

AKTIVITAS ENZIM PENDEGRADASI KITIN DARI ISOLAT SDI23 ASAL PETIS SERTA KARAKTERISASI pH DAN SUHU AKTIVITAS ENZIM HASIL PURIFIKASI PARSIAL

CHITINOLYTIC ENZYME ACTIVITY OF ISOLATE SDI23 FROM PETIS AND THE ACTIVITY OF ITS PARTIALLY PURIFIED ENZYME IN DIFFERENT pH AND TEMPERATURE

Eny Orinda, Indun D. Puspita, Muhammad* P. Putra, Ustadi, Iwan Y. B. Lelana

Jurusan Perikanan Fakultas Pertanian UGM
Jl. Flora A4 Bulaksumur Sleman 55218

*Penulis untuk korespondensi, E-mail: indun_dp@ugm.ac.id

Abstrak

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui aktivitas enzim pendegradasi kitin yang dihasilkan selama pertumbuhan dari lima isolat bakteri kitinolitik (SDI23, MDR23, SDI15, SDI13 dan BLT12) asal petis udang serta mengetahui karakteristik aktivitas enzim hasil pemurnian parsial pada berbagai suhu (30-55°C) dan pH (4-9). Kelima isolat ditumbuhkan pada medium koloidal kitin cair dengan suhu inkubasi 37°C selama 96 jam. Pengamatan terhadap jumlah bakteri (log CFU/ml) dan aktivitas spesifik enzim (U/mg) dilakukan setiap 12 jam. Aktivitas enzim pendegradasi kitin diukur secara kuantitatif, dengan mengukur jumlah N-asetilglukosamin yang dihasilkan dari hidrolisis koloidal kitin oleh enzim. Purifikasi parsial dilakukan dengan presipitasi ammonium sulfat bertingkat (20-80%) yang dilanjutkan dengan dialisis. Isolat SDI23, MDR23, SDI15 dan BLT12 menunjukkan waktu pertumbuhan optimum dengan jumlah sel tertinggi pada jam ke-48, sedangkan isolat SDI13 pada jam ke-24. Aktivitas spesifik enzim tertinggi ditunjukkan oleh isolat SDI23 sebesar 0,66 U/mg pada inkubasi selama 48 jam. Berdasarkan hasil tersebut, isolat SDI23 dipilih untuk memproduksi enzim pada tahap purifikasi parsial. Supernatan bebas sel dari media kultur isolat SDI23 disiapkan dari inkubasi SDI23 dalam medium koloidal kitin cair pada suhu 37°C selama 48 jam. Presipitasi dengan amonium sulfat pada fraksi 80% dan dialisis menghasilkan ekstrak kitinase kasar dengan nilai aktivitas spesifik enzim sebesar 0,072 U/mg dan 0,063 U/mg. Enzim hasil pemurnian parsial menunjukkan aktivitas optimum pada pH 6 dan suhu 45°C dengan nilai aktivitas spesifik enzim sebesar 0,09 U/mg.

Kata kunci : petis, enzim pendegradasi kitin, presipitasi ammonium sulfat

Abstract

The objectives of this research were to determine the growth curve and chitinase activities of five chitinolytic bacterial isolates; partially purification of crude chitinase by ammonium sulfate precipitation and dialysis; and characterization of chitinase at various temperatures (30-55°C) and pH (4-9). The quantitative method to measure chitinase activity was conducted by colorimetric by measuring the amount of N-asetylglucosamine produced from the reaction of chitinase and colloidal chitin. Five isolates were grown in colloidal chitin broth at 37°C for 96 hours and the observations was done every 12 hours. Isolates SDI23, MDR23, SDI15 and BLT12 showed optimum growth at 48 hours, whereas SDI13 at 24 hours. The greatest chitinase activity was shown by isolate SDI23 (0.66 U/mg) at 48 hours of incubation and was chosen as the best isolate. Crude enzyme prepared from 48 hours culture medium of SDI23 was partially purified by ammonium sulfate precipitation (20-80%) and dialysis. The result showed that specific activity of chitinase obtained from 80% ammonium sulphate fraction before and after dialysis was 0,072 U/mg and 0,063 U/mg, respectively. Crude extract of chitinase produced by isolate SDI23 showed optimal activity at pH 6 and temperature of 45°C with the value of 0,09 U/mg.

