

ISOLASI DAN IDENTIFIKASI BAKTERI KITINOLITIK YANG TERDAPAT PADA CANGKANG LOBSTER AIR TAWAR (*Cherax quadricarinatus*)

ISOLATION AND IDENTIFICATION OF CHYTINOLITIC BACTERIA FROM THE CRAYFISH (*Cherax quadricarinatus*) SHELL

Hari Suprpto^{1*}, Sudarno¹ dan Istikhara Mentari Tito²

¹Departemen Manajemen Kesehatan Ikan dan Budidaya Perairan, Fakultas Perikanan dan Kelautan Universitas Airlangga, Surabaya

²Program Studi Budidaya Perairan, Fakultas Perikanan dan Kelautan, Universitas Airlangga, Surabaya

*suprptoHari@yahoo.com

Abstrak

Indonesia memiliki potensi perikanan yang sangat tinggi, salah satunya adalah lobster. Ekspor lobster air tawar cenderung meningkat tiap tahun. Total ekspor hasil lobster budidaya mencapai 94.511 ton/tahun. Pangsa pasar lobster air tawar tidak hanya terbatas di dalam negeri saja tetapi juga ke luar negeri. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui adanya bakteri kitinolitik dan juga jenis-jenis bakteri kitinolitik yang terdapat pada cangkang lobster air tawar. Penelitian ini menggunakan metode observasi untuk mengetahui adanya bakteri kitinolitik yang ada pada cangkang lobster air tawar. Data yang digunakan dalam penelitian ini adalah secara deskriptif. Data yang diperoleh dianalisis secara deskriptif yaitu penyajian data tentang morfologi dan karakteristik dari bakteri kitinolitik yang diisolasi dari cangkang lobster air tawar (*Cherax quadricarinatus*) dan dibandingkan dengan morfologi dan karakteristik bakteri kitinolitik dengan literatur yang sesuai. Hasil penelitian ini adalah diperoleh bahwa bakteri yang diisolasi dari cangkang lobster air tawar (*Cherax quadricarinatus*) dapat tumbuh dan berkembang pada media uji. Kemudian hasil uji hidrolisis bakteri kitinolitik ditandai dengan adanya zona bening yang dihasilkan dari bakteri tersebut. Dari hasil pengujian tersebut didapatkan jenis – jenis bakteri yaitu *Aeromonas* sp., *Bacillus* sp. dan *Pseudomonas* sp.

Kata kunci: lobster air tawar, bakteri, isolasi, bakteri kitinolitik, zona bening.

Abstract

Indonesia have highest potential of fishery. One of them is Lobster. It has increasing slightly, approximately 94.511 ton/years. The aims this research to determine the presence of chitinolytic bacteria and identify its species in crayfish shells. This research was performed via observation method to determine the presence of chitinolytic bacteria, which are exist in crayfish (*Cherax quadricarinatus*) shell. The data used in this research is descriptive. The data descriptively analyzed represented the morphology and characteristics of chitinolytic bacteria isolated from crayfish (*Cherax quadricarinatus*) and comparison the morphology and characteristics of chitinolytic bacteria with appropriate literature. These results obtained that the bacteria isolated from crayfish (*Cherax quadricarinatus*) shell can grow and develop in the test medium. Then, chitinolytic activity was signed by the formation of clear zone on the test medium. The results obtained several bacterium species including *Aeromonas* sp., *Bacillus* sp. and *Pseudomonas* sp.

Keywords: crayfish, bacteria, isolation, chytinolytic bacteria, clear zone

Pendahuluan

Latar Belakang

Indonesia memiliki kekayaan jenis ikan yang sangat tinggi. Dilihat dari jumlah jenis ikan air tawar, Indonesia menempati rangking ke dua di dunia setelah Brazil dan merupakan peringkat pertama di Asia. Jumlah ikan air tawar pada saat ini menunjukkan bahwa pengetahuan mengenai kekayaan sumber daya ikan ini masih relatif sangat kecil, tidak saja dari pengenalan jenis, tetapi juga pengetahuan mengenai potensinya (Budiman *et al.*, 2002).

Ekspor lobster air tawar cenderung meningkat tiap tahun. Pada tahun 1990, ekspor lobster ke Belanda mencapai 745,132 ton atau 89,59% dari total ekspor lobster di Indonesia (862 ton). Pada tahun 1995, ekspor lobster Indonesia mencapai 182.065 ton/tahun, 2% dari total ekspor (3.641,3 ton) diantaranya adalah lobster air tawar. Total ekspor hasil lobster budidaya mencapai 94.511 ton / tahun. Pangsa pasar lobster air tawar tidak hanya terbatas di dalam negeri saja tetapi juga ke luar negeri (Iskandar, 2006).

