari lima isolat bakteri yang ditemukan, terdapat satu isolat bakteri yang memiliki aktivitas enzim kitinase, yang memiliki diameter A 1,28 cm, B 1,25 cm, C 1,26 cm, D 1,29 cm. Aktivitas antijamur dari enzim kitinase yang berasal dari isolat bakteri ini diuji terhadap jamur *Candida albicans*, enzim kitinase ini memiliki diameter zona lisis A 1,97 cm, B 2,03 cm, C 2,02 cm, D 1,84 cm. Isolat bakteri tersebut diidentifikasi dengan cara pengamatan morfologi, pewarnaan Gram, dan serangkaian uji biokimia (uji fermentasi karbohidrat, uji motil, uji indol, uji MR-VP, uji sitrat, dan uji TSIA). Hasil identifikasi menunjukkan bahwa genus isolat bakteri tersebut adalah *Bacillus*

Kata kunci : Enzim kitinase, antijamur, *bacillus*

ABSTRACT

Chitinase enzyme is an enzyme which can degradate or lysis chitin. Chitin is an component from a part of fungi's cell wall. Fungi's infection usually cure with antifungal drugs, but now there is an upgrading resistance cases to antifungal drugs, one of the case is resistance of Candida albicans to a variety of azoles. Based on this the alternative of antifungal drugs is need to be found. Screening and identification bacteria which produce chitinase enzyme from marine water in Pondok Bali Beach was done. The samples were taken by three different places, there were from 300 m, 600 m, and 900 m measured from coastal area. The test of the activity of this chitinase enzyme was done by the direct induction of agar diffusion method. From five isolated bacterium, there was one isolated bacteria which had chitinase enzyme activity. The diameter of lysis zone were A 1,28, B 1,25 cm, C 1,26 cm, D 1,29 cm and then the activity of isolated was tested against Candida albicans and the diameter of lysis zone were A 1,97 cm, B 2,03 cm, C 2,02 cm, D 1,84 cm. The identification of this isolated bacteria was done by morphologic observation, Gram staining, and biochemical test (fermentation carbohydrate test, motil test, indol test, MR-VP test, citrate test, and TSIA test). The result of the identification showed that genera of this isolated bacteria was Bacillus

Key words : Chitinase enzyme, antifungal, bacillus

KATA PENGANTAR

Segala puji dan syukur penulis panjatkan kehadirat Allah SWT, yang telah memberikan rahmat serta hidayah-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan penelitian mandiri yang berjudul “Skrining dan Identifikasi Bakteri Penghasil Enzim Kitinase dari Air Laut di Perairan Pantai Pondok Bali”. Penyusunan penelitian ini untuk memenuhi kelengkapan persyaratan untuk kenaikan pangkat di Fakultas Farmasi, Universitas Padjadjaran.

Penelitian ini merupakan penelitian awal untuk menskrining bakteri yang memiliki aktivitas enzim kitinase yang berasal dari biota laut. Penelitian ini dapat dijadikan penelitian awal untuk pencarian gen yang berperan dalam aktivitas enzim tersebut untuk rekayasa di bidang bioteknologi.

Jatinangor, Oktober 2008

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
ABSTRAK	i
<i>ABSTRACT</i>	ii
KATA PENGANTAR	iii
DAFTAR ISI	v
DAFTAR TABEL	viii
DAFTAR GAMBAR	ix
DAFTAR LAMPIRAN	x
 BAB I PENDAHULUAN	
1.1. Latar Belakang	1
1.2. Identifikasi Masalah	3
1.3. Tujuan Penelitian	3
1.4. Kegunaan Penelitian	3
1.5. Metode Penelitian	3
1.6. Waktu dan Tempat Penelitian	4
 BAB II TINJAUAN PUSTAKA	
2.1. Laut	5
2.1.1. Pengertian Laut	5
2.1.2. Salinitas	6

2.1.3. Bakteri Laut	6
2.1.4. Pantai Pondok Bali	7
2.2. Kitin	7
	Halaman
2.2.1 Pengertian Kitin	7
2.2.2 Struktur Kimia Kitin Struktur Kimia Kitin	8
2.2.3 Sifat Fisikokimia Kitin	8
2.2.4 Sumber-sumber Kitin	9
2.2.5 Cara Mengisolasi Kitin	10
2.3. Enzim Kitinase	11
2.3.1 Pengertian Enzim Kitinase	11
2.3.2 Penggolongan Enzim Kitinase	11
2.3.3 Bakteri Penghasil Enzim Kitinase	13
2.4. <i>Candida albicans</i>	14
2.4.1. Resistensi <i>Candida albicans</i>	15
2.4.2. Obat-obatan Antijamur	16
2.4.3 Obat Antijamur yang Resisten terhadap <i>Candida albicans</i>	17
2.4.4 Mekanisme Kerja Obat Antijamur yang Telah Resisten	17
2.4.5 Mekanisme Resistensi <i>Candida albicans</i> secara Molekular	19

BAB III BAHAN DAN METODE

3.1. Alat	20
-----------------	----

3.2. Bahan	20
3.2.1. Sampel Air Laut	20
3.2.2. Bahan Kimia	20
	Halaman
3.3. Metode Penelitian	21
3.3.1. Pengumpulan Sampel Air Laut	21
3.3.2. Isolasi Bakteri yang Berasal dari Air Laut	21
3.3.3. Pengujian Aktivitas Enzim Kitinase	22
3.3.4. Identifikasi Bakteri Penghasil Enzim Kitinase ...	23
3.3.5. Uji Aktivitas Enzim Kitinase Terhadap Jamur <i>Candida albicans</i>	26
 BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	
4.1. Isolasi Bakteri Air Laut dari Pantai Pondok Bali	27
4.2. Penapisan Bakteri Penghasil Enzim Kitinase	28
4.3. Pengujian Produk Ekstrasel	28
4.4. Identifikasi Bakteri Uji	29
4.5. Uji Aktivitas Antijamur	34
 BAB V SIMPULAN DAN SARAN	
5.1. Simpulan	35
5.2. Saran	35
DAFTAR PUSTAKA	36
LAMPIRAN	40

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
4.1. Hasil Pengamatan Morfologi Koloni Bakteri Air Laut dari Pantai Pondok Bali	27
4.2. Penapisan Bakteri Penghasil Enzim Kitinase	28
4.3. Diameter Zona Lisis Aktivitas Enzim Kitinase	29
4.4. Hasil Pengamatan Uji Biokimia	33
4.5. Hasil Pengamatan Uji Aktivitas Antijamur	34

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
2.1 Laut	5
2.2 Pantai Pondok Bali	7
2.3 Struktur Kimia Kitin	8
2.4 <i>Candida albicans</i>	14
4.1 Koloni bakteri air laut dari Pantai Pondok Bali	40
4.2 <i>Master Plate</i> bakteri air laut dari Pantai pondok Bali	41
4.3 Hasil penapisan isolat bakteri penghasil enzim kitinase	42
4.4 Diameter zona lisis koloni Pondok Bali 4	43
4.5 Hasil identifikasi bakteri	44
4.6 Hasil uji biokimia	45
4.7 Hasil uji aktivitas antijamur	46

DAFTAR LAMPIRAN

LAMPIRAN		Halaman
1	MORFOLOGI KOLONI BAKTERI AIR LAUT DARI PANTAI PONDOK BALI	40
2	MASTER PLATE BAKTERI AIR LAUT DARI PANTAI PONDOK BALI	41
3	HASIL PENAPISAN ISOLAT BAKTERI PENGHASIL ENZIM KITINASE	42
4	IDENTIFIKASI BAKTERI	44
5	UJI AKTIVITAS ANTIJAMUR	46

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Laut, seperti halnya daratan, dihuni oleh biota, yaitu tumbuh-tumbuhan, hewan dan mikroorganisme hidup. Biota laut menghuni hampir semua bagian laut, mulai dari pantai, permukaan laut sampai dasar laut yang terdalam. Keberadaan biota laut ini sangat menarik perhatian, karena manfaatnya yang besar bagi kehidupan manusia (Juwana dan Romimohtarto, 2007).

Air laut diduga banyak mengandung berbagai jenis bakteri. Bakteri laut merupakan salah satu mikroorganisme yang mampu menjaga kesinambungan kehidupan di dalam laut karena kemampuannya mendegradasi senyawa organik (Ruyitno, 2004). Air laut diduga mengandung bakteri yang dapat menghasilkan enzim kitinase. Enzim kitinase dihasilkan oleh bakteri, fungi, tanaman, dan hewan. Bakteri kitinolitik mengeluarkan kitinase sebagai sarana memperoleh nutrisi dan agen parasitisme (Toharisman, 2007). Bakteri kitinolitik memiliki kemampuan dalam menghidrolisis kitin menjadi derivat kitin. Derivat ini banyak dimanfaatkan dalam berbagai bidang seperti biokimia, bioteknologi, farmakologi, medis, dan industri misalnya sebagai bahan kosmetik, kapsul obat, dan makanan hewan (Muzzarelli, 1985). Kitinase dapat digunakan sebagai agensia antifungi dan teknologi protoplast fungi (Ohno, 1996).

Kitinase dari organisme laut berperan dalam proses daur ulang kitin. Dengan adanya kitinase penguraian kitin berlangsung berkesinambungan sehingga

tidak terjadi akumulasi dari sisa cangkang udang, kepiting, cumi-cumi dan organisme laut lainnya (Gooday, 1994). Kitinase merupakan enzim yang mampu menghidrolisis polimer kitin menjadi monomern N-asetilglukosamin atau kitin oligosakarida. Enzim ini dihasilkan oleh bakteri, tanaman, dan hewan (Cohen-Kupiec and Chet, 1998).

