

**ISOLASI DAN UJI AKTIVITAS ENZIM KITINASE BAKTERI
DARI FESES KUKANG (*Nycticebus javanicus*) ASAL GARUT
DAN BOGOR**

SKRIPSI

**Disusun untuk melengkapi syarat-syarat
guna memperoleh gelar Sarjana Sains**



NITA LISTIYANI

3425111402

**PROGRAM STUDI BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS NEGERI JAKARTA
2016**

PERSETUJUAN PANITIA UJIAN SKRIPSI

ISOLASI DAN UJI AKTIVITAS ENZIM KITINASE BAKTERI DARI FESES
KUKANG (*Nycticebus javanicus*) ASAL GARUT DAN BOGOR

Nama : Nita Listiyani

No. Reg : 3425111402

	Nama	Tanda Tangan	Tanggal
Penanggung Jawab Dekan	<u>Prof. Dr. Suyono, M.Si</u> NIP. 19671218 199303 1 005		21/02/16
Wakil Penanggung Jawab Pembantu Dekan	<u>Dr. Mukningsih, M.Si</u> NIP. 19640511 198903 2 001		21/02/16
Ketua	<u>Dr. Yulia Imdiyanti, M.Si</u> NIP. 19650723 20011 2 001		5/8 - 2016
Sekretaris/Penguji I	<u>Dra. Tri Handayani K, M.Si</u> NIP. 19660316 199203 2 001		18/02/16
Anggota Pembimbing I	<u>Dr. Dalia Sukmawati, M.Si</u> NIP. 19730914 200604 2 001		2/08/16
Pembimbing II	<u>Dr. Rini Puspitaningrum, M.Biomed</u> NIP. 19681004 200112 2 001		21/01/16
Penguji II	<u>Elsa Lisanti, S.Pt., M.Si</u> NIP. 19710420 2001112 2 002		2/8/16

Dinyatakan lulus ujian skripsi pada tanggal 27 Mei 2016.

PERSEMBAHAN

Dengan mengucapkan puji syukur kepada Allah SWT, atas rahmat dan hidayahnya, maka dengan ketulusan dan kerendahan hati serta setiap perjuangan dan jerihpayah, aku persembahkan sebuah karya nan kecil ini kepada :

Orang tua yang kusayangi dan juga kucintai. Terima kasih telah memberikan dukungan, Cinta dan kasih sayang serta mengiringi, Dengan do'a demi keberhasilanku. Malaikat yang dikirim Allah untuk menemaniku dan membimbingku tanpa kenal lelah menghadapi sifat kemanusiaanku yang kadang kala tertutupi dengan kesabaranmu. Terimakasih atas ilmu pasti yang diberikan dengan semu tanpa kenal lelah, kesabaranmu guruku, keikhlasanmu membuatku bangkit dan terus belajar.

*Adikku tersayang dan seluruh keluarga besarku yang selalu Mendo'akanku serta memberi bantuan dalam segala hal dalam menggapai cita-cita
Sahabat-sahabatku, terimakasih atas kebersamaan
Dan kesetiiaannya selama ini*

Dosenku,

Perjuanganmu mungkin hanya sebagian yang terlihat. Sungguh pasti lebih banyak, namun kerendahan hatimu menutupi seluruhnya, dan kamipun dapat menerima dengan baik apa yang kau sampaikan.

Universitas Negeri Jakarta

Yang telah mendewasakan dan membuka pikiranku tentang dunia ini. Tempatku memperoleh ilmu dan merancang mimpi yang menjadi sebagian jejak langkahku menuju kesuksesan.

NL

ABSTRAK

NITA LISTIYANI. Isolasi dan Uji Aktivitas Enzim Kitinase Bakteri dari Feses Kukang (*Nycticebus javanicus*) asal Garut dan Bogor. Skripsi. Program Studi Biologi, Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Negeri Jakarta. 2016.

Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi dan menguji aktivitas bakteri penghasil enzim kitinase dari feses kukang (*N. javanicus*) asal Garut dan Bogor. Penelitian dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi dan Genetika, Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Negeri Jakarta, pada bulan September-Desember 2015. Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode deskriptif untuk menggambarkan hasil degradasi kitin oleh isolat bakteri kitinolitik pada medium dan uji aktivitas enzim kitinase. Parameter yang diamati, antara lain; penentuan indeks kitinolitik pada media *colloidal chitin agar* (CCA) 1% dengan mengukur diameter zona bening yang terbentuk disekitar koloni bakteri dikurangi diameter koloni bakteri dan pengukuran aktivitas enzim kitinase menggunakan teknik spektrofotometri. Hasil yang didapat pada penelitian yaitu terdapat 80 isolat bakteri penghasil enzim kitinase asal Garut dan Bogor. Dua belas isolat bakteri potensial menghasilkan enzim kitinase dari sampel feses asal Garut dan Bogor dipilih untuk diuji aktivitas enzim kitinase. Isolat bakteri K1.90 memiliki aktivitas enzim kitinase terbesar yaitu $21,64 \times 10^{-3}$ U/ml. Isolat bakteri asal Bogor memperlihatkan aktivitas enzim kitinase yang berbeda dengan isolat bakteri asal Garut.

Kata kunci: Feses, Isolasi, Kitinase, *N. javanicus*, Uji aktivitas

ABSTRACT

NITA LISTIYANI. Isolation and Chitinolytic Bacteria Activity from Feces of Loris (*Nycticebus javanicus*) at Garut and Bogor. Essay. Biological Studies Program. Department of Biology, Faculty of Mathematics and Natural Sciences, State University of Jakarta. 2016.

This study aims to isolate and examine chitinolytic bacteria activity from feces of loris (*N. javanicus*) at Garut and Bogor. This study was carried in the Microbiology and Genetics Laboratory of Biology Ministry, Faculty of Mathematics and Natural Sciences, State University of Jakarta, on September-December 2015. The method used in this study was descriptive method for describe the result of degradation chitinolytic bacteria on medium and chitinolytic activity assay. Parameter observed, such as; chitinolytic index for determination chitinase activity on colloidal chitin agar (CCA) 1% for measurement clear zone formed bacteria colonies minus diameter of bacteria colonies and measurement of the activity used spectrophotometric technic. The results of this study was 80 chitinolytic bacteria isolates from feces of loris at Garut and Bogor. Twelve potential chitinolytic bacteria from Garut and Bogor was selected to measure chitinolytic activity. Bacteria isolate K1.90 was the largest chitinase activity, with activity of $21,64 \times 10^{-3}$ U/ml. Chitinolytic bacterial isolates from Bogor was shown the different from chitinase activity bacterial isolates from Garut .

Keywords: Activity assay, Chitinase, Feces, Isolation, *N. javanicus*

KATA PENGANTAR

Puji dan syukur penulis panjatkan kepada Allah SWT atas segala limpahan rahmat, berkat, anugerah dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “Isolasi dan uji aktivitas enzim kitinase bakteri dari feses kukang (*Nycticebus javanicus*) asal Garut dan Bogor” dengan baik dan sesuai dengan ketentuan yang disyaratkan. Proposal skripsi ini disusun untuk memenuhi salah satu syarat mendapatkan gelar Sarjana Sains Program Studi Biologi, Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Negeri Jakarta.

Ucapan terima kasih diberikan kepada orang tua yang telah memberikan dukungan serta do'a dan perhatian yang luar biasa sehingga tugas ini dapat terselesaikan tepat pada waktunya. Penulis menyadari sebagai manusia yang tidak mampu berdiri sendiri, laporan ini pun tidak akan selesai tanpa bantuan dari beberapa pihak. Oleh karena itu, penulis menyampaikan terima kasih kepada :

1. Ibu Dr. Dalia Sukmawati M.Si dan Ibu Dr. Rini Puspitaningrum, M.Biomed selaku dosen pembimbing yang telah memfasilitasi penelitian ini, membimbing, memberikan ilmu dan memberi pengertian, motivasi, serta masukan untuk membantu penulis dalam menyelesaikan skripsi.
2. Ibu Dra. Tri Handayani Kurniati, M.Si dan Ibu Elsa Lisanti S.Pt, M.Si, selaku dosen penguji atas segala saran, dan masukan dalam penyempurnaan perbaikan skripsi ini.

3. Ibu Dr. Reni Indrayanti M.Si, selaku Ketua Program Studi Biologi Universitas Negeri Jakarta.
4. Bapak Agung Sedayu M.Sc, selaku Ketua Laboratorium Program Biologi Universitas Negeri Jakarta.
5. Ibu Dr. rer. nat. Apriliana Layli Fitri (almh.), M.S, M.Ed dan Ibu Dr. Dalia Sukmawati, M.Si selaku pembimbing akademik yang telah membimbing penulis selama masa perkuliahan.
6. Dr. Francis Cabanna M.Sc., selaku Research Coordinator Little Fireface Project yang telah memberikan kesempatan untuk belajar mengenai kukang dan memberikan izin untuk pengambilan sampel.
7. Dr. Yossa Istiadi M.Si., selaku Pembina KSP Macaca Universitas Negeri Jakarta yang telah memberikan izin dan ilmu mengenai pembelajaran primata.
8. Sahabat seperjuangan Maida, Bagus, Siwi, Rani, Fitri, Yudi, Dita dan rekan kerja di laboratorium Neni, Saida, Amalia, Lutfi, Sunani, Lulu, Hilma, Mei, Disa, Nurul, Tria, Lita, Resti yang telah banyak memberikan pemahaman mengenai primata dan mikrobiologi.
9. Teman-teman VLDRM 37 Biologi 2011 dan KSP Macaca UNJ, yang telah memberikan bantuan, dukungan, semangat dan doa yang luar biasa, terima kasih.
10. Ibu Deselina, Bapak M. Isnin Noer M.Si, dan Bapak Ato yang senantiasa memberi bantuan di laboratorium.
11. Seluruh pihak yang ikut membantu, baik secara langsung maupun tidak langsung.

Penulis menyadari bahwa sebagai manusia pasti memiliki kekurangan dan keterbatasan. Oleh karena itu, penulis mengharapkan kritik dan saran

yang bersifat membangun untuk penyelesaian skripsi ini. Semoga tulisan ini dapat bermanfaat bagi pembaca dan digunakan sebaik-baiknya.

Jakarta, Juli 2016

Nita Listiyani

DAFTAR ISI

	Halaman
ABSTRAK	i
ABSTRACT	ii
KATA PENGANTAR	iii
DAFTAR ISI	vi
DAFTAR TABEL	viii
DAFTAR GAMBAR	ix
DAFTAR LAMPIRAN	x
BAB I. PENDAHULUAN	
A. Latar Belakang	1
B. Perumusan Masalah.....	2
C. Tujuan	2
D. Manfaat	3
BAB II. KAJIAN PUSTAKA DAN KERANGKA BERPIKIR	
A. Kajian Pustaka.....	4
1. Kitin	4
2. Enzim kitinase	5
3. Faktor-faktor yang mempengaruhi produksi kitinase ..	6
4. Penentuan aktivitas kitinase.....	7
5. Isolasi bakteri penghasil enzim kitinase	8
6. Bakteri penghasil enzim kitinase.	9
7. Kukang (<i>Nycticebus javanicus</i>).	11
B. Kerangka Berpikir	15
BAB III. METODOLOGI PENELITIAN	
A. Tujuan Operasional	17
B. Tempat dan Waktu Penelitian.....	17
C. Metode Penelitian.....	17
D. Prosedur Penelitian	17
1. Alat dan bahan.....	18
2. Cara kerja	18
a. Pembuatan medium dan sterilisasi	19
b. Isolasi Bakteri kitinolitik	19
c. Pengujian <i>pre-eliminatory</i> zona bening.	20
d. Pengujian indeks kitinolitik isolat bakteri	21
e. Pengamatan morfologi isolat bakteri.	21
f. Pengukuran jumlah sel bakteri.	22
g. Pengukuran aktivitas enzim kitinase	22
h. Pengukuran kadar protein.....	22
i. Pewarnaan gram.....	23
E. Teknik Pengumpulan Data.....	24

F. Teknik Analisis Data.	25
BAB IV. HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN	
1. Bakteri penghasil enzim kitinase dari feses kukang.	26
2. Pengujian <i>pre-eliminatory zona</i> bening.	30
3. Penentuan indeks kitinolitik isolat bakteri.	32
4. Uji aktivitas enzim kitinase isolat bakteri..	38
5. Kemampuan menurut kecendrungan isolat bakteri dalam menghasilkan enzim..	44
6. Pengamatan morfologi makroskopis dan mikroskopis.....	47
BAB V. KESIMPULAN	
A. Kesimpulan.	51
B. Implikasi.....	51
C. Saran.	51
DAFTAR PUSTAKA	53
LAMPIRAN	58
SURAT KETERANGAN PENELITIAN	
SURAT PERNYATAAN KEASLIAN SKRIPSI	
RIWAYAT HIDUP	

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Perbedaan pakan kukang di alam dan di penangkaran	14
2. Isolat bakteri yang diperoleh dari feses kukang	28
3. Parameter hasil uji pre-eliminary	31
4. Indeks kitinolitik isolat bakteri Garut dan Bogor	34
5. Uji aktivitas enzim kitinase isolat bakteri Garut dan Bogor	39
6. Pengukuran jumlah sel bakteri Garut dan Bogor	42
7. Parameter pengukuran kecendrungan isolat bakteri.....	44
8. Morfologi makroskopis dan mikroskopis isolat bakteri	49

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Struktur kimia dari kitin	4
2. Skema pemutusan domain enzim kitinolitik	6
3. <i>Nycticebus javanicus</i>	12
4. Bakteri hasil isolasi asal feses kukang (<i>N. javanicus</i>)	27
5. Zona bening pada pengujian <i>pre-eliminatory</i>	30
6. Zona bening isolat bakteri asal Garut dan Bogor	35
7. Diagram rata-rata indeks kitinolitik 22 isolat bakteri	37
8. Pemutusan rantai kitin oleh enzim kitinase	40
9. Pewarnaan Gram isolat bakteri	48

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1.Pembuatan medium.	58
2.Pemilihan 22 isolat bakteri representatif.`	59
3.Perhitungan aktivitas enzim kitinase.....	61
4.Perhitungan kadar protein	65

BAB I PENDAHULUAN

A. Latar Belakang Masalah

Enzim kitinase merupakan enzim yang mampu menghidrolisis kitin menjadi mono- dan oligomer dari kitin (Stoykov *et al.*, 2015). Selain mampu menghidrolisis kitin, pemanfaatan enzim kitinase antara lain; berperan dalam produksi protein sel tunggal dari limbah kitin untuk pakan hewan (Patil *et al.*, 2000), inhibitor jamur patogen pada tanaman (Suryanto *et al.*, 2011), dan senyawa hasil degradasi enzim kitinase berupa *bioactive chito-oligosakarida* dan N-asetil glukosamin dapat dipergunakan untuk aplikasi biomedis (Azuma *et al.*, 2014).

Enzim kitinase dapat ditemukan di berbagai organisme diantaranya; bakteri, fungi, khamir, tumbuhan, aktinomisetes, serangga dan manusia (Hamid *et al.*, 2013). Macdonald *et al.*, (2013) melaporkan, telah berhasil mengisolasi bakteri penghasil enzim kitinase dari feses primata pemakan serangga monyet Goeldie (*Callimico goeldii*).

Kukang (*Nycticebus javanicus*) merupakan primata endemik di pulau Jawa, dan tergolong primata omnivora yang mengkonsumsi serangga. Cabana & Plowman (2014) melaporkan, kukang di alam mengkonsumsi eksudat dari pohon, sari bunga dan berbagai macam serangga. Sedangkan di penangkaran, kukang memiliki pola makan dengan komposisi getah arabica, nektar bunga, serangga (jangkrik, ulat, belalang), dan getah pohon (petai, sengon) (YIAR Indonesia, 2015).

Proses penguraian makanan dalam tubuh kukang membutuhkan peranan enzim sebagai biokatalisator reaksi enzimatik, salah satunya enzim kitinase. Enzim kitinase merupakan enzim yang bekerja untuk mengurai kitin menjadi senyawa sederhana produk degradasi kitin. Senyawa sederhana produk degradasi dari kitin dapat dimanfaatkan kembali oleh tubuh kukang. Selain itu, keberadaan kitin dalam saluran pencernaan kukang akan menyediakan nutrisi dan energi bagi bakteri penghasil enzim kitinase dalam tubuh kukang.

Penelitian mengenai bakteri yang menghasilkan enzim kitinase dari feses kukang belum banyak dilakukan. Penelitian ini bertujuan menguji aktivitas enzim kitinase bakteri dari feses kukang (*N. javanicus*) asal Garut (di alam) dan Bogor (di penangkaran pusat rehabilitasi). Penelitian merupakan salah satu upaya untuk mendapatkan bakteri penghasil enzim kitinase yang potensial dari feses kukang.

B. Perumusan Masalah

Perumusan masalah dari penelitian adalah apakah bakteri dari feses kukang (*N. javanicus*) asal Garut dan Bogor menghasilkan enzim kitinase?

C. Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan isolat bakteri yang berpotensi menghasilkan enzim kitinase dari feses kukang (*N. javanicus*) asal Garut dan Bogor.

