

BIOMA

B. 8

JURNAL ILMIAH BIOLOGI MAKASSAR

VOL. 4. NO. 1. APRIL 2009

MONITORING OF PLANKTONIC LARVAE OF GREEN MUSSEL, *PERNA VIRIDIS* (LINNE), IN MARUNDA BAY, JAKARTA GULF, INDONESIA

Eddy Soekendarsi 1-3

BIOSORPSI ION CD(II) DAN CU(II) OLEH AMPAS SAGU Uji EFEKTIVITAS EKSTRAK DAUN PARE (*Momordica charantia* L.) dan MIMBA (*Azadirachta indica* A. Juss) TERHADAP MORTALITAS LARVA NYAMUK *Aedes aegypti* L.

Eva Johannes, Syahribulan, Isra Wahid, I., Mindjah Waty 4-10

BIOSORPSI ION CD(II) DAN CU(II) OLEH AMPAS SAGU

Paulina Taba, Nursiah La Nafie, St. Fauziah, Damaris Pabiban dan Liveria Tikupadang 11-22

PENGGUNAAN SKIM MILK SEBAGAI LARUTAN PEMBLOK ALTERNATIF BSA DALAM PENENTUAN TITER ANTIBODI IgM TERHADAP ANTIGEN PGL-1 *Mycobacterium leprae* DENGAN METODE ELISA

Helmy Widyastuti 23-31

BIOSORPSI ION LOGAM Ni(II) DAN Co(II) DENGAN MENGGUNAKAN BIOMASSA RHIZOMA LAMUN *Thalassia hemprichii* YANG TERDAPAT DI PULAU BARRANG LOMPO

Nursiah La Nafie, Paulina Taba, Asmanidar Quraisy, Deasy Natalia 32-43

PEMBELAJARAN MATAKULIAH GENETIKA LANJUTAN BERBASIS MULTIMEDIA DENGAN METODE SISTEM BLOK

Syafaraenan 44-50

ISOLASI DAN KARAKTERISASI ENZIM KITINASE DARI BAKTERI TERMOFIL ISOLAT ST-3,2b

Hasnah Natsir, Seniwati Dali, Astin dan Trisnanova 51-58



JURUSAN BIOLOGI

FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM

UNIVERSITAS HASANUDDIN

MAKASSAR

JURNAL ILMIAH BIOLOGI MAKASSAR
JURUSAN BIOLOGI, FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS HASANUDDIN

- Pelindung / Penasehat : Dekan Fmipa – Unhas
Ketua Jurusan Biologi – Fmipa – Unhas
- Ketua Redaksi : Willem Moka
- Anggota Redaksi : Muh. Ruslan Umar
Ambeng
Zaraswaty Dwiyana
Rosana Agus
Hj. Sri Suhadyah
- Bendahara : A. Masniawati
- Editor : Eddy Soekendarsih
Hj. Dirayah R. Husain
Magdalena Litaay
Munif S. Hassan
Syafaraenan
Elis Tambaru
- Distributor : Syahribulan
Eddyman W. Ferial
Himpunan Mahasiswa Biologi – Fmipa – Unhas

No. SK : 0004.709 / JL.3.02 / SK.ISSN / 2008
ISSN : 1907 - 7033

Alamat Redaksi

Jurusan Biologi
Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Jl. Perintis Kemerdekaan Km. 10. Tamalanrea, Makassar, 90245
Telpon / Fax : 0411 585 466; E-mail : bioluh@yahoo.com
Universitas Hasanuddin

ISOLASI DAN KARAKTERISASI ENZIM KITINASE DARI BAKTERI TERMOFIL ISOLAT ST-3,2b

Hasnah Natsir, Seniwati Dali, Astin dan Trisnana
Laboratorium Biokimia Jurusan Kimia Fakultas MIPA – UNHAS.