Pada dasawarsa terakhir, disinyalir adanya peningkatan kasus infeksi oleh jamur. Kasus yang utama adalah infeksi mukosa mulut, usus, dan vagina oleh jamur *Candida albicans* (Rahardja dan Tjay, 2003). Diagnosis laboratorium dan pengobatan terhadap penyakit yang disebabkan oleh *Candida albicans* belum memberikan hasil yang memuaskan (Ellepola and Morrison, 2005). Resistensi terhadap antijamur juga sering terjadi (Ha and White, 1999). Pembentukan biofilm pada *Candida albicans* dapat menjadi salah satu faktor terjadinya resistensi, adapun obat-obatan antijamur yang dikabarkan resisten terhadap biofilm *Candida albicans* adalah golongan azole, amfoterisin B, flusitosin, dan nistatin (Prasanna *et al.*, 2006).

Berdasarkan latar belakang tersebut maka pada penelitian ini dilakukan skrining dan identifikasi bakteri air laut yang dapat menghasilkan enzim kitinase yang kedepannya dapat menjadi salah satu alternatif zat antijamur.

1.2 Identifikasi Masalah

Air laut diduga mengandung bakteri penghasil enzim kitinase. Dengan demikian perlu dilakukan skrining dan identifikasi bakteri penghasil enzim kitinase yang terdapat dalam air laut, yang diharapkan dapat digunakan sebagai alternatif penghasil enzim kitinase yang berguna sebagai antijamur.

1.3 Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk menskrining dan mengidentifikasi bakteri penghasil enzim kitinase yang terdapat dalam air laut serta menguji aktivitas enzim kitinase tersebut terhadap jamur *Candida albicans*.

1.4 Kegunaan Penelitian

Dari penelitian ini diharapkan dapat memperoleh bakteri penghasil enzim kitinase dari air laut sehingga dapat digunakan sebagai alternatif sumber penghasil enzim kitinase yang dapat digunakan sebagai antijamur.

1.5 Metode Penelitian

Penelitian ini dilakukan dengan beberapa tahap, yaitu:

1. Pengumpulan Sampel Air Laut dari Pantai Pondok Bali
2. Isolasi Bakteri yang Berasal dari Air Laut Pantai Pondok Bali
 - a. Penyiapan Media Uji
 - b. Isolasi Bakteri
 - c. Pembuatan *Master Plate* Koloni Bakteri

3. Pengujian Aktivitas Enzim Kitinase
 - a. Penyiapan Kitin
 - b. Penyiapan Media Uji
 - c. Pengujian Aktivitas Bakteri Penghasil Enzim Kitinase
4. Identifikasi Bakteri Penghasil Enzim Kitinase
 - a. Pengamatan Morfologi Koloni Bakteri
 - b. Pewarnaan Gram
 - c. Uji Biokimia, meliputi:
 - i. Uji Fermentasi Karbohidrat
 - ii. Uji Motil Indol Urea (MIU)
 - iii. Uji Sitrat
 - iv. Uji Metil Red (MR)
 - v. *Voges-Proskauer* (VP)
5. Uji Aktivitas Antijamur terhadap Jamur *Candida albicans*

1.6 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Februari 2009 hingga April 2009, yang bertempat di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Farmasi, Universitas Padjadjaran.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Laut

2.1.1 Pengertian Laut

Laut adalah bagian dari bumi kita yang tertutup oleh air asin. Kata laut telah dikenal sejak dulu oleh bangsa kita dan bahkan oleh bangsa-bangsa di beberapa negara di Asia Tenggara seperti Filipina, Malaysia, Thailand, Singapura dan mungkin beberapa suku bangsa lain di kawasan ini. Laut lepas yang luas yang dibatasi oleh benua-benua kita kenal sebagai samudera.



Gambar 2.1 Laut

Laut seperti halnya daratan, dihuni oleh biota, yaitu tumbuh-tumbuhan, hewan, dan mikroorganisme hidup. Biota laut menghuni hampir semua bagian laut yang terdalam sekalipun. Keberadaan biota laut ini sangat menarik perhatian manusia, bukan saja karena kehidupannya yang penuh rahasia, tetapi juga karena manfaatnya yang besar bagi kehidupan manusia (Juwana dan Romimohtarto, 2007).

2.1.2 Salinitas

Untuk mengukur keasinan air laut digunakan istilah salinitas. Seperti diketahui, air laut memiliki rasa yang asin karena mengandung garam. Menurut teori, zat-zat garam tersebut berasal dari dalam dasar laut melalui proses *outgassing*, yaitu rembesan dari kulit bumi di dasar laut yang berbentuk gas ke permukaan laut (Juwana dan Romimohtarto, 2007).

2.1.3 Bakteri Laut

Air laut mengandung mikroorganisme yang dapat dikelompokkan ke dalam dua grup, yaitu :

1. Bakteri *indigenous* yang tidak tumbuh pada medium tanpa air laut, misalnya *Beggiatoa*, *Thiothrix*, *Thiovolum*, dan *Thiobacillus*.
2. Bakteri transien yang habitat alaminya bukan air laut, tetapi tahan terhadap garam sehingga dapat hidup di dalam air laut, misalnya *Bacillus*, *Corynebacterium*, *Actinomyces*, dan *Sarcina*.

Selain itu di dalam air laut juga mungkin terdapat bakteri halofilik, yaitu bakteri yang membutuhkan konsentrasi garam tertentu untuk pertumbuhannya *Spirillum*, *Vibrio parahaemolyticus* (Fardiaz, 2002).

1.1.4. Pantai Pondok Bali

Pondok Bali merupakan kawasan wisata andalan di Kabupaten Subang. Pantai Pondok Bali merupakan salah satu pantai yang terletak di kawasan pantai utara Pulau Jawa. Pantai Pondok Bali terletak di Pamanukan, tepatnya di Desa Mayangan, Kecamatan Legonkulon, Kabupaten Subang Utara, Jawa Barat.



Gambar 2.2 Pantai Pondok Bali

Kabupaten Subang mempunyai garis pantai sepanjang 68 km. Garis pantai membentang mulai dari sebelah utara Kecamatan Blanakan hingga Kecamatan Pusakanegara. Salah satu bagian dari pantai utara Kabupaten Subang adalah Pantai Pondok Bali (Rusli, 2005).

2.2 Kitin

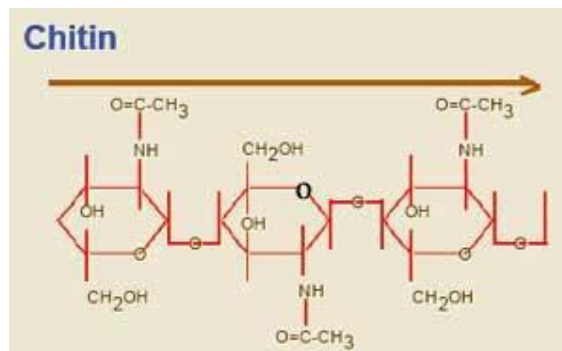
2.2.1 Pengertian Kitin

Kitin merupakan konstituen utama dari eksoskeleton serangga dan *arthropoda* lain serta ditemukan pula pada fungi. Kitin merupakan polimer yang kuat, resisten terhadap air. Kitin terdiri atas rantai-rantai panjang derivat gula yang ditambah sebuah gugus nitrogen.

Kitin merupakan polimer kedua terbanyak di alam setelah selulosa. Kitin memiliki struktur yang mirip selulosa, karena keduanya memiliki kelarutan sangat rendah dalam air serta mengalami biodegradasi melalui mekanisme yang hampir serupa dengan melibatkan kompleks enzim (Skjak-Braek, 1989).

2.2.2 Struktur Kimia Kitin

Kitin mempunyai rumus empiris $(C_6H_9O_4 \cdot NHCOCH_3)_n$, merupakan zat padat yang tidak larut air, pelarut organik, alkali pekat, asam mineral lemah, tetapi larut dalam asam-asam mineral yang pekat. Polisakarida ini mempunyai berat molekul tinggi dan merupakan polimer berantai lurus dengan nama lain β -(1-4)-2-asetamida-2-dioksi-D-glukosa (N-asetil-D-glukosamin) (Richards, 1951).



Gambar 2.3 Struktur Kimia Kitin

2.2.3 Sifat Fisikokimia Kitin

Kitin berbentuk padat, amorf, tidak berwarna, tidak larut dalam air, asam encer, alkohol dan semua pelarut organik lainnya, tetapi kitin dapat larut dalam fluoroalkohol dan asam mineral pekat (Richards, 1951).

Rantai kitin antara satu dengan yang lainnya berasosiasi dengan ikatan hidrogen yang sangat kuat antara gugus N-H dari satu rantai dan gugus C=O dari rantai yang berdekatan. Ikatan hidrogen menyebabkan kitin tidak dapat larut dalam air dan membentuk formasi serabut (Cabib, 1987).

2.2.4 Sumber-Sumber Kitin

Kitin di alam dapat ditemui pada alga, nematoda, kelompok arthropoda, crustaceae, mollusca, protozoa, dan fungi. (Harman, 1993). Sumber kitin terbanyak diperoleh dari kelas Crustacea seperti udang, rajungan, dan kepiting. Sebagian limbah udang yang dihasilkan oleh pengusaha pengolahan udang berasal dari kepala, kulit, dan ekornya. Kulit udang mengandung protein (25-40%), kitin (15-20%) dan kalsium karbonat (45-50%) (Muzzarelli, 1985).

Kandungan kitin dari kulit udang lebih sedikit dibandingkan berasal dari kulit atau cangkang kepiting. Kandungan kitin pada limbah kepiting mencapai 50-60%, sedangkan limbah udang menghasilkan 42-57%, sedangkan cumi-cumi dan kerang masing-masing 40% dan 14-35%. Namun karena bahan baku yang diperoleh yang mudah diperoleh adalah udang, maka proses untuk mendapatkan kitin dan kitosan biasanya lebih memanfaatkan limbah udang (Marganof, 2003).