Keywords: petis, chitinolytic anzyme, ammonium sulphate precipitation

Pengantar

Kitin merupakan senyawa homopolisakarida tidak bercabang yang terdiri dari N-Asetilglukosamin yang dihubungkan dengan ikatan β -1,4-glikosida (Gooday, 1990). Sumber utama kitin adalah limbah hasil laut seperti: kulit udang, lobster, dan cangkang kepiting, serta dinding sel jamur dan bakteri (Chang *et al.*, 2004). Beberapa sifat fungsional yang dimiliki kitin, seperti antimikrobia, antioksidan, antikoagulan, hemostasis, fibroblastik, dan absorben, membuatnya banyak diaplikasikan di berbagai bidang, seperti farmasi, kosmetik, kedokteran, pangan, pertanian, pengolahan air, dan perikanan (Prashanth & Tharanathan, 2007). Salah satu kelemahan kitin adalah kelarutannya yang relatif rendah pada pH netral sehingga membuat adanya keterbatasan pada aplikasinya. Kelarutan yang rendah salah satunya disebabkan oleh besarnya molekul kitin. Depolimerasi merupakan upaya untuk memperbaiki kelarutan dan sifat fungsional kitin (Prashanth & Tharanathan, 2007).

Metode depolimerasi kitin dapat dilakukan secara kimiawi maupun biologis. Metode kimiawi menggunakan asam pekat seperti asam klorida (HCl) dinilai kurang efektif karena tidak ramah lingkungan (Tsigos *et al.*, 2000), sehingga metode biologis lebih banyak dipilih untuk dikembangkan. Metode depolimerasi secara biologis dapat dilakukan dengan bantuan enzim pendegradasi kitin, kitinase, yang dihasilkan oleh bakteri kitinolitik. Menurut Chasanah *et al.* (2009), kitinase termasuk ke dalam kelompok enzim hidrolase yang dapat mendegradasi kitin secara langsung menjadi produk dengan berat molekul kecil, yang dihasilkan oleh mikroorganisme, baik secara intra maupun ekstraseluler (Noviendri *et al.*, 2008).

Mikroorganisme prokariot penghasil kitinase umumnya berasal dari kelompok bakteri yaitu *Pseudomonas*, *Vibrio*, *Photobacterium*, *Actinomycetes*, *Bacillus*, *Aeromonas*, *Streptomyces* dan *Clostridium* (Noviendri *et al.*, 2008). Bakteri penghasil enzim kitinase dapat dideteksi dan diisolasi melalui terbentuknya zona bening pada medium kitin agar (Purwani *et al.*, 2002). Habitat bakteri kitinolitik umumnya adalah lingkungan yang mengandung kitin dalam jumlah tinggi, seperti eksoskeleton krustasea (Vogan *et al.*, 2002), kompos dengan kandungan kitin (Sakai *et al.*, 1998), serta air dan sedimen laut (Brzezinska & Donderski, 2001). Selain itu bakteri kitinolitik juga dapat ditemukan pada produk

olahan maupun limbah hasil perikanan. Limbah krustasea yang digunakan sebagai bahan utama pembuatan beberapa produk pangan seperti petis dan terasi, diduga berpotensi memiliki kandungan bakteri kitinolitik. Beberapa penelitian telah berhasil mengisolasi bakteri kitinolitik dari terasi (Noviendri *et al.*, 2008) dan limbah udang (Chasanah *et al.*, 2009).

Penelitian ini merupakan lanjutan dari penelitian sebelumnya yang telah berhasil mengisolasi bakteri kitinolitik sejumlah 34 isolat dari petis udang yang diolah secara tradisional (Premono, 2013). Sebanyak 5 isolat bakteri kitinolitik yang memiliki nilai Indeks Kitinolitik (IK) > 2 dipilih dalam penelitian ini. Tujuan dari penelitian ini adalah melakukan purifikasi parsial menggunakan metode ammonium sulfat presipitasi untuk mendapatkan ekstrak kitinase kasar, mengetahui aktivitas kitinase dari ekstrak enzim kasar yang dihasilkan dari proses purifikasi parsial, serta mengetahui aktivitas kitinase dari ekstrak enzim kasar pada berbagai nilai pH dan suhu. Diharapkan kitinase yang dihasilkan oleh isolat dapat dikembangkan untuk metode depolimerasi kitin secara biologis.

Bahan dan Metode

Mikroorganisme dan Persiapan inokulum

Bakteri yang digunakan dalam penelitian ini adalah 5 isolat bakteri (MDR23, BLT12, SDI13, SDI15 dan SDI23) asal petis udang. Kelima bakteri ini dipilih karena memiliki indeks kitinolitik (IK) > 2 (Premono, 2013). Isolat bakteri dari *glycerol stock* ditumbuhkan dengan cara digoreskan pada media TSA dan diinkubasi pada suhu 30°C selama 24 jam. Inokulum disiapkan dengan cara memindahkan satu koloni bakteri dari TSA ke dalam TSB kemudian diinkubasi pada suhu 30°C selama 24 jam.