ABSTRAK

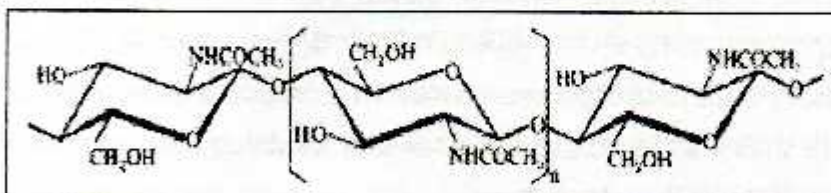
Kitinase merupakan enzim ekstraseluler yang dapat menghidrolisis kitin menjadi tetra-, tri- dan di-oligomer kitin. Penelitian ini bertujuan mengisolasi dan mengkarakterisasi sifat biokimia kitinase dari bakteri termofil isolat ST-3,2b dengan menggunakan koloidal kitin sebagai substrat. Isolasi kitinase dilakukan mulai dari peremajaan isolat, penyiapan inokulum, dan produksi enzim. Selanjutnya karakterisasi sifat biokimia kitinase dilakukan dengan penentuan suhu, pH dan konsentrasi substrat optimum, serta penentuan senyawa kofaktor yang dapat bersifat aktivator atau inhibitor terhadap aktivitas kitinase. Hasil penelitian menunjukkan bahwa aktivitas kitinase isolat ST-3,2b memiliki aktivitas optimum pada jam ke 40 dari waktu fermentasi dengan nilai aktivitas kitinase sebesar 0,2250 Unit/mL dengan kadar protein 0,1021 mg/mL serta aktivitas spesifik 2.2037 U/mg protein. Kitinase isolat ST-3,2b ini bekerja optimum pada pH 7,0 suhu 60°C, konsentrasi substrat adalah 0,3 % dengan diaktifkan oleh ion logam Mg^{2+} , Ca^{2+} dan Mn^{2+} serta dihambat oleh ion logam Co^{2+} , Fe^{2+} dan Zn^{2+} .

Kata kunci: bakteri termofil; kitinase; koloidal kitin

PENDAHULUAN

Indonesia adalah negara yang sangat kaya dengan plasma nutfah termasuk mikroorganisme yang hidup di dalamnya sehingga mampu menyediakan isolat-isolat mikroba yang memiliki nilai ekonomis yang tinggi. Pencarian (skrining) isolat-isolat mikroba secara umum bertujuan mencari mikroba penghasil metabolit yang dapat bermanfaat bagi manusia misalnya antibiotik, enzim, dan senyawa antitumor atau substansi bioaktif lainnya (Natsir, dkk. 1999).

Kitinase (E.C.3.2.1.14) adalah enzim yang mampu menghidrolisis polimer kitin menjadi oligomer kitin (tri-, di- atau monomer). Kitin merupakan polimer linier karbohidrat yang tersusun dari monomer N-asetil-glukosamin dengan ikatan 1,4- β -glikosidik (Gambar 1). Kitinase ekstraseluler ini umumnya dihasilkan oleh cendawan dan bakteri yang menggunakan kitin sebagai sumber karbon dan nitrogen (Tsujiyo, dkk., 1992 ; Itoi, dkk., 2007).



Gambar 1. Struktur Kitin (Dalwoo, 2002)

Kitinase saat ini banyak dieksplorasi karena kebutuhan enzim kitinase dalam bidang kesehatan dan pertanian sangat dibutuhkan. Kitinase mampu memproduksi

Stok kultur bakteri isolat ST-3,2b dikultur kembali beberapa kali dalam medium LA + koloidal kitin 1,0 % hingga diperoleh isolat murni. Selanjutnya dilakukan penyiapan inokulum pada medium sintetik minimal (MSM) atau medium produksi enzim dengan

Peremajaan Isolat dan Penyiapan Inokulum

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah biakan bakteri termofil isolat ST-3,2b, koloidal kitin sebagai substrat, bahan medium (amonium sulfat, yeast ekstrak, bacto tripton, NaCl, K_2HPO_4 , $MgSO_4 \cdot 7H_2O$), Bovine Albumin Serum (BSA) sebagai standar protein. Alat yang digunakan antara lain: neraca analitis, inkubator oven, autoclave, waterbath, shaker inkubator, spektrofotometer, sentrifuge dan lain-lain.

Bahan dan Alat Penelitian

METODE PENELITIAN

Gambar 2. Isolat ST-3,2b dalam medium LA pH 7,0 + Koloidal Kitin 2,0% dengan suhu inkubasi 60 °C.