Pada serangga mengandung 80% komponen kutikulannya merupakan kitin. Pada Crustaceae, kitin melekat pada suatu matriks dari CaCO_3 dan fosfat. Kitin pada alga terutama ditemukan diatom laut dengan kandungan 10-15% berat kering. Lebih dari 80.000 ton kitin per tahun dihasilkan di perairan. Kitin pada jamur berbentuk mikrofibril yang memiliki panjang yang berbeda bergantung

pada spesies dan lokasi selnya. Kandungan kitin pada jamur bervariasi antara 4-9% berat kering sel (Rajarathanam *et al.*, 1998).

2.2.5 Cara Mengisolasi Kitin

Isolasi kitin dari limbah udang dilakukan secara bertahap. Tahap awal dimulai dengan pemisahan mineral-mineral dalam limbah udang dengan larutan asam yang disebut demineralisasi, kemudian proses pemisahan protein dengan larutan basa yang disebut deproteinasi, dan yang terakhir proses pemutihan dengan aseton dan natrium hipoklorit.

Adapun teknologi pengolahan tersebut dilakukan melalui beberapa tahap, yaitu:

1. Demineralisasi

Limbah cangkang udang dicuci dengan air mengalir dan dikeringkan di bawah sinar matahari sampai kering, kemudian dicuci dalam air panas dua kali lalu direbus selama 10 menit kemudian ditiriskan dan dikeringkan. Bahan yang sudah kering lalu digiling sampai menjadi serbuk ukuran 40-60 mesh kemudian dicampur asam klorida 1 N (HCl 1 N) dengan perbandingan 10 : 1 untuk pelarut dibandingkan dengan kulit udang, lalu diaduk merata kemudian didiamkan selama 13 jam setelah itu dipanaskan pada suhu 90°C selama satu jam. Residu berupa padatan dicuci dengan air sampai pH netral dan selanjutnya dikeringkan dalam oven pada suhu 80°C selama 24 jam atau dijemur sampai kering.

2. Deproteinasi

Limbah udang yang telah dimineralisasi dicampur dengan larutan natrium hidroksida dengan perbandingan antara pelarut dan cangkang udang 6 : 1. Diaduk sampai merata kemudian didiamkan selama 13 jam setelah itu dipanaskan pada suhu 90°C selama satu jam. Larutan lalu disaring dan didinginkan sehingga diperoleh residu padatan yang kemudian dicuci dengan air sampai pH netral dan dikeringkan pada suhu 80°C selama 24 jam atau dijemur sampai kering. Bentuk akhir dari kitin bisa berbentuk serbuk maupun serpihan (Hartati, 2002)

2.3 Enzim Kitinase

2.3.1 Pengertian Enzim Kitinase

Kitinase merupakan enzim yang mampu menghidrolisa polimer kitin menjadi kitin oligosakarida atau monomer *n*-asetilglukosamin. Enzim ini dihasilkan oleh bakteri, tanaman, dan hewan (Cohen-Kupiec and Chet, 1998). Kitinase tersebar mulai dari bakteri, serangga, virus, tumbuhan, dan hewan (Ohno *et al.*, 1996). Kitinase memainkan peranan yang penting dalam fisiologi dan ekologi (Saito *et al.*, 1998).

2.3.2 Penggolongan Enzim Kitinase

Enzim kitinase berdasarkan cara kerjanya dalam mendegradasi substrat dikelompokkan kedalam dua tipe yaitu :

1. Endokitinase, yaitu kitinase yang memotong secara acak ikatan β -1,4 bagian internal mikrofibril kitin. Produk akhir yang terbentuk bersifat mudah larut berupa oligomer pendek N-asetilglukosamin (GlcNAc) yang memiliki berat molekul rendah seperti kitotetraose.
2. Eksokitinase dinamakan juga kitobiosidase atau kitin 1,4- β -kitobiosidase, yaitu enzim yang mengkatalisis secara aktif pembebasan unit-unit diasetilkitibiosidase tanpa ada unit-unit monosakarida atau oligosakarida yang dibentuk. Pemotongan hanya terjadi pada ujung non reduksi mikrofibril kitin dan tidak secara acak.

Enzim kitinase berdasarkan homolog sekuen asam aminonya dibedakan atas dua famili, yaitu :

1. Famili 18

Famili 18 dibagi menjadi dalam tiga sub famili yaitu A, B, dan C. Famili 18 meliputi kitinase dari virus, bakteri, jamur, dan hewan, serta kelas III dan V merupakan kitinase dari tumbuhan (Gijzen *et al.*, 2001).

2. Famili 19

Famili 19 mencakup kelas I, II, dan IV yang berasal dari tumbuhan. Tanaman mengeluarkan kitinase untuk mempertahankan diri dari serangan patogen. (Gooday, 1994). Kitinase kelas IV famili 19 selain tersebar pada tanaman juga ditemukan tersebar pada *Streptomyces sp* (Ohno *et al.*, 1996). Kitinase

tanaman kelas I dengan kitinase tanaman kelas II secara struktural homolog, tetapi kitinase kelas II tidak memiliki domain kaya *cystein* seperti kitinase kelas I. Sementara, kitinase kelas III dan V tidak memiliki homologi dengan kitinase kelas I, II, dan IV (Fukamizo, 2000).

2.3.3 Bakteri Penghasil Enzim Kitinase

Bakteri kitinolitik dapat menghasilkan berbagai enzim kitinase, walaupun kontribusi enzim untuk degradasi kitin belum diketahui secara menyeluruh. Bakteri dan jamur merupakan organisme yang mampu memanfaatkan kitin sebagai sumber karbon dan nitrogen. Genus bakteri yang sudah banyak dilaporkan memiliki kitinase antara lain *Aeromonas*, *Alteromonas*, *Chromobacterium*, *Enterobacter*, *Ewingella*, *Pseudoalteromonas*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Vibrio* (Gooday, 1994), *Bacillus*, dan *Pyrococcus* (Harman *et al.*, 1993).

Bakteri mengeluarkan kitinase sebagai sarana memperoleh nutrisi dan agen parasit, sementara fungi, protozoa dan invertebrata mengeluarkan enzim tersebut untuk proses morfogenesis (Gooday, 1994).

Kitinase dari organisme laut berperan dalam proses daur ulang kitin. Banyak bakteri dan fungi mengeluarkan kitinase untuk menguraikan kitin menjadi karbon dan nitrogen. Dua senyawa terakhir ini selanjutnya dipakai sebagai sumber energi biota lainnya. Dengan adanya kitinase penguraian kitin berlangsung kontinyu sehingga tidak terjadi akumulasi kitin dari sisa cangkang udang, kepiting, cumi-cumi dan organisme laut lainnya. Secara alami, kitinase dihasilkan serangga untuk proses morfogenesis. Dalam perkembangan

pertumbuhan serangga, kitin pada kutikel tua didegradasi kitinase, kemudian diganti kitin baru hasil enzim kitin sintase. Proses ini terus berlangsung selama siklus pertumbuhan serangga (Gooday, 1994).

2.4. *Candida albicans*

Candida albicans merupakan flora normal yang terdapat pada saluran cerna, saluran pernafasan bagian atas, kulit, dan mukosa genital. *Candida albicans* memiliki struktur dinding sel yang kompleks, tebalnya 100 sampai 400 nm. Komposisi primer terdiri dari glukukan, manan, kitin (Brown *et al.*, 2005).



Gambar 2.4 *Candida albicans*

Candida albicans dalam populasi yang meningkat dapat menimbulkan masalah. *Candida albicans* merupakan fungi penyebab sariawan (Kumamoto and Vines, 2004), lesi pada kulit, vulvaginitis (Wilson, 2005), *candiduria* atau infeksi candida pada saluran kemih (Kobayashi *et al.*, 2004), *gastrointestinal candidiasis* yang dapat menyebabkan *gastric ulcer* (Brzozowski *et al.*, 2005), atau bahkan dapat menjadi komplikasi kanker (Dinubile *et al.*, 2005). Diagnosis laboratorium dan pengobatan terhadap penyakit yang disebabkan oleh *Candida albicans* belum

memberikan hasil yang memuaskan (Ellepola and Morrison, 2005). Resistensi terhadap antifungi juga sering terjadi (Ha and White, 1999).

2.4.1 Resistensi *Candida albicans*

Kemampuan suatu mikroorganisme untuk mempengaruhi lingkungannya diantaranya tergantung pada kemampuannya untuk membentuk suatu komunitas. *Candida albicans* membentuk komunitasnya dengan membentuk ikatan koloni yang disebut biofilm (Nobile and Mitchell, 2005). Biofilm berfungsi sebagai pelindung sehingga mikroorganisme yang membentuk biofilm memiliki resistensi terhadap antimikroba biasa (Nikawa *et al.*, 1997). Hasil *scanning* mikroskop elektron menunjukkan bahwa biofilm *Candida albicans* yang matang berisi sel dalam bentuk khamir maupun hifa yang menyisip dan terikat rapat pada bahan ekstraseluler yang biasanya berbentuk fibrous (Andes *et al.*, 2004).

Secara struktur, biofilm terbentuk dari dua lapisan, yaitu lapisan basal yang tipis yang merupakan lapisan khamir dan lapisan luar yang merupakan lapisan hifa yang lebih tebal tetapi lebih renggang (Baillie and Douglas, 1999). Adapun dinding sel *Candida albicans* terdiri dari enam lapisan, dari luar ke dalam adalah lapisan fibrillar, manoprotein, β -glukan, β -glukan-kitin, manoprotein, dan membran plasma (Cotter and Kavanagh, 2000). Faktor yang dapat mempengaruhi pembentukan biofilm pada *Candida albicans* adalah, ketersediaan udara. Ketersediaan udara akan mendukung pembentukan biofilm. Pada kondisi anaerob, *Candida albicans* dapat membentuk hifa tetapi tidak mampu membentuk biofilm (Biswas and Chaffin, 2005).