Sukardi (2002) menjelaskan bahwa di masa depan, pasokan hasil perikanan diharapkan berasal dari budidaya lebih besar dibandingkan dari hasil penangkapan. Dengan demikian, budidaya

ikan merupakan salah satu sumber pertumbuhan ekonomi yang harus diwujudkan melalui sistem budidaya yang berdaya saing, berkelanjutan dan berkeadilan. Potensi yang ada di laut tidak hanya dimanfaatkan oleh masyarakat pada saat ini juga memanfaatkan potensi perikanan yang ada di darat khususnya potensi perikanan air tawar.

Perikanan air tawar memiliki beragam jenis komoditas unggulan yang tersebar di seluruh Indonesia. Salah satu jenis komoditas primadona yang unggul adalah lobster air tawar. Tumembouw (2011) mengatakan lobster air tawar atau yang lebih dikenal dengan *red claw* dan merupakan jenis lobster yang habitatnya berasal dari Queensland, Australia. Ciri utama dari lobster ini adalah di kedua ujung capitnya berwarna merah. Lobster air tawar dikenal di Indonesia pada tahun 1990 sebagai ikan hias, memasuki tahun 2000, bisnis lobster air tawar mulai populer karena telah ditemukan teknik budidayanya. Sukmajaya dan Suharjo (2003) menjelaskan beberapa keunggulan lobster air tawar yaitu memiliki kandungan lemak, kolesterol dan garam yang rendah dibandingkan dengan lobster air laut serta dagingnya yang lunak dan mengandung protein yang cukup tinggi. Menurut Curtis dan Jones (1995) jenis *red claw* (*Cherax*

quadricarinatus) memiliki nilai ekonomis yang paling tinggi dibandingkan dengan jenis lobster air tawar lainnya.

Kebutuhan lobster air tawar (*Cherax quadricarinatus*) di Eropa dan Asia Tenggara pada tahun 2004-2005 dapat mencapai 1.589 ton. Negara yang banyak mengimpor lobster jenis ini adalah Taiwan, Jepang, Hongkong, USA dan beberapa negara lain di Uni Eropa (Nurjanah *et al.*, 2008).

Selain kandungan tersebut diatas, lobster air tawar juga memiliki kandungan kitin pada cangkangnya. Kitin merupakan bahan organik yang ada pada kelompok hewan mollusca, crustaceae, insekta dan arthropoda, karena cangkang kepiting, udang dan lobster kandungan kitinnya cukup tinggi yakni 20-50% (Hanjaya dkk, 2013). Kitin dapat dimanfaatkan dalam berbagai aplikasi diantaranya dapat digunakan dalam bidang farmasi, biokimia, bahan campuran kosmetik dan lain sebagainya. Keberadaan kitin yang melimpah dengan cepat terdegradasi, karena adanya beberapa bakteri dan fungi yang mempunyai enzim kitinase yang mampu mendegradasi kitin (Herdyastuti *et al.*, 2009). Kitinase merupakan enzim yang mampu menghidrolisa polimer kitin menjadi kitin oligosakarida atau monomer n-asetilglukosamin. Enzim kitinase ini

dapat dihasilkan oleh bakteri, tanaman dan hewan (Rostinawati, 2008).

Fitri dan Yasmin (2011), menjelaskan bakteri kitinolitik merupakan kelompok bakteri yang mampu menghasilkan enzim kitinase untuk menguraikan zat kitin. Selain itu, manfaat dari bakteri kitinolitik adalah sebagai pengembangan strain melalui rekayasa genetika (Suhartono, 1989), agen biokontrol, biopestisida dan pembuatan protein sel tunggal (Patil *et al.*, 2000). Karakteristik dari bakteri kitinolitik dapat diketahui dengan melakukan pengamatan morfologi koloni bakteri, dimana dengan mengetahui ciri-ciri morfologi tersebut maka dapat mempermudah dalam melakukan identifikasi jenis bakteri kitinolitik.

Dari latar belakang diatas, dilakukan isolasi dan identifikasi bakteri kitinolitik yang terdapat pada cangkang lobster air tawar. Uji biokimia yang dilakukan adalah mencakup bentuk dan warna koloni, mortalitas, bentuk sel dan sifat gram.