Produksi Kitinase oleh Isolat Bakteri

Produksi kitinase dilakukan dengan menumbuhkan isolat pada medium kitin cair sebanyak 3 kali ulangan. Medium kitin cair memiliki komposisi K_2HPO_4 0,1% (b/v), $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,01% (b/v), NaCl 0,1% (b/v), $(NH_4)_2SO_4$ 0,7% (b/v), *Yeast Extract* 0,05% (b/v), dan koloidal kitin 2% (b/v) (Nasran *et al.*, 2003). Koloidal kitin dibuat dengan mengikuti metode Arnold & Solomon (1986). Sebanyak 500 μ l inokulum dimasukkan ke dalam 50 ml medium kitin cair dalam labu erlenmeyer 100 ml dan diinkubasi selama 96 jam pada suhu 37°C dengan agitasi 80 rpm. Pengambilan sampel dilakukan setiap 12 jam sebanyak 1 ml untuk pengamatan pertumbuhan

bakteri dan 2 ml kultur bebas sel yang telah disentrifuge selama 6.000 rpm, suhu 4°C selama 10 menit untuk pengukuran jumlah protein ekstraseluler dan pengujian aktivitas kitinase.

Pengukuran Pertumbuhan Bakteri

Pengenceran berseri dilakukan terhadap 100 µl sampel menggunakan 900 µl NaCl 0,85% (b/v) hingga beberapa tingkat pengenceran. Sebanyak 100 µl suspensi pada setiap tingkat pengenceran ditebar pada medium TSA dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C lalu dihitung jumlah koloni yang tumbuh. Tingkat pengenceran yang digunakan dalam perhitungan adalah pengenceran dengan jumlah koloni 30-300 CFU/ml.

Pengukuran Konsentrasi Protein Ekstraseluler

Supernatan bebas sel diambil sebanyak 500 µl direaksikan dengan 500 µl reagen Bradford, divorteks kemudian diukur absorbansinya dengan panjang gelombang 595 nm (Bradford, 1976). Medium cair tanpa isolat digunakan sebagai kontrol negatif. Kurva standar dibuat dengan menginterpolasi BSA (Bovine Serum Albumin) berbagai konsentrasi dengan nilai absorbansi pada panjang gelombang 595 nm untuk mendapatkan persamaan matematis dari kurva tersebut. Nilai absorbansi sampel kemudian dibandingkan dengan nilai absorbansi larutan standar BSA di dalam persamaan untuk mendapatkan konsentrasi protein ekstraseluler dari sampel.

Penentuan Aktivitas Kitinase

Sebanyak 500 µl supernatan bebas sel direaksikan dengan 1 ml koloidal kitin 1,3% (dalam buffer fosfat 50mM pH 7,4) dengan cara diinkubasi selama 30 menit dalam waterbath pada suhu 37°C. Untuk menghentikan reaksi, campuran direbus dalam air mendidih selama 5 menit, didinginkan dan disentrifuge (10.000 rpm) selama 5 menit (Wang *et al.*, 2011). Jumlah N-asetilglukosamin (NAG) hasil reaksi di atas diukur dengan metode Reissig *et al.* (1955). Sebanyak 0,25 ml supernatan hasil reaksi ditambahkan 0,05 ml kalium tetraborat (pH 9,1) kemudian direndam dalam air mendidih selama 3 menit. Setelah dingin, larutan ditambahkan dengan 1,25 ml p-dimetilaminobenzaldehida (DMAB) dan segera diinkubasi pada suhu 37°C selama 20 menit. Absorban sampel diukur dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 584 nm. Medium kitin cair tanpa isolat digunakan sebagai kontrol negatif. Pembuatan kurva standar, larutan standar GlcNAc pada berbagai konsentrasi diinterpolasikan dengan nilai absorbansi pada panjang gelombang

584 nm untuk mendapatkan persamaan matematis dari kurva tersebut. Nilai absorbansi sampel dan kontrol kemudian dibandingkan dengan nilai absorbansi larutan standar NAG. Satu unit (1 U) aktivitas kitinase didefinisikan sebagai jumlah NAG yang dilepaskan per menit oleh enzim pada kondisi inkubasi tersebut di atas. Aktivitas spesifik enzim adalah perbandingan aktivitas enzim dengan kadar protein yang terdapat dalam sampel dengan satuan U/mg (Reissig *et al.*, 1955).