2.4.2 Obat-obatan antijamur

Obat-obatan antijamur dapat digolongkan sebagai berikut:

1. Antibiotika : griseofulvin dan antibiotika polyen : amfoterisin B, nistatin, dan natamisin, yang pada umumnya bekerja fungistatis. Mekanisme kerjanya adalah dengan melalui pengikatan diri pada ergosterol yang mutlak diperlukan jamur untuk pembentukan dinding selnya. Akibatnya adalah keusakan membran sel dan peningkatan permeabilitasnya, sehingga komponen intraseluler yang penting untuk kehidupan sel keluar dan akhirnya sel-sel jamur tersebut akan mati.
2. Derivat imidazol : mikonazol, ketokonazol, klotrimazol, bifonazol, ekonazol, isokonazol, dan tiokonazol. Mekanisme kerjanya berdasarkan pada pengikatan pada enzim sitokrom P450, sehingga sintesis ergosterol dirintangi dan terjadi kerusakan membran sel. Bekerja fungistatis dan bakteristatis lemah terhadap bakteri Gram-positif.
3. Derivat triazol : flukonazol, itrakonazol, dan terkonazol. Pada umumnya bekerja fungistatis dengan mekanisme kerja seperti imidazol, tetapi bersifat lebih selektif terhadap sistem enzim jamur manusia. Bekerja terhadap dermatofit dan *Candida sp.*
4. Asam-asam organik : asam benzoat, asam salisilat, asam propionat, asam kaprilat, dan asam undesilat. Mekanisme kerjanya bersifat keratolitik.
5. Lainnya : terbinafin, tolnaftat, haloprogin, naftifin, sikopiroks, selensulfida, dan piriton (Rahardja dan Tjay, 2003).

2.4.3 Obat Antijamur yang Resisten terhadap *Candida albicans*

Dilaporkan bahwa biofilm *Candida albicans* telah resisten terhadap beberapa obat antijamur diantaranya beberapa macam obat-obatan golongan azole, termasuk didalamnya flukonazol, voriconazol, mikonazol, itrakonazol, ketokonazol, klorheksidin, flusitosin, nistatin, dan amfoterisin B. Adapun kebanyakan mekanisme obat-obat antijamur bekerja dalam hal menghambat sintesis ergosterol dimana sterol merupakan membran utama sel jamur (Prasanna *et al.*, 2006).

2.4.4 Mekanisme Kerja Obat Antijamur yang Telah Resisten :

1. Amfoterisin B

Mekanisme kerja : Amfoterisin B bekerja mengikat ergosterol, yaitu sterol dasar di dalam membran sel jamur, sehingga menyebabkan rusaknya fungsi pelindung membran, hilangnya konstituen sel, gangguan metabolisme, dan kematian sel. Selain menimbulkan efek-efek permeabilitas membran, amfoterisin B juga dapat menyebabkan gangguan oksidasi pada sel-sel jamur. Membran sel manusia juga mengandung sterol oleh karena itu amfoterisin B dapat bersifat racun, karena dapat ikut merusak sel-sel pada manusia.

2. Flusitosin

Mekanisme kerja : Flusitosin dibawa ke dalam sel-sel jamur oleh permease cytosine dan kemudian diubah menjadi 5-fluorouracil cytosine yang mengikat RNA sebagai pengganti urasil. Proses ini membuat sintesis protein menjadi

tidak normal. Selain itu flusitosin juga menghambat sintesis timidilat sehingga menyebabkan terganggunya sintesis DNA.

3. Ketokonazol

Mekanisme kerja : Ketokonazol berinterferensi dengan biosintesis ergosterol, sehingga menyebabkan perubahan sejumlah fungsi sel yang berhubungan dengan membran.

4. Itrakonazol

Mekanisme kerja : Itrakonazol berinterferensi dengan enzim yang dipengaruhi oleh *cytochrome P-450, 14-demethylase*. Interferensi ini menyebabkan akumulasi *14-methylsterol* dan menguraikan ergosterol di dalam sel-sel jamur.

5. Flukonazol

Mekanisme kerja : Flukonazol berinterferensi dengan ergosterol, sehingga menyebabkan perubahan sejumlah fungsi sel yang berhubungan dengan membran.

6. Mikonazol

Mekanisme kerja : Mikonazol bekerja dengan cara berinterferensi dengan biosintesis ergosterol, sehingga menyebabkan perubahan sejumlah fungsi sel yang berhubungan dengan membran. Mikonazol berinteraksi dengan lemak-lemak membran sehingga menyebabkan kerusakan membran secara langsung yang pada akhirnya berlanjut pada kerusakan konstituen-konstituen sel.

7. Griseofulfin

Mekanisme kerja : Griseofulfin bekerja melalui pengikatan diri pada ergosterol yang mutlak dibutuhkan jamur untuk pembentukan dinding sel

jamur, akibatnya adalah kerusakan membran sel dan peningkatan permeabilitasnya sehingga komponen intraseluler yang penting untuk kehidupan sel keluar dan akhirnya sel-sel tersebut mati (Rahardja dan Tjay, 2003).

2.4.5 Mekanisme Resistensi *Candida albicans* secara molekular

Candida albicans dapat mengalami resistensi salah satunya terhadap obat-obat golongan azol, mekanisme yang terjadi karena adanya perubahan dari target enzim, yaitu pada P-450 lanosterol 14 α -demetilase, dimana gen pengkodennya adalah (Erg11p). Pada *Candida albicans* yang mengalami resistensi terjadi mutasi sehingga membutuhkan konsentrasi azol dalam sel yang lebih tinggi untuk membentuk molekul enzim di dalam sel, dan akhirnya menyebabkan substitusi asam amino yang dapat menyebabkan penurunan afinitas derivat azol (Perea *et al.*,2001).

BAB III

BAHAN DAN METODE

3.1 Alat

Alat sentrifugasi (Hettick), cawan petri (Pyrex), erlenmeyer (Pyrex), jangka sorong (Vernier Caliper), mikroskop (Olympus), mikropipet (Socorex), ose, outoklaf (Hirayama), oven (Memmert), penangas listrik (Toyomi), pinset, rak tabung reaksi, spatel, tabung eppendorf 1,5 mL, tabung reaksi (Duran), timbangan analitik (Mettler Toledo).

3.2 Bahan

3.2.1 Sampel Air Laut

Sampel air laut yang berasal dari Pantai Pondok Bali, Subang, Jawa Barat.

3.2.2 Bahan Kimia

Agar *Simmon Citrate* (Difco), air fuksin, air suling, alkohol 95%, *barrit* (Merck), fenol merah, glukosa (Merck), indikator metil merah (Merck), Kalium Hidroksida 0.1 N (Merck), karbol gential violet (CGV), *kovac*, laktosa (Merck), lugol, maltosa (Merck), manitol (Oxoid), minyak imersi, motil indol (Difco), *Nutrient Agar* (Oxoid), *Nutrien Broth* (Pronadisa), *Potato Dextrose Agar* (Oxoid), sukrosa (Merck), *α-naftol* (Merck).

3.3 Metode Penelitian

Penelitian ini dilakukan dengan beberapa tahapan, yaitu:

3.3.1 Pengumpulan sampel air laut

Sebanyak 1 ml air laut disuspensikan ke dalam medium *Nutrient Broth* (NB), kemudian suspensi tersebut diinkubasi pada suhu 37° C selama 18- 24 jam. Sampel air laut yang disuspensikan diambil dari 3 tempat yang berbeda dihitung dari garis pantai, yaitu 300 m, 600 m, dan 900 m.

3.3.2 Isolasi Bakteri yang Berasal dari Air Laut

1. Penyiapan Media Uji

Media *Nutrient Agar* (NA) dituangkan ke dalam cawan petri dan dibiarkan membeku.

2. Isolasi Bakteri

Isolasi bakteri dilakukan menggunakan metode cawan gores. Satu ose suspensi bakteri digoreskan pada media uji dan diinkubasikan pada suhu 37° C selama 18-24 jam.

3. Pembuatan *Master Plate* Koloni Bakteri

Isolat bakteri dari berbagai koloni yang tumbuh digoreskan pada media uji untuk *master plate* dan diinkubasikan pada suhu 37° C selama 18-24 jam.

3.3.3 Pengujian Aktivitas Enzim Kitinase

1. Penyiapan Kitin

Limbah udang yang sudah dikeringkan, ditimbang lalu diberi perlakuan sebagai berikut :

a. Demineralisasi

Kulit udang ditambahkan HCl 1 N (1:10) diaduk, didiamkan selama 13 jam. Kemudian cairan kulit udang tersebut dipanaskan sambil diaduk selama 1 jam pada suhu 90°C. Kemudian cairan tersebut disaring, sehingga diperoleh endapan. Endapan tersebut dicuci dengan air suling sampai pH netral kemudian dikeringkan.

b. Deproteinasi

Hasil dari proses demineralisasi ditambahkan NaOH (1:6) diaduk dan didiamkan selama 13 jam pada suhu 90°C. Kemudian cairan tersebut disaring, endapan yang diperoleh dicuci dengan air suling hingga pH netral kemudian dikeringkan. (Hartati, 2002).

2. Penyiapan Media Uji

Sebanyak 2 % kitin disuspensikan ke dalam media NA

3. Pengujian Aktivitas Enzim Kitinase

Masing-masing koloni pada *master plate* diambil 1 ose, kemudian digoreskan pada media uji. Aktivitas enzim kitinase ditunjukkan dengan terbentuknya zona lisis pada sekitar koloni. Kemudian suspensi bakteri yang memberikan aktivitas enzim kitinase diujikan dengan metode difusi agar dengan cara perforasi. Adapun caranya adalah sebagai berikut :

a. Penyiapan Suspensi Bakteri Penghasil Enzim Kitinase

Satu ose koloni bakteri penghasil enzim kitinase disuspensikan dalam media NB dan dinkubasikan pada suhu 37°C selama 18-24 jam. Kekeruhan suspensi dibandingkan dengan bilangan *Mc Farland* pada 10^3

b. Penyiapan Media Uji

Sebanyak 2% kitin disuspensikan ke dalam media NA. Media NA tersebut dilubangi menggunakan perforator.

c. Pengujian Aktivitas Enzim

Suspensi bakteri uji sebanyak 50 μL dimasukkan ke dalam lubang pada media uji. Kemudian media uji tersebut diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam. Aktivitas enzim kitinase ditunjukkan dengan terbentuknya zona lisis pada sekitar koloni. Semakin besar zona lisis yang terbentuk, maka semakin besar pula aktivitas enzim kitinase yang dimiliki bakteri uji tersebut.