Tujuan

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui adanya bakteri kitinolitik dan jenis-jenis bakteri kitinolitik yang terdapat pada cangkang lobster air tawar (*Cherax quadricarinatus*).

Manfaat

Manfaat yang diharapkan dari hasil penelitian ini adalah dapat dijadikan data acuan untuk mengetahui aktifitas dari macam-macam bakteri kitinolitik yang terkandung dalam cangkang lobster air tawar (*Cherax quadricarinatus*).

Materi dan Metode

Alat dan Bahan

Materi penelitian yang digunakan terdiri dari bahan dan alat penelitian. Alat-alat yang digunakan antara lain, *laminary air flow*, *refrigerator*, inkubator, *autoclave*, labu *erlenmeyer*, tabung reaksi, *hotplate stirrer*, cawan Petri atau *Petri disk*, *obyek glass*, *sectio kit*, *cover glass*, bunsen, ose, mikroskop, gelas ukur, pipet tetes. Peralatan lain yang digunakan antara lain *alumunium foil*, lemari pendingin, kapas, alat tulis, dan kamera digital. Bahan-bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah media agar yaitu media TSA, media Urea, media MR-VP, glukosa (maltosa, sukrosa, ramnosa, arabinosa, sorbitol, inositol, laktosa, manitol dan media MHA. Bahan-bahan yang diperlukan dalam pembuatan media agar kitin adalah NaNO_3 1,5 gr, K_2HPO_4 0,5 gr, MgSO_4 0,5 gr, Na_2CO_3 0,5 gr, CaCl_2 0,1 gr, koloidal kitin 15 gr, agar 17

gr dan akuades 1 L (Herdyastuti *et al.*, 2010).

Metode Penelitian

Penelitian ini menggunakan metode observasi untuk mengetahui adanya bakteri kitinolitik yang ada pada cangkang lobster air tawar. Data yang digunakan dalam penelitian ini adalah secara deskriptif.

Prosedur Kerja

Dalam penelitian kali ini, langkah-langkah yang perlu dilakukan dalam kegiatan isolasi bakteri adalah dengan menyiapkan isolat bakteri yang berasal dari cangkang lobster air tawar (*Cherax quadricarinatus*) dengan cara disuspensikan kedalam media TSB, diinkubasikan pada suhu 37°C selama 18-24 jam. Tujuan dari diinkubasikan pada media TSB adalah agar berbagai bakteri yang terkandung dalam cangkang lobster air tawar dapat keluar lebih teliti. Media TSB (Tryptoy Soy Broth) adalah media umum yang digunakan untuk isolasi pertumbuhan mikroorganisme yang telah diperkaya berbagai nutrisi sehingga dapat mendorong pertumbuhan mikroorganisme menjadi lebih teliti dan beragam. Komposisi dasi media TSB adalah 20 g/L pepton, 2,5 g/L glukosa, 5 g/ L NaCl dan

2,5 g/L K_2HPO_4 (Corning 2012). Hasil inkubasi media TSB kemudian di goreskan pada media kitin dan selanjutnya diinkubasikan pada suhu $37^{\circ}C$ selama 18-24 jam .

Selanjutnya isolat bakteri pada media TSB ditanam pada media TSA dan kemudian diinkubasikan pada suhu $37^{\circ}C$ selama 18-24 jam. Kemudian didapatkan beberapa koloni pada media TSA. Setelah itu, isolat bakteri tersebut dimurnikan kembali pada media TSA dan diinkubasi pada suhu $37^{\circ}C$ selama 24 jam. Kemudian dilakukan uji karakteristik bakteri.

Pengujian aktifitas enzim kitinase pada bakteri kitinolitik adalah ditandai dengan adanya zona bening yang terdapat di sekitar bakteri yang telah digoreskan pada media kitin. Bakteri yang telah digoreskan pada media kitin kemudian diinkubasi pada suhu $37^{\circ}C$ selama 18-24 jam. Aktivitas enzim kitinase ditunjukkan dengan terbentuknya zona lisis pada sekitar koloni. Semakin besar zona lisis yang terbentuk, maka semakin besar pula aktivitas enzim kitinase yang dimiliki bakteri uji tersebut.