Purifikasi Parsial Kitinase dengan Presipitasi Amonium Sulfat dan Dialisis

Isolat yang menunjukkan aktivitas kitinase tertinggi dipilih untuk tahap produksi enzim. Kitinase dimurnikan dengan menggunakan metode pengendapan amonium sulfat bertingkat 20, 40, 60 dan 80%. Sebanyak 2,5 ml kultur bakteri dari TSB yang telah diinkubasi pada suhu 30°C selama 24 jam, ditransfer ke dalam medium kitin cair 250 ml dan diinkubasi pada suhu 37°C dengan agitasi 80 rpm. Media kultur dipanen pada waktu produksi enzim yang maksimal dengan cara disentrifugasi hingga mencapai kecepatan 3500 rpm, suhu 4°C selama 15 menit. Supernatan ditambahkan amonium sulfat dengan tingkat kejenuhan 20% secara perlahan sambil diaduk hingga larut sempurna pada suhu 4°C selama 1 jam. Sampel kemudian disentrifugasi pada 3.500 rpm suhu 4°C selama 15 menit. Endapan, yang merupakan fraksi protein 20% amonium sulfat, ditambahkan dengan 5 ml buffer fosfat pH 7. Sedangkan supernatan yang didapat ditambah kembali dengan amonium sulfat pada tingkat kejenuhan 20% dan diperlakukan seperti proses di atas untuk mendapatkan fraksi protein 40% amonium sulfat. Proses yang sama dilakukan kembali hingga mendapatkan fraksi 60% dan 80% amonium sulfat. Fraksi yang paling tinggi nilai aktivitas kitinasenya dipilih untuk dilakukan dialisis. Endapan yang telah dilarutkan dimasukkan ke dalam kantong selofan (12.000 MWCO), kemudian direndam dalam buffer fosfat pH 7 dengan perbandingan 10:1 dengan volume larutan di dalam kantong selofan selama semalam pada suhu ± 4 °C. Dialisat yang didapat merupakan ekstrak kasar enzim kitinase. Aktivitas kitinase dan kadar protein pada tiap tahapan purifikasi diuji. Hasil rendemen (%) diperoleh dengan membandingkan total aktivitas enzim (U) akhir dengan total aktivitas enzim awal (U) dikali 100%. Total aktivitas enzim (U) didapat dengan cara perkalian antara volume enzim (ml) dengan aktivitas enzim (U/ml), sedangkan total

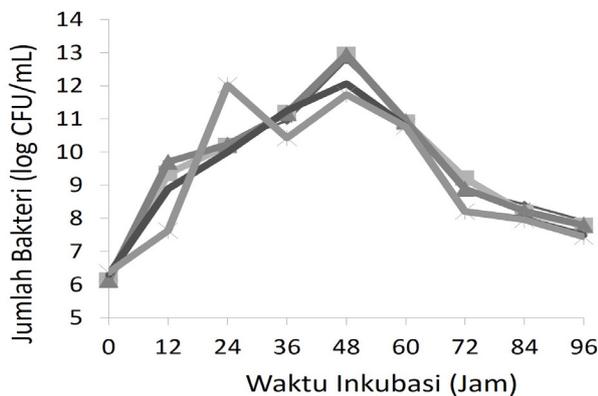
protein diperoleh dengan cara perkalian antara volume enzim (ml) dengan kadar protein (mg/ml).

Karakterisasi Ekstrak Kitinase Kasar pada Berbagai Kondisi pH dan Suhu

Kitinase kasar yang diperoleh dari tahap purifikasi parsial kemudian dikarakterisasi untuk melihat aktivitasnya pada berbagai pH (4-9) dan suhu (30, 35, 40, 45 dan 50°C). Pengujian aktivitas kitinase pada berbagai pH dilakukan dengan menggunakan bufer sitrat 0,1 M (pH 4-5), bufer fosfat 0,2 M (pH 6-7) dan bufer borat 0,2 M (pH 8-9) (Hartini, 2003). Pengujian aktivitas enzim mengikuti metode Reissig et al. (1955) seperti yang telah dijelaskan.