3.3.4 Identifikasi Bakteri Penghasil Enzim Kitinase

1. Pengamatan Morfologi Koloni

Pengamatan morfologi koloni meliputi bentuk dan warna koloni.

2. Pewarnaan Gram

Pewarnaan Gram dilakukan untuk membedakan bakteri gram positif dan gram negatif. Bakteri uji dioleskan di atas kaca objek dan difiksasi diatas api. Olesan tersebut digenangi dengan Karbol gentian violet selama satu menit dan digenangi kembali dengan lugol selama satu menit. Olesan tersebut di cuci

dengan pemucat alkohol 95% selama tiga puluh detik, dan dibilas dengan air suling. Olesan tersebut digenangi dengan pewarna air fuksin selama tiga puluh detik hingga zat warna tersebut larut, kemudian dibilas dengan air suling. Olesan tersebut dikeringkan menggunakan kertas saring, kemudian ditetesi dengan minyak imersi dan diamati di bawah mikroskop.

3. Uji Biokimia

a. Uji Fermentasi Karbohidrat

Koloni yang akan diidentifikasi diambil menggunakan ose. Koloni tersebut diinokulasikan ke dalam tabung-tabung yang masing-masing berisi glukosa, laktosa, manosa, maltosa, dan sukrosa. Ke dalam masing-masing larutan gula tersebut ditambahkan indikator *phenol red* (fenol merah) dan dimasukkan tabung durham dengan posisi terbalik. Suspensi mikroba tersebut diinkubasikan pada suhu 37° C selama 18-24 jam. Bila warna medium berubah menjadi kuning, artinya koloni tersebut membentuk asam dari fermentasi karbohidrat. Bila pada tabung durham terdapat gelembung udara, artinya dari fermentasi tersebut terbentuk gas.

b. Uji Motil Indol Urea (MIU)

Koloni yang akan diidentifikasi diambil menggunakan ose. Koloni diinokulasi pada satu media uji motil indol urea yang berupa agar semi solid dengan cara ditusuk. Media diinkubasikan pada suhu kamar selama 18-24 jam. Pergerakan bakteri ditunjukkan dengan adanya penyebaran koloni di sekitar tusukan. Reaksi urea positif ditunjukkan perubahan warna media menjadi merah muda. Reaksi indol positif ditunjukkan dengan

penambahan pereaksi *kovac* yang kemudian akan menghasilkan cincin merah di atas permukaan, dan menunjukkan negatif jika menghasilkan cincin jingga di atas permukaan.

c. Uji Sitrat

Koloni yang akan diidentifikasi diambil menggunakan ose. Kobi ditanamkan secara gores zig-zag pada media perbenihan *simmons citrate* yang berupa agar miring. Kemudian media diinkubasikan pada suhu 37° C selama 18-24 jam. Koloni berwarna biru menunjukkan hasil positif sedangkan koloni berwarna hijau menunjukkan reaksi negatif.

d. Uji Metil Red (MR)

Koloni yang akan diidentifikasi diambil menggunakan ose. Kobi diinokulasi pada media MR-VP. Media diinkubasikan pada suhu 37° C selama 18-24 jam. Kemudian ditambahkan tiga sampai empat tetes indikator merah metil. Warna merah menunjukkan reaksi positif.

e. Uji *Voges – Proskauer* (VP)

Koloni yang akan diidentifikasi diambil menggunakan ose. Kobi diinokulasi pada media MR-VP. Media diinkubasikan pada suhu 37° C selama 18-24 jam. Kemudian ditambahkan reagen *Barrit*. Suspensi tersebut dikocok selama 20-30 detik. Reaksi VP positif, bila terjadi pembentukan asam yang ditandai berubahnya warna medium menjadi merah muda setelah penambahan pereaksi *Barrit*.

3.3.5 Uji Aktifitas Enzim Kitinase terhadap Jamur *Candida albicans*.

1. Penyiapan Jamur uji

Sato ose *Candida albicans*, dilarutkan dalam sejumlah NaCl fisiologis, kemudian sebanyak 50 μ L suspensi *Candida albicans* dimasukkan ke dalam cawan.

2. Penyiapan Media Uji

Media *Potato Dextrose Agar* (PDA) dituangkan ke dalam cawan petri steril yang telah diberi suspensi *Candida albicans* kemudian digoyang hingga suspensi jamur tercampur rata dengan PDA, diamkan hingga membeku. Setelah beku lubangi PDA dengan menggunakan perforator.

3. Pengujian aktifitas Enzim Kitinase Sebagai Antijamur

Suspensi bakteri ditambahkan serbuk kitin kemudian diinkubasikan pada suhu 37⁰ C selama 18-24 jam Hasil inkubasi disentrifugasi dengan kecepatan 2000 rpm selama 20 menit. Setelah disentrifugasi bagian supernatannya diambil dan disuspensikan ke dalam media yang telah dilubangi dengan perforator sebanyak 50 μ L, kemudian diinkubasikan dengan suhu \pm 37⁰ C selama 18-24 jam. Adanya aktivitas antijamur dilihat dari terbentuknya zona bening disekitar lubang.

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Isolasi Bakteri Air Laut dari Pantai Pondok Bali

Isolasi ini dilakukan untuk mendapatkan koloni tunggal bakteri. Terdapat beberapa koloni tunggal berdasarkan jarak pengambilan sampel air laut dan dari bentuk koloni yang terbentuk. Hasil isolasi dapat dilihat pada Tabel 4.1 dan Lampiran 1 Gambar 4.1

Tabel 4.1 Hasil Pengamatan Morfologi Koloni Bakteri Air Laut dari Pantai Pondok Bali

Isolat Bakteri	Jarak Pengambilan Sampel	Warna Koloni	Bentuk Koloni
1	300 m	Putih	Bulat kecil
2	600 m	Putih	Bulat lebar
3	600 m	Putih	Bulat kecil
4	900 m	Putih	Bulat lebar
5	900 m	Putih	Bulat kecil

Dari tiap koloni tunggal yang berbeda tersebut diambil dan dibuat *Master Plate*. Gambar *Master Plate* dari tiap koloni bakteri tersebut dapat dilihat pada Lampiran 2 Gambar 4.2

4.2 Penapisan Bakteri Penghasil Enzim Kitinase

Pengujian ini bertujuan untuk memperoleh isolat bakteri penghasil enzim kitinase. Pengujian aktivitas enzim kitinase dilakukan dengan metode cawan gores. Hasil pengujian menunjukkan bahwa isolat bakteri nomor 4 menghasilkan enzim kitinase. Hal tersebut ditunjukkan dengan terbentuknya zona lisis di sekitar koloni bakteri. Zona lisis tersebut terbentuk karena terurainya kitin yang terdapat dalam media uji oleh enzim kitinase yang dihasilkan oleh isolat bakteri tersebut. Hasil pengujian dapat dilihat pada Tabel 4.2 dan Lampiran 3 Gambar 4.3

Tabel 4.2 Penapisan Bakteri Penghasil Enzim Kitinase

Isolat bakteri	Aktivitas enzim kitinase
1	-
2	-
3	-
4	+
5	-

Keterangan : (-) = Tidak memiliki aktivitas enzim kitinase

(+) = Memiliki aktivitas enzim kitinase

4.3 Pengujian Produk Ekstrasel

Pengujian ini bertujuan untuk mengetahui kemampuan produk ekstrasel dari isolat bakteri untuk melisis kitin. Media uji yang digunakan adalah media NA-Kitin dalam pengujian ini dilakukan untuk mengetahui sejauh mana aktivitas

produk ekstrasel bakteri dalam hal ini enzim kitinase yang dihasilkan dari isolat bakteri tersebut untuk dapat melisis kitin dan menghasilkan zona lisis. Metode pengujian menggunakan metode perforasi. Suspensi bakteri sebanyak 50 μ L dimasukkan ke dalam lubang menggunakan mikropipet, kemudian diinkubasikan selama 18-24 jam di dalam inkubator. Hasil uji tersebut dapat dilihat pada Tabel 4.3 dan Lampiran 3 Gambar 4.4

Tabel 4.3 Diameter Zona Lisis Aktivitas Enzim Kitinase

Isolat Bakteri	Diameter Zona Lisis (cm)			
	Lubang A	Lubang B	Lubang C	Lubang D
4	1,28	1,25	1,26	1,29

Berdasarkan hasil pengamatan tersebut dapat diketahui bahwa isolat bakteri yang diambil dari sampel air laut dapat menghasilkan produk ekstrasel yang dapat melisis kitin dan menghasilkan zona lisis.

4.4 Identifikasi Bakteri Uji

Identifikasi yang dilakukan meliputi pengamatan visual, pewarnaan Gram, dan uji Biokimia. Pengamatan visual dilakukan dengan mengamati bentuk dan warna koloni yang akan diidentifikasi. Pewarnaan Gram digunakan untuk mengetahui morfologi sel bakteri serta membedakan bakteri Gram positif dan Gram negatif. Jika dilihat dibawah mikroskop, bakteri Gram positif akan berwarna ungu karena dinding sel dapat menahan kompleks pewarna primer (CGV-Lugol), sedangkan bakteri gram negatif berwarna merah karena pewarna

primer (CGV-Lugol) hilang akibat pembilasan dengan alkohol dan terwarnai oleh pewarna air fuksin. Identifikasi dengan uji biokimia dilakukan dengan uji gula-gula (glukosa, manitol, laktosa, maltosa, dan sukrosa), uji motil, uji indol, uji TSIA, uji MR-VP, dan uji sitrat.

