

**ISOLASI DAN PURIFIKASI ENZIM KITINASE DARI ISOLAT BAKTERI
TANAH LIMBAH INDUSTRI PETIS UDANG DENGAN METODE
AFINITAS KITIN**

SKRIPSI

Oleh :

TIUS ENGGARSARI SUSANTO

NIM 105100501111002



JURUSAN TEKNOLOGI HASIL PERTANIAN

FAKULTAS TEKNOLOGI PERTANIAN

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

MALANG

2014

**Isolasi dan Purifikasi Enzim Kitinase dari Isolat Bakteri Tanah Limbah
Industri Petis Udang dengan Metode Afinitas Kitin**

Oleh :

TIUS ENGGARSARI SUSANTO

NIM 105100501111002

Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh
gelar Sarjana Teknologi Pertanian



JURUSAN TEKNOLOGI HASIL PERTANIAN

FAKULTAS TEKNOLOGI PERTANIAN

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

MALANG

2014

LEMBAR PERSETUJUAN

Judul Skripsi : Isolasi dan Purifikasi Enzim Kitinase dari Isolat Bakteri Tanah Limbah Industri Petis Udang dengan Metode Afinitas Kitin

Nama Mahasiswa : Tius Enggarsari Susanto

NIM : 105100501111002

Jurusan : Teknologi Hasil Pertanian

Fakultas : Teknologi Pertanian

Dosen Pembimbing,

Dr. Ir. Aji Sutrisno, M.Sc

NIP. 19680223 199303 1 002

Tanggal Persetujuan :

LEMBAR PENGESAHAN

Judul Skripsi : Isolasi dan Purifikasi Enzim Kitinase dari Isolat Bakteri Tanah Limbah Industri Petis Udang dengan Metode Afinitas Kitin

Nama Mahasiswa : Tius Enggarsari Susanto

NIM : 105100501111002

Jurusan : Teknologi Hasil Pertanian

Fakultas : Teknologi Pertanian

Dosen Penguji I,

Dosen Penguji I,

Dr. Ir. Joni Kusnadi, M.Si
NIP. 19620612 198703 1 031

Dr. Widya Dwi Rukmi P., STP, MP
NIP. 19700504 199903 2 002

Dosen Penguji III,

Dr. Ir. Aji Sutrisno, M.Sc
NIP. 19680223 199303 1 002

Ketua Jurusan,

Agustin Krisna Wardani, STP., MSi., PhD
NIP. 19690807 199702 2 001

Tanggal Pengesahan:

RIWAYAT HIDUP

Penulis merupakan putri pertama dari pasangan Agus Hari Susanto dan Suprpti Rahayu. Lahir diLumajang pada tanggal 21 Juni 1992.

Penulis menyelesaikan pendidikan Sekolah Dasar di SD Kristen Petra Tulungagung dan lulus pada tahun 2004. Penulis melanjutkan pendidikan ke Sekolah Menengah Tingkat Pertama di SMP Negeri 6 Ponorogo dan lulus pada tahun 2007. Kemudian melanjutkan ke Sekolah Menengah Umum di SMA Katolik Untung Suropati Sidoarjo dan lulus pada tahun 2010. Pada tahun tersebut, penulis melanjutkan pendidikan di Jurusan Teknologi Hasil Pertanian, Fakultas Teknologi pertanian Universitas Brawijaya. Akhirnya penulis dapat menyelesaikan pendidikan S1 pada tahun 2014.

Selama perkuliahan, penulis aktif dalam kegiatan organisasi dan kepanitiaan dalam kampus yaitu sebagai koordinator komisi 2 PMK Efrata, Ketua LKM PMK Efrata, anggota bidang III UKM ARSC dan anggota UKM *English for Specific Purpose* (ESP). Penulis pernah menjadi asisten praktikum Biologi di Fakultas Biologi pada tahun 2011 dan asisten praktikum Mikrobiologi Pangan pada tahun 2012 di Fakultas Teknologi Pertanian.

LEMBAR PERUNTUKAN

Engkau tak perlu disinari matahari di waktu siang, dan tak perlu diterangi bulan di waktu malam. Sebab Aku TUHAN akan menjadi penerang abadi bagimu, Aku menyinari engkau dengan keagungan-Ku.



“Kita tahu sekarang, bahwa Allah turut bekerja dalam segala sesuatu untuk mendatangkan kebaikan bagi mereka yang mengasihinya Dia, yaitu bagi mereka yang terpanggil sesuai dengan rencana Allah.”

Roma 8:28

Terimakasih kepada Tuhan Yesus Kristus yang telah senantiasa menyertai dan memberiku kemampuan serta hikmat hingga aku dapat menyelesaikan tugas akhir ini. Karya kecil ini kupersembahkan untuk kedua orang tuaku tercinta, adik-adikku, orang yang kucintai, dan teman-temanku.

PERNYATAAN KEASLIAN SKRIPSI

Nama Mahasiswa : Tius Enggarsari Susanto
NIM : 105100501111002
Jurusan : Teknologi Hasil Pertanian
Fakultas : Teknologi Pertanian
Judul Skripsi : Isolasi dan Purifikasi Enzim Kitinase dari Isolat Bakteri Tanah Limbah Industri Petis Udang dengan Metode Afinitas Kitin

Menyatakan bahwa,
Skripsi dengan judul di atas merupakan karya asli penulis tersebut di atas.
Apabila di kemudian hari terbukti pernyataan ini tidak benar, saya bersedia dituntut sesuai dengan hukum yang berlaku.

Malang, Juli 2014
Pembuat Pernyataan,

Tius Enggarsari Susanto
NIM 105100501111002

Tius Enggarsari Susanto. 105100501111002. **Isolasi dan Purifikasi Enzim Kitinase dari Isolat Bakteri Tanah Limbah Industri Petis Udang dengan Metode Afinitas Kitin**

Pembimbing : Dr.Ir. Aji Sutrisno, M.Sc

RINGKASAN

Indonesia merupakan negara kepulauan dengan sebagian besar wilayahnya berupa perairan. Industri berbasis perairan di Indonesia telah banyak berkembang salah satunya adalah pengolahan udang. Menurut kementerian kelautan dan perikanan (2013), total produksi udang pada tahun 2012 mencapai 415.703 ton. Limbah pengolahan udang yang terdiri dari kulit, ekor dan kepala udang mencapai sekitar 30% dari satu ekor udang. Limbah udang memiliki potensi yang besar untuk diolah menjadi produk kitin. Kitin merupakan polisakarida yang tersusun atas β -1,4-N-asetil-D-glukosamin (GlcNac). Pada umumnya kitin berikatan dengan protein dan mineral. Kitin memiliki struktur yang rigid dan tidak dapat larut dalam air sehingga kitin menjadi sumber pencemaran senyawa organik.

Berdasarkan permasalahan di atas, dilakukan isolasi dan skrining mikroba kitinolitik dari tanah limbah industri petis udang di Sidoarjo, Jawa Timur. Mikroba kitinolitik yang diperoleh mampu menghasilkan enzim kitinase yang mampu mendegradasi kitin sehingga dapat mengurangi tingkat pencemaran senyawa organik. Selanjutnya enzim kitinase yang diperoleh dilakukan karakterisasi. Penelitian ini menggunakan metode deskriptif. Hasil penelitian dipaparkan berdasarkan tahapan penelitian yang dilakukan.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa terdapat tiga isolat mikroba yang ditunjukkan dengan adanya zona bening di sekitar koloni mikroba. Indeks kitinolitik tertinggi ditunjukkan oleh isolat TP02 sebesar 2,22. Aktivitas spesifik ekstrak enzim kasar sebesar 0,008 Unit/mg dan enzim murni sebesar 0,052 Unit/mg. Kadar protein ekstrak enzim kasar 3,636 mg/ml dan enzim murni sebesar 1,127 mg/ml. Tingkat kemurnian enzim kitinase murni mencapai 6,548 kali. Berat molekul enzim kitinase dari isolat TP02 dengan menggunakan SDS-PAGE sekitar 68,257 kDa. Enzim kitinase isolat TP02 memiliki pH optimum 7, suhu optimum 35°C, kestabilan pH 5-7 dan kestabilan suhu 30-45°C. Enzim kitinase isolat TP02 spesifik terhadap substrat kitin. Produk hidrolisis substrat dideteksi dengan metode kromatografi lapis tipis. Hasil hidrolisis berupa N-asetil-D-glukosamin (GlcNac) dan GlcNac_n.