Penelitian tentang isolasi mikroba penghasil kitinase berhasil dilakukan antara lain (Natsir, dkk, 2002), dan kitinase dari bakteri termofil diisolasi dari sumber air panas (Natsir, dkk, 2002), dan kitinase dari bakteri termofil diisolasi dari sumber air panas Sulawesi Utara (Yuli, dkk, 2004). Beberapa isolat yang telah diisolasi dari sumber air panas Sulawesi Selatan seperti isolat SA-3,1a dan isolat ST-3,2b (Gambar 1) memiliki aktivitas kitinolitik, namun belum diketahui karakteristik sifat biokimianya. Oleh karena itu, dalam penelitian ini dilakukan isolasi dan karakterisasi enzim kitinase khusus isolat ST-3,2b yang meliputi penentuan aktivitas kitinase pada pH dan suhu optimum, konsentrasi substrat, waktu inkubasi dan penentuan ion logam yang dapat berfungsi sebagai aktivator atau inhibitor terhadap aktivitas kitinase.

Penelitian tentang isolasi mikroba penghasil kitinase berhasil dilakukan antara lain cendawan (Patil, dkk, 2000; Santoso dkk, 2000). Selain itu, kitinase juga dapat digunakan untuk mencegah penyakit busuk buah atau busuk batang pada tanaman akibat aktivitas senyawa anti tumor (Patil, dkk, 2000). Selain itu, kitinase juga dapat digunakan untuk senyawa kito-oligomer kitin (kito-heksosa dan kito-heptosa) yang dapat berfungsi sebagai

komposisi : amonium sulfat 0,7 %, yeast ekstrak 0.05 %, bacto tripton 0,1 %, NaCl 0,1 %, K_2HPO_4 0,1 %, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,01 % dan koloidal kitin 0,5 %.

Isolasi dan Produksi Enzim Kitinase

Produksi kitinase dilakukan dalam erlenmeyer 500 mL yang berisi 250 mL medium produksi dimasukkan 25 mL spora biakan bakteri isolat ST-3,2b (inokulum aktif), kemudian dishaker pada suhu $60^\circ C$ selama 3 hari dengan kecepatan aerasi 190 rpm. Dari hasil optimasi ini diperoleh kondisi optimum produksi kitinase yaitu: komposisi medium dan waktu inkubasi optimum sehingga diperoleh kitinase dengan aktivitas tertinggi untuk dilanjutkan pada tahap berikutnya. Uji aktivitas kitinase dengan metode Ueda dan Arai (1992) dan Natsir, *dkk.*(2002) serta analisis kadar protein dilakukan secara Lowry (1951).

Uji Aktivitas Kitinase (Ueda dan arai, 1992 dan Natsir, *dkk.*, 2002)

Campuran 2 mL buffer fosfat pH 7 dengan 1 mL larutan enzim (sampel) dan 1 mL koloidal kitin 0,3 % sebagai substrat, kemudian diinkubasi pada suhu $60^\circ C$ selama 60 menit. Sisa kitin dalam campuran reaksi diukur turbiditasnya pada panjang gelombang 660 nm. Satu unit aktivitas enzim didefinisikan sebagai jumlah enzim kitinase yang menyebabkan penurunan absorbansi pada panjang gelombang 660 nm per menit per mL enzim.

Pengujian Kadar Protein (Lowry, *dkk.* 1951)

Pengujian ini menggunakan Metode Lowry, dengan komposisi Lowry B adalah Na_2CO_3 2% dalam NaOH 0,1 N : $CuSO_4$ 1% : Natrium-kalium-tartrat (100 : 1 : 1) dan Lowry A adalah larutan asam phospho-tungstic-phospho-molybdic (folin) : aquades (1 : 1). Kadar protein diukur dengan menggunakan BSA (Bovine serum Albumin) sebagai standar dan diukur dengan menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang maksimum.

Karakterisasi Enzim Kitinase (Natsir, *dkk.*, 2002 dan Itoi, *dkk.*, 2007).