D. Manfaat Penelitian

Manfaat dari penelitian ini adalah

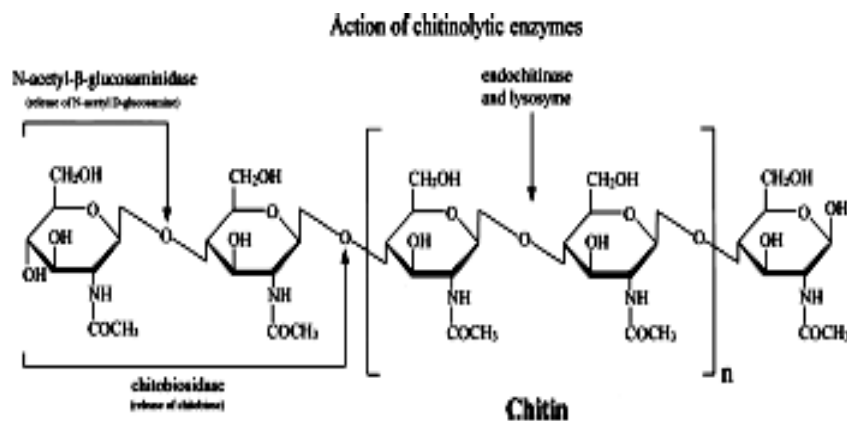
1. Diperolehnya isolat bakteri dari feses kukang (*N. javanicus*) yang mampu menghasilkan enzim kitinase.
2. Isolat bakteri yang diperoleh memiliki potensi menghasilkan enzim kitinase sebagai agen pendegradasi kitin yang potensial.
3. Enzim kitinase dapat digunakan untuk mempercepat proses pengelolaan limbah kitin di alam, sehingga senyawa turunan kitin bisa menjadi bahan dasar senyawa kimia dengan aplikasi yang luas.

BAB II KAJIAN PUSTAKA, KERANGKA BERPIKIR, DAN PERUMUSAN HIPOTESIS

A. Kajian Pustaka

1. Kitin

Kitin merupakan homopolisakarida yang tersusun atas N-asetil glukosamin yang dihubungkan oleh ikatan β -1,4 glikosida.



Gambar 1. Struktur kimia dari kitin (Stoykov *et al.*, 2015)

Kelimpahan kitin di alam menempati urutan ke-2 setelah selulosa. Di alam, kitin dapat berikatan dengan protein, mineral ataupun zat warna. Sumber utama kitin ialah cangkang udang hasil dari limbah pengolahan udang. Cangkang udang mengandung 25-40% protein, 40-50% mineral dan 15-20% kitin. Kadar kitin yang ada di cangkang udang bervariasi bergantung jenis udangnya dan berkisar antara 20-60% (Widhyastuti, 2010). Ukuran molekul yang relatif besar dan kelarutan yang rendah, sulit diserap tubuh manusia, aplikasinya sangat terbatas membuat kitin menjadi salah satu

sumber pencemaran senyawa organik.

Pencemaran senyawa organik dari kitin dapat diolah melalui dua cara antara lain; 1) secara kimiawi dengan cara demineralisasi dan deproteinisasi melalui penambahan asam atau basa kuat, 2) secara biokimia dengan penambahan enzim proteolitik untuk deproteinisasi dan melibatkan enzim kitinase untuk mendegradasi limbah kitin (Haliza & Soehartono, 2012).

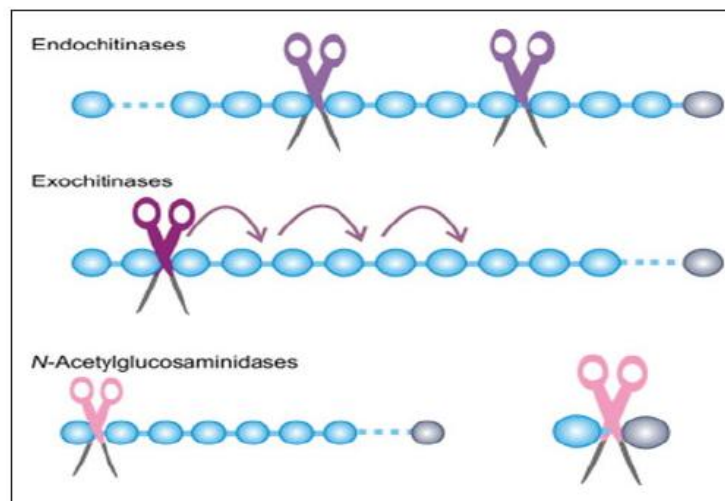
Kitin dan turunannya telah banyak diaplikasikan pada berbagai industri sebagai bahan dasar untuk bahan-bahan kimia yang diperlukan secara luas di berbagai bidang seperti; biokimia, obat-obatan, pangan, gizi, enzimologi, industri kertas, tekstil dan film. Kitin dapat digunakan sebagai senyawa yang dapat membentuk kitosan dan N-asetil glucosamin, dimana senyawa tersebut dapat dimanfaatkan sebagai pengawet, antibiotik dan pemanis produk pangan (Widhyastuti, 2010).

2. Enzim kitinase

Enzim kitinase adalah enzim yang mampu menghidrolisis kitin menjadi senyawa turunan kitin, berupa monomer dan oligomer dari kitin. Berdasarkan mekanisme pemotongan polisakarida, enzim kitinase dapat diklasifikasikan ke dalam dua kategori utama, endokitinase dan eksokitinase.

Endokitinase merupakan kelompok enzim yang mendegradasi kitin secara acak dari situs internal kitin yang memutus ikatan β -1,4 glikosida dan menghasilkan oligomer pendek N-asetil glukosamin. Oligomer pendek N-

asetil glukosamin hasil degradasi enzim memiliki ciri berat molekul yang rendah. Beberapa contoh oligomer N-asetil glukosamin dapat berupa kitotetraose, kitotriose dan di-asetilkitobiose. Sedangkan, eksokitinase merupakan kelompok enzim yang memotong kitin hanya dari ujung bagian non-reduksi yang dapat menghasilkan potongan berupa dimer N-asetil glukosamin dan monomer N-asetil glukosamin. Enzim yang memotong ikatan oligomer N-asetil glukosamin menjadi dimer dinamakan kitobiosidase, namun bila potongan yang dihasilkan berupa monomer maka enzim tersebut dinamakan N-asetil glukosaminidase.



Gambar 2. Skema pemutusan domain enzim kitinolitik (Haliza & Soehartono, 2012).

3. Faktor-faktor yang mempengaruhi produksi enzim kitinase

Faktor-faktor yang mempengaruhi produksi enzim kitinase pada bakteri ialah suhu, pH, dan substrat spesifik. Suhu dan pH, merupakan faktor yang mempengaruhi kecepatan terbentuknya produk enzim kitinase pada bakteri. Sebagian besar enzim kitinase pada bakteri memiliki kondisi optimum pada kisaran pH 3,5-9 dengan kisaran suhu 40-75°C. Pada bakteri pengaruh pH dan suhu bergantung pada sumber asal bakteri diisolasi (Hamid *et al.*, 2013). Das *et al.*, (2012) melaporkan, telah ditemukan bakteri dari tanah yang menghasilkan enzim kitinase dengan pH optimum 7,5 dengan suhu 35°C. Soeka (2015) melaporkan, *Streptomyces macrosporeus* telah berhasil diisolasi dari tanah kebun dengan pH optimum 7,5 pada suhu 25°C. Han *et al.*, (2014) melaporkan, *Serratia* sp. dan *Bacillus* sp. berhasil diisolasi dari serangga dengan kisaran pH 7-8.

Substrat spesifik yang digunakan oleh bakteri mempengaruhi sebagian besar enzim kitinase yang dihasilkan. Sebagian besar bakteri mampu menggunakan substrat koloidal kitin, etilen glikol, dan kitin oligosakarida. Umumnya sumber utama substrat spesifik bakteri ialah koloidal kitin (Haliza & Soehartono, 2012). Lamine *et al.*, (2012) melaporkan, *Serratia marcescens* memiliki aktivitas kitinase konstan dengan konsentrasi koloidal kitin 1%-1,5% pada media kultur dan aktivitas tinggi dengan konsentrasi koloidal kitin 2 %.

4. Penentuan aktivitas kitinase

Aktivitas kitinase merupakan ukuran jumlah produk yang dihasilkan dari suatu pemecahan substrat kitin. Satu unit aktivitas kitinase didefinisikan sebagai pelepasan 1 μmol gula reduksi (N-asetil glukosamin) per menit. Penentuan aktivitas kitinase dapat dilakukan dengan menggunakan metode Reissig (1955).

Metode Reissig (1955), merupakan metode yang dimodifikasi untuk mengestimasi produk hasil degradasi kitin per menit setelah direaksikan dengan reagen. Reagen yang dipakai ialah *para-dimethyl-amino-benzaldehyde* (DMAB) dan dibaca pada panjang gelombang 540-585 nm. Hasil reaksi antara koloidal kitin, enzim dan potassium tetraborat pada suhu panas akan menghasilkan senyawa antara asetil heksosamin. Senyawa antara tersebut kemudian akan dikomplekskan bentuknya menggunakan reagen DMAB yang akan menghasilkan warna. Warna yang dihasilkan kemudian akan di baca pada panjang gelombang 544-585 nm.

Metode ini merupakan metode yang dapat diaplikasikan untuk menganalisis jumlah gula N-asetil glukosamin yang terhidrolisis dalam ekstrak enzim kasar (*crude enzyme*) dari jaringan hewan dan bakteri secara kuantitatif.

5. Isolasi bakteri penghasil enzim kitinase

Sumber bakteri umumnya berasal dari perairan, tanah, tempat pembuangan limbah udang dan sebagainya (Pratiwi *et al.*, 2015). Isolasi

bakteri penghasil enzim kitinase dapat diperoleh dari sumber isolasi dengan cara menumbuhkannya dalam media yang mengandung kitin.

Kitin yang dipergunakan merupakan suspensi dari koloidal kitin yang tambahkan dalam media agar untuk menumbuhkan isolat bakteri kitinolitik (Herdyastuti *et al.*, 2010). Koloidal kitin adalah kitin yang dilarutkan dalam asam klorida pekat. Koloidal kitin dapat dipergunakan dengan berbagai variasi. Hsu dan Lockwood (1975) melaporkan, konsentrasi medium isolasi untuk pertumbuhan aktinomisetes berkisar antara 0,2%-0,8% dan pada konsentrasi 0,4% ditemukan zona bening yang optimum. Soeka, (2015) dan Saima *et al.*, (2013) menggunakan koloidal kitin 1% untuk mengisolasi bakteri dari tanah. Selain mempergunakan koloidal kitin komposisi lain yang dipergunakan ialah garam mineral, *yeast extract* dan agar yang dilarutkan dalam aquadest.

Hal lain yang digunakan untuk mendapatkan bakteri penghasil enzim kitinase adalah metode isolasi. Metode isolasi seri bertingkat dengan pelarut garam fisiologis merupakan metode isolasi yang biasa digunakan (Babana *et al.*, 2013).

6. Bakteri penghasil enzim kitinase

Bakteri penghasil enzim kitinase adalah bakteri yang berperan dalam mendegradasi kitin menjadi senyawa turunan kitin. Enzim kitinase yang

dihasilkan oleh bakteri berbeda dalam hal jenis enzim yang dipakai untuk mendegradasi kitin menjadi senyawa turunan kitin. Enzim kitinase termasuk kedalam kelas hidrolase dengan jenis ikatan yang dihidrolisis ialah glikosidik ester karboksila. Enzim kitinase memiliki berat molekul 30-120 kDA (Haliza & Soehartono, 2012) pada mikrobial, 40,9 kDA yang ditemui pada manusia (Fusetti *et al.*, 2002). Kelompok bakteri yang memiliki aktivitas kitinolitik antara lain *Aeromonas*, *Serratia*, *Vibrio*, *Streptomyces* dan *Bacillus* (Saima *et al.*, 2013).

Penelitian mengenai isolasi bakteri kitinolitik dari tanah, perairan dan sumber kitin telah dilakukan untuk mengatasi masalah pencemaran limbah kitin, seperti: limbah cangkang udang. Beberapa penelitian telah berhasil mengisolasi dan mengidentifikasi bakteri kitinolitik dari tanah dan perairan. *Stenotrophomonas* sp. telah berhasil diseleksi menggunakan media kitin agar yang mengandung koloidal kitin 1% dari air embun dan air tanah Gunung Bromo, memiliki aktivitas enzim sebesar $4,8 \times 10^{-3}$ U/ml, berbentuk batang dan gram negatif (Soeka & Sulistiani, 2011).

Aeromonas hydrophila dan *A. punctata* telah berhasil diisolasi dari tanah dengan menggunakan media kitin agar yang mengandung koloidal kitin 1%, memiliki bentuk basil dan gram negatif. *A. hydrophila* memiliki aktivitas enzim kitinase sebesar 64,41 U/ml sedangkan *A. punctata* memiliki aktivitas enzim kitinase sebesar 59,41 U/ml yang ditumbuhkan pada media LB dan koloidal kitin (Saima *et al.*, 2013). *Cellulosimicrobium* spp., *Arthrobacter* spp., *Staphylococcus* spp. dan Enterobacteriaceae telah berhasil diisolasi

dari feses *Callimico goeldii* (Macdonald *et al.*, 2013). Bakteri hasil isolasi dari feses *Callimico goeldii* memiliki bentuk basil dan kokus, gram positif dan non motil. Han *et al.*, (2014), telah berhasil mengisolasi bakteri dari serangga yang memiliki bentuk basil dan basil-pendek, memiliki endospora, Gram positif dan Gram negatif.

Bacillus papandayan K29-14 berhasil diisolasi dari Kawah Kamojang Gunung Papandayan Garut, Jawa Barat dengan menggunakan koloidal kitin sebagai substrat pertumbuhan. *B. papandayan* K29-14 memiliki bentuk batang, berspora dan Gram positif, memiliki pH 8,0 dan suhu optimum 55°C, stabil terhadap panas selama 5 jam pada suhu 55°C (Subianto, 2001 dalam Haliza & Soehartono, 2012).

7. Kukang (*Nycticebus javanicus*)

Kukang adalah primata bertubuh kecil, kekar, dan memiliki ekor yang sangat pendek. Semua jari kukang mempunyai kuku, kecuali jari kedua, memiliki cakar pendek. Warna tubuh kukang pada umumnya coklat abu-abu pucat, dengan garis coklat dari bagian atas kepala hingga bagian tengah punggung atau pangkal ekor. Mata kukang memiliki lingkaran berwarna gelap mengelilingi kedua mata. Mata memancarkan cahaya kemerahan dengan jelas apabila terkena cahaya pada malam hari dan rambut halus dan lebat (Ario, 2010).



Gambar 3. *Nycticebus javanicus* (Nekaris *et al.*, 2008)

Klasifikasi kukang menurut E. Geoffroy, (1812) dalam (Nekaris *et al.*, 2008) ialah:

Kingdom : Animalia
Phylum : Chordata
Class : Mamalia
Order : Primates
Family : Lorisidae
Genus : *Nycticebus*
Species : *Nycticebus javanicus*

Penyebaran kukang di Indonesia meliputi Pulau Kalimantan, Sumatra, dan Jawa. Penyebaran kukang di Pulau Jawa meliputi kawasan Tamanjaya, Carita, Bodogol, Cibodas, Limbangan, Sokokembang, Pronojiwo, Bandalit, Cimungkat, Cipaganti, Ruksajaya, Bantarkalong, Sumedang dan Ciamis (Voskamp *et al.*, 2014).

Habitat kukang berada di hutan pegunungan, hutan sekunder, dan terkadang di daerah perkebunan. Kukang merupakan mamalia yang aktif di malam hari (nokturnal) dan biasanya hidup di atas pohon (arboreal) yang berukuran kecil hingga besar. Makanan kukang berupa buah-buahan yang berdaging dan serangga (Ario, 2010).

Struktur anatomi kukang memiliki lidah yang kecil, sekum yang panjang dan duodenum yang pendek. Anatomi kukang tersebut membantu kukang dalam memecah struktur karbohidrat, baik getah ataupun eksoskeleton invertebrata yang tersusun dari kitin (Reece *et al.*, 2011). Menurut Cabana & Plowman (2014), kukang memiliki usus besar dan sekum yang fungsional, dengan struktur tersebut memungkinkan kukang untuk mencerna serangga yang tersusun atas kitin. Telah dibuktikan kukang memiliki beberapa kitinase dalam mukosa lambung di sistem pencernaannya dan dapat menghidrolisis kitin menjadi energi.

Menurut IUCN (2015), kukang memiliki status terancam punah akibat hilangnya habitat dan perdagangan. Kehilangan habitat terjadi karena konversi lahan menjadi perkebunan yang berkorelasi terhadap penurunan tajam populasi kukang selama 10 tahun terakhir. Sedangkan tradisi perdagangan kukang menjadi salah satu perhatian karena, umumnya kukang digunakan sebagai hewan peliharaan, kepercayaan dan obat tradisional. Voskamp *et al.* (2014), melaporkan tradisi perdagangan dan hilangnya habitat merupakan penyebab terancam punahnya kukang.

Meskipun keberadaan kukang telah dilindungi sejak tahun 1993, perdagangan kukang masih marak diperjualbelikan.

Upaya lain yang telah dilakukan ialah melalui upaya penangkaran untuk rehabilitasi kukang. Upaya penangkaran untuk rehabilitasi kukang merupakan perlindungan satwa seperti mamalia yang terancam punah supaya dapat dikembalikan lagi ke alam. Pola makan kukang di penangkaran seharusnya tidak jauh berbeda dengan yang ada di alam (Tabel 1).