Hasil dan Pembahasan

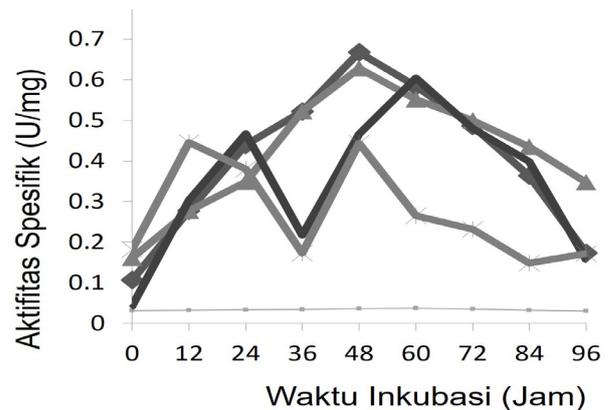
Gambar 1 menunjukkan pola pertumbuhan yang serupa pada beberapa isolat, yaitu isolat BLT12, MDR23, SDI15 dan SDI23. Peningkatan jumlah sel terjadi hingga jam ke-48, kemudian mengalami penurunan hingga jam ke-96. Isolat SDI13 menunjukkan laju pertumbuhan yang lebih cepat dengan jumlah sel tertinggi dicapai pada jam ke-24, diikuti dengan penurunan jumlah sel secara bertahap hingga jam ke-96. Perbedaan jumlah sel antar isolat diduga akibat perbedaan laju pertumbuhan dan kecepatan membelah diantara isolat-isolat tersebut. Pembelahan biner akan terjadi apabila nutrisi di dalam medium tercukupi. Menurut Patil et al. (2000), bakteri menghasilkan kitinase secara ekstraseluler untuk pengambilan nutrisi. Hasil degradasi kitin oleh kitinase berupa GlcNAc akan digunakan bakteri sebagai sumber karbon dan nitrogen untuk metabolismenya.



Gambar 1. Pertumbuhan bakteri kitinolitik isolat SDI23 (◆), SDI15 (■), BLT12 (▲), MDR23 (●), SDI13 (✱) pada medium kitin cair yang diinkubasi pada suhu 37°C, 100 rpm.

Bakteri yang tumbuh pada lingkungan dengan kandungan kitin yang tinggi akan menghasilkan kitinase untuk mendegradasi polimer kitin menjadi monomernya, sehingga kitin tersebut siap digunakan sebagai nutrisi (Brzezinska & Donderski, 2003). Aktivitas kitinase spesifik tertinggi ditunjukkan oleh isolat SDI23 pada jam ke-48 yaitu sebesar 0,66 U/mg (Gambar 2). Aktivitas kitinase yang tinggi seiring dengan pertumbuhan bakteri. Pada waktu inkubasi 48 jam, jumlah sel mencapai titik tertinggi yaitu 12,76 log CFU/ml. Keterkaitan ini menunjukkan bahwa kitinase yang dihasilkan bersifat ekstraseluler dan digunakan bakteri untuk menghidrolisis kitin menjadi senyawa sederhana yang nantinya akan digunakan sebagai nutrisi (Patil et al., 2000). Isolat BLT12 dan SDI13 juga menghasilkan nilai aktivitas tertinggi pada jam ke-48, sedangkan isolat MDR23 pada jam ke-60. Isolat SDI15 tidak menunjukkan adanya peningkatan aktivitas kitinase walaupun terjadi peningkatan jumlah sel. Peningkatan jumlah sel yang terjadi pada isolat tersebut diduga akibat senyawa-senyawa lain (selain NAG) yang mampu memicu pertumbuhan sel. Hal ini diduga terjadi akibat adanya enzim pendegradasi kitin selain kitinase yang dihasilkan oleh bakteri. Koloidal kitin juga dapat dihidrolisis oleh kitin deasetilase yang menghasilkan kitosan dan kitosanase yang menghasilkan kitobiosa (Fukamizo, 2000).

Aktivitas kitinase dan pertumbuhan bakteri yang ditunjukkan oleh isolat SDI23 dan BLT12 cenderung sama. Hal ini menunjukkan bahwa pada kedua isolat tersebut terjadi fenomena *growth associated* yang artinya produk NAG yang terbentuk diakibatkan karena aktifnya pertumbuhan sel. Isolat MDR23

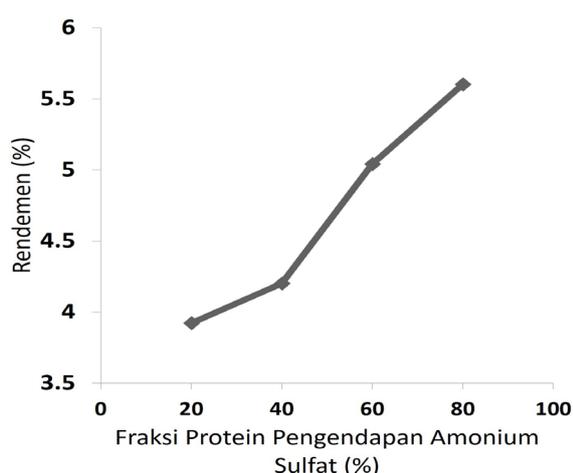


Gambar 2. Aktivitas kitinase isolat SDI23 (◆), SDI15 (■), BLT12 (▲), MDR23 (●), SDI13 (✱) pada medium kitin cair yang diinkubasi pada suhu 37°C, 100 rpm.

dan SDI13 menunjukkan aktivitas kitinase yang tidak stabil (naik turun), hal ini diduga kedua isolat tersebut memproduksi kitinase pada awal pertumbuhannya. Sejalan dengan penggunaan NAG untuk pertumbuhan, dimungkinkan kitinase juga digunakan bakteri sebagai sumber protein sehingga aktivitas kitinasenya menurun.