Kata kunci : kitinase, limbah udang, mikroba kitinolitik, tanah limbah industri petis udang

Tius Enggarsari Susanto. 105100501111002. **Isolation and Purification of Chitinase Enzyme from Bacteria Isolate of Shrimp Paste Waste Soil Industry with Chitin Affinity Method**

Supervisor: Dr. Ir Aji Sutrisno, M.Sc

SUMMARY

Indonesia is an archipelago with the most of its territory is in the form of sea. Industrial based of sea in Indonesia has been evolved, one of them is the shrimps processing. According to the ministry of maritime affairs and fisheries (2013), total of shrimps production in 2012 reached 415.703 tonnes. Shrimp processing wastes, consisting of skin, tail and head of the shrimp reach about 30% of a shrimp. Shrimp wastes has great potential to be processed into product of chitin. Chitin is the polysaccharide composed by β -1,4-N-acetyl-D-glucosamine (GlcNAc). In general, chitin is binding with protein and mineral. Chitin has a rigid structure and it cannot soluble in water therefore that chitin becomes the source contamination of organic compounds.

Based on that problem, it needs to do the isolation and screening of chitinolytic microbe from shrimp paste waste soil industry in Sidoarjo , East Java. Chitinolytic microbes that is obtained able to produce chitinase enzyme which able degrade chitin in order to reduce the contamination level of organic compounds. Furthermore, chitinase enzyme that already obtained will be characterized. This research uses the descriptive method. The results is presented based on the step of the research.

The results showed that there are three microbial isolates that indicated by a clear zone around the colonies of microbes. The highest chitinolytic index is indicated by isolate TP02 that is 2.22. The specific activity of crude enzyme extracts is 0,008 units / mg and the pure enzyme is 0.052 units / mg. The protein content of crude enzyme extract is 3.636 mg / ml and the pure enzyme is 1.127 mg / ml. The purification of the chitinase was increased to 6,548 fold. The molecular weight of chitinase enzymes of isolate TP02 determined by SDS-PAGE is about 68.257 kDa. Chitinase enzymes of isolate TP02 has the optimum pH is 7, optimum temperature is 35°C, pH stability is pH 5-7 and the termal stability is 30-45°. Chitinase enzymes of isolate TP02 specific to substrate chitin. The hydrolysis product of substrate is detected by thin layer chromatography method. The hydrolysis products are N-acetyl-D-glucosamin (GlcNAc) and GlcNAc_n.

Keywords: chitinase, chitinolytic microbe, shrimp paste waste soil industry, shrimp waste

KATA PENGANTAR

Puji dan syukur kepada Tuhan Yesus Kristus atas berkat dan penyertaanNya, sehingga penulis dapat menyelesaikan laporan skripsi ini dengan baik. Skripsi ini disusun sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar sarjana S1 di Fakultas Teknologi Pertanian. Penulis menyampaikan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada :

1. Dr. Agustin Krisna Wardani, STP, M.Si selaku Ketua Jurusan Teknologi Hasil Pertanian, Universitas Brawijaya, Malang.
2. Dr.Ir. Aji Sutrisno, M.Sc selaku Dosen Pembimbing skripsi.
3. Orang tua dan seluruh keluarga yang selalu memberikan dukungan, doa dan semangat.
4. Dosen dan karyawan Jurusan Teknologi Hasil Pertanian atas segala bimbingan, bantuan dan saran yang telah diberikan.
5. Segenap laboran Jurusan Teknologi Hasil Pertanian (Mbak Luluk, Mbak Vita, Mbak Yuli, Mbak Fitri, Mas Agus, Mas Bekti) yang telah membantu kegiatan selama di Laboratorium.
6. Teman-teman (Yaninda, Sandra, Yus, Divan, Debora, Sari, Karina), seluruh keluarga besar Efrata atas segala bantuan, dukungan, doa dan motivasinya serta teman-teman yang tidak dapat saya sebutkan satu persatu.
7. Kepada semua pihak yang belum disebutkan, terima kasih atas dukungannya.

Penulis menyadari bahwa skripsi ini masih jauh dari sempurna. Maka dari itu penulis mengharapkan kritik dan saran yang dapat membangun dan memperbaiki penulisan laporan skripsi ini. Penulis juga meminta maaf atas segala kekurangan dalam penyusunan laporan skripsi ini. Semoga karya tulis ini dapat member manfaat bagi banyak pihak.

Malang, Juli 2014

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
LEMBAR PERSETUJUAN	ii
LEMBAR PENGESAHAN	iii
RIWAYAT HIDUP	iv
LEMBAR PERUNTUKAN	v
PERNYATAAN KEASLIAN SKRIPSI	vi
RINGKASAN	vi
SUMMARY	viii
KATA PENGANTAR	ix
DAFTAR ISI	x
DAFTAR TABEL	xii
DAFTAR GAMBAR	xiii
DAFTAR LAMPIRAN	xiv
I. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Perumusan Masalah.....	2
1.3 Tujuan.....	3
1.4 Manfaat.....	3
1.5 Hipotesa.....	3
II. TINJAUAN PUSTAKA	4
2.1 Limbah Udang.....	4
2.2 Kitin.....	4
2.3 Kitinase.....	6
2.4 Mikroba Kitinolitik.....	10
2.5 Isolasi dan Skrining.....	11
2.6 Pemurnian Parsial Enzim Kitinase.....	11
2.7 Penentuan Aktivitas Enzim Kitinase.....	13
2.8 Kromatografi Lapis Tipis.....	16
2.9 Karakteristik Kitinase.....	16
III. METODOLOGI PENELITIAN	20
3.1 Tempat dan Waktu Pelaksanaan.....	20
3.2 Alat dan Bahan.....	20
3.3 Metode Penelitian.....	21
3.4 Pelaksanaan.....	21
3.5 Pengamatan dan Analisis Data.....	27
3.6 Diagram Alir Penelitian.....	27
IV. HASIL DAN PEMBAHASAN	41
4.1 Isolasi dan Seleksi Mikroba Kitinolitik.....	41
4.2 Pemurnian Enzim Kitinase dengan Metode Kitin Binding dan Dialisis.....	49
4.3 Karakterisasi Enzim Kitinase.....	52
V. KESIMPULAN DAN SARAN	64
5.1 Kesimpulan.....	64
5.2 Saran.....	64