Tabel 1. Perbedaan pakan kukang di alam dan di penangkaran

Pakan kukang di alam	Pakan Kukang di Penangkaran (pusat rehabilitasi)
Eksudat dari pohon, sari bunga, serangga (Starr & Nekaris, 2013);	Jangkrik, Ulat Hongkong, ulat sutera, Cicak dan kadal rumput (Sinaga <i>et al.</i> , 2010)
Biji, serangga, kadal, mamalia kecil (Napier & Napier, 1967)	Buah-buahan, jangkrik, ulat pohon, ayam atau burung kecil, tokek, kodok (Sanchez, 2008)

Cabana & Plowman (2014) melaporkan, kukang yang terdapat di penangkaran mengalami masalah penurunan kesehatan terutama kesehatan gigi, kegagalan reproduksi dan obesitas, dan dilaporkan kesehatan kukang meningkat setelah diberi perlakuan pada pola pakan kukang di penangkaran. Penambahan pakan berupa getah pohon, sari bunga dan serangga serta mengurangi buah akan meningkatkan kesehatan kukang di penangkaran.

Pakan kukang di alam dan di penangkaran berkaitan pula dengan proses defekasi dengan bantuan mikroflora dalam tubuh kukang. Xu *et al.*

(2013), menyatakan, analisis metagenomik taksonomi menunjukkan mikroba pada feses kukang didominasi Filum Bacteroidetes dan Proteobacteria. Filum Bacteroidetes meliputi Bacteriodes, Prevotella, dan Paracateriodes yang beberapa diantaranya berfungsi sebagai pemecah protein dan karbohidrat serta membantu menghindari radang usus besar dalam tubuh kukang. Sementara Filum Proteobacteria meliputi *Pseudomonas*, Enterobactidales dan Burkholderiales, yang diantaranya memiliki fungsi untuk mendegradasi pelarut organik dalam tubuh kukang.

Beberapa mikroflora dalam tubuh kukang berfungsi sebagai agen pencernaan, sehingga proses penyerapan nutrisi dapat berjalan dengan baik dan menghasilkan produk akhir berupa feses. Feses merupakan indikator yang baik untuk mengetahui kesehatan saluran cerna. Saluran pencernaan dalam tubuh hewan mencerminkan sebuah komunitas kompleks mikroba yang ada di dalam saluran cerna.

B. Kerangka Berpikir

Penggunaan kitin kembali sebagai produk yang bermanfaat melibatkan peran enzim kitinase. Enzim kitinase dapat ditemui pada berbagai mikroorganisme, salah satunya bakteri. Bakteri penghasil enzim kitinase menggunakan kitin sebagai sumber nutrisi untuk pertumbuhannya. Penelitian baru-baru ini menyatakan, telah ditemukan bakteri penghasil enzim kitinase dari feses primata pemakan serangga.

Kukang (*N. javanicus*) merupakan primata yang mengkonsumsi serangga. Serangga secara alami komponen tubuhnya terusun atas kitin. Proses degradasi kitin dalam tubuh kukang membutuhkan bantuan bakteri penghasil enzim kitinase. Bakteri penghasil enzim kitinase diduga dapat diisolasi dari feses kukang. Oleh karena itu, diharapkan akan didapatkan isolat bakteri penghasil enzim kitinase dari feses kukang asal Garut dan Bogor.

BAB III METODOLOGI PENELITIAN

A. Tujuan Operasional

Tujuan operasional penelitian ini adalah:

1. Melakukan isolasi bakteri kitinolitik dari feses kukang (*N. javanicus*) asal Garut dan Bogor.
2. Melakukan pemilihan isolat bakteri kitinolitik yang diisolasi dari feses kukang (*N. javanicus*) asal Garut dan Bogor dengan berdasarkan indeks kitinolitik yang terbentuk.
3. Mengukur jumlah sel bakteri kitinolitik dengan menggunakan teknik spektrofotometri.
4. Mengukur aktivitas enzim kitinase dari bakteri kitinolitik dengan teknik spektrofotometri.
5. Melakukan karakterisasi isolat bakteri dengan melihat morfologi bakteri secara makroskopis dan mikroskopis

B. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi dan Genetika Universitas Negeri Jakarta, pada bulan April-Desember 2015.

C. Metode Penelitian

Metode yang digunakan dalam penelitian adalah metode deskriptif eksploratif, dengan melihat aktivitas enzim kitinase, indeks kitinolitik,

jumlah sel, dan kadar protein pada isolat bakteri.

D. Prosedur Penelitian

1. Alat

Alat yang digunakan selama penelitian adalah *sentrifuge*, spektrofotometer hitachi U-3900, *vortex*, oven, pH indikator universal, jangka sorong digital, autoklaf, timbangan digital, *shaking incubator*, *magnetic stirer* dan *hot plate*, *laminar air flow*, penangas air, mikropipet, *freezer* dan refrigtor. Peralatan gelas yang digunakan adalah labu erlenmeyer, cawan petri, tabung reaksi, corong gelas, batang pengaduk, gelas kimia, gelas ukur, spatel *Drygalski*, dan botol selai.

2. Bahan

Bahan-bahan yang digunakan terdiri dari:

- a) Sampel feses dari Garut dan Bogor, dua sampel diperoleh dari masing-masing lokasi. Sampel feses dari Garut merupakan sampel yang didapat dari kukang liar yang bernama Tereh dan Sherly. Sedangkan sampel feses dari Bogor merupakan sampel kukang penangkaran yang bernama K1 dan K2. Sampel tersebut kemudian dimasukkan kedalam tabung vial steril. Tabung vial dimasukkan kedalam *cooling box* dan dibawa ke laboratorium untuk dianalisis.
- b) Medium, Medium *colloidal chitin agar* (CCA) digunakan sebagai medium isolasi, skrining dan uji aktivitas enzim kitinase bakteri kitinolitik. Medium *nutrien agar* (NA) digunakan untuk pengamatan

morfologi, purifikasi isolat, pemeliharaan isolat *working culture* dan *stock culture*.

- c) Bahan Kimia, HCL 37% dan NaOH 10 N digunakan untuk pembuatan medium CCA. Asam asetat glacial digunakan untuk mengencerkan reagen DMAB. Reagen DMAB, dan potassium tetraborat digunakan saat pengujian aktivitas enzim kitinase.

3. Cara kerja

a. Pembuatan medium dan sterilisasi

Medium yang digunakan terdiri dari medium *colloidal chitin agar* (CCA), dan *nutrient agar* (NA). Pembuatan medium dapat dilihat pada lampiran 1. Medium kemudian dilarutkan dalam aquadest hingga homogen. Setelah homogen medium diberi sumbat kapas dan ditutup kertas. Alat dimasukkan kedalam plastik dan dibalut kertas. Sterilisasi alat dan medium dilakukan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C dan tekanan 2 atm selama 15 menit (Benson, 2001).

b. Isolasi bakteri kitinolitik

Isolasi bakteri kitinolitik dilakukan menggunakan metode langsung dan metode pengayaan berdasarkan modifikasi Babana *et al.*, (2013), sebanyak sampel feses 1 g disuspensikan dalam 9 ml larutan fisiologis steril sampai homogen dan dilakukan pengenceran sampai 1:10 dan 1:100. Sebanyak 0,1 ml suspensi sel diinokulasikan ke medium CCA 1% dengan

dua kali pengulangan, dan diinkubasi selama 48 jam pada suhu 28 °C. Koloni bakteri yang tumbuh pada medium CCA 1% dibuatkan *colony library*. Pengambilan koloni bakteri dilakukan menggunakan tusuk gigi steril. Bakteri yang tumbuh dan menghasilkan zona bening disekitar koloni pada medium kitin agar kemudian dipurifikasi. Purifikasi dilakukan pada medium *nutrient agar*, dan diinkubasi pada suhu 28 °C selama 24 jam (Cappucino & Sherman, 2001 dalam Sukmawati, 2014). Koloni bakteri yang telah dipurifikasi dipelihara dalam media *nutrient agar* sebagai biakan *working culture* dan *stock culture*, biakan *working culture* kemudian dipakai untuk pengujian *pre-eliminatory* zona bening.

c. Pengujian *pre-eliminatory* zona bening

Pengujian *pre-eliminatory* zona bening dilakukan dengan menumbuhkan bakteri penghasil enzim kitinase dalam medium *colloidal chitin agar* (CCA) 1%. Sebanyak 4-5 goresan bakteri dipindahkan kedalam medium yang dibagi menjadi 4 kuadran. Setiap kuadran dibuatkan kotak dengan ukuran 0,5 cm X 0,5 cm. Bakteri yang menghasilkan zona bening kemudian diberikan skor '+' untuk zona bening kecil (range 0,1-0,79 cm), '++' untuk zona bening sedang (range 0,80-0,89 cm), '+++ ' untuk zona bening besar (range 0,90-0,94 cm), '++++' untuk zona bening sangat besar (range 0,95-1,91 cm) dan '-' untuk tidak adanya zona bening (0,0 cm).

d. Pengujian kemampuan isolat bakteri penghasil enzim kitinase berdasarkan nilai indeks kitinolitik

Pengujian dilakukan dengan menginokulasi isolat bakteri ke dalam CCA 1% sampai usia 24 jam. Sebanyak 15 µl suspensi sel bakteri yang tumbuh kemudian diinokulasikan kedalam sumur pada medium CCA 1% dan diinkubasi selama 48 jam pada suhu 27-28°C. Pembuatan sumur pada medium CCA 1% dilakukan dengan menggunakan sedotan steril berdiameter 0,5 cm. Satu cawan petri terbagi menjadi 4 kuadran dan masing-masing kuadran dibuatkan sumuran (Fitriana & Jayuska, 2014). Setelah bakteri diinokulasikan ke dalam sumur, bakteri dalam medium pengujian diinkubasi selama 48 jam. Selanjutnya diukur diameter zona bening untuk menentukan indeks kitinolitik. Ukuran diameter indeks kitinolitik yang didapat menunjukkan jumlah monomer N-asetil glukosamin yang terbentuk dari hasil pemecahan kitin oleh enzim kitinase (Pratiwi *et al.*, 2015). Bakteri hasil isolasi yang potensial dan menghasilkan indeks kitinolitik terbesar kemudian dipilih untuk uji aktivitas enzim kitinase.

Pratiwi *et al.*, (2015) menyatakan, indeks kitinolitik didapat dengan cara:

$$\text{Indeks kitinolitik} = \frac{\text{Diameter zona bening yang terbentuk disekitar koloni}}{\text{diameter koloni bakteri}}$$

e. Pengamatan morfologi koloni bakteri secara makroskopik dan mikroskopik

Pengamatan morfologi koloni bakteri secara makroskopik dan mikroskopik dilakukan pada medium NA dan diinkubasi selama 24 jam suhu 28° C. Parameter pengamatan makroskopik bakteri berupa bentuk, warna,

tepi, dan elevasi koloni. Pengamatan mikroskopis bakteri berupa bentuk sel bakteri.

f. Pengukuran jumlah sel bakteri

Pengukuran jumlah sel bakteri dilakukan berdasarkan Colome *et al.*, (1986), pengukuran jumlah sel bakteri bertujuan untuk menentukan kepadatan sel bakteri. Jumlah populasi bakteri dapat diukur menggunakan pengukuran OD (*optical density*) menggunakan teknik spektrofotometri. Kepadatan sel bakteri dapat dihitung dengan menumbuhkan bakteri pada media agar miring dan disuspensikan menggunakan aquadest. Suspensi bakteri kemudian diukur pada panjang gelombang 600 nm.

g. Pengukuran aktivitas enzim kitinase

Pengujian aktivitas kitinase dilakukan berdasarkan modifikasi metode Soeka & Sulistiani (2011). Bakteri yang akan digunakan untuk uji aktivitas enzim kitinase ditumbuhkan pada medium CCA 1% miring selama 24 jam sebanyak 15 gores. Kemudian dibuat suspensi bakteri dengan menghomogenkan biakan bakteri dengan 5 ml aquadest. Setelah itu suspensi bakteri di sentrifugasi dengan kecepatan 10.160 g selama 10 menit. Supernatan hasil sentrifugasi merupakan larutan enzim kasar. Sebanyak 0,5 ml larutan enzim kasar direaksikan dengan 0,5 ml substrat koloidal kitin 1% dengan pH 7 dan diinkubasi pada suhu 50⁰C selama 30 menit. Setelah inkubasi selama 30 menit reaksi dilanjutkan dengan tujuan

menghentikan reaksi enzimatik (dimasukkan ke dalam air mendidih 100°C) selama 5 menit. Selanjutnya disentrifugasi dengan kecepatan 10,160 g selama 5 menit dan supernatan dipisahkan dari pellet. Sebanyak 250 µl supernatan ditambah 50 µl potasium tetraborat, dididihkan selama 3 menit dan didinginkan. Ditambahkan 1,25 ml reagen 4-(dimetilamino)-benzaldehid (DMAB), diinkubasi pada suhu 37°C selama 20 menit kemudian diukur aktivitas enzim kitinase dengan menggunakan nilai OD spektrofotometer pada panjang gelombang 584 nm.

Perhitungan nilai aktivitas enzim kitinase berdasarkan Widhyastuti (2010):

$$\text{Aktivitas} = \frac{[\text{GlcNac}]_{\text{sampel}} - [\text{GlcNac}]_{\text{blanko}} \times V_{\text{tr}}}{(t \times V_{\text{a}} \times V_{\text{e}})}$$

Keterangan,

A : Aktivitas

[GlcNAc] : Konsentrasi N-asetil-D-glukosamina (µmol) hasil reaksi enzimatik, ditetapkan menggunakan persamaan kurva standar

t : Waktu inkubasi (30 menit)

V_{tr} : Volume total reaksi enzimatik (1,0 ml)

V_e : Volume enzim yang digunakan (0,5 ml)

V_a : Volume filtrat yang dianalisa (0,5 ml)

h. Pengukuran kadar protein

Pengukuran kadar protein dilakukan berdasarkan Walker (2002), dengan menggunakan metode spektrofotometri. Sebanyak 15 gores bakteri

ditumbuhkan pada medium CCA 1% miring. Setelah itu suspensi bakteri disentrifugasi dengan kecepatan 3500 rpm selama 10 menit. Supernatan kemudian diukur pada panjang gelombang 280 nm. Konsentrasi protein (mg/ml) kemudian didapat dari perhitungan larutan standar BSA (bovine serum albumin).

i. Pewarnaan gram

Prosedur pewarnaan Gram dilakukan menurut Benson (2001). Sebelum memulai pewarnaan, kaca objek dibersihkan terlebih dahulu dengan alkohol 70% dan dilewatkan diatas lampu spirtus. Selanjutnya ditetaskan akuades steril dan dibuat apusan bakteri, kemudian difiksasi. Larutan crystal violet (Gram A) kemudian ditetaskan pada apusan bakteri dan didiamkan selama 20 detik. Setelah itu kaca objek dibilas dengan air mengalir dan dikeringkan. Setelah kering, larutan iodine (Gram B) ditetaskan pada apusan dan didiamkan selama 1 menit. Selanjutnya kaca objek dibilas dengan air mengalir dan dikeringkan. Kemudian dengan cara yang sama, apusan bakteri ditetaskan dengan larutan etanol 95% (Gram C), dan larutan safranin (Gram D). Setelah penetesan, larutan Gram C dan Gram D masing-masing didiamkan 20 detik. Setelah dibilas dengan air mengalir dan dikeringkan, bentuk sel dan tipe gram dari tiap isolat diamati menggunakan mikroskop perbesaran 1000X.

E. Teknik Pengumpulan data

Data yang diambil dalam penelitian ini adalah kemampuan isolat dalam menghasilkan enzim kitinase diukur dengan indeks kitinolitik setiap isolat dan data aktivitas enzim kitinase bakteri secara kuantitatif diukur menggunakan spektrofotometer serta morfologi makroskopis dan mikroskopis bakteri.

F. Teknik Analisis Data

Hasil penelitian disusun dalam bentuk tabel dan berupa data kualitatif dan kuantitatif. Seluruh data yang diperoleh kemudian dianalisis dan dibandingkan dengan pustaka yang sesuai.

BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

1. Bakteri penghasil enzim kitinase dari feses kukang (*N. javanicus*)

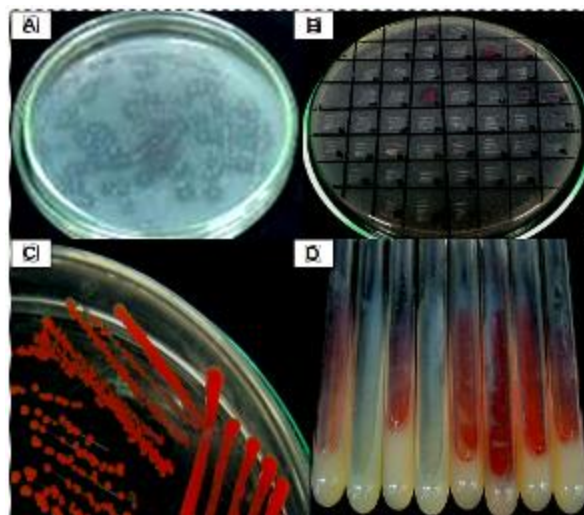
Pengambilan sampel feses dilakukan pada bulan April sampai dengan Mei 2015 dengan menggunakan metode *non-invasive sampling*. Pengambilan data menggunakan metode *non-invasive sampling* dilakukan karena, kukang merupakan satwa liar dan terancam punah. Satwa liar dan terancam punah membutuhkan pendekatan tersendiri karena populasinya kecil dan sulit ditemui. Metode *non-invasive sampling* ini dapat mewakili jumlah sampel yang diambil dan sumber perolehan sampel yang didapat saat dilakukan sampling. Zhang *et al.*, (2013) menyatakan, pengambilan sampel pada metode *non-invasive sampling* dapat dilakukan pada berbagai spesies dengan kisaran yang luas. Adapun sumber yang dipakai dapat berupa feses.