Pemilihan isolat terbaik dilakukan dengan melihat pola pertumbuhan bakteri dan nilai aktivitas spesifik kitinase yang menggambarkan produksi enzim oleh bakteri. Isolat yang menunjukkan kesesuaian antara kedua parameter yaitu isolat SDI23. Waktu inkubasi yang digunakan untuk produksi enzim oleh isolat SDI23 adalah 48 jam. Berdasarkan uji biokimia yang dilakukan Premono (2013), isolat SDI23 memiliki kemiripan dengan *Vibrio* sp. Aktivitas kitinase yang dihasilkan pada penelitian ini lebih besar dibandingkan dengan penelitian Nasran *et al.* (2003) pada bakteri *Vibrio harveyi* yang menghasilkan aktivitas kitinase sebesar $10,82 \times 10^{-6}$ U/ml pada suhu inkubasi 37°C. Jenis enzim yang dimiliki *V. harveyi* adalah kitinase dan kitin deasetilase (Nasran *et al.*, 2003).

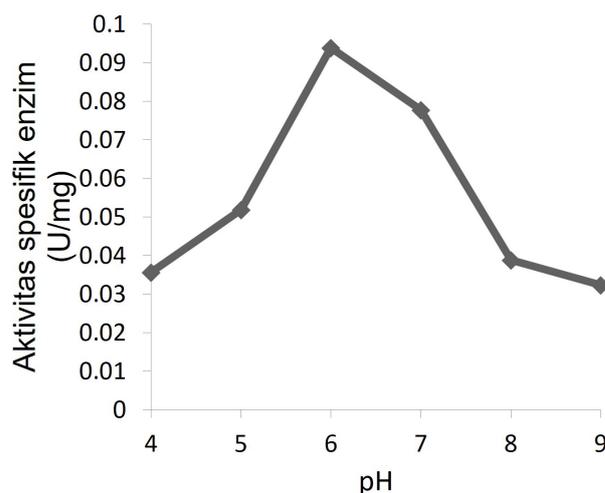
Semakin tinggi tingkat kejenuhan amonium sulfat, semakin tinggi nilai aktivitas spesifik enzim kitinase. Aktivitas spesifik kitinase pada kejenuhan ammonium sulfat 20, 40, 60, dan 80% secara berurutan adalah 0,054; 0,057; 0,068; dan 0,072 U/mg. Hal ini mengindikasikan bahwa sebagian besar enzim kitinase mangalami *salting out* pada kejenuhan ammonium sulfat 80%. Peningkatan



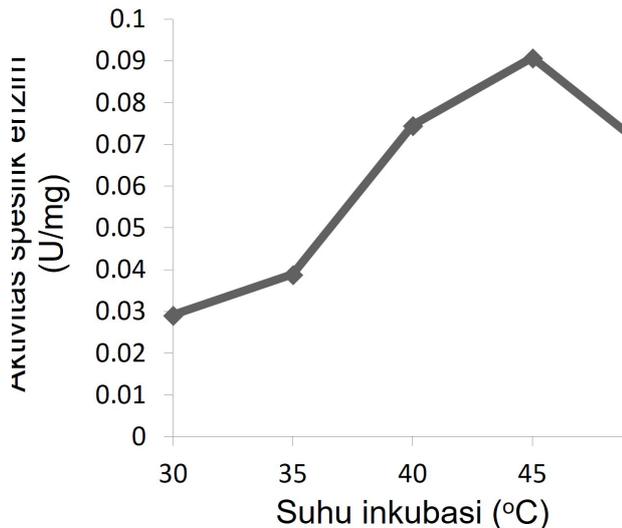
Gambar 3. Rendemen (%) kitinase kasar yang didapatkan pada tiap tahap purifikasi menggunakan metode presipitasi ammonium sulfat.