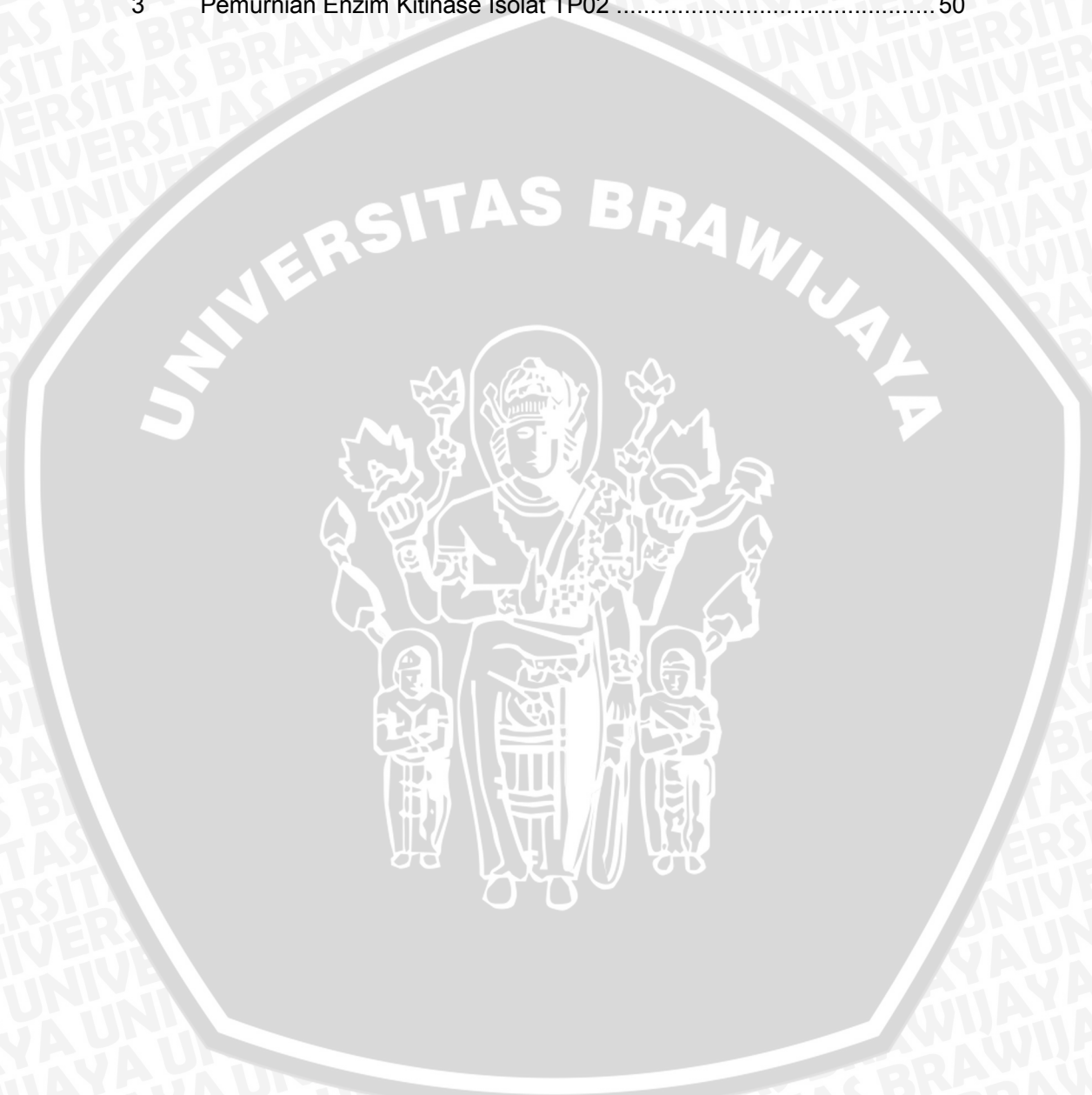


DAFTAR PUSTAKA.....	66
LAMPIRAN	74
DOKUMENTASI.....	88



DAFTAR TABEL

Nomor	Teks	Halaman
1	Indeks Kitinolitik Isolat Terpilih	44
2	Karakteristik Morfologi Isolat TP02	45
3	Pemurnian Enzim Kitinase Isolat TP02	50