Parameter Penelitian

Parameter dalam penelitian ini meliputi parameter utama dan parameter pendukung. Parameter utama yang diamati

adalah bakteri yang tumbuh. Parameter pendukung adalah suhu inkubasi.

Analisis Data

Data yang diperoleh dianalisis secara deskriptif yaitu penyajian data tentang morfologi dan karakteristik dari bakteri kitinolitik yang diisolasi dari cangkang lobster air tawar (*Cherax quadricarinatus*) dan dibandingkan dengan morfologi dan karakteristik bakteri kitinolitik dengan literatur yang sesuai.

Hasil dan Pembahasan

Berdasarkan penelitian yang dilakukan, diperoleh bahwa bakteri yang diisolasi dari cangkang lobster air tawar (*Cherax quadricarinatus*) dapat tumbuh dan berkembang pada media uji. Bakteri diisolasi berdasarkan bentuk dan warna koloni. Sampel yang telah diinkubasi selama 24 jam didapatkan 8 koloni yang diantaranya memiliki warna putih susu, krem tipis, krem tebal, coklat, kuning, putih keruh, putih dimana koloni tersebut tumbuh padat pada media TSA. Koloni tersebut kemudian dimurnikan kembali pada media TSA dan diinkubasi selama 24 jam. Hasil dari pemurnian tersebut beberapa koloni dikelompokkan sesuai dengan warna dan bentuk yang sama

sehingga dari hasil pengelompokan tersebut didapatkan 4 isolat bakteri.

Koloni hasil isolasi dipilih sebanyak 4 isolat dengan berbagai bentuk yang berbeda. Isolat tersebut kemudian diberi tanda 1, 2, 3 dan 4. Masing-masing isolat memiliki morfologi koloni yang berbeda satu sama lain.

Setelah didapatkan hasil karakteristik dan uji biokimia, kemudian dicocokkan dengan literatur yang ada, yakni menggunakan buku *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*.

Dari hasil pengujian tersebut didapatkan jenis – jenis bakteri yaitu *Aeromonas* sp., *Bacillus* sp. dan *Pseudomonas* sp.. Keempat isolat tersebut selanjutnya dilakukan uji hidrolisis kitin

Bakteri yang telah diisolasi dengan menggunakan media TSA juga kemudian diisolasi menggunakan media yang mengandung kitin. Uji hidrolisis bakteri kitinolitik ditandai dengan adanya zona bening yang dihasilkan dari bakteri tersebut.

Hasil dan Pembahasan

Untuk mempelajari sifat-sifat dan karakteristik dari mikroba, maka masing-masing mikroba harus dipisahkan dari satu dengan yang lainnya sehingga didapatkan kultur atau biakan murni dari mikroba tersebut. Untuk mendapatkan isolat bakteri

dari suatu bahan yang mengandung campuran mikroba dapat dilakukan isolasi (Fardiaz, 1989).

Setelah didapatkan 4 isolat bakteri yang kemudian dilanjutkan dengan uji kitinolitik. Uji kitinolitik tersebut bertujuan untuk menunjukkan bahwa bakteri tersebut merupakan bakteri kitinolitik. Hal tersebut ditunjukkan dengan terbentuknya zona bening yang timbul di sekeliling bakteri (Gambar 1). Aktivitas kitinolitik secara kualitatif dapat ditentukan adanya zona bening di sekitar koloni bakteri yang tumbuh pada medium agar kitin (Gohel *et al.*, 2006). Zona bening terbentuk akibat enzim kitinolitik yang dibebaskan ke luar sel bakteri untuk memecah makromolekul kitin menjadi molekul kitin yang lebih kecil, sehingga bakteri dapat mengambil nutrisi dalam bentuk molekul-molekul kecil (Joklik *and* Smith, 1968). Enzim kitinolitik yang disekresikan bakteri dalam medium agar kitin kemudian diikat oleh partikel kitin (koloidal kitin), sehingga kitin menjadi terdegradasi dan komposisi kitin dalam medium menjadi berkurang. Degradasi oligomer kitin dan penggunaan molekul hasil degradasi tersebut oleh bakteri membuat medium tampak jernih, terutama di sekitar koloni bakteri (Chen *and* Lee, 1994).