nilai aktivitas spesifik kitinase ini seiring dengan peningkatan rendemen enzim (Gambar 3). Dialisis dilakukan dengan menggunakan sampel fraksi protein 80% amonium sulfat. karena menghasilkan rendemen yang paling besar dibandingkan fraksi lain. Aktivitas spesifik kitinase pada dialisis (0,063 U/mg) mengalami sedikit penurunan dibandingkan dengan sampel sebelum dialisis (0,072 U/mg), namun total protein kedua sampel tidak jauh berbeda yaitu sebesar 0,101 mg/ml pada sampel sebelum dialisis dan 0,107 mg/ml pada sampel dialisis. Diduga keberadaan garam amonium sulfat maupun molekul-molekul non-protein lainnya dapat mengganggu sisi aktif enzim dalam mengikat substrat dan dapat mempengaruhi nilai aktivitas spesifiknya.

Enzim memiliki pH optimum yang khas yaitu pH yang menyebabkan aktivitas maksimum (Lehninger, 1997). Gambar 4 menunjukkan aktivitas kitinase yang meningkat hingga mencapai pH 6 dengan aktivitas kitinase spesifik sebesar 0,09 U/mg. Selanjutnya aktivitas menurun seiring meningkatnya pH. Hal ini sesuai dengan penelitian Park *et al.* (2000) yang menyatakan bahwa kitinase *Vibrio* sp. dapat bekerja optimum pada pH 6. Adanya penurunan aktivitas kitinase setelah pH optimum disebabkan adanya perubahan keadaan ion enzim dan keadaan ion substrat yang mengakibatkan terjadinya denaturasi enzim yang disertai hilangnya aktivitas katalitik enzim. Selain itu adanya perubahan struktur tersier enzim akibat denaturasi dapat



Gambar 4. Aktivitas spesifik kitinase kasar pada berbagai kondisi pH yang dihasilkan oleh isolat SDI23.



Gambar 5. Aktivitas spesifik kitinase kasar pada berbagai suhu yang dihasilkan oleh isolat SDI23.

menyebabkan kelompok asam amino hidrofobik dalam enzim kontak dengan air sehingga solubilitas enzim menjadi berkurang. Berkurangnya solubilitas kitinase dapat mengakibatkan turunnya aktivitas enzim secara bertahap (Harper *et al.*, 1984).

Pengaruh suhu terhadap aktivitas kitinase pada penelitian ini dapat dilihat pada Gambar 5. Aktivitas spesifik dari kitinase yang optimal ditunjukkan pada suhu 45°C, yaitu sebesar 0,09 U/mg. Kitinase pada isolat bakteri SDI23 ini dapat digolongkan ke dalam kitinase mesofilik yang mempunyai suhu optimum berkisar 25-45°C (Noviendri *et al.*, 2008). Hal ini sesuai dengan penelitian Park *et al.* (2000) yang menyatakan bahwa suhu optimum dari kitinase yang dimiliki *Vibrio* sp. yaitu 45°C. Aktivitas kitinase meningkat seiring dengan peningkatan suhu reaksi hingga suhu 45°C kemudian menurun pada suhu 50°C. Hal ini dimungkinkan karena meningkatnya energi kinetik akibat meningkatnya suhu reaksi yang mempercepat gerakan vibrasi, translasi dan rotasi antara molekul enzim dan substrat sehingga memperbesar frekuensi tumbukan yang merupakan peluang keduanya untuk bereaksi menyebabkan substrat koloid kitin yang dapat dihidrolisis menjadi monomer NAG lebih banyak. Penurunan aktivitas kitinase pada suhu 50°C dapat disebabkan oleh kerusakan kitinase akibat terputusnya ikatan sekunder enzim karena energi kinetik akibat suhu yang tinggi melampaui energi pada protein untuk mempertahankan bentuk sisi aktif (Harper *et al.*, 1984).

Kesimpulan

Penelitian ini menunjukkan bahwa metode presipitasi ammonium sulfat dapat digunakan untuk memurnikan secara parsial enzim pendegradasi kitin yang dihasilkan oleh isolat SDI23. Purifikasi parsial dengan amonium sulfat fraksi 80% dapat meningkatkan aktivitas spesifik kitinase dari 0,048 U/mg menjadi 0,072 U/mg, dan setelah didialisis menjadi 0,063 U/mg. Aktivitas spesifik kitinase kasar yang dihasilkan oleh isolat SDI23 optimum pada pH 6 dan suhu 45°C, dengan nilai 0,09 U/mg. Suhu optimal untuk aktivitas kitinase yang cukup tinggi dari isolat SDI23 ini diharapkan dapat dijadikan faktor pembatas untuk aktivitas enzim selain kitinase serta kemungkinan adanya kontaminasi bakteri dalam pengembangan metode depolimerasi kitin secara enzimatik.