Produksi kitinase dilakukan pada kondisi optimum, kemudian dilakukan pemisahan sel dari medium dengan cara sentrifugasi pada kecepatan 3500 rpm, 30 menit, $4^\circ C$. Supernatan yang mengandung ekstrak kasar enzim kitinase dikarakterisasi dengan cara : campuran [Enzim : Substrat : Buffer] diinkubasi pada berbagai variasi kondisi, seperti : suhu , pH, waktu inkubasi, dan konsentrasi substrat, serta pengaruh ion logam terhadap aktivitas kitinase. Untuk mengetahui jenis logam yang berperan sebagai aktivator atau inhibitor, maka campuran enzim, substrat, dan bufernya ditambahkan berbagai jenis logam seperti: $MgCl_2$; $CaCl_2$; $MnCl_2$; $CoCl_2$; $NiCl_2$; $ZnCl_2$ dan $CuCl_2$ serta EDTA pada konsentrasi 1.0 mM dan 5.0 mM, kemudian diinkubasi selama 60 menit seperti pada penentuan suhu dan pH optimum. Selanjutnya dilakukan pengukuran absorbansi pada

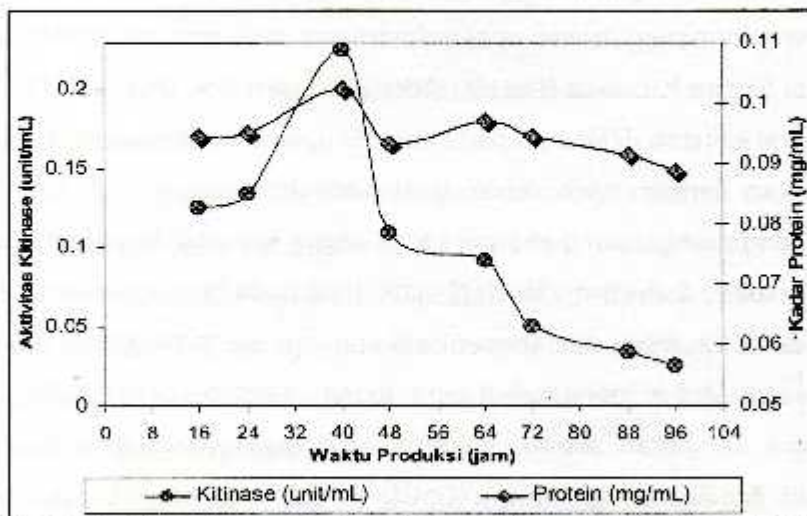
spektrofometer dengan panjang gelombang 660 nm dan perhitungan aktivitas enzim kitinase.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil isolasi kitinase dari isolat *ST-3,2b* diperoleh data yang menunjukkan bahwa pertumbuhan bakteri terus meningkat hingga pada jam ke 40 dan stabil hingga pada jam ke 48 selanjutnya mengalami penurunan, hal ini berarti terjadi fase kematian, yang kemungkinan disebabkan oleh habisnya nutrisi dalam medium sehingga sel lisis atau mati. Sedangkan data aktivitas kitinase dan kadar protein dari isolat *ST-3,2b* memiliki nilai tertinggi setelah waktu produksi 40 jam, dengan nilai aktivitas 0,2250 Unit/mL dan kadar protein 0,1021 mg/mL seperti terlihat pada Tabel 1 dan Gambar 3. Hal ini dapat terjadi karena kerapatan sel semakin padat dan ketersediaan nutrisi dalam mediumnya semakin berkurang sehingga enzim kitinase disekresikan keluar sel dalam jumlah yang banyak untuk mendegradasi substrat (kitin) pada dinding sel mikroba.

Tabel 1. Data Kadar Protein dan Aktivitas Kitinase dari isolat *ST-3,2b* pada berbagai waktu produksi.

No.	Waktu Produksi (jam)	Kadar Protein (mg/mL)	Aktivitas Kitinase (unit/mL)
1	16	0.0944	0.1250
2	24	0.0949	0.1334
3	40	0.1021	0.2250
4	48	0.0931	0.1084
5	64	0.0969	0.0917
6	72	0.0944	0.0500
7	88	0.0915	0.0334
8	96	0.0887	0.0250



Gambar 3. Grafik kadar protein dan aktivitas kitinase dari isolat *ST-3,2b* pada berbagai waktu produksi.