Pengambilan sampel secara non-invasif tidak memerlukan penangkapan pada objek penelitian ataupun bersinanggungan langsung dengan hewan uji sehingga bisa menghilangkan resiko stres fisiologis atau efek samping berbahaya akibat penggunaan obat bius bagi hewan yang bersangkutan (Savira, 2012). Penelitian mengenai sampling menggunakan metode *non-invasive sampling* telah dilakukan oleh Nugroho, (2014) untuk memperoleh materi genetik banteng liar berdasarkan analisis mitokondria dari sampel feses. Xu *et al.*, (2013), menggunakan metode *non-invasive*

sampling untuk analisis metagenomik taksonomi pada feses kukang. Matsui (2007) melaporkan, penggunaan metode *non-invasive sampling* efektif digunakan untuk mengisolasi bakteri dari feses kukang karena, dengan metode ini hasil yang didapat sesuai dengan sumber substrat yang digunakan.

Sampel feses kukang diperoleh dari dua lokasi yang berbeda, yaitu dari hutan perkebunan di Garut dan kandang pusat rehabilitasi di Bogor. Tujuan pengambilan sampel di dua lokasi yang berbeda adalah untuk mendapatkan variasi dan jumlah isolat bakteri yang banyak serta berpotensi menghasilkan enzim kitinase.

Isolasi bakteri menggunakan metode *dilution* dengan teknik *spread plate*, bertujuan untuk mendapatkan jumlah bakteri yang banyak dan tumbuh di permukaan agar (Gambar 4).



Gambar 4. Bakteri hasil isolasi asal feses kukang (*N. javanicus*) dari Bogor.

- Hasil isolasi bakteri inkubasi 24 jam, medium CCA 1%, suhu 27-28°C.
- Pembuatan *colony library* inkubasi 24 jam, medium CCA 1%, suhu 27-28°C.

- c. Purifikasi isolat bakteri inkubasi 24, medium NA, suhu 27-28°C.
- d. Penyimpanan *stock culture* inkubasi 24, medium NA, suhu 27-28°C.

Tahap selanjutnya setelah isolasi ialah pembuatan *colony library*. Pembuatan *colony library* bertujuan untuk menghitung jumlah koloni bakteri dan melihat perbedaan morfologi setiap koloni bakteri serta efektivitas penggunaan medium isolasi bakteri. Koloni bakteri yang tumbuh kemudian dipilih berdasarkan adanya zona bening disekitar koloni. Koloni yang memiliki zona bening kemudian dipurifikasi untuk mendapatkan koloni tunggal. Setiap koloni tunggal akan disimpan dalam medium *Nutrient Agar* (NA) untuk dijadikan *stock culture* dan *working culture*.

Hasil isolasi bakteri asal feses kukang diperoleh sebanyak 1085 isolat. Sampel isolat bakteri tersebut terdiri dari; 430 isolat bakteri asal feses sampel Garut dan 655 isolat bakteri asal sampel Bogor (Tabel 2). Perolehan isolat bakteri asal sampel Bogor lebih banyak berbeda dengan isolat bakteri asal sampel Garut.

Tabel 2. Perolehan isolat bakteri dari feses kukang (*N. javanicus* asal Garut dan Bogor. Inkubasi 24 jam, medium CCA 1%, suhu 27-28°C.

Asal sampel	Asal feses	Total isolat
Garut	Sampel 1	300
	Sampel 2	130
Bogor	Sampel 1	438
	Sampel 2	217
Jumlah		1085

Perbedaan hasil perolehan jumlah isolat bakteri dikarenakan terdapatnya perbedaan waktu pengambilan sampel feses, dan suhu

penyimpanan sebelum dilakukan isolasi bakteri. Waktu pengambilan sampel feses asal Garut dilakukan terlebih dahulu, sehingga sampel feses kukang disimpan dalam *freezer* -20°C sebelum dilakukan isolasi bakteri. Lain halnya dengan sampel feses kukang asal Bogor yang langsung dilakukan isolasi bakteri tanpa disimpan dalam *freezer*.

Penyimpanan sampel feses pada *freezer* dengan suhu tertentu berpengaruh terhadap pertumbuhan mikroorganisme yang akan mengerucut pada jumlah mikroorganisme. Carroll *et al.*, (2012) melaporkan, suhu penyimpanan sangat mempengaruhi jumlah mikroorganisme, suhu -80°C merupakan suhu yang optimal dipakai ketika dilakukan penyimpanan sampel. Pendapat tersebut diperkuat oleh pernyataan Sukmawati (2014), penyimpanan sampel feses pada suhu -20°C tanpa larutan protektan dapat mempengaruhi pertumbuhan bakteri karena protektan dapat dijadikan sebagai pelindung sel selama proses *freezing*. Penyimpanan sampel feses kukang asal Garut pada suhu -20°C tanpa protektan dapat mematikan sel mikroorganisme. Protektan merupakan senyawa kimia yang dapat mengurangi kerusakan sel. Kelompok senyawa kimia yang berperan, antara lain; asam amino, sakarida dan makromolekul.

Berdasarkan kemampuan menghasilkan zona bening pada tahap *colony library* terpilih 36 isolat bakteri asal Garut dan 44 isolat bakteri asal Bogor. Total keseluruhan sampel berjumlah 80 isolat bakteri yang terpelihara dalam medium NA sebagai *stock culture* dan *working culture*.

2. Pengujian *pre-eliminatory* zona bening terhadap 80 isolat

Pengujian *pre-eliminatory* zona bening terhadap 80 isolat bertujuan untuk mengetahui aktivitas bakteri penghasil enzim kitinase pada medium CCA (*colloidal chitin agar*) 1%. Pengujian *pre-eliminatory* zona bening dilakukan setelah penyimpanan isolat bakteri pada *stock culture*. Pengujian *pre-eliminatory* diawali dengan membagi medium CCA 1%. Cawan petri dibagi menjadi empat kuadran dengan masing-masing kuadran dibuatkan kotak dengan ukuran 0,5 cm X 0,5 cm. Sebanyak 5 goresan bakteri diinokulasikan ke dalam kotak pada medium CCA 1%. Bakteri ditumbuhkan selama 96 jam pada suhu 27-28°C. Hasil positif ditunjukkan dengan adanya zona bening di sekitar koloni (Gambar 5).



Gambar 5. Zona bening yang terbentuk pada pengujian *pre-eliminatory* zona bening inkubasi 72 jam pada medium CCA 1%, suhu 27-28°C.

- a. Isolat bakteri positif menghasilkan zona bening.
- b. Isolat bakteri negatif menghasilkan zona bening.

Tabel 3. Parameter hasil uji *pre-eliminatory* dan jumlah isolat bakteri penghasil zona bening dalam uji pada media CCA 1%, inkubasi 96 jam, suhu 27-28°C.

Parameter uji zona bening pada medium CCA 1% Isolat Garut	Jumlah isolat	Hasil uji zona bening pada medium <i>colloidal chitin agar</i> 1% Isolat Bogor	Jumlah isolat
++++ ^a	6	++++ ^a	41
+++ ^b	12	+++ ^b	0
++ ^c	11	++ ^c	0
+ ^d	5	+ ^d	2
-	2	-	1
Total	36	Total	44

a = zona bening sangat besar, *range* (0,95-1,91) cm

b = zona bening besar, *range* (0,90-0,94) cm

c = zona bening sedang, *range* (0,80-0,89) cm

d = zona bening kecil, *range* (0,1-0,79) cm

- = tidak terdapat zona bening, (0,0) cm

Hasil pengujian *pre-eliminatory* zona bening terhadap 80 isolat bakteri diperoleh 47 isolat potensial zona bening dan 3 isolat tidak menghasilkan zona bening (Tabel 3). Isolat bakteri yang menghasilkan zona bening yang mampu menghasilkan enzim kitinase akan membentuk zona bening pada medium CCA 1% yang mengandung kitin. Berdasarkan pengamatan, zona bening sudah mulai terbentuk pada usia biakan 24 jam setelah diinokulasikan pada medium CCA 1%. Zona bening yang dihasilkan pada isolat bakteri pengukuran hari pertama sampai dengan hari ke-empat mengalami fluktuasi angka yang bervariasi.

Perbedaan ukuran zona bening yang dihasilkan setiap isolat bakteri disebabkan adanya perbedaan aktivitas kitinase dari masing-masing isolat. Menurut Soeka & Sulistiani (2011) dan Pratiwi *et al.*, (2015), ukuran zona bening yang dihasilkan bergantung pada jumlah monomer N-asetil

glukosamin yang dihasilkan dari proses hidrolisis kitin oleh kitinase. Semakin besar zona bening yang terbentuk, maka semakin banyak enzim kitinase yang dihasilkan sehingga aktivitas kitinolitik dari isolat bakteri akan semakin tinggi. Degradasi oligomer kitin menjadi senyawa yang lebih sederhana membuat medium tampak menjadi bening disekitar koloni.

Adapun diantaranya tiga isolat bakteri yang tidak menghasilkan zona bening. Tidak dihasilkannya zona bening pada ketiga isolat diduga disebabkan oleh penyimpanan biakan bakteri penghasil enzim kitinase pada medium NA kurang menginduksi untuk diproduksinya enzim kitinase, sehingga ketika bakteri diberikan medium CCA 1% belum mampu untuk memproduksi enzim kitinase.

Cahyani (2013) melaporkan, kemampuan bakteri untuk menghasilkan aktivitas kitinase akan menurun ketika bakteri tidak ditumbuhkan pada media yang mengandung kitin. Pernyataan tersebut diperkuat dengan penelitian Saima *et al.*, (2013), ditambahkannya *colloidal chitin* pada medium akan menginduksi produksi enzim yang dihasilkan oleh bakteri.

3. Penentuan kemampuan isolat bakteri penghasil enzim kitinase berdasarkan indeks kitinolitik.

Penentuan kemampuan isolat bakteri penghasil enzim kitinase berdasarkan indeks kitinolitik dilakukan berdasarkan kemampuan menghasilkan zona bening pada pengujian *pre-eliminatory* (*range* zona bening berkisar > 0,90 cm) dan karakteristik makroskopis isolat bakteri (Lampiran

2). Penentuan indeks kitinolitik isolat bakteri potensial dilakukan dengan menggunakan metode sumur berdasarkan Fitriana & Jayuska (2014).

Penggunaan metode sumur merupakan metode yang efektif untuk melihat zona bening yang terbentuk dan menampilkan hasil yang jelas. Koloni bakteri yang tumbuh dapat memanfaatkan medium dari permukaan atas hingga permukaan bawah medium CCA 1%. Menurut Listari (2009), kelebihan metode sumur yaitu memiliki pengukuran zona yang jelas, karena isolat bakteri yang tumbuh tidak hanya dipermukaan media tetapi juga sampai ke bawah media pertumbuhan.

Sebanyak 15 µl suspensi sel bakteri yang tumbuh pada medium *colloidal chitin broth* (CCB) 1% inkubasi 24 jam kemudian diinokulasikan kedalam sumur pada medium CCA 1% dan diinkubasi selama 48 jam pada suhu 27-28°C. Penggunaan medium CCA 1% pada saat uji kemampuan isolat bakteri dilakukan supaya zona bening terlihat jelas dan konsentrasi koloidal kitin pada medium suspensi bakteri yang ditumbuhkan sebelumnya sama dengan konsentrasi koloidal kitin saat medium uji indeks kitinolitik. Hal ini dilakukan supaya tidak terjadi perbedaan konsentrasi koloidal kitin antara medium pertumbuhan bakteri dan medium uji indeks kitinolitik serta aktivitas enzim kitinase yang dihasilkan konstan. Perbedaan konsentrasi koloidal kitin akan menentukan tekanan osmosis suatu larutan. Semakin tinggi konsentrasi zat terlarut, maka semakin tinggi pula tekanan osmosis larutan tersebut dan sebaliknya. Tekanan osmosis mempengaruhi sel mikroba karena berkaitan dengan ketersediaan air bagi sel mikroba.

Hsu & Lockwood (1975) menyatakan, adanya perbedaan konsentrasi koloidal kitin yang dipakai akan berpengaruh jelas terhadap zona bening yang terbentuk. Hal tersebut juga diperkuat oleh pendapat Lamine *et al.*, (2012) yang menyatakan, konsentrasi koloidal kitin 1% merupakan konsentrasi kostan untuk dihasilkannya enzim kitinase.

Tabel 4. Indeks kitinolitik isolat bakteri Garut dan Bogor pada medium CCA 1%, inkubasi 48 jam, suhu 27-28°C.

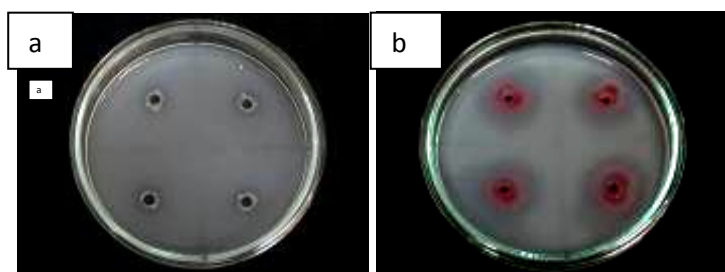
No.	Kode Isolat	IK 1	IK 2	IK 3	IK 4	Rata-rata IK (cm)±SE
1	K1.60	3,41	3,85	2,85	2,97	3,27±0,23
2	K1.1	1,89	2,50	3,31	1,19	2,22±0,45
3	K1.25	1,66	2,45	1,93	1,88	1,98±0,17
4	K1.90	2,38	2,28	1,78	1,36	1,95±0,24
5	K1.33	2,10	1,79	1,08	2,32	1,82±0,27
6	K1.97	1,48	1,54	1,55	1,52	1,52±0,01
7	K1.59	1,77	1,39	1,41	1,42	1,50±0,09
8	K1.2	1,13	1,27	1,31	1,09	1,20±0,05
9	K1.73	1,00	1,09	0,93	1,00	1,01±0,03
10	K1.56	0,50	1,16	1,43	0,89	0,99±0,05
11	K1.85	0,79	1,02	0,81	0,91	0,88±0,05
12	T.68	0,72	0,53	0,58	0,54	0,59±0,04
13	T.65	0,63	0,53	0,54	0,60	0,58±0,02
14	T.63	0,56	0,64	0,57	0,53	0,57±0,06
15	T.50	0,65	0,50	0,41	0,44	0,50±0,05
16	T.51	0,59	0,44	0,56	0,39	0,49±0,05
17	T.56	0,34	0,44	0,54	0,37	0,42±0,20
18	T.67	0,29	0,25	0,39	0,49	0,36±0,45
19	K1.100	0,26	0,31	0,41	0,29	0,32±0,03
20	T.37	0,32	0,29	0,30	0,16	0,27±0,04
21	K1.13	0,26	0,33	0,10	0,31	0,25±0,05
22	K1.6	0,22	0,23	0,20	0,19	0,21±0,01

K1=isolat asal Bogor, T= isolat asal Garut, IK= indeks kitinolitik, SE= standar eror

Berdasarkan hasil perhitungan indeks kitinolitik terdapat variasi hasil pengukuran indeks kitinolitik. Variasi nilai indeks kitinolitik memiliki *range*

dengan persentase berbeda-beda, antara lain: *range* 2,23-3,27 cm (4,55%), *range* 1,52-2,22 cm (22,73%), *range* 1,02-1,50 cm (13,64%), *range* 0,88-0,99 cm (9,10%), *range* 0,50-0,59 cm (18,18%), *range* 0,42-0,49 cm (9,10%), *range* 0,32-0,36 cm (9,10%), dan *range* 0,21-0,27 cm (13,64%) (Tabel 4).

Perolehan nilai indeks kitinolitik dengan *range* 3,27-0,9 cm (tertinggi) didominasi oleh isolat bakteri asal Bogor. Hal tersebut dapat diduga, kemampuan isolat bakteri asal Bogor lebih cepat dalam mendegradasi substrat kitin yang ada pada medium CCA 1%. Kemampuan degradasi ditandai dengan terbentuknya zona bening disekitar medium CCA 1%. Lain halnya dengan isolat bakteri asal Garut yang memiliki kemampuan mendegradasi dengan *range* 0,59-0,36 cm. Fenomena tersebut memperkuat dugaan sebelumnya dimana isolat bakteri asal Garut memiliki gambaran penghasilan enzim kitinase yang lebih rendah, berbeda dengan isolat bakteri asal Bogor (Gambar 6).



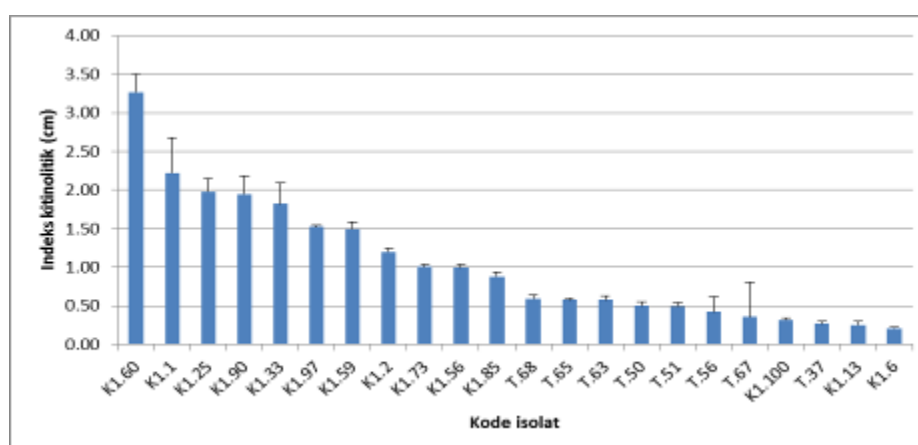
Gambar 6. Zona bening yang dihasilkan isolat bakteri inkubasi 48 jam, pada medium CCA 1%, suhu 27-28°C.