Tabel 1. Hasil Karakteristik Bakteri

Karakteristik	1	2	3	4
Uji Gram	-	-	+	-
Warna	krem	krem	putih	Putih
Morfologi sel	batang	batang	batang	Batang
Oksidase	+	+	-	+
Katalase	+	+	+	+
O/F	F	F	NR	NR
TSIA	As/As	As/As	As/NR	As/As
LIA	-	-	+	+
Motilitas	+	+	-	-
Indole	+	+	-	-
MR	+	-	-	-
Vp	+	+	-	-
Citrate	-	-	-	-
Urease	-	-	-	+
Glukosa	+	+	+	+
Laktosa	-	-	-	-
Sukrosa	+	+	-	+
Arabinosa	-	-	-	-
Manitol	+	+	+	-
Inositol	-	-	V	-
Maltose	+	+	+	+

Hasil uji hidrolisis kitin menunjukkan bahwa isolat tersebut merupakan bakteri kitinolitik. Hal tersebut ditandai dengan terbentuknya zona bening di sekitar bakteri. Hal itu menunjukkan bahwa bakteri dapat mengambil nutrisi dalam bentuk molekul-molekul kecil. Semakin besar zona bening yang terbentuk, maka semakin besar pula kemampuan isolat dalam mendegradasi kitin (Yusmarini *et al.*, 2009).

Selanjutnya isolat yang mempunyai aktivitas enzim kitinase dilakukan uji identifikasi. Dari hasil pengamatan semua

bakteri dilakukan pewarnaan gram yang menunjukkan semua bakteri menunjukkan gram negatif dan gram positif (Tabel 1).

Berdasarkan hasil isolasi bakteri, morfologi bakteri yang diisolasi dari cangkang lobster air tawar (*Cherax quadricarinatus*) memiliki koloni yang dengan bentuk bulat, tidak beraturan dan ada pula yang datar. Hal tersebut menunjukkan karakteristik dari bakteri tersebut. Uji sifat morfologi koloni bakteri sangat penting untuk identifikasi bakteri karena karakteristik koloni bakteri pada medium lempeng dapat memiliki nilai

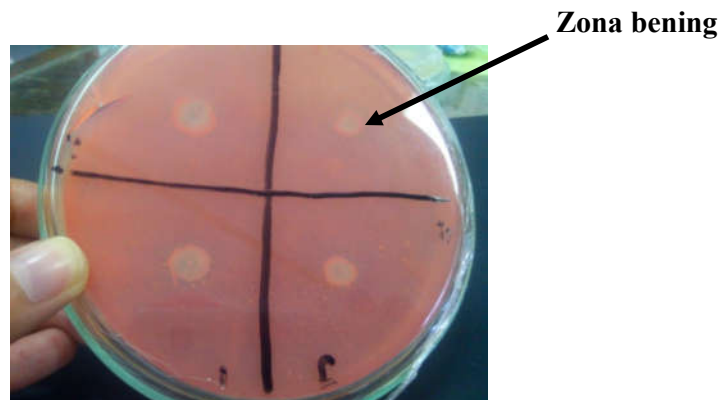
identitas (Prabaningtyas, 2003). Hasil uji identifikasi tersebut kemudian dilanjutkan dengan uji biokimia dan hasil dari uji

tersebut dicocokkan dengan *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*.

Tabel 2. Hasil Karakteristik Bakteri

Karakteristik	1	2	3	4
Uji Gram	-	-	+	-
Morfologi sel	batang	batang	batang	Batang
Oksidase	+	+	-	+
Katalase	+	+	+	+
O/F	F	F	NR	NR
TSIA	As/As	As/As	As/NR	As/As
LIA	-	-	+	+
Motilitas	+	+	-	-
Indole	+	+	-	-
MR	+	-	-	-
Vp	+	+	-	-
Citrate	-	-	-	-
Urease	-	-	-	+
Glukosa	+	+	+	+
Laktosa	-	-	-	-
Sukrosa	+	+	-	+
Arabinosa	-	-	-	-
Manitol	+	+	+	-
Inositol	-	-	v	-
Maltose	+	+	+	+
Hasil Identifikasi	<i>Aeromonas sp.</i>	<i>Aeromonas sp.</i>	<i>Bacillus sp.</i>	<i>Pseudomonas sp.</i>

(Holt *et al.*, 2000)



Gambar 1. Pengamatan zona bening

Dari hasil uji identifikasi dan uji biokimia didapatkan 3 bakteri kitinolitik yaitu *Aeromonas* sp., *Bacillus* sp dan *Pseudomonas* sp. ketiga bakteri yang diidentifikasi tersebut memiliki kemampuan untuk mendegradasi kitin (Tabel 2). Menurut Thompson *et al.*, (2001), beberapa genus bakteri yang mampu menghasilkan enzim kitinolitik adalah *Aeromonas*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Pseudomonas* dan *Serratia*. (Goodday, 1994).