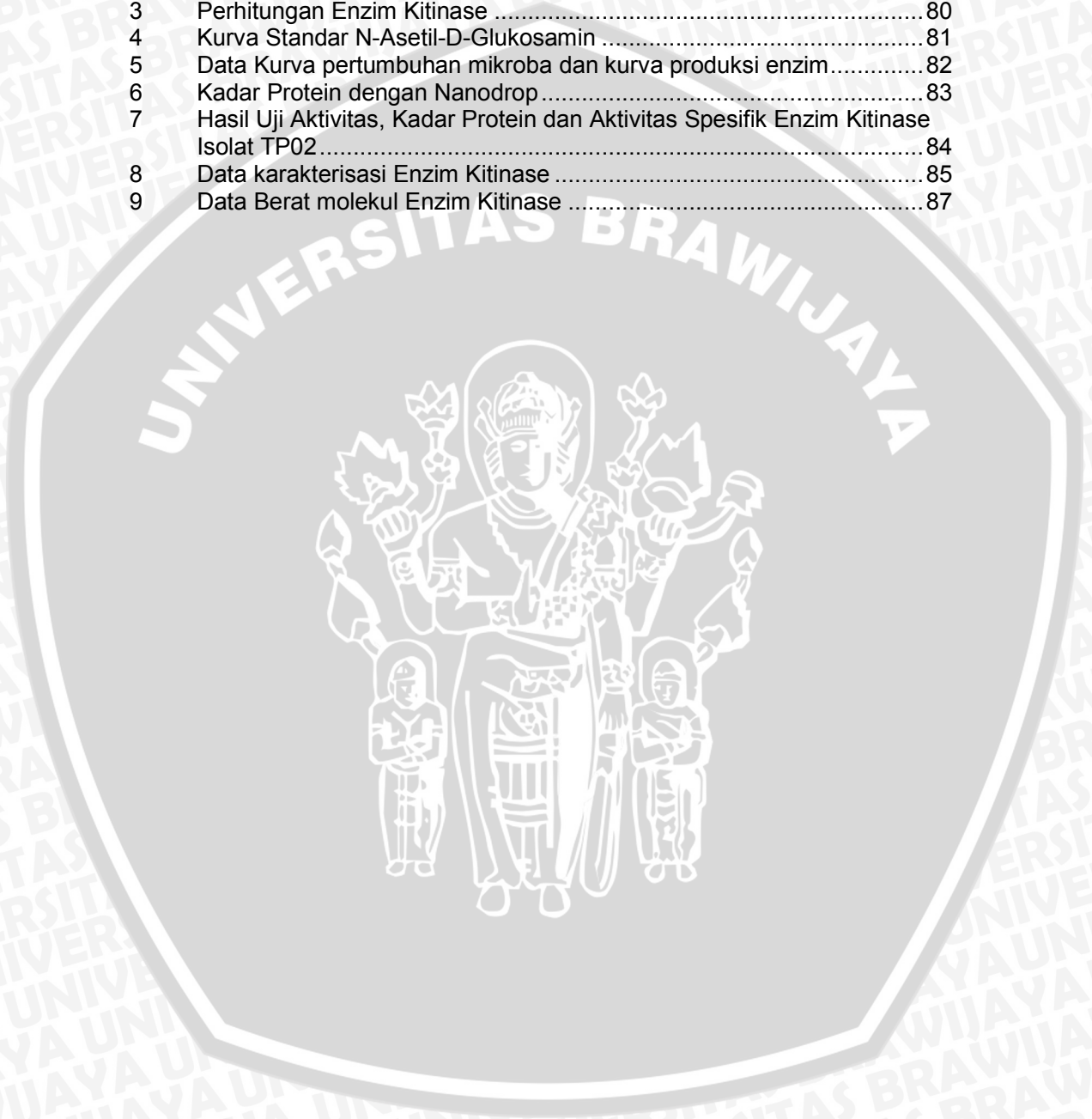


DAFTAR GAMBAR

Nomor	Teks	Halaman
1	Struktur Kimia dari Kitin.....	5
2	Skema Pola Pemutusan Domain Enzim Kitinolitik.....	7
3	Mekanisme <i>retaining</i> dan <i>invertig</i> oleh kitinase.....	8
4	Proses dan enzim yang terlibat dalam degradasi senyawa kitin.....	9
5	Jalur degradasi kitin secara enzimatis.....	10
6	Dialisis.....	12
7	Elektroforesis gel poliakrilamid.....	15
8	Diagram Alir Pembuatan Koloidal Kitin.....	27
9	Diagram Alir Isolasi Bakteri.....	28
10	Diagram Alir Pewarnaan Gram.....	29
11	Diagram Alir Kurva Pertumbuhan Mikroba.....	30
12	Diagram Alir Isolasi dan Pemurnian Enzim Kitinase.....	31
13	Diagram Alir Pengukuran Aktivitas Enzim Kitinase.....	33
14	Diagram Alir Pengaruh Suhu pada Aktivitas Enzim Kitinase.....	34
15	Diagram Alir Pengaruh pH pada Aktivitas Enzim Kitinase.....	35
16	Diagram Alir Kestabilan Enzim Kitinase Terhadap Suhu.....	36
17	Diagram Alir Kestabilan Enzim Kitinase Terhadap pH.....	37
18	Diagram Alir Uji Spesifisitas Substrat.....	38
19	Diagram Alir Penentuan Berat Molekul Enzim dengan SDS-PAGE dan Zimogram.....	39
20	Diagram Alir Deteksi Produk Hidrolisis dengan Kromatografi Lapis Tipis.....	40
21	Pengenceran (A) dan Hasil Isolasi Mikroba Kitinolitik pada Suhu 37°C (B).....	42
22	Zona Bening Mikroba 72 Jam.....	43
23	Pertumbuhan Isolat TP02 dan TP03 pada Media Cair 12 jam (A), 24 jam (B) dan 48 jam (C).....	44
24	Pengecatan Gram Isolat Mikroba TP02.....	46
25	Pertumbuhan Isolat TP02 pada Media Cair Koloidal Kitin Suhu 37°C, 46°C, 55°C.....	47
26	Kurva Pertumbuhan Mikroba dan Produksi Enzim.....	48
27	Hasil SDS-PAGE pada Marker (1), Enzim Kitinase Murni (2), dan Zimogram Enzim Kitinase Murni (3).....	53
28	Pengaruh Suhu pada Aktivitas Enzim Kitinase Isolat TP02.....	55
29	Kestabilan Enzim Kitinase Terhadap Suhu.....	57
30	Pengaruh pH pada Aktivitas Enzim Kitinase Isolat TP02.....	58
31	Kestabilan Enzim Kitinase Terhadap pH.....	59
32	Uji spesifisitas substrat.....	61
33	Produk Kromatografi Lapis Tipis dengan Standar (1), Enzim Kitinase Isolat TP02 (2) dan kontrol negatif (3).....	62

DAFTAR LAMPIRAN

Nomor	Teks	Halaman
1	Prosedur Analisa	74
2	Komposisi Reagen, Media, bahan, dan pewarna	78
3	Perhitungan Enzim Kitinase	80
4	Kurva Standar N-Asetil-D-Glukosamin	81
5	Data Kurva pertumbuhan mikroba dan kurva produksi enzim	82
6	Kadar Protein dengan Nanodrop	83
7	Hasil Uji Aktivitas, Kadar Protein dan Aktivitas Spesifik Enzim Kitinase Isolat TP02	84
8	Data karakterisasi Enzim Kitinase	85
9	Data Berat molekul Enzim Kitinase	87



I PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Indonesia merupakan negara kepulauan dan sebagian besar wilayahnya merupakan perairan. Salah satu produk perairan di Indonesia yang mengalami peningkatan produksi adalah udang. Kementerian Kelautan dan Perikanan (2013) menyatakan bahwa pada tahun 2012, total produksi udang mencapai 415.703 ton. Udang tersebut sekitar 80-90% diekspor dalam bentuk udang beku tanpa kulit dan kepala. Limbah udang yang dihasilkan dari satu ekor udang sekitar 30% (Kementerian Kelautan dan Perikanan, 2011). Pada tahun 2004, kulit dan kepala udang yang dihasilkan mencapai 78.000 ton (Kementerian kelautan dan perikanan, 2004).

Kulit udang mengandung 15-20% kitin (Fohcher, 1992 dalam Azhar, 2010). Kitin merupakan biopolimer yang banyak terdapat di alam yang tersusun atas β -1,4-N-asetil-D-glukosamin (GlcNac). Pada umumnya kitin berikatan dengan protein, mineral dan pigmen. Ketersediaan limbah udang yang besar di Indonesia menyebabkan terjadinya pencemaran lingkungan akibat bau busuk yang ditimbulkan. Hal tersebut disebabkan karena degradasi kitin pada limbah udang memerlukan waktu yang relatif lama. Ukuran molekul kitin yang relatif besar dan kelarutan kitin rendah juga menyebabkan kitin menjadi sumber utama pencemaran senyawa organik (Haliza dan Suhartono, 2012). Degradasi kitin dapat dilakukan dengan cara biokimia yaitu menggunakan enzim. Pada umumnya metode biokimia lebih banyak digunakan karena menggunakan enzim sehingga lebih ekonomis dan ramah lingkungan (Herdyastuti *et al*, 2009).

Kitinase adalah enzim yang akan menghidrolisis ikatan glikosidik β -1,4 pada kitin sehingga kitin lebih mudah didegradasi. Enzim kitinase dapat dihasilkan oleh mikroorganisme kitinolitik. Saat ini enzim kitinase banyak digunakan sebagai agen biokontrol karena dapat mendegradasi kitin menjadi produk yang ramah lingkungan. Selain itu, dapat digunakan dalam bidang kesehatan, pangan, industri dan lain-lain (Herdyastuti *et al*, 2009).

Mikroba kitinolitik merupakan mikroorganisme yang dapat menghasilkan enzim kitinase yang mampu mendegradasi senyawa kitin. Produksi kitinase dengan menggunakan mikroba telah banyak digunakan karena medium

pemeliharaan lebih murah dan mudah serta dapat menghasilkan oligomer yang diinginkan (Mejia-Saules *et al*, 2006). Rebecca (2013) telah berhasil mengisolasi dan mengidentifikasi bakteri kitinolitik dari tanah yaitu *Serratia marcescens*. Nurdebyandaru *et al* (2010) berhasil mengisolasi bakteri kitinolitik dari rizosphere cabe yaitu *Bacillus* sp.

Tanah merupakan sumber mikroorganisme pendegradasi kitin yang baik. Oleh karena itu, pada penelitian ini dilakukan isolasi mikroba dari tanah di limbah industri petis udang. Tanah tersebut berada di sekitar limbah industri petis udang. Tanah telah dikondisikan secara alami sejak lama dengan keberadaan limbah udang. Limbah industri petis berupa kulit, kepala dan ekor udang mengandung kitin yang dapat digunakan sebagai substrat pertumbuhan mikroba, sehingga tanah tidak perlu dilakukan pengkayaan dengan substrat terlebih dulu. Oleh karena itu diharapkan dengan adanya sampel tanah ini, proses isolasi dan skrining mikroba kitinolitik menjadi lebih cepat. Pada penelitian ini diharapkan enzim kitinase yang diperoleh dapat mendegradasi kitin menjadi oligomernya sehingga mengurangi pencemaran senyawa organik dari kitin dan aplikasi kitin menjadi lebih luas. Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan enzim kitinase dari isolat bakteri tanah limbah petis udang dan mengetahui karakteristik enzim kitinase yang dihasilkan.

1.2 Perumusan Masalah

Berdasarkan uraian latar belakang diatas, maka didapatkan perumusan masalah dari penelitian ini adalah:

1. Bagaimana potensi isolat bakteri yang terdapat pada tanah limbah industri petis udang dalam menghasilkan enzim kitinase?
2. Bagaimana aktivitas enzim kitinase yang didapatkan dari isolat mikroba?
3. Bagaimana karakteristik enzim kitinase yang didapatkan dari isolat mikroba?