- a) T.50 (Garut), dan
- b) K1.73 (Bogor).

Soeka & Sulistiani (2011) dalam penelitiannya menyatakan, isolat yang memiliki aktivitas enzim kitinase ditandai dengan adanya zona bening di

sekitar koloni. Keberadaan zona bening di sekitar koloni bakteri akan menandakan besarnya kemampuan bakteri dalam menggunakan koloidal kitin sebagai substrat yang mengandung karbon untuk pertumbuhan bakteri (Yunita *et al.*, 2014). Zona bening yang terbentuk diduga berasal dari produk hasil degradasi koloidal kitin yang bersifat hidrofilik sehingga dapat berikatan dengan air yang terkandung dalam medium CCA 1%, sedangkan pada medium yang tidak terdapat zona bening disebabkan oleh sifat komponen kitin yang tidak mudah larut dalam air atau hidrofobik. Menurut Synowiecky & Al Khateeb (2003), sifat turunan kitin yang penting untuk aplikasi yang dapat dimanfaatkan ialah memiliki kemampuan mengikat air dan minyak karena terdapat gugus hidrofobik dan hidrofilik.

Hasil rata-rata indeks kitinolitik 48 jam inkubasi, menunjukkan isolat K1.60, K1.1, K1.25, K1.90, K1.33, K1.97, K1.59 memproduksi enzim kitinolitik yang mampu mendegradasi substrat kitin lebih cepat dibandingkan 15 isolat lainnya (Gambar 7).



Gambar 7. Rata-rata indeks kitinolitik setiap isolat pada medium CCA 1%, usia 48 jam, suhu 27-28°C.

Kecepatan mendegradasi substrat kitin akan cepat ketika faktor lingkungan bakteri sesuai dengan lingkungan ketika bakteri diisolasi dari sumbernya. Berdasarkan pengamatan ketika pengambilan sampel, feses dari Garut memiliki rentang pH 5-6 sedangkan pada sampel feses dari Bogor memiliki rentang pH 6-7. Berdasarkan pengamatan tersebut diduga, pH lingkungan bakteri (feses) berpengaruh terhadap pertumbuhan bakteri dalam menghasilkan indeks kitinolitik setiap bakteri.

Hal tersebut sesuai dengan beberapa penelitian (Das *et al.*, 2012; Soeka, 2015 & Han *et al.*, 2014) bahwa pH optimum yang dihasilkan bakteri sesuai dengan pH lingkungan sumber bakteri diisolasi. Haliza & Soehartono (2012) menyatakan, setiap bakteri memiliki karakter yang dipengaruhi beberapa faktor lingkungan. Faktor lingkungan mempengaruhi produksi enzim kitinase pada bakteri. Beberapa faktor lingkungan yang berpengaruh ialah suhu, pH, dan substrat spesifik. Hal tersebut sependapat dengan pernyataan Hamid *et al.*, (2013), keadaan optimum bakteri dalam menghasilkan enzim dipengaruhi oleh pH dan suhu.

4. Uji aktivitas enzim kitinase bakteri dari feses kukang (*N. javanicus*)

Pengujian aktivitas enzim kitinase dilakukan berdasarkan modifikasi metode Soeka & Sulistiani (2012). Dua belas isolat bakteri dipilih berdasarkan nilai indeks kitinolitik terbesar pada kedua lokasi. Pengukuran aktivitas enzim kitinase dilakukan dengan menumbuhkan bakteri dalam medium CCA *slant* 1% dan inkubasi selama 24 jam. Pendekatan pengujian

aktivitas enzim kitinase ketika usia 24 jam dipilih karena telah mencapai usia optimum dihasilkannya enzim kitinase.

Setelah inkubasi selama 24 jam, enzim kitinase kasar diisolasi menggunakan metode sentrifugasi. Penggunaan metode sentrifugasi berfungsi untuk memisahkan enzim dari partikel-partikel lain. Supernatan hasil sentrifugasi kemudian diambil sebagai sampel enzim kitinase kasar. Sebanyak 0,5 ml larutan enzim kasar direaksikan dengan 0,5 ml substrat koloidal kitin pada suhu 50 °C, pH 7.0 selama 30 menit. Kadar produk degradasi kitin oleh kitinase pada bakteri diukur berdasarkan kurva standar N-asetil glukosamin.

Pembuatan kurva standar N-asetil glukosamin dilakukan dengan menyiapkan larutan standar N-asetil glukosamin menjadi 6 titik pengukuran yaitu pada konsentrasi 2,5 µg; 5 µg; 7,5 µg; 10 µg; 12,5 µg dan 15 µg. Pembuatan larutan diawali ketika produksi hasil reaksi enzimatik selesai dilakukan yaitu pada saat penambahan potasium tetraborat dan diikuti langkah selanjutnya hingga proses pembacaan larutan standar N-asetil glukosamin pada serapan 584 nm.

Perhitungan menggunakan kurva standar N-asetil glukosamin (GlcNAc) digunakan untuk mengetahui produk hasil degradasi kitin (*colloidal chitin*) berupa N-asetil glukosamin oleh enzim kitinase yang dihasilkan oleh bakteri. Perhitungan aktivitas enzim kitinase dilakukan berdasarkan (Widhyastuti, 2010) (Lampiran 3).

Berdasarkan hasil yang diperoleh terdapat variasi aktivitas enzim kitinase pada isolat bakteri penghasil enzim kitinase. Isolat bakteri asal Bogor memiliki aktivitas kitinase yang berbeda dengan aktivitas enzim kitinase yang dihasilkan isolat asal Garut (Tabel 5).

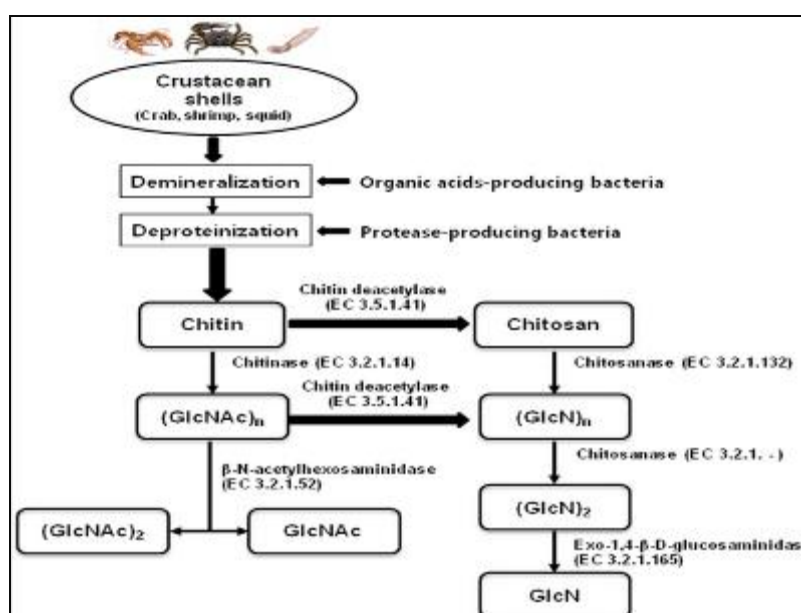
Tabel 5. Uji aktivitas enzim kitinase bakteri isolat Bogor dan Garut dengan substrat *colloidal chitin* 1%, dengan usia bakteri 24 jam CCA 1%, suhu 50°C

Asal	Kode isolat	Aktivitas kitinase ($\times 10^{-3}$ U/ml)
Bogor	*K1.90	21.64
	K1.97	11.64
	K1.25	9.67
	K1.60	7.68
	K1.1	6.88
	K1.33	2.84
Garut	T.51	1.12
	T.56	0.51
	T.65	0.51
	T.68	0.49
	T. 50	0.28
	T.63	0.07

*K: K1=isolat asal Bogor, T= isolat asal Garut

Perbedaan aktivitas kitinase pada bakteri kemungkinan berasal dari jenis enzim kitinase yang dihasilkan setiap isolat bakteri berbeda berpengaruh terhadap produk hasil degradasi koloidal kitin. Abdel-A *et al.*, (2012) melaporkan, ketika koloidal kitin dipakai sebagai substrat terdapat tiga jenis enzim yang berperan dalam mendegradasi medium yaitu: ChiA, ChiB dan ChiC. Chi A dapat menghidrolisis koloidal kitin menjadi N-asetil glukosamin dan kitosan (Gambar 8). Sedangkan ChiB dan ChiC dapat menghidrolisis selulosa dan senyawa turunannya.

Pemutusan rantai kitin oleh kitinase yang dihasilkan bakteri menghasilkan hasil degradasi kitin yang berbeda-beda. Perbedaan produk hasil degradasi bergantung pada jenis enzim kitinase yang dihasilkan oleh setiap bakteri (Gambar 8).



Gambar 8. Pemutusan rantai kitin oleh enzim yang dihasilkan bakteri kitinolitik menghasilkan produk yang berbeda (Park & Jung, 2014).

Berdasarkan analisa tersebut diduga saat pengujian aktivitas enzim kitinase pada bakteri, koloidal kitin yang dijadikan substrat yang direaksikan dengan enzim bakteri menghasilkan jenis enzim yang belum dapat memecah secara sempurna kitin menjadi N-asetil glukosamin, tetapi hanya dalam bentuk oligomer kitin. Proses enzimatik yang dilakukan terhadap keseleruhan sampel memiliki konsentrasi supernatan dan substrat kitin yang digunakan sama yaitu 0,5 ml. Reaksi enzimatik tersebut berlangsung pada kondisi yang sama dengan waktu yang dipakai selama 30 menit. Waktu

yang dipakai selama 30 menit merupakan waktu yang relatif singkat sehingga untuk mendapatkan hasil degradasi berupa N-asetil glukosamin hanya dapat dilakukan oleh jenis enzim eksokitinase (yang dapat memutus rantai kitin hanya pada bagian ujung, seperti; β -N-acetilhexoaminidase dan Exo-1-4- β -D-glukosaminidase).

Berdasarkan hasil diduga enzim yang dihasilkan oleh isolat Bogor termasuk ke dalam kelas eksokitinase, sedangkan enzim yang dihasilkan oleh isolat Garut termasuk ke dalam kelas endokitinase. Analisa tersebut diasumsikan berdasarkan hasil yang didapat dari pengukuran beberapa isolat bakteri Garut dan Bogor yang menunjukkan analisa sampel asal Garut lebih sedikit terukur aktivitasnya bahkan mendekati angka yang dihasilkan blanko. Analisa tersebut diperkuat dengan pendapat Widhiyastuti (2010) yang menyatakan, metode Reissig hanya sensitif terhadap produk hasil degradasi kitin berupa N-asetil-D-glukosamina dan tidak sensitif terhadap produk hidrolisis endokitinase.

Penentuan aktivitas enzim kitinase menggunakan metode Reissig (1995) adalah penentuan aktivitas yang dimodifikasi untuk mengestimasi senyawa gula N-asetil amino hasil degradasi kitin oleh aktivitas enzim kitinase. Saat berlangsungnya pengukuran gula N-asetil amino, gula N-asetil amino hasil degradasi direaksikan dengan potassium tetraborat dalam kondisi alkali dan pemanasan akan menghasilkan senyawa antara asetil heksosamin yang mengakibatkan terjadinya perubahan warna pada larutan menjadi ungu.

Pengukuran jumlah sel menggunakan teknik spektrofotometri

Pengukuran jumlah sel menggunakan teknik spektrofotometri merupakan penghitungan jumlah sel bakteri secara tidak langsung. Berikut perbedaan jumlah sel setiap isolat bakteri dengan aktivitas enzim kitinase yang dihasilkan (Tabel 6).

Tabel 6. Pengukuran jumlah sel isolat bakteri pada absorbansi 600 nm, pada medium CCA 1%, inkubasi 24 jam, suhu 27-28°C

Kode isolat	OD pada 600 nm(100X p) \pm SE
*K1.90	0,06 \pm 0,00
K1.97	0,08 \pm 0,0005
K1.25	0,05 \pm 0,00
K1.60	0,05 \pm 0,0005
K1.1	0,06 \pm 0,0005
K1.33	0,05 \pm 0,0005
T.51	0,11 \pm 0,0005
T.56	0,05 \pm 0,0005
T.65	0,05 \pm 0,001
T.68	0,04 \pm 0,001
T. 50	0,11 \pm 0,0005
T.63	0,08 \pm 0,0005

*K: K1=isolat asal Bogor, T= isolat asal Garut, SE= standar error

Hasil analisa menunjukkan isolat bakteri memiliki pengukuran jumlah sel beragam pada penghitungan jumlah sel serapan 600 nm (Tabel 6). Isolat bakteri T.51 dan T.50 memiliki angka absorbansi tertinggi yang menunjukkan isolat tersebut memiliki jumlah sel terbanyak berbeda dengan isolat bakteri lainnya. Isolat bakteri T.68 merupakan isolat bakteri yang memiliki jumlah sel lebih rendah berbeda dengan isolat bakteri lainnya. Spektrofotometri merupakan metode yang cepat untuk menghitung jumlah bakteri dalam suatu larutan menggunakan spektrofotometer. Bakteri menyerap cahaya sebanding dengan volume total sel (ditentukan oleh

ukuran dan jumlah). Ketika mikroba bertambah jumlahnya atau semakin besar ukurannya dalam biakan cair, terjadi peningkatan kekeruhan dalam biakan. Kekeruhan dapat disebut *optical density* (absorpsi cahaya, biasanya diukur pada panjang gelombang 520 nm – 700 nm).

5. Kemampuan setiap isolat menurut kecenderungan dalam menghasilkan enzim kitinase

Kemampuan isolat bakteri dalam menghasilkan enzim kitinase terhadap konsumsi serangga dalam tubuh kukang dapat dilihat dari beberapa kecenderungan isolat bakteri. Parameter pengukuran kecenderungan isolat bakteri ditentukan berdasarkan aktivitas enzim, indeks kitinolitik, kepadatan jumlah sel dan kadar protein isolat bakteri. Hasil menunjukkan sampel isolat bakteri asal feses Bogor memiliki kecenderungan yang tinggi berbeda dengan isolat bakteri asal Garut.

Isolat bakteri K1.97 memiliki kecenderungan nilai lebih tinggi dari nilai rata-rata setiap parameter uji (aktivitas enzim = $5,28 \times 10^{-3} \text{U/ml}$; indeks kitinolitik = 1,33 cm; jumlah sel = 0,07 dan kadar protein = 0,24 mg/ml). Aktivitas enzim kitinase yang dihasilkan sebesar $11,64 \times 10^{-3} \text{U/ml}$ dengan indeks kitinolitik sebesar 1,52 cm (Tabel 7).

Nilai optimum isolat bakteri K1.97 memberikan asumsi bahwa konsentrasi enzim yang tinggi memiliki aktivitas enzim kitinase yang berperan dalam mendegradasi kitin dalam tubuh kukang.

Tabel 7. Parameter pengukuran kecenderungan setiap isolat dalam menghasilkan enzim kitinase

Asal isolat	Kode isolat	Aktivitas kitinase ($\times 10^{-3}$ U/ml)	Indeks kitinolitik (cm)	Jumlah sel (OD 600nm)	Protein (mg/ml)
Bogor	K1.97⁺⁺⁺⁺	11,64	1,52	0,08	0,25
	K1.90 ⁺⁺⁺	21,64	1,95	0,06	0,44
	K1.60 ⁺⁺⁺	7,68	3,27	0,05	0,30
	K1.25 ⁺⁺⁺	9,67	1,98	0,05	0,16
	K1.1 ⁺⁺⁺	6,88	2,22	0,06	0,21
	K1.33 ⁺⁺⁺	2,84	1,82	0,05	0,20
Garut	T.51 ⁺⁺⁺	1,12	0,49	0,11	0,39
	T. 50 ⁺⁺⁺	0,28	0,50	0,11	0,26
	T.63 ⁺⁺⁺	0,07	0,57	0,08	0,19
	T.65 ⁺⁺⁺	0,51	0,58	0,05	0,14
	T.56 ⁺⁺⁺	0,51	0,42	0,05	0,13
	T.68 ⁺⁺⁺	0,49	0,59	0,04	0,20
Rata-rata nilai parameter uji		5,28	1,33	0,07	0,24

Keterangan,

K1 = isolat asal Bogor, T = isolat asal Garut,

+ = isolat bakteri pada parameter uji, lebih tinggi dari nilai rata-rata parameter uji,

- = isolat bakteri pada parameter uji, lebih rendah dari nilai rata-rata parameter uji.

Jumlah sel pada bakteri yang tinggi akan mempercepat degradasi kitin oleh kitinase. Meningkatnya jumlah sel bakteri akan meningkatkan sintesis enzim saat proses metabolisme dalam sel (Saropah *et al.*, 2012). Jumlah sel bakteri berbanding lurus dengan konsentrasi enzim yang dihasilkan. Begitu pula dengan kadar protein sebesar 0,25 mg/ml. Kadar protein digunakan untuk menghitung kemurnian enzim, semakin besar kadar protein yang didapat maka tingkat kemurnian enzim semakin tinggi bergantung pada besarnya aktivitas enzim yang dihasilkan (Lehninger, 1982).

Kecenderungan isolat bakteri K1.97 memiliki aktivitas enzim kitinase yang tinggi didukung dengan kadar protein dan jumlah sel yang banyak akan meningkatkan reaksi degradasi serangga dalam tubuh kukang.