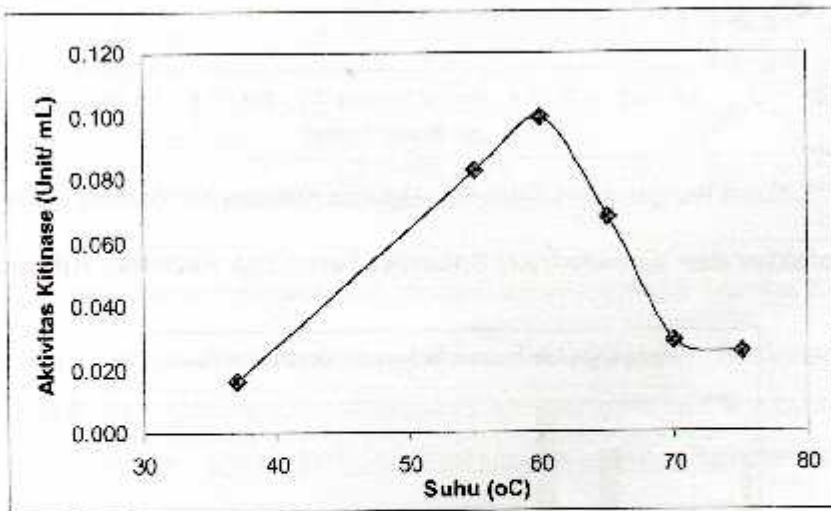
Kitinase dari isolat ST-3,2b yang telah diisolasi pada kondisi optimum, dalam hal ini enzim ekstrak kasar (*crude enzyme*) dilakukan berbagai uji untuk mengetahui sifat biokimianya.

Suhu dan pH Optimum

Aktivitas enzim akan meningkat seiring meningkatnya suhu sampai tingkat optimal, kemudian aktivitas enzim akan menurun karena mengalami denaturasi sehingga kehilangan aktivitasnya. Aktivitas kitinase dari isolat ST-3,2b meningkat mulai suhu 37 °C hingga 60 °C dan selanjutnya pada suhu 65 °C terjadi penurunan aktivitas data tersebut terlihat pada Tabel 2 dan grafik pada Gambar 4.

Tabel 2. Aktivitas Kitinase dari isolat ST-3,2b pada berbagai suhu inkubasi

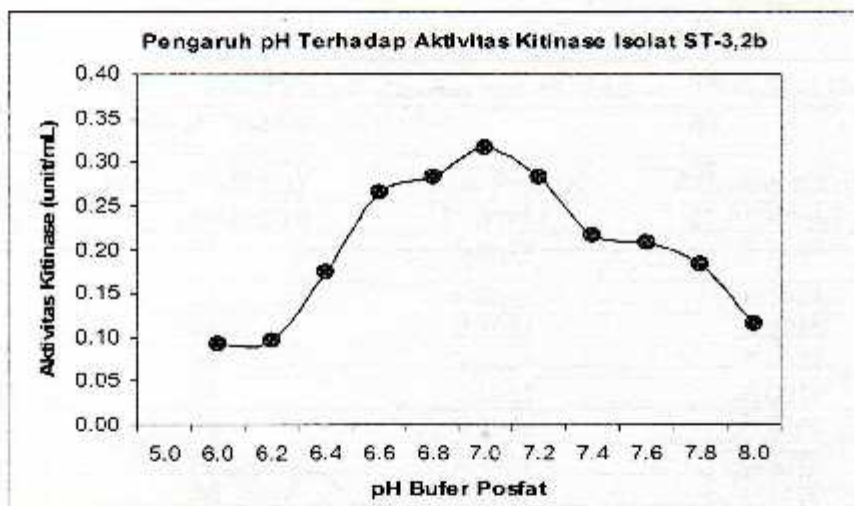
No	Suhu Inkubasi (°C)	Aktivitas Kitinase ST-3,2b (Unit/ ml)
1	37	0.0167
2	55	0.0830
3	60	0.1000
4	65	0.0670
5	70	0.0292
6	75	0.0250



Gambar 4. Kurva Pengaruh Suhu terhadap Aktivitas Kitinase dari bakteri isolat ST-3,2b

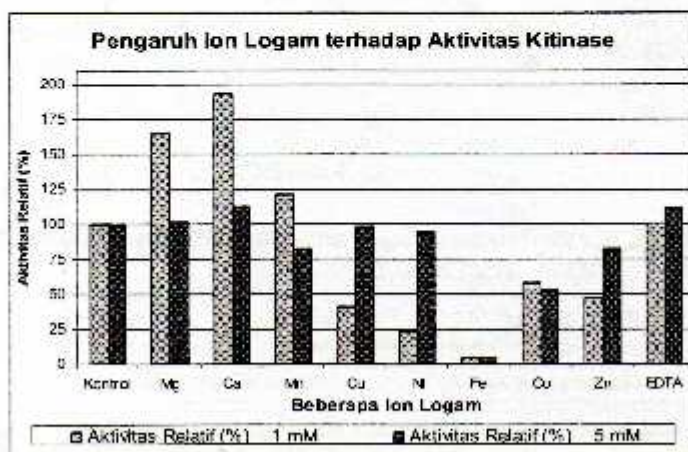
Tabel 3. Pengaruh pH terhadap aktivitas kitinase isolat ST-3,2b