1.3 Tujuan

Penelitian ini bertujuan untuk :

1. mendapatkan mikroba kitinolitik yang berpotensi menghasilkan enzim kitinase dengan aktivitas tinggi
2. mengetahui aktivitas dan potensi enzim kitinase dalam menghidrolisis kitin
3. mengetahui karakteristik enzim kitinase yang didapatkan dari isolat mikroba.

1.4 Manfaat

Hasil penelitian yang berupa isolat bakteri penghasil enzim kitinase dan karakterisasi enzim kitinase dapat menjadi informasi untuk mengembangkan produksi enzim kitinase.

1.5 Hipotesa

Diduga dengan adanya isolasi dan skrining mikroba kitinolitik dari tanah limbah industri petis udang diperoleh mikroba yang mampu menghasilkan enzim kitinase yang dapat mendegradasi kitin menjadi N-asetil-D-glukosamin. Diduga pemurnian dengan metode afinitas kitin dapat meningkatkan kemurnian enzim kitinase secara efektif.

II TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Limbah Udang

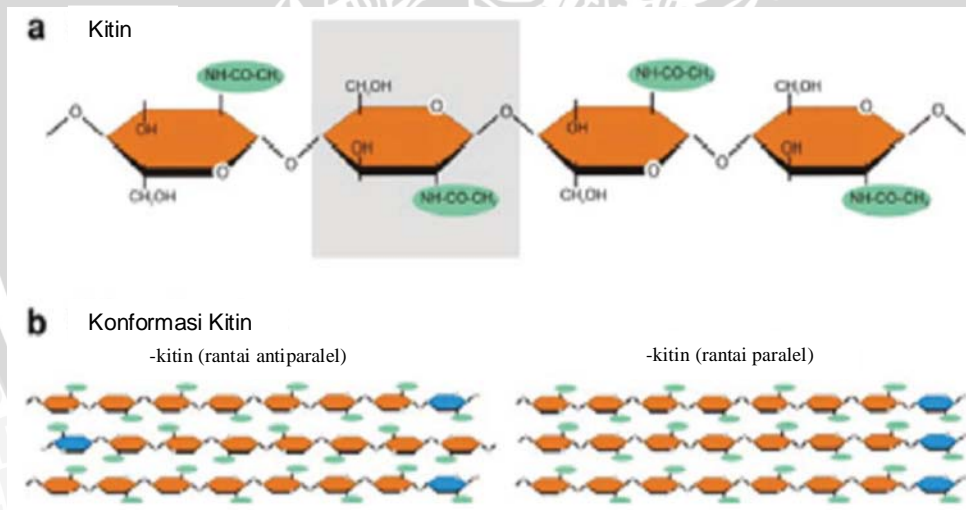
Indonesia merupakan negara kepulauan yang sebagian besar wilayahnya berupa perairan. Berbagai jenis produk telah dihasilkan dari wilayah perairan di Indonesia. Salah satu produknya adalah udang. Produksi udang di Indonesia setiap tahun terus mengalami peningkatan. Menurut Kementerian Kelautan dan Perikanan (2013), pada tahun 2012 total produksi udang mencapai 415.703 ton. Kulit, kepala dan bagian ekor udang ini menjadi limbah produksi udang. Limbah udang yang dihasilkan dari satu ekor udang adalah sekitar 30% (Kementerian Kelautan dan Perikanan, 2011). Pada tahun 2004, kulit dan kepala udang mencapai 78.000 ton (Kementerian kelautan dan perikanan, 2004). Limbah udang dapat diolah menjadi beberapa produk seperti kerupuk udang, petis udang, terasi udang, kecap udang, tepung udang, silase udang, dan pupuk organik (Firlianty, 2009). Limbah kulit dan limbah cair udang biasanya dibuang tanpa perlakuan tertentu. Hal tersebut dapat menyebabkan pencemaran lingkungan. Limbah kulit udang mengandung protein 25-44%, kitin 15-20%, kalsium karbonat 45-50% (Fohcher, 1992 dalam Azhar, 2010). Limbah udang dapat diolah menjadi kitin dan turunannya yang memiliki nilai ekonomis tinggi. Di pasar internasional, kitin dijual dengan harga US\$ 10 per kilogram, dan kitosan US\$ 15-40 per kilogram tergantung kualitasnya (Purwanti, 2012).

2.2 Kitin

Kitin merupakan polisakarida yang tersusun atas β -1,4-N-asetil-D-glukosamin (GlcNac). Kitin banyak ditemukan pada kulit crustaceae (kepiting, udang, dan lobster), ubur-ubur, eksoskeleton artropoda, dinding sel fungi (22-40%), kulit telur nematoda, binatang atau tumbuhan (Okazaki et al, 1995 dalam Haliza dan Suhartono, 2012). Kitin memiliki kandungan nitrogen sebesar 6,98% sehingga dapat digunakan sebagai agen pengkelat. Kitin pada rantai polimer N-asetilglukosamin memiliki ikatan hidrogen antara gugus NH dari satu rantai dan gugus C=O dari rantai yang berdekatan sehingga membentuk mikrofibril, memiliki

struktur yang rigid dan tidak dapat larut dalam air (Widhyastuti, 2010). Tingkat kekerasan dan fleksibilitas kitin berbeda-beda tergantung pada bagian tubuh arthropoda (Saguez, 2008). Crustaceae mengandung kitin yang cukup tinggi yaitu sekitar 20-60% tergantung pada spesiesnya (Skaugrud dan Sargent, 1990). Skaugrud dan Sargent (1990) juga mengungkapkan bahwa pada crustaceae, kitin merupakan struktur yang rigid pada eksoskeleton, dikarenakan pada rantai polimer N-asetil-D-glukosamin terdapat ikatan hidrogen antar molekul membentuk mikrofibril menghasilkan struktur yang stabil dan rigid, tidak larut dalam air sehingga dapat mengkristal.

Menurut Widhyastuti (2010), terdapat 3 jenis fibril kitin yaitu α -kitin, β -kitin dan γ -kitin. Rantai polimer β -kitin yang berdekatan tersusun secara antiparalel. Hal ini ditemukan pada jamur dan artropoda. Pada α -kitin, rantai polimer tersusun secara paralel, ditemukan pada penyusun rangka cumi-cumi. Pada γ -kitin tersusun dari dua rantai secara paralel dan rantai ketiga antiparalel.



Gambar 1 Struktur Kimia dari Kitin (Verena, 2008)

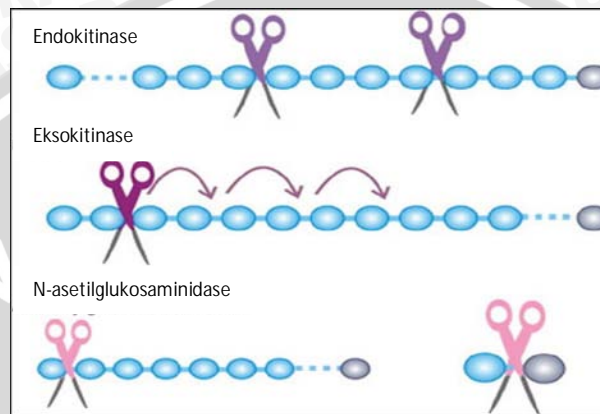
Aplikasi kitin antara lain dalam bidang biokimia, farmasi, pangan, gizi, enzimologi, industri kertas, tekstil, film, sebagai pengawet, dan antibiotik. Tetapi kitin sulit diaplikasikan dalam bidang farmasi dan pangan fungsional karena sifatnya yang tidak larut air (Widhyastuti, 2010). Hal tersebut menyebabkan kitin