Ucapan Terimakasih

Terimakasih kepada Fakultas Pertanian UGM yang telah mendanai penelitian ini dalam skema hibah penelitian fakultas.

Daftar Pustaka

- Arnold, L.D. & N.A. Solomon. 1986. Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology. American Society for Microbiology. Washington. 830 p.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 12:248-254
- Brzezinska, M.S. & W. Donderski. 2001. Occurrence of chitinolytic bacteria in water and bottom sediment of eutrophic lakes in Iławskie Lake District. *Polish J. of Environmental Studies*. 10(5):331-336
- Chang, S.C., J.T. Wang, P. Vandamme, J.H. Hwang, P.S. Chang, & W.M. Chen. 2004. *Chitinimonas taiwanensis* gen. nov., sp. nov., A novel chitinolytic bacterium isolated from a freshwater pond for shrimp culture. *Systematic & Applied Microbiology*. 27(1):43-49
- Chasanah, E., M. Ilmi, & W. Mangunwardoyo. 2009. Penapisan bakteri kitinolitik dari limbah pengolahan udang. *J. Pascapanen dan Bioteknologi Kelautan dan Perikanan*. 4(1):59-68

- Fukamizo, T. 2000. Chitinolytic enzyme: catalysis, substrate binding and their application. *Current Protein & Peptide Science*. 1(1):105-124
- Gooday, G.W. 1990. Physiology of microbial degradation of chitin and chitosan. *Biodegradation*. 1:177-190
- Harper, H.A., V.W. Rodwel, & P.A. Mayer. 1984. *Review of Physiological Chemistry*. Lange Medical Publication, California. 868 p.
- Lehninger, A.L. 1997. *Dasar-Dasar Biokimia*. (Alih bahasa: Suhartono, M.T). Erlangga, Jakarta.
- Nasran, S., F. Ariyani & N. Indriati. 2003. Produksi kitinase dan kitin deasetilase dari *Vibrio harveyi*. *J. Penelitian Perikanan Indonesia*. 9:33-38
- Noviendri, D., Y.N. Fawzya. & E. Chasanah. 2008. Karakterisasi dan sifat kinetika enzim kitinase dari isolat bakteri T5a1 asal terasi. *J. Pascapanen dan Bioteknologi Kelautan dan Perikanan*. 3(2):123-129
- Park, S.H., J. Lee & H.K. Lee. 2000. Purification and characterization of chitinase from a marine bacterium, *Vibrio* sp. 98CJ11027. *The J. of Microbiology*. 38(4):224-229
- Patil, R.S., V. Ghormade, & M.V. Deshpande. 2000. Chitinolytic Enzymes: An Exploration. *Enzyme and Microbial Technology*. 26(7):473-483
- Prashanth, K.V.H. & R.N. Tharanathan. 2007. Chitin/chitosan: modifications and their unlimited application potential—an overview. *Trends in Food Science and Technology*. 18:117-131
- Purwani, E.Y., A. Toharisman, E. Chasanah, J.F. Laksmi, V. Welan, M.T. Suhartono, T. Purwadaria, J.K. Hwang & Y.R. Pyun. 2002. Studi pendahuluan enzim kitinase ekstraseluler yang dihasilkan oleh isolat bakteri asal Manado. *J. Teknologi dan Industri Pangan*. 8(2):111-117
- Reissig J.L., J.L. Strominger, & F.A. Leloir. 1955. A modified colorimetric method for the estimation of N-acetylamino sugars. *J. of Biological Chemistry*. 217:959-966
- Sakai, K., A. Yokota, H. Kurokawa, M. Wakayama & M. Moriguchi. 1998. Purification and characterization of three thermostable endochitinases of a noble *Bacillus* strain, MH-1, isolated from chitin-containing compost. *Applied and Environmental Microbiology*. 64(9):3397-3402.
- Tsigos, I., A. Martinou, D. Kafetzopoulos & V. Bouriotis. 2000. Chitin deacetylases: New, versatile tools in biotechnology. *Trends in Biotechnology*. 18(7):305-312
- Vogan, C.L., C.C. Ramos & A.F. Rowley. 2002. Shell disease syndrome in the edible crab, *Cancer pagurus*—isolation, characterization and pathogenicity of chitinolytic bacteria. *Microbiology*. 148(3):743-754
- Wang, S.L., T.W. Liang & Y.H. Yen. 2011. Bioconversion of chitin-containing wastes for the production of enzymes and bioactive material. *Carbohydrate Polymers*. 84(2):732-742