Berdasarkan aspek penilaian tersebut diduga kukang yang terdeteksi isolat bakteri K1.97 memiliki kecenderungan mengkonsumsi lebih banyak serangga. Pola pakan kukang di Bogor merupakan pola pakan kukang yang sudah terstruktur dimana kukang telah diberikan pakan berupa serangga secara rutin, sehingga aktivitas enzim kitinase yang dihasilkan isolat bakteri K1.97 sangat potensial.

Kecenderungan menghasilkan enzim kitinase yang potensial dari isolat bakteri asal Bogor mungkin disebabkan oleh lingkungan disekitar bakteri yang mendukung pertumbuhan bakteri dalam menghasilkan senyawa yang dibutuhkan untuk memenuhi nutrisi saat proses pertumbuhannya. Seperti yang dikemukakan Apriani (2012), menyatakan enzim kitinase berperan penting dalam proses pengambilan nutrisi sebagai sumber karbon dan nitrogen yang dibutuhkan bakteri untuk pertumbuhannya.

Lain halnya dengan isolat bakteri T.68 (Tabel 7) asal Garut yang memiliki aktivitas enzim kitinase terendah, dengan asumsi yang sama diduga kukang yang terdeteksi isolat bakteri T.68 memiliki kecenderungan mengkonsumsi serangga yang lebih sedikit. Pola pakan kukang di Garut merupakan pola pakan kukang yang berada di alam sehingga untuk pemberian pakan kukang berupa serangga sangat bergantung pada kondisi ketersediaan pakan kukang di alam, sehingga memungkinkan aktivitas enzim kitinase isolat bakteri kurang potensial. Menurut Knarreborg *et al.*, (2002) dalam Minson (2013), asupan makanan akan mempengaruhi perubahan struktur bakteri pada setiap periode kehidupan hewan.

Perbedaan perilaku makan akan mempengaruhi struktur mikroorganisme yang membantu proses pencernaan.

Hal tersebut didukung dengan penelitian Starr & Nekaris (2013), pakan kukang di alam ialah eksudat dari pohon, sari bunga dan serangga. Sedangkan pakan kukang di penangkaran meliputi buah-buahan, jangkrik, ulat pohon, ayam atau burung kecil, tokek dan kodok (Sanchez, 2008). YIAR Indonesia (2015) melaporkan, kukang yang ada di penangkaran (pusat rehabilitasi) telah diberikan makan berupa: getah arabica, sayuran, telur, nektar bunga, serangga (jangkrik, ulat, belalang), getah pohon (petai dan sengon) dengan pemberian pakan yang teratur.

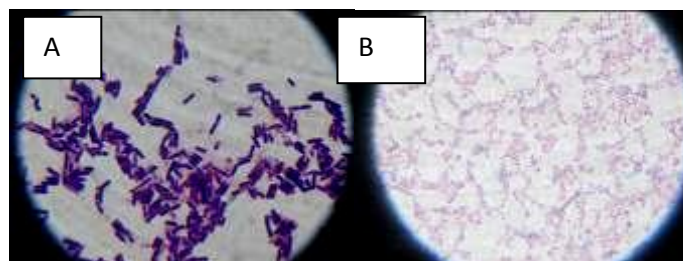
Perlakuan pemberian pakan di penangkaran memberikan efek yang baik untuk tubuh kukang dalam menghasilkan enzim kitinase sebagai sumber nutrisi bagi bakteri penghasil enzim kitinase. Hal tersebut sesuai dengan laporan Cabana & Plowman (2014), kesehatan kukang yang berada di penangkaran meningkat setelah diberikan perlakuan penambahan makanan berupa getah pohon, sari bunga dan serangga.

6. Pengamatan morfologi makroskopis dan mikroskopis isolat bakteri penghasil enzim kitinase

Pengamatan morfologi makroskopis dan mikroskopis isolat bakteri dilakukan terhadap 12 isolat bakteri potensial penghasil enzim kitinase. Pengamatan morfologi makroskopis bakteri meliputi warna koloni, bentuk koloni, dan tepi koloni. Pengamatan dilakukan dengan menginokulasi isolate

bakteri kedalam medium NA selama 24 jam. Inokulasi bakteri sama seperti pada tahap purifikasi sehingga terdapat satu koloni yang teramati. Pengamatan mikroskopis pada bakteri dilakukan saat bakteri berusia 24 jam dengan menggunakan pewarnaan Gram berdasarkan Benson (2001).

Berdasarkan hasil yang didapat warna koloni bakteri didominasi warna putih, merah tua terang, merah tua gelap, dan merah muda. Bentuk koloni tak beraturan, bundar dan keriting. Memiliki tepi rata, seperti silia, seperti telinga, beringgit, dan berombak (Colome, 1986; Benson, 2001). Hal tersebut diduga bakteri penghasil enzim kitinase memiliki jenis yang berbeda berdasarkan karakteristik morfologi koloni. Han *et al.*, (2014) melaporkan ditemukan bakteri penghasil enzim kitinase dengan warna putih dan crem dengan bentuk koloni tidak beraturan pada serangga. Hasil serupa juga ditemukan pada pengamatan secara mikroskopis bakteri, bentuk sel batang, terdapatnya endospora pada bakteri Gram positif dan bentuk sel basil pada Gram negatif (Gambar 9), menunjukkan kesamaan karakter isolat bakteri yang ditemukan pada serangga.



Gambar 9. Pewarnaan Gram isolat pada inkubasi 24 jam, medium NA, suhu 27-28°C. A :Gram positif; basil; dan B :Gram negatif, kokus (Perbesaran 1000X).

Hal ini dapat diduga, bahwa bakteri yang ditemukan pada feses kukang memiliki sedikit kesamaan karakter dengan bakteri penghasil enzim kitinase yang ditemukan pada serangga. Namun, perlu untuk diuji secara berkelanjutan.

Prosedur pewarnaan Gram dilakukan untuk mengetahui tipe Gram yang dimiliki sel bakteri penghasil enzim kitinase. Pengujian ini berguna untuk mengklasifikasikan bakteri berdasarkan perbedaan struktur dinding sel bakteri. Bakteri gram negatif adalah bakteri yang tidak mempertahankan zat warna metil ungu pada metode pewarnaan Gram. Sementara bakteri Gram positif akan mempertahankan warna ungu gelap setelah dicuci dengan alkohol. Perbedaan klasifikasi antara kedua jenis bakteri ini terutama didasarkan pada perbedaan struktur dinding sel bakteri (Willey, 2008). Bentuk sel dan tipe Gram dapat teramati pada (Tabel 8).

Tabel 8. Morfologi makroskopis dan mikroskopis 12 isolat terpilih uji aktivitas enzim kitinase.

Kode isolate	Warna	Bentuk koloni	Tepi koloni	Bentuk sel	Pewarnaan Gram	Spora
T65	Putih	Keriting	Beringgit	Basil	Positif	Ada
T63	Putih	Bundar	Berombak	Basil	Positif	Ada
T68	Putih	Keriting	Rata	Basil	Positif	Ada
T56	Putih	Bundar	Rata	Basil	Positif	Ada
T50	Putih	Tak beraturan	Seperti telinga	Basil	Positif	Ada
T51	Putih	Bundar	Seperti telinga	Basil	Positif	Ada
K1.97	Merah tua gelap	Bundar	Rata	Kokus	Negatif	Tidak ada
K1.25	Merah tua gelap	Bundar	Rata	Kokus	Negatif	Tidak ada
K1.1	Merah tua gelap	Bundar	Rata	Kokus	Negatif	Tidak ada
K1.90	Merah tua terang	Bundar	Rata	Kokus	Negatif	Tidak ada
K1.60	Merah tua gelap	Bundar	Rata	Kokus	Positif	Tidak ada
K1.33	Merah muda	Bundar	Rata	Kokus	Negatif	Tidak ada

Tujuh isolat ditemukan memiliki tipe Gram positif dan lainnya bertipe Gram negatif. Hal tersebut diduga bakteri penghasil enzim kitinase dapat ditemukan dengan tipe Gram positif ataupun Gram negatif. Hasil penelitian ini sesuai dengan berbagai penelitian yang menemukan bahwa bakteri Gram negatif dapat menghasilkan enzim kitinase, seperti *Aeromonas hydrophila*, *A. punctata*, *Stenotrophomonas* sp., *Serratia*, *Vibrio*, (Saima *et al.*, 2013; Soeka & Sulistiani, 2011). Sedangkan bakteri Gram positif yang diketahui dapat menghasilkan enzim kitinase adalah *Cellulosimicrobium* spp., *Arthobacter* spp., *Staphylococcus* spp., *Bacillus* sp. (Macdonald *et al.*, 2013; Saima *et al.*, 2013; & Han *et al.*, 2014). Namun tidak sejalan dengan penelitian Kuroshima *et al.*, (1996) bahwa bakteri penghasil enzim kitinase memiliki Gram variabel, yang biasanya ditemukan dengan Gram positif.

BAB V

KESIMPULAN, IMPLIKASI, DAN SARAN

A. Kesimpulan

Dua belas isolat bakteri mampu menghasilkan enzim kitinase diperoleh dari feses kukang (*Nycticebus javanicus*) asal Garut dan Bogor. Isolat bakteri K1.90 asal sampel Bogor, merupakan isolat penghasil enzim kitinase yang potensial berdasarkan nilai indeks kitinolitik dan uji aktivitas enzim yang dihasilkan.

B. Implikasi

Penelitian ini menunjukkan bahwa isolat bakteri dari feses kukang (*N. javanicus*), berpotensi menghasilkan enzim kitinase. Keterlibatan enzim kitinase yang dihasilkan isolat bakteri asal Garut dan Bogor pada feses kukang, menunjukkan adanya bakteri dalam tubuh kukang yang mampu menghasilkan enzim kitinase dan memainkan peran penting sebagai biokatalisator pendegradasi kitin pada serangga sebagai pakan kukang.

C. Saran

Berdasarkan hasil yang diperoleh, adapun saran untuk penelitian selanjutnya, sebagai berikut:

1. Optimasi faktor-faktor yang mempengaruhi produksi enzim kitinase,
2. Identifikasi isolat bakteri penghasil enzim kitinase secara biokimia ataupun molekular.

3. Karakteristik enzim kitinase yang dihasilkan isolat bakteri yang sudah diidentifikasi, serta pembuatan kurva pertumbuhan bakteri setiap isolat

DAFTAR PUSTAKA

- Abdel-A, S.M., M.E. Moharam, H.A. Hamed, & F.E. Mouafi. 2012. Extracellular metabolites produced by a novel strain, *Bacillus alvei* nrc-14: 1. Some properties of the chitinolytic system *New York Sci J*. (1): 5.
- Ario, A. 2010. *Panduan Lapangan Mengenal Satwa Taman Nasional Gunung Gede Pangrango*. Jakarta: Conservation International Indonesia.
- Apriani, L. 2008. *Seleksi Bakteri Penghasil Enzim Kitinolitik Serta Pengujian Beberapa Variasi Suhu dan pH Untuk Produksi Enzim*. Skripsi. 85 hlm.
- Azuma, K., S. Ifuku., T. Osaki, Y. Okamoto & S. Minami. 2014. Preparation and biomedical application of chitin and chitosan nanofiber. *J Biomed Nanotechnol*. (10): 2891-2920.
- Babana, A.H., A.H. Dicko, K. Maiga, A. Kassogue, D. Traore, & F.A. Faradji. 2013. Isolation and characterization of crop rhizospheric actinomycetes with antimicrobial activity in Mali. *Appl Microbiol Res*. (1): 1-8.
- Benson, H. J. 2001. *Microbial Applications Laboratory Manual, Eight edition*. Newyork: The McGraw-Hill Companies Inc.
- Cabana, F & A. Plowman. 2014. Pygmy slow loris *Nycticebus pygmaeus* natural diet replication in captivity. *Endang Spec Res*. (23): 197-204.
- Cahyani, L. 2013. *Pemanfaatan Tepung Cangkang Udang Sebagai Media Produksi Kitinase oleh Bakteri Kitinolitik Isolat 26*. Skripsi. Universitas Jember. 23 hlm.
- Carroll I.M., Ringel-Kulka T., Siddle J.P., Klaenhammer T.R., & Ringel Y. 2012. Characterization of the fecal microbiota using high-throughput sequencing Reveals a Stable Microbial Community during Storage. *Plos one* (10): e46953.
- Colome, J.S., A.M. Kubinski, R.J. Cano, & D.V. Grady. 1986. *Laboratory Exercise in Microbiology*. California Polyecnic state University:West Publish Company.
- Das, M.P., L. J. Rebecca, S. Sharmila, Anu, A. Banerjee & D. Kumar. 2012. Identification and optimization of cultural conditions for chitinase production by *Bacillus amyloliquefaciens*. *J Chem Pharm Res*. (12):

4969-4974.

- Fitriana N. & A. Jayuska. 2014. Aktivitas antibakteri ekstrak etanol buah asam kandis (*Garcinia discia blumm*) yang terekapsitulasi maltodemin. *J Kimia Khatulistiwa*. (3): 7-11.
- Fusetti F., V. Moeler., D. Houston, H.J. Rozeboom, B.W. Dijkstra, R.G. Boot, J.M. Aerts, & V. Alten. 2002. Structure of human chitotriosidase. Implications for specific inhibitor design and function of mammalian chitinase-like lectins. *Biol Chem* (277): 25537-44.
- Haliza, W & M.T. Suhartono. 2012. Karakteristik kitinase dari mikrobia. *Bul Teknologi Pascananen Pertanian*. (8).
- Hamid, R., [M.A. Khan](#), [M. Ahmad](#), [M.M. Ahmad](#), [Malik Z. A.](#), [J. Musarrat](#), & [S. Javed](#). 2013. Chitinase: an update. *J Pharm Bioallied Sci*. (1): 21-29.
- Han, K-I., B.B. Patnaik, A-R.Cho, H.K. Lim, J.M. Lee, Y.G. Jang, Y.S. Jeong, T.K. Yoo, G.S. Lee, & M.D. Han. 2014. Characterization of chitinase producing *Serratia* and *Bacillus* isolated from insects. *Entomol res*. (44): 109-120.
- Hsu, S.C. & J.L. Lockwood. 1975. Powdered chitin agar as a selective medium for enumeration of *actinomycetes* in water and soil. *Appl microbiol*. (29): 422-426.
- Kuroshima, K., Sakane T., Takata R., & Yokota A. 1996. *Bacillus ehimensis* sp. nov. and *Bacillus chitinolyticus* sp. nov., new chitinolytic members of the genus bacillus. *Int J syst bacteriol*. (46): 76-80.
- Lamine B. M., B.M. Lamine & A. Bouziane. 2012. Chitinase production by *Serratia Marcescens* DSM 30121 and Biological control of locusts. *J Biotechol Biomaterial* (2): 133.
- Lehninger.1982. *Dasar-dasar biokimia jilid 1*. Jakarta: Erlangga.
- Listari, Y. 2009. *Efektivitas penggunaan metode pengujian antibiotik isolat Streptomyces dari rizosfer familia poaceae terhadap Escherichia coli*. Skripsi. Universitas Negeri Surakarta.
- Macdonald, C, S. Barden, & S. Foley. 2013. Isolation and characterization of chitin degrading microorganism from the feces of goeldi's monkey *Callimico goeldii*. *J Appl Microbiol*. (116): 52-59.

- Minson, J.C. 2013. *Diet related factors in the conservations of kiwi (Apteryx mantelli)*. Disertasi. 214 hlm.
- Matsui, A., F. Rakotondraparany, M. Hasegawa, & S. Horai. 2007. Determin of a complete lemur mitochondrial genom from feces. *Mammal study*. (32): 7-16.
- Napier, J.R. & P.H. Napier. 1967. *A Hand Book of Living Primates*. New york : Academi Press.
- Nekaris, K.A.I., M. Shekelle, Wirdateti, E.J Rode, V. Nijman. 2015. *Nycticebus javanicus*. *The IUCN Red List of threathned species*. Version 2014. www.iucnredlist.org diakses pada 29 Mei 2015.
- Nekaris, K.A.I., K. L. Sanchez, J.S. Thorn, Indah W. & Vincent N. 2008. *Javan Slow Loris Nycticebus javanicus É.Geoffroy, 1812 Indonesia*.
- Nugroho, A. 2014. *Keragaman genetik banteng (Bos javanicus d'alton, (1823) di taman nasional meru betiri dan alas purwo berdasarkan sekuen d-loop dna mitokondria*. Tesis. Universitas Gajah Mada. 64 hlm.
- Park, R-D & Jung, W-J. 2014. Bioproduction of chitooligosaccharides: present and perspectives. *Mar Drugs*. (11): 5328-5356.
- Patil, R.S., V. Ghormade, & M.V. Desphande 2000. Review Chitinolytic enzymes: an exploration. *Enzyme and Microb Technol* (26): 473–483.
- Pratiwi, R.S., T.E. Sutanto, Y. Alpha & A. Sutrisno. 2015. Enzim kitinase dan aplikasinya di bidang Industri. *J Pangan Agroindustri*. (3): 878-887.
- Reissig, J.I., J.I. Strominger, & L.F. Leloir. 1995. A modified colorimetric method for the estimation of n-acetylamino sugars. *J Biol Chem*. (217): 959-966.
- Reece, J.B., L.A. Urry., M.L. Cain., S.A. Wasserman, P.V. Minorsky, & R.B. Jackson. 2011. *Campbell Biology ninth edition*. US:Pearson.
- Saima, M.K., Roohi, & I.Z Ahmad. 2013. Isolation of novel chitinolytic bacteria and production optimization of extracellular chitinase. *J Genet Eng Biotechnol*. (11): 39-46.