menjadi sumber utama dalam pencemaran senyawa organik (Haliza dan Suhartono, 2012). Pengolahan limbah untuk mendegradasi kitin dapat dilakukan dengan beberapa cara yaitu dengan demineralisasi dan deproteinasi melalui penambahan asam atau basa kuat, dengan membakar limbah dan menguburnya dalam tanah sehingga memerlukan waktu yang cukup lama dan dapat menghasilkan NH_3 , serta dengan metode biokimia menggunakan enzim sehingga lebih ekonomis, ramah lingkungan (Herdyastuti et al, 2009). Selain itu Tsigos (2000) dan Gohel (2008) juga mengatakan bahwa metode biokimia mudah dikendalikan, terurai secara biologis, dan dapat membentuk oligomer atau polimer yang diinginkan. Produk turunan kitin seperti kitin-oligosakarida, karboksimetil kitin, hidroksietil kitin, etil kitin memiliki berbagai macam manfaat. Kitin-oligosakarida memiliki aktivitas melawan oksidasi, mampu diaplikasikan pada makanan, obat-obatan, dan produk kosmetik, mampu meningkatkan kekebalan tubuh dalam pengobatan AIDS, kanker, jantung dan penyakit darah (Shahidi, 1999). Dalam bidang kedokteran, karboksimetil kitin, hidroksietil kitin dan etil kitin digunakan sebagai bahan dasar pembuatan benang operasi yang dapat diserap dalam jaringan tubuh, tidak toksik, dan mampu disimpan dalam waktu lama. Dalam bidang farmasi, N-asetil-D-glukosamin digunakan sebagai obat dalam mengontrol kadar gula darah, suplemen, antiinflamasi, dan lain-lain. Dalam bidang kosmetik, N-asetil-D-glukosamin dapat mengurangi hilangnya hiperpigmentasi karena dapat membantu mengurangi aktivitas enzim tirosinase yang berperan dalam produksi melanin (Haliza dan Suhartono, 2012).

2.3 Kitinase

Kitinase merupakan poli (1,4-N-asetil- -D-glukosamin)-glikanohidrolase. Enzim kitinase dapat dihasilkan oleh mikroorganisme kitinolitik, artropoda, dan beberapa hewan tingkat tinggi (amfibi, ikan, mamalia) (Ubhayasekera, 2005). Enzim kitinase akan memotong ikatan glikosida pada kitin untuk menghasilkan oligosakarida terlarut (Orikoshi et al, 2005). Rentang pH optimum kitinase adalah sebesar 4-9 (Khan, 2002). Terdapat 3 jenis kitinase yaitu eksokitinase yang mengkatalisis pembebasan N-asetil-glukosamin, memotong kitin hanya dari ujung non reduksi; endokitinase yang mendegradasi kitin secara acak dari dalam menghasilkan oligomer pendek N-asetil-D-glukosamin; dan N-asetil-

glukosaminidase yang memutuskan diasetilkitobiosa dan menghasilkan N-asetilglukosamin (GlcNAc). Struktur kitinase dikenal sebagai multi domain karena memiliki lebih dari satu domain yaitu domain katalitik, domain pengikatan kitin, dan domain fibronectin III (Herdyastuti et al, 2009).

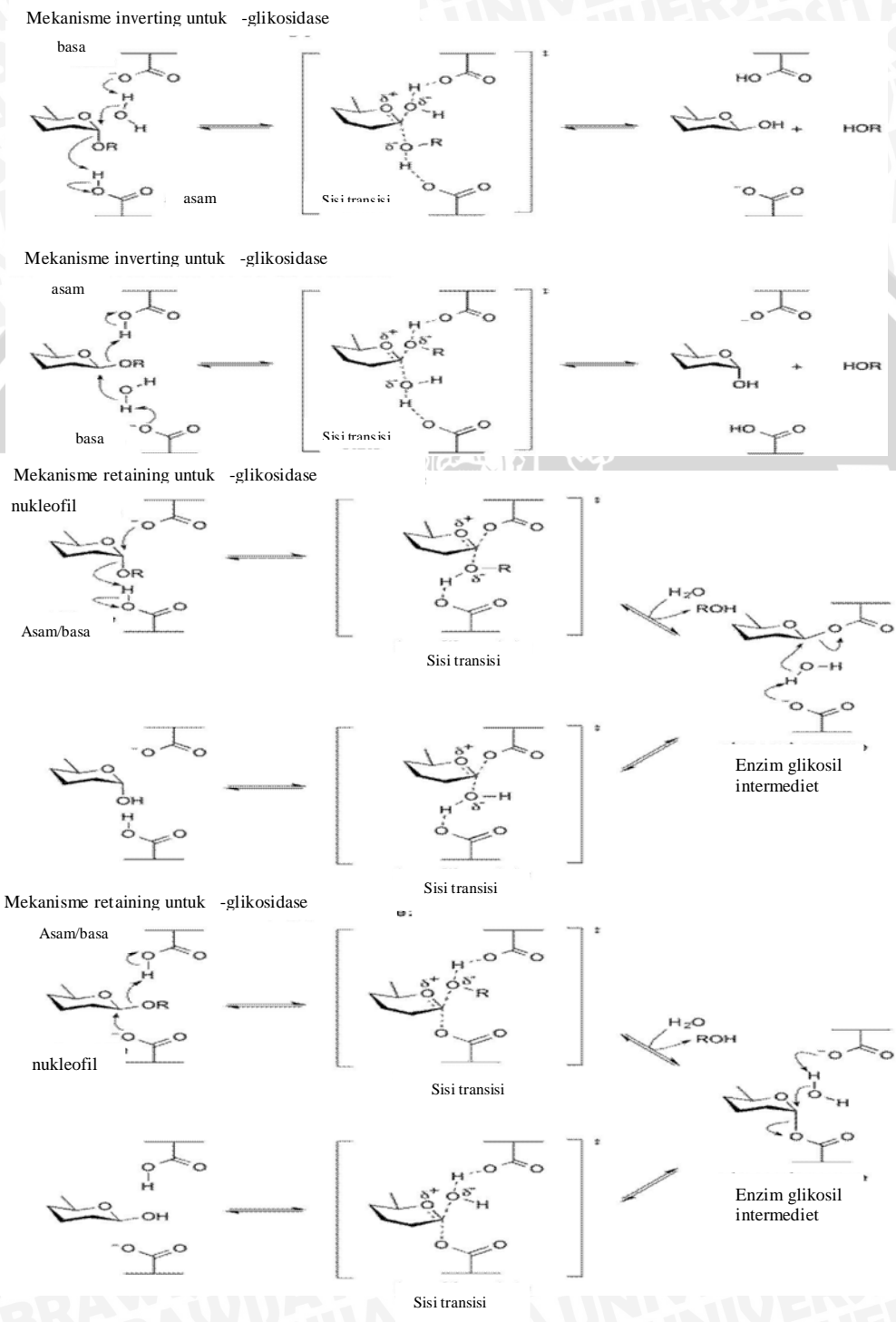


Gambar 2 Skema Pola Pemutusan Domain Enzim Kitinolitik (Verena, 2008)

Kitinase dikelompokkan menjadi 3 keluarga (family) hidrolase glycosyl yaitu keluarga (family) 18, 19, 20. Perbedaan dari ketiga kelompok tersebut adalah sumber enzim kitinase. Family 18 merupakan kitinase dari bakteri, virus, jamur, beberapa kitinase dari hewan dan tanaman (kelas III dan V). Family 19 berasal dari tanaman (kelas I, II dan IV). Family 20 -N-acetylhexosaminidases dari Streptomyces dan manusia (Haliza dan Suhartono, 2012). Famili 18, 19 dan 20 memiliki mekanisme katalitik yang berbeda. Menurut Itoh et al (2002), kitinase famili 18 melakukan katalisis yang diikuti substrat dan menggunakan mekanisme retaining. Kitinase famili 19 menggunakan mekanisme asam dan basa, dan mengkatalisis hidrolisis kitooligosakarida dengan inversi konfigurasi anomerik. Mekanisme kitinase famili 20 adalah retaining.