Pengamatan morfologi bakteri penghasil enzim kitinase pertama-tama dilakukan dengan pengamatan visual. Bakteri tersebut berwarna putih dan berbentuk bulat. Sel bakteri ini berbentuk batang dan tergolong Gram positif. Hasil pengamatan dapat dilihat pada Lampiran 4 Gambar 4.5

Hasil pengamatan uji gula-gula (glukosa, manitol, laktosa, maltosa, dan sukrosa). Hasil positif ditandai dengan perubahan warna merah menjadi kuning dengan demikian dapat disimpulkan bahwa koloni bakteri putih mampu memfermentasikan karbohidrat dengan substrat glukosa, manitol, laktosa, maltosa, dan sukrosa.

Uji motil menunjukkan hasil positif hal ini dapat dilihat dengan mengamati penyebaran pertumbuhan bakteri tidak hanya disekitar tusukan. Hal ini menunjukkan koloni bakteri tersebut memiliki alat gerak.

Uji indol menunjukkan hasil negatif hal ini diketahui dengan tidak terbentuknya cincin merah pada lapisan atas cairan setelah pemberian pereaksi kovac. Dengan demikian bakteri tersebut tidak mampu menguraikan Triptofan. Adanya produksi indol pada bakteri bertujuan untuk memeriksa kemampuan bakteri mendegradasi asam amino esensial triptofan (Cappucino and Sherman, 1983). Enzim yang berperan dalam proses ini adalah triptonase. Produk metabolit

triptofan adalah indol, asam piruvat dan amonia. Keberadaan indol dideteksi dengan reagen kovac dan terbentuknya warna merah.

Uji TSIA memberikan hasil negatif karena tidak terbentuk warna hitam pada goresan, hal ini menunjukkan bahwa tidak ada hidrogen sulfida yang dihasilkan oleh bakteri. Uji metil red dilakukan untuk mengetahui apakah bakteri tersebut merupakan bakteri *mixed acid fermenter* (peragian asam campuran). Pada uji ini akumulasi asam-asam dapat menurunkan pH sampai 5. Sehingga bila indikator metil merah ditambahkan dalam kondisi pH serendah itu maka indikator tersebut akan berwarna merah. Hal ini menunjukkan bahwa organisme tersebut adalah peragian asam campuran. Pada umumnya organisme ini adalah penghasil gas yang istimewa karena menghasilkan enzim format hidrogenase yang memecahkan asam format menjadi karbon dioksida dan air dalam jumlah sebanding. Pada uji metil red memberikan hasil yang negatif karena tidak terbentuk larutan berwarna merah. Oleh karena itu dapat disimpulkan bahwa bakteri tersebut tidak menghasilkan asam melainkan 2,3-butanadiol dan etanol

Untuk mendeteksi keberadaan senyawa 2,3-butanadiol dilakukan uji Voges-Proskauer, dimana memerlukan pereaksi *Barrit*, pereaksi ini yaitu campuran dari α -naftol dan KOH, karena untuk mendeteksi senyawa 2,3-butanadiol tidak dapat secara langsung melainkan mendeteksi melalui prekursornya yaitu *asetoin* (asetil-metil dan karbinol) dimana apabila terdapat *asetoin* maka akan mengakibatkan adanya perubahan warna menjadi merah muda. Metode ini sering disebut metode tidak langsung Voges-Proskauer (Brown Alfred, 2005). Pengujian yang dilakukan memberikan hasil negatif. Hal ini ditunjukkan

dengan tidak terjadi perubahan warna dari larutan menjadi warna merah muda setelah penambahan reagen *Barrit*.

Uji sitrat dilakukan untuk mengetahui apakah bakteri tersebut menggunakan sitrat sebagai sumber energi apabila tidak ada glukosa atau laktosa. Sitrat permease berperan membawa sitrat dari luar sel ke dalam sel. Sitrat yang telah berada di dalam sel akan masuk ke dalam siklus krebs. Sitrat merupakan intermediet utama siklus krebs, sitrat akan diubah menjadi asam oksaloasetat dan asam asetat dengan bantuan enzim sitrase. Selanjutnya asam oksaloasetat dan asam asetat diubah menjadi asam piruvat dan karbondioksida. Karbondioksida bereaksi dengan air dan natrium yang terdapat dalam media agar *simmons citrate* sehingga membentuk natrium bikarbonat. Keberadaan natrium bikarbonat mengakibatkan media bersifat basa sehingga merubah warna indikator bromthymol biru yang tadinya berwarna hijau menjadi berwarna biru. Dalam uji ini menunjukkan hasil negatif. Hal ini ditunjukkan dengan tidak berubahnya warna menjadi biru, berarti bakteri tersebut tidak menggunakan sitrat sebagai sumber karbon. Hasil pengamatan uji biokimia dapat dilihat pada Tabel 4.4 dan Lampiran 4 Gambar 4.6

Tabel 4.4 Hasil Pengamatan Uji Biokimia

Ciri-Ciri	Bakteri Uji	Genus <i>Bacillus</i>
Warna Koloni	Putih	Putih
Bentuk Koloni	Bulat	Bulat
Suhu Tumbuh	37° C	37° C
Perwarnaan Gram:		
Jenis Bakteri	Gram (+)	Gram (+)
Uji Biokimia:		
Glukosa	+	+
Laktosa	+	+
Sukrosa	+	+
Maltosa	+	+
Manitol	+	+/-
Motilitas	+	+
TSIA	-	td
Sitrat	-	-
Indol	-	-
VP	-	-/+
MR	-	-/+

Keterangan : td = tidak dijelaskan pada pustaka

Berdasarkan hasil pengamatan identifikasi morfologi, pewarnaan Gram dan uji biokimia kemudian dibandingkan dengan pustaka sehingga dapat disimpulkan bahwa bakteri penghasil enzim kitinase pada air laut berasal dari genus *Bacillus*

4.5 Uji Aktivitas Antijamur

Hasil produk ekstrasel bakteri yang merupakan enzim kitinase tersebut diduga dapat memiliki aktivitas sebagai antijamur. Hal ini dibuktikan dengan menginkubasi suspensi bakteri penghasil enzim kitinase dengan sejumlah kitin kemudian setelah diinkubasi dengan suhu 37° C suspensi tersebut di sentrifugasi dengan sentrifugator dengan kecepatan 2000 rpm selama 20 menit Hasil sentrifugasi tersebut kemudian diambil supernatannya yang diduga enzim kitinase dan ditanamkan pada media PDA yang telah berisi jamur *Candida albicans*. Adapun hasil dapat dilihat pada Tabel 4.5 Lampiran 5 Gambar 4.7

Tabel 4.5 Hasil Pengamatan Uji Aktifitas Antijamur

Enzim Kitinase	Diameter Zona Lisis (cm)			
	Lubang A	Lubang B	Lubang C	Lubang D
	1,97	2,03	2,02	1,87

BAB V

SIMPULAN DAN SARAN

5.1 Simpulan

Dari lima isolat bakteri yang diisolasi dari air laut di Pantai Pondok Bali, ditemukan satu isolat bakteri yang menghasilkan enzim kitinase. Hasil identifikasi menunjukkan bahwa isolat bakteri penghasil enzim kitinase tersebut adalah genus *Bacillus*

Pengujian aktivitas produk ekstrak bakteri berupa enzim kitinase sebagai antijamur memberikan hasil yang positif terhadap jamur *Candida albicans*.

5.2 Saran

Diperlukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui spesies bakteri yang menghasilkan enzim kitinase menggunakan PCR 16s rDNA untuk mendukung kebenaran hipotesis genus isolat bakteri.

DAFTAR PUSTAKA

- Andes, D., J. Nett, P. Oschel, R. Albrecht R, K. Marchillo and A. Pitula. 2004. Development and characterization of an in-vivo central venous catheter *Candida albicans* biofilm model. *Infect Immun.*72(10):6023-31.
- Alfred, Brown. 2005. *Laboratory Manual in General Microbiology: Microbiological Applications*. Mc. Graw-hill Comp.US
- Baillie G.S and L.J Douglas.1999. Role of dimorphism in the development of *Candida albicans* biofilm. *J. Med. Microbiol.*48(7):671-9.
- Biswas S.K and W.L Chaffin WL. 2005. Anaerobic growth of *C.albicans* does not support biofilm formation under similar conditions used for aerobic biofilm. *Curr. Microbiol.*
- Brown, M.R., C.A. Thompson, CA, and F.M. Mohamed. 2005. Systemic candidiasis in an apparently immunocompetent . *J. Vet. Diagn. Invest.* 17(3):272-6
- Brzozowski, T. M. Zwolinska-Weislo, P.C Konturec, S. Kwiecien, D. Drozdowicz, S.J. Konturek, J. Stachura, A. Budak, J. Bogdal, Pawlik and Habn Eg. 2005. Influence of gastric colonization with *Candida albicans* on ulcer healing in rats: Effect of ranitidine, aspirin and probiotic therapy. *Scand. J. Gastroenterol.*40(3):286-96
- Cabib, E. 1987. The Synthesis and Degradation of Chitin : *Advances in Enzymology*. Vol. 59, An Interscience Publication John Willey and Sons Inc., New York. pp. 59 – 101
- Cappucino, J.G., and N. Sherman.1983. *Microbiology a Laboratory Manual*.6th ed.USA:Pearson Education Inc.
- Cohen-Kupiec R, L. Chet. 1998. The molecular biology of chitin digestion. *Curr. Opinion Biotechnology* 9: 270-277.
- Cotter, G and K. Kavanagh. 2000. Adherence mechanism of *Candida albicans*. *Br. J. Biomed. Sci.*57(3):24-9.
- Dinubille M.J, D. Bille, C.A Sable and N.A Kartsonis. 2005. Invasive Candidiasis in cancer Patient: Observation from a randomized clinical trial. *J. Infect.*50(5):443-9.
- Ellepola, A.N, and C.J. Morrison. 2005. Laboratory diagnostic of invasive Candidiasis. *J.Microbiol.*43:65-84.