Kesimpulan dan Saran

Dari hasil penelitian didapatkan bakteri kitinolitik *Aeromonas* sp., *Bacillus* sp dan *Pseudomonas* sp. pada cangkang Lobster Air Tawar (*Cherax quadricarinatus*). Bakteri tersebut mampu untuk mendegradasi kitin yang ditandai dengan adanya zona bening di sekitar bakteri.

Perlu dilanjutkan penelitian lanjutan mengenai bakteri kitinolitik yang terdapat pada cangkang lobster air tawar (*Cherax quadricarinatus*) sebagai daya hambat maupun keperluan lainnya untuk budidaya.

Daftar Pustaka

Budiani, A., Santoso, D.A., Susanti, I.Mawardi S., dan Siswanto. 2004. Ekspresi β -1,3 Glukanase

dan Kitinase pada Tanaman Kopi Arabika (*Coffea Arabica* L.) Tahan dan Rentan Karat Daun. *Jurnal Menara Perkebunan*. 72 (2): 57-71.

Chen, J. P. and M. S. Lee. 1994. Simultaneous Production and Partition of Chitinase during Growth of *Serratia Marcescens* in an Aqueous Two-phase System. *Biotechnology Techniques*. 8(11): 783-788.

Fardiaz, S. 1989. Petunjuk Laboratorium. Analisis Mikrobiologi Pangan. Bogor: Pusat Antar Universitas Pangan dan Gizi. Direktorat Jendral Pendidikan Tinggi, Departemen Pendidikan dan Kebudayaan. Institut Pertanian Bogor.

Gooday, G. W. 1994. *Physiology of Microbacterial Degradation of Chitin and Chitosan*. Biochemistry of Microbacterial Degradation. Netherlands.

Gohel, V., A. Singh, M. Vimal, P. Ashwini and H. S. Chatpar. 2006. Bioprospecting and Antifungal Potential of Chitinolytic Microorganism. *African Journal of Biotechnology* 5(2) : 54-72.

Herdyastuti, N., T. J. Raharjo, Mudasir and S. Matsjeh. 2009. Chitinase and Chitinolytic Microorganism : Isolation, Characterization and Potential. Departemen of Chemistry. Universitas Negeri Surabaya. 9(1), 37-47.

Holt, J.G and N.R. Krieg. 2000. *Bergey's Manual Of Determinative Bacteriology*. 9th Edition. Lippincott Williams & Wilkins. A Wolters

- Kluwer Company. Philadelphia. USA.
- Iskandar, 2006, *Budidaya Lobster Air Tawar*, Agro Media Pustaka, Jakarta.
- Lenni, F. dan Y. Yasmin. 2011. Isolasi dan Pengamatan Morfologi Koloni Bakteri Kitinolitik. *Jurnal Ilmiah Pendidikan Biologi*, 3(2) : 20-25.
- Patil, R. S., J. Lee and H. K. Lee. 2000. *Purification and Characterization of Chitinase from Marine Bacterium Vibrio sp.* The Journal Microbiology. 26: 473-483.
- Prabaningtyas, S. 2003. *Karakteristik Bakteri Koleksi Laboratorium Mikrobiologi Universitas Negeri Malang*. Malang.
- Suhartono, M. T. 1989. *Enzim dan Bioteknologi*. Departemen Pendidikan dan Kebudayaan
- Direktorat Jendral Pendidikan Tinggi antar Universitas Bioteknologi Institut Pertanian Bogor. Bogor. VI. 322 hlm.
- Sukmajaya, Y dan I. Suharjo. 2003. *Lobster Air Tawar*. Agro Media Pustaka.
- Rostinawati, T. 2008. *Skrining dan Identifikasi Bakteri Penghasil Enzim Kitinase dari Air Laut di Perairan Pantai Pondok Bali*. Penelitian Mandiri. Fakultas Farmasi. Universitas Padjadjaran. Jatinangor. hal 22-25.
- Tumebow, S. S. 2011. *Kualitas Air pada Kolam Lobster Air Tawar (Cherax quadricarinatus) di BBAT Tatelu*. *Jurnal Perikanan dan Kelautan Tropis*. Fakultas Perikanan dan Kelautan. Universitas Sam Ratulangi Manado.