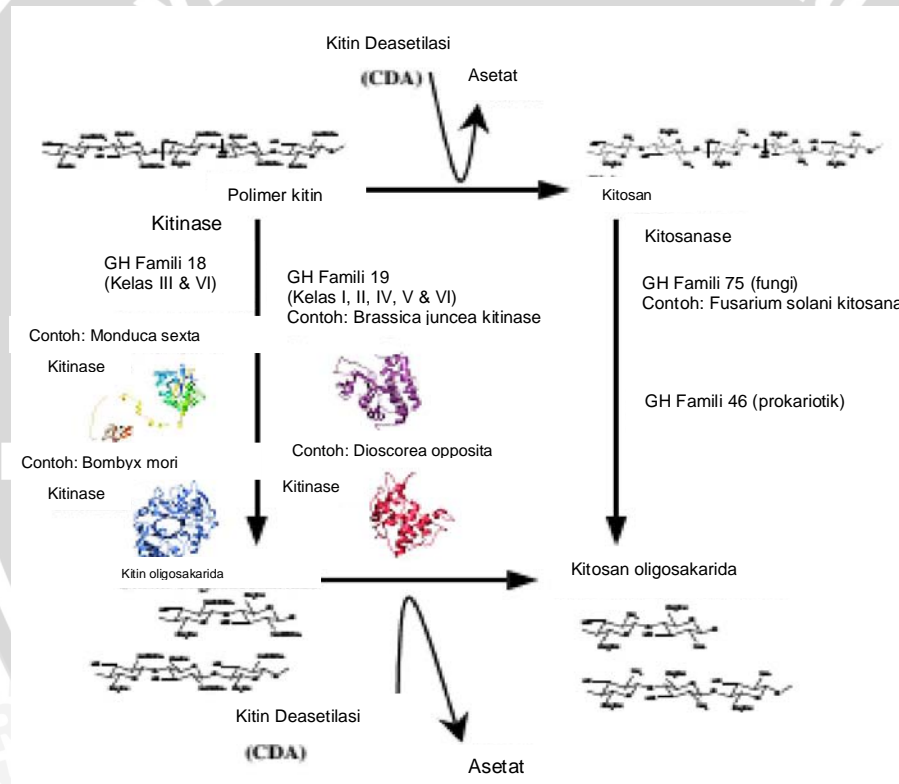
Mekanisme hidrolisis pada kitinase famili 18 adalah double-displacement. Pada mekanisme tersebut, protonasi residu GlcNAc pada konformasi perahu menghasilkan intermediet oksazolin yang dapat dihidrolisis untuk membentuk produk dengan retensi konfigurasi anomerik. Mekanisme hidrolisis pada kitinase famili 19 adalah single-displacement. Pada mekanisme tersebut, dua residu asam

amino diperlukan pada sisi aktif dan produk hidrolisis menunjukkan inversi konfigurasi anomerik (Brameld and Goddard, 1998 dalam Dahiya et al, 2006).



Gambar 3 Mekanisme retaining dan inverting oleh kitinase (CAZyedia)

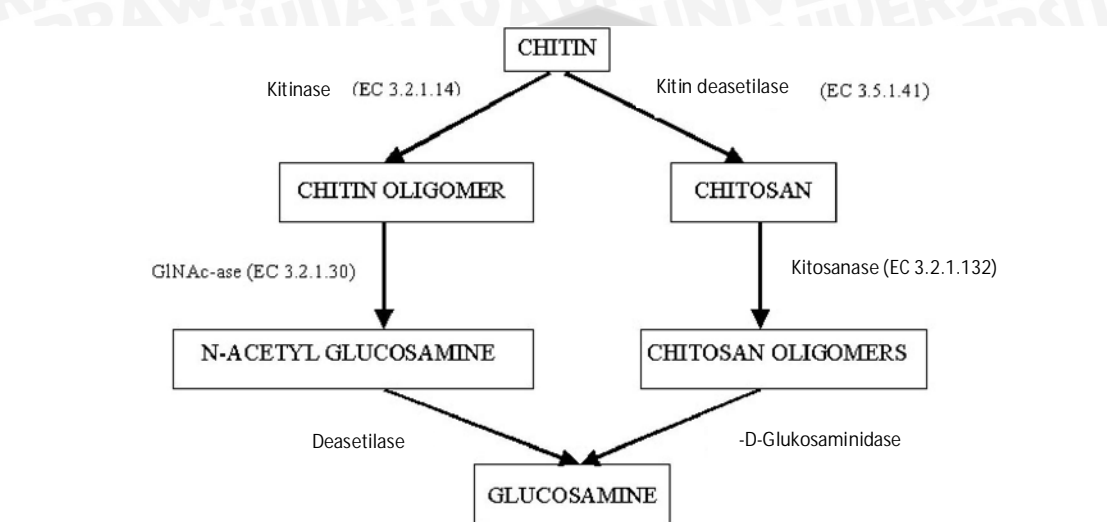
Kitinase dibagi dalam 5 kelas yaitu kelas I sampai V. Kelas I-IV sebagian besar merupakan kitinase pada tanaman. Menurut Haliza dan Suhartono (2012), kitinase kelas I memiliki domain N-terminal kaya sistein dan domain kitin berikatan hevein (chitin-binding hevein-like domain). Kitinase kelas II tersusun dari domain katalitik yang monomernya homologi dengan domain katalitik kitinase kelas I tetapi tidak memiliki domain N-terminal kaya sistein dan domain kitin berikatan hevein. Kitinase kelas III hanya memiliki sekuen yang homologi dengan kitinase *Hevea brasiliensis*, tidak memiliki kesamaan sekuen dengan kitinase tanaman lain. Kitinase kelas IV, memiliki struktur yang sama dan sekuen yang berbeda dengan kitinase kelas I. Kitinase kelas IV mewakili kitinase ekstraseluler. Kitinase kelas V pada umumnya terdapat pada bakteri.



Gambar 4 Proses dan enzim yang terlibat dalam degradasi senyawa ktiin (Ubhayasekera, 2005)

Enzim kitinase memiliki peran yang bermacam-macam. Seperti yang dipaparkan oleh Haliza dan Suhartono (2012), kitinase memiliki peran dalam menginduksi pertahanan tanaman terhadap serangan jamur patogen, mampu

memproduksi kitin-oligosakarida dan dapat digunakan dalam industri makanan serta obat-obatan.



Gambar 5 Jalur degradasi kitin secara enzimatik (Gooday, 1994)

2.4 Mikroba Kitinolitik

Mikroba kitinolitik adalah mikroba yang mampu menghasilkan enzim kitinase untuk mendegradasi kitin. Menurut Herdyastuti et al (2009), tanah dan air merupakan sumber mikroorganisme pendegradasi kitin yang baik. Terdapat beberapa mikroba yang telah diketahui mampu menghasilkan enzim kitinase, antara lain *Enterobacter*, *Streptomyces*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichoderma* (Omumasaba et al, 2001). Beberapa mikroba tersebut dapat memanfaatkan kitin sebagai sumber nitrogen dan karbon. Berbagai mikroorganisme akan menghasilkan jenis kitinase yang berbeda, spesifitas terhadap substrat yang bervariasi, dan karakteristik yang berbeda (Toharisman, 2007). Hal ini juga didukung oleh Haliza dan Suhartono (2012) yang mengatakan bahwa, karakteristik kitinase sangat beragam, dapat diketahui dari studi dasar terkait peran biologis mereka terhadap degradasi kitin.