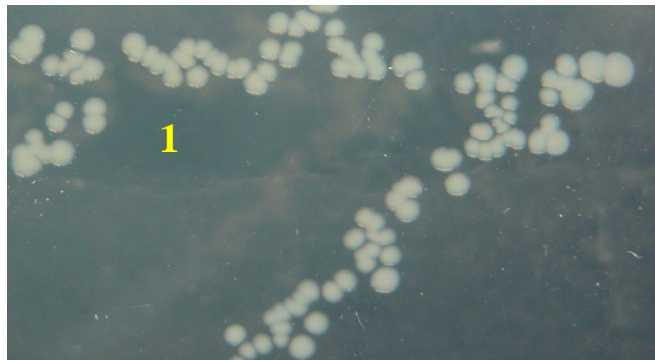
- Fardiaz, Srikandi. 2002. *Polusi Air dan Udara*. Yogyakarta: Kanisius. Hal.42
- Fukamizo, T. 2000. Chitinolytic enzymes: catalysis, substrate binding, and their application. *Curr. Prot. Peptide Sci.* 1: 105-124
- Gijzen, M, K. Kuflu, D. Qutob, JT, Chernys. 2001. A class I Chitinase from Soybean Seed Coat. *J. Exp. Bot.* 52: 2283-2289
- Gooday, GW. 1994. Physiology of microbial degradation of chitin and chitosan. in Ratledge C, editor. *Biochemistry of microbial degradation*. Netherlands: *Kluwer Academic Publ*,p: 279-312.
- Ha, K.C and T.C.,White. 1999. Effect of azole antifungal drugs on the transition from yeast cells to hyphae in susceptible and resistant isolates of the pathogenic yeast *C. albicans*. *Antimicrobial Agent Chemoter.* 43(4):763-8.
- Harman, G. E., C.K. Hayes, M. Lorito, R. M. Broadway, A. Di Pietro, C. Peterbauer and A. Tronsmo. 1993. Chitinolytic Enzymes of *Trichoderma harzianum* : *Purification of Chitobiosidase and Endochitinase*. *Phytopathology* 83: 313-318
- Hartati, F., S. Tri, Rakhmadioni, dan A. Loekito. 2002. Faktor-faktor yang berpengaruh terhadap deproteinasi dalam pembuatan kitin dari cangkang rajungan (*Portunus pelagious*). *Biosain*. Vol. 2(1)
- Juwana, S. dan K. Romimohtarto. 2007. *Biologi Laut*. Jakarta: Djambatan
- Kobayashi C.C, De Fernandes, K.C. Miranda, De Sonsa, and Silva Mdo R. 2004. Candiduria in Hospital Patients: A *Study Prospective Mycopathologia*. 158(1):49-52.
- Kumamoto, C.A and M.D. Vines. 2004. Alternative *Candida albicans* lifestyle: Growth on The Surface. *Annu. Rev. Microbial.*
- Marganof. 2003. *Potensi Limbah Udang Sebagai Penyerap Logam di Perairan*. [http://rudycr.topcities.com/pps702_71034/marganof.htm] Diakses tanggal 12 februari 2009.
- Muzzarelli,R.A.A.1985.*Chitin*: G.O. Aspinall (Ed) The Polysaccharides.Academic Press Inc., New York. Vol.3, pp.417-450.
- Nikawa, Hamada, Yamamoto and Kumagai. 1997. Effect salivary or serum pellicles on *C. albicans* growth and biofilm formation on soft lining material *in-vitro*. *J. Oral Rehabil.*24(8):594-604.

- Nobile, C.J and Mitchell, A.P.2005. Regulation of cell-surface genes and biofilm formation by the *C. albicans* transcription factor *Bcr1p*.*Curr Biol*.15(12):1150-5
- Ohno T, Armand S, Hata T, Nikaidou N, Henrissat B, Mitsutomi M, Watanabe T. 1996. A Modular family 19 chitinase found in the prokaryotic organism *Streptomyces Griceus* HUT 6037. *J. Bacteriol* 178: 5065-5070.
- Perea,S, J.Lopez, Martinez, Petterson.2001. Prevalence of Molecular Mechanism Resistance to Azole in *C.albicans* from HIV.*J.Antimrob*.p2676-2684
- Prasanna, Peter, R.L. Miller, R.D. Nelso, and B.J. Tyler. 2006. A *Small Subpopulation of Blastospores in Candida albicans Biofilms Exhibit Resistance to Amphotericin B Associated with Differential Regulation of Ergosterol and β -1,6-Glucan Pathway genes*. <http://www.asm.org/html>. Diakses tanggal 5 Juli 2009.
- Rahardja, Kirana, dan Tjay TH. 2003. *Obat- Obat Penting*. Jakarta: Elex Media Komputindo.
- Rajarathanam, S., M. N. J. Shashirekha and Z. Bano. 1998. Biodegradative and biosynthetic capacities of mushrooms : Present and Future Strategies. *Crit. Rev. in Biotechnol.* 18 : 91 – 236.
- Richards, A. G. 1951. *The Integument of Arthropods*. The Chemical Components and Their Properties.University of Minnesota Press, Minneapolis.
- Rusli. 2005. *Kajian Kerusakan Hutan Bakau di Pantai Pondok Bali kabupaten Subang*. <http://www.ganeshadigilab.ac.id>. Diakses tanggal 28 Januari 2009.
- Ruyitno. 2004. *Bakteri Laut untuk Kebutuhan Manusia*. 17 September 2004. <http://www.kompas.go.id>. Diakses tanggal 5 Februari 2009.
- Saito, A., T. Fujii, T. Yoneyama and K. Miyashita. 1998. *glkA* is involved in glucose repression of chitinase production in *Streptomyces lividans*. *J.Bacteriol.* 180: 2911-2914.
- Skjak-Braek G.A., T. Athosen, P.T. Sandford. 1989. *Chitin and Chitosan: Sources, Chemistry, Biochemistry, Physical Properties and Applications*. London. Elsevir appl Sci, p:561.

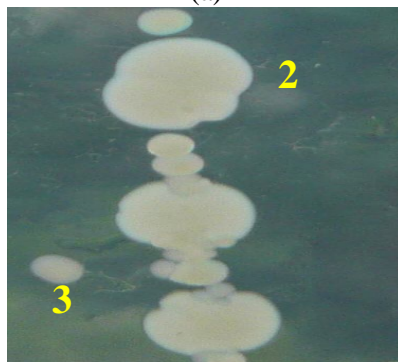
- Toharisman, Aris. 2007. *Peluang Pemanfaatan Enzim Kitinase di Industri Gula*.
<http://www.p3gi.kitinase-toharisman>. Diakses tanggal 4 Februari 2009
- Wilson, C. 2005. Recurrent Vulvaginitis Candidiasis: An Overview of Traditional and Alternative Therapies. *Adv. Nurse Pract.* 13(5):24-9

LAMPIRAN 1

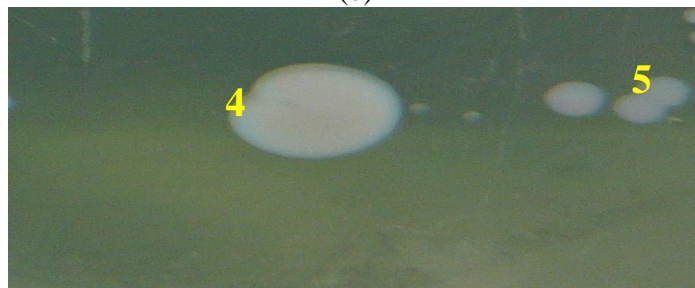
MORFOLOGI KOLONI BAKTERI AIR LAUT DARI PANTAI PONDOK BALI



(a)



(b)



(c)

Gambar 4.1 Koloni bakteri air laut dari Pantai Pondok Bali
(a) Jarak 300 m (b) Jarak 600 m (c) Jarak 900 m

Keterangan : 1 = Koloni bakteri putih, bulat kecil (300 m)
2 = Koloni bakteri putih, bulat lebar (600 m)
3 = Koloni bakteri putih, bulat kecil (600 m)
4 = Koloni bakteri putih, bulat lebar (900 m)
5 = Koloni bakteri putih, bulat kecil (900 m)

LAMPIRAN 2

MASTER PLATE BAKTERI AIR LAUT DARI PANTAI PONDOK BALI



(a)



(b)



(c)



(d)



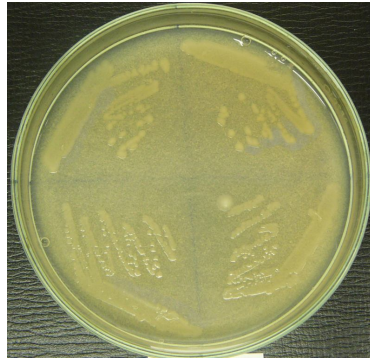
(e)

Gambar 4.2 *Master Plate* bakteri air laut dari Pantai Pondok Bali

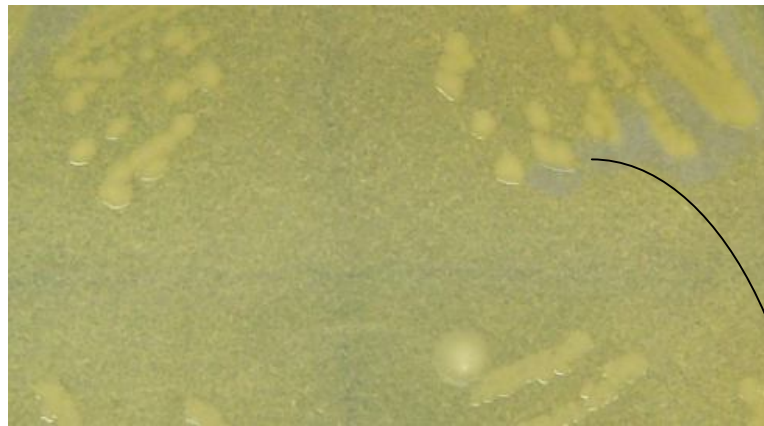
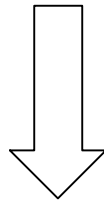
Keterangan: (a) Koloni Pondok Bali 1
(b) Koloni Pondok Bali 2
(c) Koloni Pondok Bali 3
(d) Koloni Pondok Bali 4
(e) Koloni Pondok Bali 5