No	pH	Aktivitas Kitinase ST-3,2b (Unit/ mL)
1	6,0	0.092
2	6,2	0.096
3	6,4	0.175
4	6,6	0.266
5	6,8	0.283
6	7,0	0.316
7	7,2	0.283
8	7,4	0.216
9	7,6	0.208
10	7,8	0.183
11	8,0	0.116



Gambar 5. Kurva Pengaruh pH Terhadap Aktivitas Kitinase dari bakteri isolat ST-3,2b

Pengaruh Kofaktor dan Konsentrasi Substrat Terhadap Aktivitas Kitinase

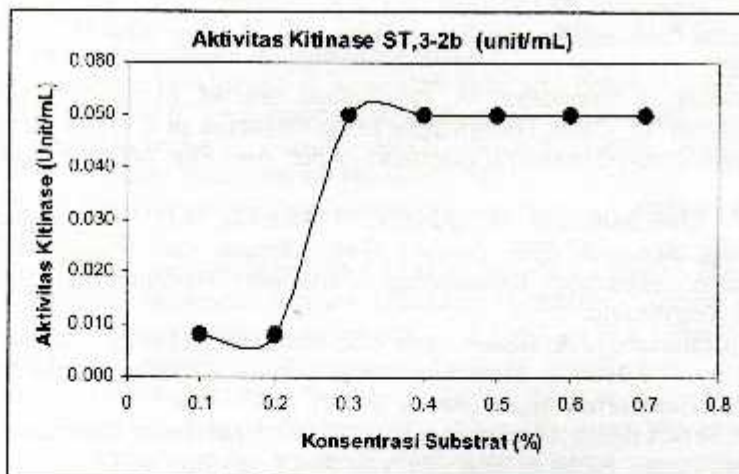


Gambar 6. Grafik Pengaruh Ion Logam Terhadap Aktivitas Kitinase

Banyak enzim dalam melaksanakan katalitiknya membutuhkan senyawa lain yang bukan protein. Ion logam diperlukan sebagai aktivator untuk meningkatkan aktivitas pada enzim tertentu dan ion logam dapat pula sebagai penghambat (inhibitor) pada konsentrasi yang berbeda. Ion logam diperlukan oleh enzim sebagai komponen pada sisi aktifnya. Dalam penelitian ini, kitinase dalam reaksinya dengan substrat ditambahkan ion logam pada konsentrasi 1 Mm dan 5 Mm. Hasil pengujian tersebut aktivitas kitinase dari isolat ST-3,2b terlihat pada Gambar 6.

Tabel 4. Aktivitas Kitinase pada Berbagai Konsentrasi Substrat

No	Konsentrasi Substrat (%)	Aktivitas Kitinase ST-3,2b (Unit/ ml)
1	0.1	0.0080
2	0.2	0.0080
3	0.3	0.0500
4	0.4	0.0500
5	0.5	0.0500
6	0.6	0.0500
7	0.7	0.0500



Gambar 7. Kurva Pengaruh Konsentrasi Substrat Terhadap Aktivitas Kitinase

Karakterisasi kitinase bakteri termofil isolat ST-3,2b berdasarkan variasi konsentrasi substrat bertujuan untuk mengetahui kondisi optimum konsentrasi substrat yang dapat bereaksi dengan enzim. Data hasil pengujian aktivitas kitinase pada berbagai konsentrasi substrat terlihat pada Tabel 4 dan Gambar 7.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian diperoleh kesimpulan bahwa, kitinase dari bakteri termofil isolat ST-3,2b memiliki waktu produksi optimum pada jam ke 40 dengan nilai aktivitas sebesar 0,2250 Unit/mL dengan kadar protein 0,1021 mg/ mL serta aktivitas

spesifik 2.2037 U/mg protein. Kitinase isolat ST-3,2b ini bekerja optimum pada pH 7,0 suhu 60°C, konsentrasi substrat adalah 0,3 % dengan diaktifkan oleh ion logam Mg^{2+} , Ca^{2+} dan Mn^{2+} 1.0 mM serta dihambat oleh ion logam Co^{2+} , Fe^{2+} dan Zn^{2+} pada konsentrasi 1.0 mM.