- Saropah, D.A., A. Jannah & A. Maunatin. 2012. Kinetika reaksi enzimatis ekstrak kasar enzim selulase hasil isolasi dari bekatul. *Alchemy* (2): 34-35.
- Savira, M. 2012. Analisis Variasi D-LOOP DNA Mitokondria pada Populasi Gajah Sumatera (*Elephas maximus sumatranus*) di Taman Nasional Way Kambas. Skripsi. Universitas Indonesia.
- Sanchez, K.L. 2008. Program penyelamatan, rehabilitasi, dan pelepasliaran kukang. *Siar Indonesia*. (3): 3-6.
- Sinaga, W., D.A. Astuti, E. Iskandar, Wirdateti, & J. Pamungkas. 2010. Konsumsi pakan hewan asal hewan pada kandang (N Coucang) di fasilitas penangkaran satwa primata IPB. *J Primatol Indones*. (2):69-75.
- Soeka, Y. S. & Sulistiani. 2011. Seleksi, karakterisasi, dan identifikasi bakteri penghasil kitinase yang diisolasi dari Gunung Bromo Jawa Timur. *J Nat Indones*. (2): 155-161.
- Soeka, Y. S. 2015. Karakterisasi enzim kitinase dan identifikasi isolat aktinomisetes KRC 21.D berasal dari Kebun Raya Cibodas. *Prossem Nas Masy Biodiv Indon*. (1): 1156-1161.
- Starr, C. & K.A.I. Nekaris. 2013. Obligate exudativory characterize the diet of the Pygmy loris (*Nycticebus pygmaeus*). *Am J Primatol* (9999): 1-8.
- Stoykov, Y.M., A.I. Pavlov, & A.I. Krastanov. 2015. Review: chitinase biotechnology: production, purification, and application. *Eng Life Sci*.(15): 30-38.
- Sukmawati, D. 2014. *Khamir asal tumbuhan saeh (broussonetia papyrifera) dan potensinya sebagai agen biokontrol kapang pada buah tomat pascapanen*. Disertasi. Universitas Indonesia. 243 hlm.
- Suryanto, D., N. Irawati., & E. Munir. 2011. Isolation and characterization of chitinolytic bacteria and their potential to inhibit plant pathogenic fungi. *Microbiol Indones* (5): 144-148.
- Synowiecki, J & N.A. Al-Khateeb . 2003. Production properties and some new application of chitin and its derivatives. Critical review in food science and nutrition. *Proquest Med Library* (2): 145-147.
- Voskamp, A., E.J. Rode, C.N.Z. Coudrat, Wirdateti, Abinawanto ,R.J. Wilson, & K.A.I. Nekaris. 2014. Modelling the habitat use and

distribution of the threatened Javan slow loris *Nycticebus javanicus*. *Endang Spec Res.* (23): 277-286.

Walker, J. M. 2002. Quantification of protein: Protein Determination by UV Absorption. *The Protocol Protein Handbook Second edition*. 1139 hlm.

Widhyastuti, N. 2010. Purifikasi n-asetil-d-glukosamina hasil sintesa secara enzimatis untuk bahan obat dan pangan fungsional. *laporan akhir program intensif peneliti dan perekayasa LIPI*. Cibinong: LIPI.

Willey J.M., L.M. Sherwood, C.J. Woolverton. 2008. *Prescott, Harley, and Klein's Microbiology seventh edition*. Newyork : McGraw-Hill.

Xu B., W.Xu, F. Yang, J.Li, X. Teng, Y.Mu, J. Zhou, & Z. Huang. 2013. Metagenomic analysis of the pygmy loris fecal microbiome reveals unique functional capacity related to metabolism of aromatic compounds. *Plos one*. 8(2): e56565.

YIAR INDONESIA. Yayasan International Animal Rescue. 2015. *Upaya konsevasi kukang Indonesia melalui 3R*. YIAR INDONESIA. Bogor: IAR Indonesia.

Yunita, M., N.R. Mubarik & D.D. Solihin. 2015. Isolation and identification of chitinolytic bacteria as biocontrol agent of pathogenic fungi on gold silkworm cocoon *Cricula trifenestrata*. *Mal J Microbiol.* (x): xxx-xxxx.

Zhang, L., J. Cai, C. Xiao., & Z. Wang. 2013. A Protocol for DNA extraction from feces of the wild Pygmy loris. *Pakistan J Zool.* (45): 1235-1239.

LAMPIRAN

Lampiran 1. Pembuatan Medium

1. NA (Nutrient Agar)

Berdasarkan yang tertera pada kemasan, sebanyak 20 gram bubuk NA dicampur dengan satu liter akuades dalam Erlenmeyer. Medium NA kemudian dimasak hingga mendidih sambil terus diaduk menggunakan batang pengaduk. Medium NA yang telah jadi kemudian disterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121°C dengan tekanan 2 atm selama 15 menit.

2. NB (Nutrient Broth)

Berdasarkan yang tertera pada kemasan, sebanyak 8 gram bubuk NB dicampur dengan satu liter akuades dalam Erlenmeyer. Medium NB kemudian dimasak hingga mendidih sambil terus diaduk menggunakan batang pengaduk. Medium NA yang telah jadi kemudian disterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121°C dengan tekanan 2 atm selama 15 menit.

3. *Colloidal Chitin*

Berdasarkan Widyastuti (2010), sebanyak 20 gram cangkang udang yang telah mengalami proses deproteinisasi dan demineralisasi ditambahkan 400mL asam klorida 37%. Setelah itu distirer selama 2jam dan dibiarkan semalam pada suhu 4°C. Kemudian saring menggunakan glasswol, residu hasil saringan ditambahkan aquadest dan Larutan NaOH 10 N(cara membuat NaOH 10N: 200g NaOH Kristal+500ml Aquadest). Dikocok perlahan dalam keadaan dingin. Cek Ph hingga Netral.Setelah Ph Netral sentrifugasi pada 4800rpm, 30 menit. Kemudian bilas pellet yang terbentuk sebanyak 2 kali dengan akuades. Gunakan pellet sebagai koloidal kitin.

4. *Colloidal Chitin Agar*

Berdasarkan modifikasi metode Widyastuti (2010), sebanyak KH_2PO_4 0,1 %, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,05%, Yeast extract 0,1 %, Koloidal kitin 1%, Agar 2 % dilarutkan dalam 1 liter aquadest.

5. *Colloidal Chitin Broth*

Berdasarkan modifikasi metode Widyastuti (2010), sebanyak KH_2PO_4 0,1 %, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,05%, Yeast extract 0,1 %, Koloidal kitin 1% dilarutkan dalam 1 liter aquadest.

6. Pembuatan Reagen DMAB Induk

Berdasarkan Widyastuti (2010), sebanyak 12,5 ml asam klorida 10N dicampurkan dengan Asam asetat glacial 87,5 ml , kemudian diaduk hingga larut. Setelah larut masukkan 10 gr bubuk DMAB. Masukkan kedalam botol kaca gelap dan simpan dalam kulkas.

Pengenceran DMAB Induk, sebanyak 1ml DMAB induk ditambahkan asam asetat glacial lalu diaduk hingga larut.

Lampiran 2. Pemilihan 22 isolat representatif berdasarkan uji *pre-eliminatory* pada medium NA, inkubasi 24 jam, suhu 27-28°C. dengan melihat karakter morfologi koloni

1) Isolat bakteri asal **Garut**

Tabel pengamatan morfologi isolat bakteri secara makroskopik dan mikroskopik, pada medium NA, inkubasi 24 jam, suhu 27-28°C.

No.	Isolat bakteri	Zona bening	Medium	Pengamatan makroskopik koloni bakteri asal Garut				
				Warna	Permukaan	Bentuk	Tepi	Elevasi
1	T45	-	-	-	-	-	-	-
2	S6	-	-	-	-	-	-	-
3	T67	++++	NA	Putih	Mengkilat	keriting	seperti silia	Cembung
4	T65	++++	NA	Putih	Mengkilat	keriting	Beringgit	Datar
5	T37	++++	NA	Putih	Mengkilat	keriting	Berombak	Datar
6	T63	++++	NA	Putih	Kusam	bundar	Berombak	Cembung
7	T68	++++	NA	Putih	Mengkilat	keriting	Rata	Datar
8	T56	++++	NA	Putih	Kusam	bundar	Rata	Cembung
9	T50	+++	NA	Putih	Mengkilat	tak beraturan	seperti telinga	Datar
10	T51	+++	NA	Putih	Kusam	bundar	seperti telinga	Cembung
11	T77	+++	NA	Putih	Kusam	keriting	seperti telinga	Cembung
12	T57	+++	NA	Putih	Kusam	bundar	seperti telinga	Cembung
13	T61	+++	NA	Putih	Kusam	keriting	seperti telinga	Cembung
14	T79	+++	NA	Putih	Kusam	keriting	seperti telinga	Cembung
15	T60	+++	NA	Putih	Kusam	keriting	seperti telinga	Cembung
16	T4	+++	NA	Putih	Kusam	keriting	seperti telinga	Cembung
17	T59	+++	NA	Putih	Kusam	keriting	seperti telinga	Datar
18	T49	+++	NA	Putih	Kusam	keriting	seperti telinga	Datar
19	T74	+++	NA	Putih	Kusam	keriting	Berombak	Datar
20	T71	+++	NA	Putih	Kusam	keriting	seperti cabik	Datar
21	T73	++	NA	Putih	Kusam	bundar	Rata	Datar
22	T52	++	NA	Putih	Kusam	bundar	Rata	Datar
23	T75	++	NA	Putih	Kusam	bundar	seperti rambit	Datar
24	T69	++	NA	Putih	Kusam	bundar	Berombak	Datar
25	T54	++	NA	Putih	Mengkilat	keriting	seperti rambut	Datar
26	T78	++	NA	Putih	Mengkilat	keriting	seperti rambut	Datar
27	S39	++	NA	Putih	Mengkilat	bundar	seperti rambut	Datar
28	T55	++	NA	Putih	Mengkilat	bundar	seperti telinga	Datar

29	T72	++	NA	Putih	Mengkilat	bundar	Berombak	Datar
30	T58	++	NA	Putih	Mengkilat	keriting	seperti rambut	Datar
31	T53	++	NA	Putih	Mengkilat	bundar	seperti telinga	Datar
32	T70	+	NA	Putih	Mengkilat	keriting	seperti silia	Datar
33	T64	+	NA	Putih	Mengkilat	keriting	seperti telinga	Datar
34	T76	+	NA	Putih	Mengkilat	keriting	Rata	Datar
35	T66	+	NA	Putih	Mengkilat	bundar	seperti silia	Datar
36	T62	+	NA	Putih	Mengkilat	keriting	seperti silia	Datar

2). Isolat bakteri asal Bogor

Tabel pengamatan morfologi isolat bakteri secara makroskopik dan mikroskopik, pada medium NA, inkubasi 24 jam, suhu 27-28°C.

No.	Isolat bakteri	Zona bening	Medium	Pengamatan makroskopik koloni				
				Warna	Permukaan	Bentuk	Tepi	Elevasi
1	K1.96.10-4	-	-	-	-	-	-	-
2	K1.56.10-4	++++	NA	Merah tua terang	Mengkilat	bundar	rata	Datar
3	K1.100.10-4	++++	NA	Merah tua terang	Mengkilat	bundar	rata	Datar
4	K1.97.10-4	++++	NA	Merah tua gelap	Mengkilat	bundar	rata	Datar
5	K1.25.10-4	++++	NA	Merah tua gelap	Mengkilat	bundar	rata	Datar
6	K1.13.10-5	++++	NA	Merah tua gelap	Mengkilat	bundar	rata	Datar
7	K1.1.10-4	++++	NA	Merah tua gelap	Mengkilat	bundar	rata	Datar
8	K1.3.10-4	++++	NA	Merah tua terang	Mengkilat	bundar	rata	Datar
9	K1.30.10-4	++++	NA	Merah tua terang	Mengkilat	bundar	rata	Datar
10	K1.6.10-4	++++	NA	Merah tua gelap	Mengkilat	bundar	rata	Datar
11	K1.26.10-4	++++	NA	Merah tua gelap	Mengkilat	bundar	rata	Datar
12	K1.40.10-4	++++	NA	Merah tua gelap	Mengkilat	bundar	rata	Datar
13	K1.12.10-5	++++	NA	Merah tua terang	Mengkilat	bundar	rata	Datar
14	K1.92.10-4	++++	NA	Merah tua terang	Mengkilat	bundar	rata	Datar
15	K1.11.10-4	++++	NA	Merah tua terang	Mengkilat	bundar	rata	Datar
16	K1.19.10-5	++++	NA	Merah tua terang	Mengkilat	bundar	rata	Datar
17	K1.63.10-4	++++	NA	Merah tua gelap	Mengkilat	bundar	rata	Datar
18	K1.88.10-4	++++	NA	Merah tua terang	Mengkilat	bundar	rata	Datar
19	K1.59.10-4	++++	NA	Merah tua gelap	Mengkilat	bundar	rata	Datar
20	K1.1.10-5	++++	NA	Merah tua gelap	Mengkilat	bundar	rata	Datar
21	K1.60.10-4	++++	NA	Merah tua gelap	Mengkilat	bundar	rata	Datar
22	K1.85.10-4	++++	NA	Merah tua gelap	Mengkilat	bundar	rata	Datar
23	K1.69.10-4	++++	NA	Merah tua terang	Mengkilat	bundar	rata	Datar
24	K1.39.10-4	++++	NA	Merah tua terang	Mengkilat	bundar	rata	Datar
25	K1.17.10-4	++++	NA	Merah tua gelap	Mengkilat	bundar	rata	Datar
26	K1.53.10-4	++++	NA	Merah tua terang	Mengkilat	bundar	rata	Datar
27	K1.22.10-5	++++	NA	Merah tua terang	Mengkilat	bundar	rata	Datar
28	K1.2.10-4	++++	NA	Merah tua gelap	Mengkilat	bundar	rata	Datar
29	K1.42.10-4	++++	NA	Merah tua gelap	Mengkilat	bundar	rata	Datar
30	K1.61.10-4	++++	NA	Merah tua terang	Mengkilat	bundar	rata	Datar
31	K1.90.10-4	++++	NA	Merah tua terang	Mengkilat	bundar	rata	Datar
32	K1.68.10-4	++++	NA	Merah tua terang	Mengkilat	bundar	rata	Datar
33	K1.19.10-4	++++	NA	Merah tua terang	Mengkilat	bundar	rata	Datar

34	K1.87.10-4	++++	NA	Merah tua terang	Mengkilat	bundar	rata	Datar
35	K1.73.10-4	++++	NA	Merah tua terang	Mengkilat	bundar	rata	Datar
36	K1.15.10-4	++++	NA	Merah tua terang	Mengkilat	bundar	rata	Datar
37	K1.55.10-4	++++	NA	Merah tua terang	Mengkilat	bundar	rata	Datar
38	K1.70.10-4	++++	NA	Merah tua gelap	Mengkilat	bundar	rata	Datar
39	K1.22.10-4(35)	++++	NA	Merah tua gelap	Mengkilat	bundar	rata	Datar
40	K1.12.10-4	++++	NA	Merah tua gelap	Mengkilat	bundar	rata	Datar
41	K1.10.10-5	++++	NA	Merah tua gelap	Mengkilat	bundar	rata	Datar
42	K1.33.10-4	++++	NA	merah muda	Mengkilat	bundar	rata	Datar
43	K1.11.10-5	+	NA	Merah tua gelap	Mengkilat	bundar	rata	Datar
44	K1.33.10-4(35)	+	NA	Merah tua terang	Mengkilat	bundar	rata	Datar

* isolat dengan blok hitam menunjukkan isolat representatif yang akan diuji indeks kitinolitik menggunakan uji sumur.