LAMPIRAN 3

HASIL PENAPISAN ISOLAT BAKTERI PENGHASIL ENZIM KITINASE



(a)



(b)

Gambar 4.3 Hasil penapisan isolat bakteri penghasil enzim kitinase

Keterangan: (a) Zona lisis dari koloni Pondok Bali 4

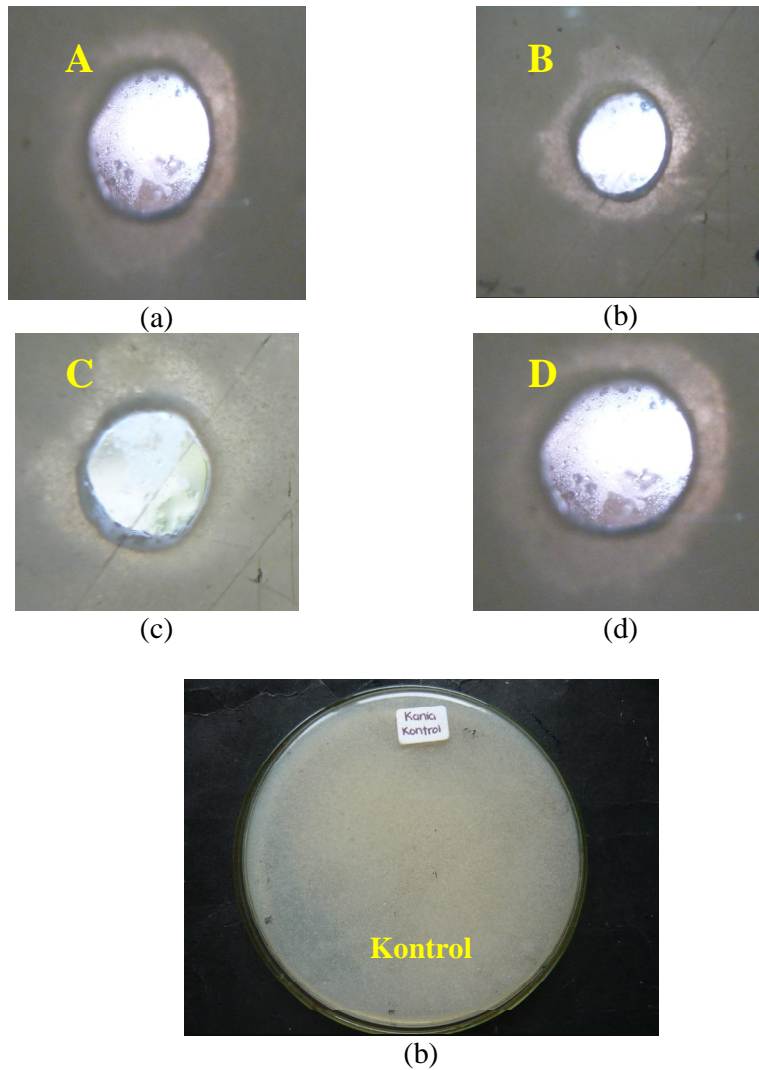
(b) Perbesaran zona lisis bakteri

Zona lisis yang berwarna bening tipis disekitar koloni Pondok Bali 4

LAMPIRAN 3

(LANJUTAN)

DIAMETER ZONA LISIS KOLONI PONDOK BALI 4

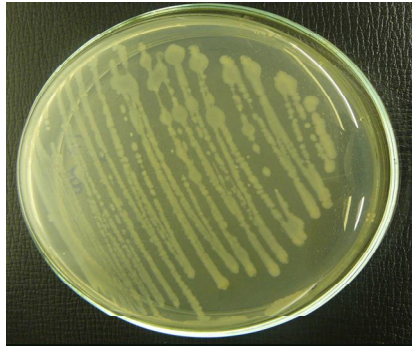


Gambar 4.4 Diameter zona lisis koloni Pondok Bali 4

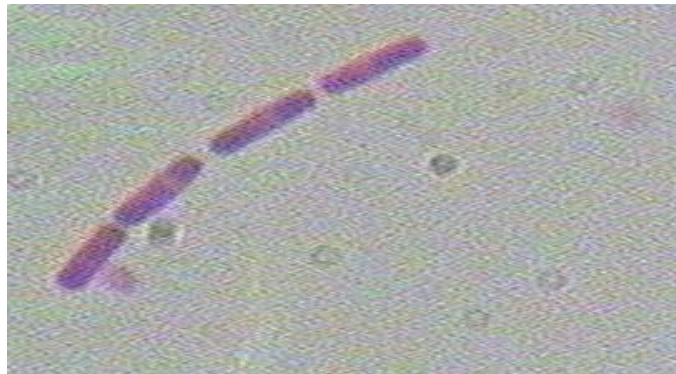
Keterangan: (a) Diameter zona lisis lubang A
(b) Diameter zona lisis lubang B
(c) Diameter zona lisis lubang C
(d) Diameter zona lisis lubang D
(e) Kontrol media NA-kitin

LAMPIRAN 4

IDENTIFIKASI BAKTERI



(a)



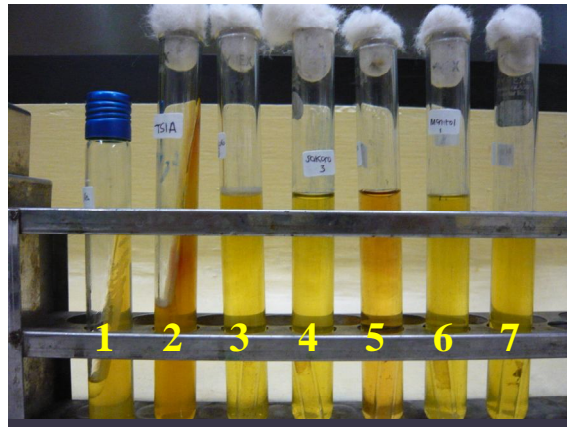
(b)

Gambar 4.5 Hasil identifikasi bakteri

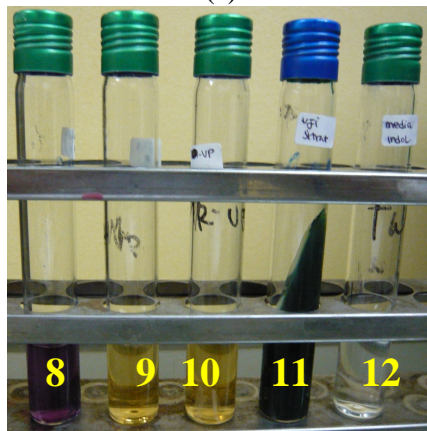
Keterangan: (a) Morfologi koloni Pondok Bali 4
(b) Hasil pewarnaan Gram koloni Pondok Bali 4

LAMPIRAN 4

(LANJUTAN)



(a)



(b)

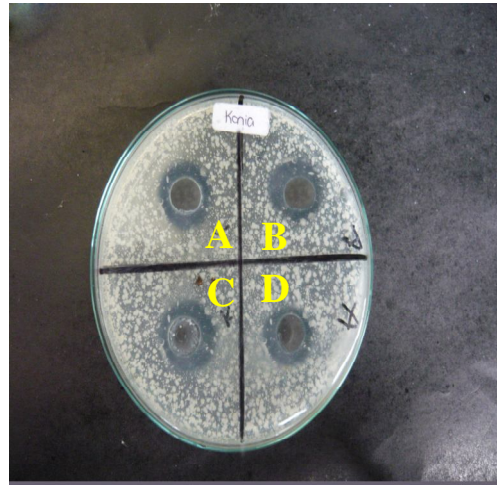
Gambar 4.6 Hasil uji biokimia (a) Uji urea, TSIA, uji fermentasi karbohidrat
(b) Uji motil, uji MR-VP, uji sitrat, uji indol

Keterangan:

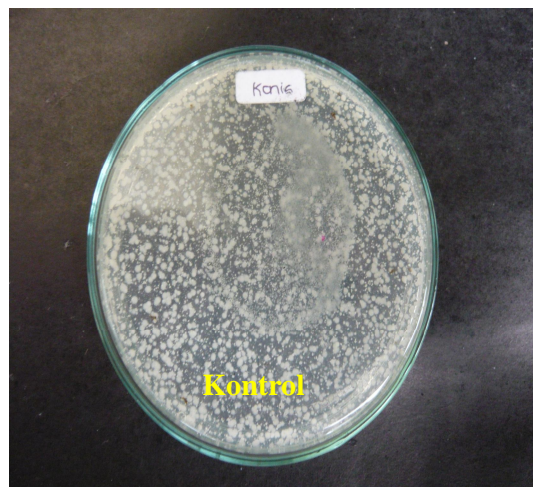
1 = Uji urea	7 = Uji laktosa
2 = TSIA	8 = Uji motil
3 = Uji glukosa	9 = Uji MR
4 = Uji sukrosa	10 = Uji VP
5 = Uji maltosa	11 = Uji sitrat
6 = Uji manitol	12 = Uji indol

LAMPIRAN 5

UJI AKTIVITAS ANTIJAMUR



(a)



(b)

Gambar 4.7 Uji aktivitas antijamur

Keterangan: (a) Hasil uji aktivitas terhadap *Candida albicans*
(b) Kontrol media PDA-*Candida albicans*