DAFTAR PUSTAKA

- Dalwoo, (2002), *Structure of Chitin/Chitosan and Cellulose*, (Online), (<http://www.dalwoo.com/chitosan/index.htm>, diakses 20 Februari 2006).
- Itoi, S., Y. Kanomata, Y. Koyama, K. Kadokura., S. Uchida, T. Nishio, and H. Sugito, (2007), Identification of a Novel Endochitinase from a Marine Bacterium *Vibrio proteolyticus* strain no 442. *Jour. Biochemica et Biophysica Acta*. 1774 : 1099 – 1107.
- Natsir, H., D.Tjandra, M.T. Suhartono, J.K. Hwang, dan Y.R. Pyun, (1999), Eksplorasi Mikroba Asidofilik Penghasil Enzim Kitinase Asal Kawah Kamojang Jawa Barat. *Prosiding II. Seminar Hasil-hasil Penelitian Bidang Ilmu Hayat*. Pusat Antar Universitas Ilmu Hayat. Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Natsir, H., D.Chandra, Y.Rukayadi, M.T. Suhartono, J.K. Hwang, and Y.R.Pyun, (2002), Biochemical Characteristics of Chitinase Enzyme from *Bacillus* sp. Of Kamojang Craater, Indonesia. *Journal Of Biochem., Molecular Biology and Biophysics*.
- Ogawa,K., N. Yoshida, K. Kariya, C. Ohnishi, and R. Ikeda, (2002), Purification and Characterization of a Novel Chitinase from *Burkholderia cepacia* strain KH2 isolated from the bed log of *Lentinus edodes*, Shitake mushroom. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 48 : 25 – 33
- Patil, S.R, V. Ghormade, and M.V.Deshpande, (2000), Cytinolytic Enzymes: an Exploration. *Enzyme and Microbial. Technology* 26: 473 – 483
- Rahayu, S. F. Tanuwijaya, M.T. Suhartono, J.K. Hwang, dan Y.R. Pyun, (2004), Study of Thermostable Chitinase Enzymes from Indonesia *Bacillus* K29-14. *J. Microbiol. And Biotech.* 4 : 647 – 652.
- Sakai, K, A. Yokota, H. Kurokawa, M. Wakayama, and M. Moriguchi, (1998), Purification and Characterization of Three Thermostable Endochitinases of a Noble *Bacillus* sp. Strain, MH-1 Isolated from Chitin-Containing Compost. *Appl. And Env. Microbiology* Vol. 64 (9): 3397 – 3402.
- Santoso, Dj., T. Chaidasmasari, A. Budiani, H.Minarsih, S.D. Utomo, dan Siswanto, (2000), Rekombinasi Konstruksi EPE dengan Gen Kitinase dan Pengaruhnya terhadap Bakteri Pembawanya. *Prosiding Bioteknologi Pertanian*. Perhimpunan Bioteknologi Pertanian Indonesia. Yogyakarta.
- Svitil, A.L, S.M.Chadhain, J.A. Moore, and D.I. Kirchman, (1997), Chitin Degradation Protein Produced by The Marine Bacterium *Vibrio harveyi* Growing on Different Forms of Chitin. *Appl. and Environmental Micro-biology* 63 (2): 408 – 413.
- Ueda, M. and M. Arai. (1992), Purification and Some Properties of Chitinases from *Aeromonas* sp. No.10S-24. *Biosci. Biotech. Biochem.* Vol. 56 (3). p: 460 - 463.
- Wang, S.L., and W.T.Chang, (1997), Purification and Characterization of Two Bifungsional Chitinases/Lysozymes Extracellularly Produced by *Pseudomonas aeruginosa* K-187 in a Shrimp and Crab Shell Powder Medium. *Appl. and Environmental Microbiology*, Vol. 63 (2): 380.
- Yuli, E. Purwani, M.T. Suhartono, Y.Rukayadi, J.K. Hwang, and Y.R.Pyun, (2004), Characteristic of Thermostable Chitinase Enzymes from the *Bacillus* sp. *Enzyme and Microbial Technology* : 13- 26.