Lampiran 3. Perhitungan aktivitas enzim kitinase berdasarkan Widhyastuti (2010):

$$A = \frac{[GlcNac]_{sampel} - [GlcNac]_{blanko} \times V_{tr}}{t \times V_a \times V_e}$$

Keterangan :

A : Aktivitas

[GlcNac] : Konsentrasi N-asetil-D-glukosamina (μmol) hasil reaksi enzimatis, ditetapkan menggunakan persamaan kurva standar

t : Waktu inkubasi (30 menit)

V_{tr} : Volume total reaksi enzimatis (1,0 ml)

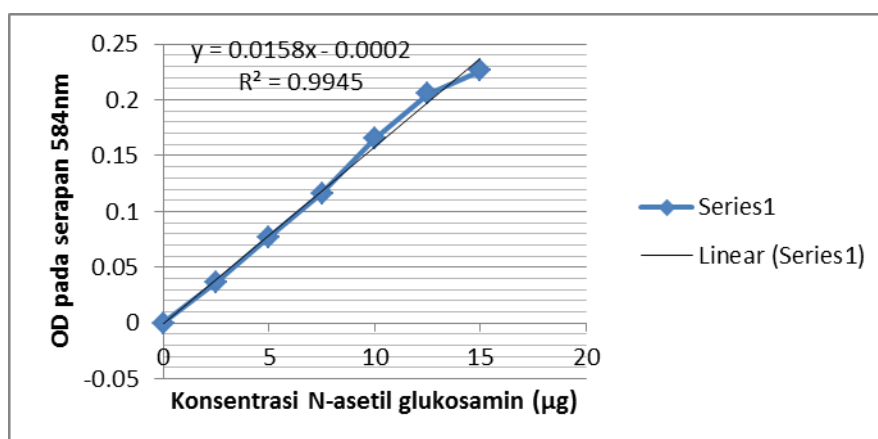
V_e : Volume enzim yang digunakan (0,5 ml)

V_a : Volume filtrat yang dianalisa (0,5 ml)

Tabel pembacaan blanko dan sampel produk N-asetil glukosamin yang dihasilkan isolat bakteri pada panjang gelombang 584nm

Larutan	Absorbansi 1	Absorbansi 2	Absorbansi rata-rata
Blanko 1	0,066	0,067	0,0665
Blanko 2	0,059	0,060	0,0595
Blanko 3	0,070	0,071	0,0705
Rata-rata absorbansi blanko			0,0655
T.50	0,073	0,073	0,073
T.63	0,067	0,068	0,0675
T.65	0,077	0,081	0,079
T.68	0,078	0,079	0,0785
T.56	0,080	0,078	0,079
T.51	0,094	0,096	0,095
K1.33	0,140	0,140	0,140
K1.97	0,373	0,375	0,374
K1.90	0,642	0,625	0,634
K1.60	0,266	0,268	0,267
K1.1	0,245	0,247	0,246
K1.25	0,321	0,317	0,319

Gambar kurva standar N-asetil glukosamin



$$Y = 0,0158x + 0,0002$$

Dengan y: absorbansi pada 584nm

X: konsentrasi N-asetil glukosamin(µg)

$$\text{Blanko : } y = 0,0158x + 0,0002$$

$$0,0655 = 0,0158x + 0,0002$$

$$X = \frac{0,0655 - 0,0002}{0,0158}$$

$$X = 4,132 \mu\text{g}$$

$$n = \frac{\text{massa}}{\text{MR}} \quad \mu\text{mol} = \frac{4,132 \mu\text{g}}{221,2} = 0,0187$$

T.50 : $y = 0,0158x + 0,0002$
 $0,073 = 0,0158x + 0,0002$
 $X = \frac{0,073 - 0,0002}{0,0158}$
 $X = 4,607 \mu\text{g}$
 $n = \frac{\text{massa}}{m_r} \quad \mu\text{mol} = \frac{4,607 \mu\text{g}}{221,2} = 0,0208$

T.63 : $y = 0,0158x + 0,0002$
 $0,0675 = 0,0158x + 0,0002$
 $X = \frac{0,0675 - 0,0002}{0,0158}$
 $X = 4,259 \mu\text{g}$
 $n = \frac{\text{massa}}{m_r} \quad \mu\text{mol} = \frac{4,259 \mu\text{g}}{221,2} = 0,0192$

T.65 : $y = 0,0158x + 0,0002$
 $0,079 = 0,0158x + 0,0002$
 $X = \frac{0,079 - 0,0002}{0,0158}$
 $X = 4,987 \mu\text{g}$
 $n = \frac{\text{massa}}{m_r} \quad \mu\text{mol} = \frac{4,987 \mu\text{g}}{221,2} = 0,0225$

T.68 : $y = 0,0158x + 0,0002$
 $0,0785 = 0,0158x + 0,0002$
 $X = \frac{0,0785 - 0,0002}{0,0158}$
 $X = 4,955 \mu\text{g}$
 $n = \frac{\text{massa}}{m_r} \quad \mu\text{mol} = \frac{4,955 \mu\text{g}}{221,2} = 0,0224$

T.56 : $y = 0,0158x + 0,0002$
 $0,079 = 0,0158x + 0,0002$
 $X = \frac{0,079 - 0,0002}{0,0158}$
 $X = 4,987 \mu\text{g}$
 $n = \frac{\text{massa}}{m_r} \quad \mu\text{mol} = \frac{4,987 \mu\text{g}}{221,2} = 0,0225$

T.51 : $y = 0,0158x + 0,0002$
 $0,095 = 0,0158x + 0,0002$
 $X = \frac{0,095 - 0,0002}{0,0158}$
 $X = 6 \mu\text{g}$
 $n = \frac{\text{massa}}{m_r} \quad \mu\text{mol} = \frac{6 \mu\text{g}}{221,2} = 0,0271$

K1.33 : $y = 0,0158x + 0,0002$
 $0,140 = 0,0158x + 0,0002$
 $X = \frac{0,140 - 0,0002}{0,0158}$
 $X = 8,848 \mu\text{g}$
 $n = \frac{\text{massa}}{m_r} \quad \mu\text{mol} = \frac{8,848 \mu\text{g}}{221,2} = 0,04$

K1.97 : $y = 0,0158x + 0,0002$
 $0,374 = 0,0158x + 0,0002$

$$\begin{aligned}
 X &= \frac{0,374 - 0,0002}{0,0158} \\
 X &= 23,658 \mu\text{g} \\
 n &= \frac{\text{massa}}{\text{mr}} \quad \mu\text{mol} = \frac{23,658 \mu\text{g}}{221,2} = 0,106 \\
 \text{K1.90 :} \quad y &= 0,0158x + 0,0002 \\
 0,634 &= 0,0158x + 0,0002 \\
 X &= \frac{0,634 - 0,0002}{0,0158} \\
 X &= 40,113 \mu\text{g} \\
 n &= \frac{\text{massa}}{\text{mr}} \quad \mu\text{mol} = \frac{40,113 \mu\text{g}}{221,2} = 0,181 \\
 \text{K1.60 :} \quad y &= 0,0158x + 0,0002 \\
 0,267 &= 0,0158x + 0,0002 \\
 X &= \frac{0,267 - 0,0002}{0,0158} \\
 X &= 16,886 \mu\text{g} \\
 n &= \frac{\text{massa}}{\text{mr}} \quad \mu\text{mol} = \frac{16,886 \mu\text{g}}{221,2} = 0,0763 \\
 \text{K1.1 :} \quad y &= 0,0158x + 0,0002 \\
 0,246 &= 0,0158x + 0,0002 \\
 X &= \frac{0,246 - 0,0002}{0,0158} \\
 X &= 15,556 \mu\text{g} \\
 n &= \frac{\text{massa}}{\text{mr}} \quad \mu\text{mol} = \frac{15,556 \mu\text{g}}{221,2} = 0,0703 \\
 \text{K1.25 :} \quad y &= 0,0158x + 0,0002 \\
 0,319 &= 0,0158x + 0,0002 \\
 X &= \frac{0,319 - 0,0002}{0,0158} \\
 X &= 20,177 \mu\text{g} \\
 n &= \frac{\text{massa}}{\text{mr}} \quad \mu\text{mol} = \frac{20,177 \mu\text{g}}{221,2} = 0,0912
 \end{aligned}$$

$$A = \frac{[\text{GlcNac}]_{\text{sampel}} - [\text{GlcNac}]_{\text{blanko}} \times V_{\text{tr}}}{t \times V_a \times V_e}$$

$$\text{Aktivitas enzim kitinase isolat T.50} = \frac{0,0208 - 0,0187 \times 1}{30 \times 0,5 \times 0,5} = 2,8 \times 10^{-4} \text{ U/ml} = 0,28 \times 10^{-3} \text{ U/ml}$$

$$\text{Aktivitas enzim kitinase isolat T.63} = \frac{0,0192 - 0,0187 \times 1}{30 \times 0,5 \times 0,5} = 6,67 \times 10^{-5} \text{ U/ml} = 0,0667 \times 10^{-3} \text{ U/ml}$$

$$\text{Aktivitas enzim kitinase isolat T.65} = \frac{0,0225 - 0,0187 \times 1}{30 \times 0,5 \times 0,5} = 5,06 \times 10^{-4} \text{ U/ml} = 0,506 \times 10^{-3} \text{ U/ml}$$

$$\text{Aktivitas enzim kitinase isolat T.68} = \frac{0,0224 - 0,0187 \times 1}{30 \times 0,5 \times 0,5} = 4,93 \times 10^{-4} \text{ U/ml} = 0,493 \times 10^{-3} \text{ U/ml}$$

$$\text{Aktivitas enzim kitinase isolat T.56} = \frac{0,0225 - 0,0187 \times 1}{30 \times 0,5 \times 0,5} = 5,06 \times 10^{-4} \text{ U/ml} = 0,506 \times 10^{-3} \text{ U/ml}$$

$$\text{Aktivitas enzim kitinase isolat T.51} = \frac{0,0271 - 0,0187 \times 1}{30 \times 0,5 \times 0,5} = 1,12 \times 10^{-3} \text{ U/ml}$$

$$\text{Aktivitas enzim kitinase isolat K1.33} = \frac{0,04 - 0,0187 \times 1}{30 \times 0,5 \times 0,5} = 2,84 \times 10^{-3} \text{ U/ml}$$

$$\text{Aktivitas enzim kitinase isolat K1.97} = \frac{0,106 - 0,0187 \times 1}{30 \times 0,5 \times 0,5} = 11,64 \times 10^{-3} \text{ U/ml}$$

$$\text{Aktivitas enzim kitinase isolat K1.90} = \frac{0,181 - 0,0187 \times 1}{30 \times 0,5 \times 0,5} = 21,64 \times 10^{-3} \text{ U/ml}$$

$$\text{Aktivitas enzim kitinase isolat K1.60} = \frac{0,0763 - 0,0187 \times 1}{30 \times 0,5 \times 0,5} = 7,68 \times 10^{-3} \text{ U/ml}$$

$$\text{Aktivitas enzim kitinase isolat K1.1} = \frac{0,0703 - 0,0187 \times 1}{30 \times 0,5 \times 0,5} = 6,88 \times 10^{-3} \text{ U/ml}$$

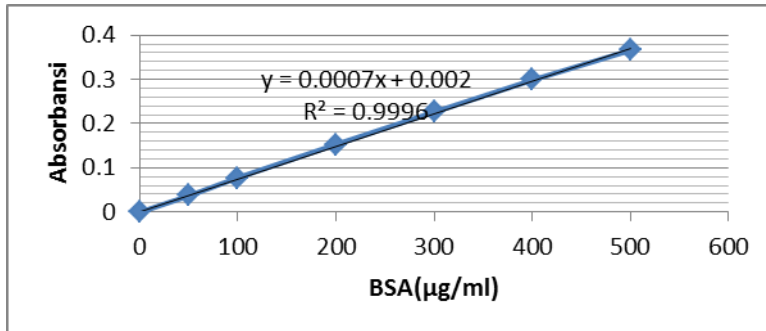
$$\text{Aktivitas enzim kitinase isolat K1.25} = \frac{0,0912 - 0,0187 \times 1}{30 \times 0,5 \times 0,5} = 9,67 \times 10^{-3} \text{ U/ml}$$

Lampiran 4. Perhitungan kadar protein

Tabel pembacaan sampel pengukuran kadar protein pada panjang gelombang 280nm

Sampel	Absorbansi 1	Absorbansi 2	Absorbansi rata-rata
T50	0,182	0,181	0,1815
T.63	0,136	0,135	0,1355
T.65	0,096	0,097	0,0965
T.68	0,142	0,142	0,142
T.56	0,095	0,096	0,0955
T.51	0,266	0,228	0,227
K1.33	0,142	0,141	0,1415
K1.97	0,177	0,178	0,1775
K1.90	0,310	0,308	0,309
K1.60	0,214	0,212	0,213
K1.1	0,145	0,147	0,146
K1.25	0,111	0,112	0,1115

Gambar kurva standar BSA



Dengan: x = absorbansi

y = konsentrasi BSA

$$\begin{aligned}
 \text{T.50} &= y = 0,0007x + 0,002 \\
 0,1815 &= 0,0007x + 0,002 \\
 X &= \frac{0,1815 - 0,002}{0,0007} \\
 &= 256,428 \mu\text{g/ml} \\
 &= 0,256 \text{ mg/ml} \\
 \text{T.63} &= y = 0,0007x + 0,002 \\
 0,1355 &= 0,0007x + 0,002 \\
 X &= \frac{0,1355 - 0,002}{0,0007} \\
 &= 190,714 \mu\text{g/ml} \\
 &= 0,190 \text{ mg/ml} \\
 \text{T.65} &= y = 0,0007x + 0,002 \\
 0,0965 &= 0,0007x + 0,002 \\
 X &= \frac{0,0965 - 0,002}{0,0007} \\
 &= 135 \mu\text{g/ml} \\
 &= 0,135 \text{ mg/ml} \\
 \text{T.68} &= y = 0,0007x + 0,002 \\
 0,142 &= 0,0007x + 0,002 \\
 X &= \frac{0,142 - 0,002}{0,0007} \\
 &= 200 \mu\text{g/ml} \\
 &= 0,200 \text{ mg/ml} \\
 \text{T.56} &= y = 0,0007x + 0,002 \\
 0,0955 &= 0,0007x + 0,002 \\
 X &= \frac{0,0955 - 0,002}{0,0007} \\
 &= 133,571 \mu\text{g/ml} \\
 &= 0,133 \text{ mg/ml} \\
 \text{T.51} &= y = 0,0007x + 0,002 \\
 0,277 &= 0,0007x + 0,002 \\
 X &= \frac{0,277 - 0,002}{0,0007} \\
 &= 392,857 \mu\text{g/ml}
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 &= 0,392 \text{ mg/ml} \\
 \text{K1.33} = & \quad y = 0,0007x + 0,002 \\
 & 0,1415 = 0,0007x + 0,002 \\
 & X = \frac{0,1415 - 0,002}{0,0007} \\
 & = 199,285 \text{ } \mu\text{g/ml} \\
 & = 0,199 \text{ mg/ml} \\
 \text{K1.97} = & \quad y = 0,0007x + 0,002 \\
 & 0,1775 = 0,0007x + 0,002 \\
 & X = \frac{0,1775 - 0,002}{0,0007} \\
 & = 250,714 \text{ } \mu\text{g/ml} \\
 & = 0,250 \text{ mg/ml} \\
 \text{K1.90} = & \quad y = 0,0007x + 0,002 \\
 & 0,309 = 0,0007x + 0,002 \\
 & X = \frac{0,309 - 0,002}{0,0007} \\
 & = 438,571 \text{ } \mu\text{g/ml} \\
 & = 0,438 \text{ mg/ml} \\
 \text{K1.60} = & \quad y = 0,0007x + 0,002 \\
 & 0,213 = 0,0007x + 0,002 \\
 & X = \frac{0,213 - 0,002}{0,0007} \\
 & = 301,428 \text{ } \mu\text{g/ml} \\
 & = 0,301 \text{ mg/ml} \\
 \text{K1.1} = & \quad y = 0,0007x + 0,002 \\
 & 0,146 = 0,0007x + 0,002 \\
 & X = \frac{0,146 - 0,002}{0,0007} \\
 & = 205,714 \text{ } \mu\text{g/ml} \\
 & = 0,205 \text{ mg/ml} \\
 \text{K1.25} = & \quad y = 0,0007x + 0,002 \\
 & 0,1115 = 0,0007x + 0,002 \\
 & X = \frac{0,1115 - 0,002}{0,0007} \\
 & = 156,428 \text{ } \mu\text{g/ml} \\
 & = 0,156 \text{ mg/ml}
 \end{aligned}$$

SURAT PERNYATAAN KEASLIAN SKRIPSI

Dengan ini saya yang bertanda tangan di bawah ini, mahasiswa Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Negeri Jakarta:

Nama : Nita Listiyani

No. Registrasi : 3425111402

Program Studi : Biologi

Menyatakan bahwa skripsi yang saya buat dengan judul “ ISOLASI DAN UJI AKTIVITAS ENZIM KITINASE BAKTERI DARI FESES KUKANG (*Nycticebus javanicus*) ASAL GARUT DAN BOGOR” adalah

1. Dibuat dan diselesaikan oleh saya sendiri, berdasarkan data yang diperoleh dari hasil percobaan pada bulan April 2015 – Desember 2015.
2. Bukan merupakan duplikat skripsi yang pernah dibuat oleh orang lain atau jiplakan karya tulis orang lain dan bukan terjemahan karya tulis orang lain.

Pernyataan ini saya buat dengan sungguh-sungguhnya dan saya bersedia menanggung segala akibat yang timbul jika pernyataan saya tidak benar.

Jakarta, April 2016
Yang membuat pernyataan

Nita Listiyani

DAFTAR RIWAYAT HIDUP



NITA LISTIYANI. Putri pertama dari Bapak Abdul Wahid dan Ibu Lasminah dilahirkan di Magelang, 07 Juli 1994. Beralamat di Jl. Gelong baru selatan IV, Grogol Petamburan, Tomang, Jakarta Barat. Pendidikan formal yang pernah ditempuh SDN Tomang 03 pagi lulus tahun 2006, SMPN 89 Jakarta lulus tahun 2009, dan SMAN 65 Jakarta lulus tahun 2011. Pada tahun 2011 penulis diterima sebagai mahasiswa jurusan Biologi di FMIPA Universitas Negeri Jakarta.

Pengalaman organisasi yang pernah diikuti selama masa perkuliahan diantaranya Staf Divisi Diklit KSP macaca UNJ periode 2012-2013. Selama masa kuliah penulis pernah mengikuti kegiatan Cakrawala Biologi (CABI) pada tahun 2011, Seminar Nasional Biologi UNJ 2012 “Isu-Isu Kritis Lingkungan, Studi Ilmiah Biologi (SIMBOL) 2012 “Keilmiahn Simbol Utama Biologi”, Workshop “Analyzing Stem Cell Using Real Time PCR” 2015, dan Asisten Praktikum mata kuliah Mikrobiologi Umum 2014 - 2015. Kemudian pada tahun 2014 penulis mengikuti Kuliah Kerja Lapangan di Pangandaran dan pada tahun yang sama penulis mengikuti Praktik Kerja Lapangan di Balai Besar Laboratorium Kesehatan Jakarta. Tahun 2015 penulis berkesempatan menjadi asisten riset selama 1 bulan di *Little Fireface Project* di Garut, Jawa barat.