Mikroba penghasil kitinase pada umumnya dapat diperoleh di lingkungan mesofil (lingkungan air, tanah, rizosphere, phyllosphere) dan termofil (sumber air panas, daerah geotermal, dan lain-lain) (Herdyastuti et al, 2009). Beberapa

peneliti telah berhasil mengisolasi dan mengidentifikasi bakteri kitinolitik dari tanah yaitu *Serratia marcescens* (Rebecca et al, 2013), *Streptomyces* sp (Sowmya, 2012). Selain itu Nurdebyandaru et al (2010) berhasil mengisolasi bakteri kitinolitik dari rizosphere cabe yaitu *Bacillus* sp. Beberapa mikroba kitinolitik yang diisolasi dari perairan seperti *Vibrio alginolyticus* TK-22 (Mura, 1992) dan *Vibrio harveyi* (Svitil, 1997).

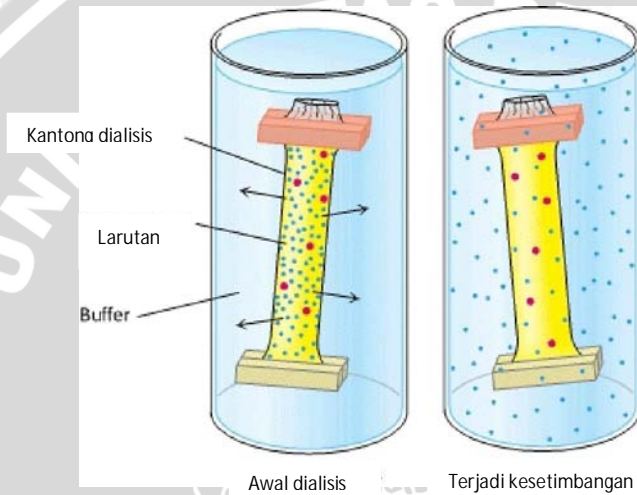
2.5 Isolasi dan Skrining

Mikroba penghasil kitinase dapat diperoleh dengan mengisolasi dalam media yang mengandung kitin. Kitin berfungsi sebagai substrat yang dapat menginduksi enzim kitinase (Haliza dan Suhartono, 2012). Mikroba penghasil kitinase diisolasi dengan menggunakan metode pengenceran seri. Sampel dari pengenceran seri di transfer ke media agar kitin dan diinkubasi dengan suhu dan waktu tertentu. Mikroorganisme kitinolitik dapat diseleksi dengan adanya zona bening yang muncul di sekitar bakteri yang berarti kitinase telah berhasil mendegradasi media agar koloidal kitin (Rebecca et al, 2013). Koloidal kitin merupakan kitin yang dilarutkan dengan asam klorida pekat dan merupakan substrat yang sangat efektif untuk menentukan aktivitas kitinase bila dibandingkan dengan serbuk kitin (Haliza dan Suhartono, 2012).

2.6 Pemurnian Parsial Enzim Kitinase

Purifikasi atau pemurnian merupakan tahap yang penting untuk mendapatkan enzim kitinase yang berkualitas. Tahap purifikasi dapat dilakukan bertahap antara lain ekstraksi, pemisahan enzim seperti presipitasi, sentrifugasi, dialisis dan filtrasi. Pemurnian lebih lanjut dapat dilakukan dengan kolom kromatografi yang diklasifikasikan berdasarkan ukuran, partikel, muatan listrik, afinitas, suhu, densitas dan solubilitas (Haliza dan Suhartono, 2012). Keberhasilan purifikasi dilihat dari tingkat kemurnian, rendemen, dan aktivitas spesifik. Semakin tinggi tingkat kemurnian enzim maka semakin tinggi pula rendemen dan aktivitas spesifik enzim (Haliza dan Suhartono, 2012). Tahap pemurnian dengan dialisis dilakukan untuk memisahkan senyawa dengan berat molekul lebih rendah dari

sampel menuju larutan buffer melalui membran semipermeabel. Protein dengan berat molekul tinggi akan tertahan dalam kantong dialisis (Nelson dan Cox, 2000). Menurut Nelson dan Cox (2000), air dan molekul kecil seperti NaCl atau glukosa akan keluar dengan bebas melalui pori-pori. Molekul kecil akan berdifusi keluar karena molekul akan berdifusi ke daerah yang memiliki konsentrasi lebih rendah. Fase cair diganti beberapa kali untuk memaksimalkan keluarnya molekul kecil dari larutan protein.



Gambar 6 Dialisis (Berg, 2002)

Metode purifikasi ada beberapa macam diantaranya purifikasi berdasarkan ukuran, depirogenasi dan afinitas. Beberapa tujuan purifikasi protein adalah untuk mengidentifikasi fungsi protein, mengidentifikasi struktur protein, menggunakan enzim untuk menghasilkan produk yang diinginkan. Dasar dari tahapan purifikasi protein yaitu (Roe, 2001):

- a. Fraksinasi awal, untuk menyiapkan protein dalam larutan jernih. Pada umumnya dilakukan dengan sentrifugasi, mikrofiltrasi dan lisis sel.
- b. Purifikasi, merupakan tahap lanjutan yang berfungsi untuk menghilangkan kontaminan dan memekatkan produk. Pada umumnya dilakukan dengan kromatografi, 3 sampai 5 tahap untuk menghilangkan kontaminan yang berbeda pada setiap tahapnya.

- c. Polishing. Setiap produk memiliki kestabilan pada kondisi tertentu. Kondisi optimum untuk menjaga stabilitas protein merupakan hal yang penting untuk diketahui karena terdapat kemungkinan protein disimpan dalam waktu tertentu setelah purifikasi. Pada tahap ini dilakukan penghilangan agregat atau protein terdegradasi menggunakan size exclusion chromatography.

Enzim kitinase dapat dipurifikasi berdasarkan ikatan kuat dengan kitin. Purifikasi dilakukan dengan menambahkan kitin pada enzim kitinase dan dilakukan sentrifugasi. Supernatan yang diperoleh dibuang, sedangkan pelet dicuci dengan bufer hingga 3 kali. Pelet hasil pencucian disentrifugasi kembali untuk menghilangkan kitin. Kemurnian kitinase ditentukan dengan SDS-PAGE, isoelectric focusing (IEF) dan Western blotting (Thompson et al, 2001).

2.7 Penentuan Aktivitas Enzim Kitinase

Aktivitas kitinase adalah ukuran jumlah produk yang dihasilkan dari pemecahan kitin sebagai substrat. Satu unit aktivitas kitinase diartikan sebagai pelepasan 1 μmol gula reduksi (N-asetil-glukosamin) per menit. Terdapat beberapa metode yang dapat digunakan dalam pengukuran aktivitas kitinase antara lain kolorimetri, spektrometer assay, pembentukan fluoresens (metode fluorogenik), zimogram serta metode staining pada plate agar kitin dan elektroforesis gel poliakrilamid (Herdyastuti et al, 2009)..

2.7.1 Metode kolorimetri

Metode kolorimetri paling umum digunakan untuk mengukur aktivitas kitinase. Metode ini didasarkan pada pelepasan N-asetil-D-glukosamin (GlcNac) per menit setelah direaksikan dengan reagen tertentu, diukur absorbansi dengan panjang gelombang tertentu (Haliza dan Suhartono, 2012). Beberapa substrat yang dapat digunakan adalah koloidal kitin, kitin azure, p-nitrophenyl-N-asetil-D-glukosamin dan senyawa kromogen. Koloidal kitin merupakan kitin yang dilarutkan dengan HCl pekat. Kitin azure terbuat dari kitin yang direaksikan dengan Remazol Brilliant Violet 5R dan diukur dengan panjang gelombang 420 nm (Harighi, 2007). p-

nitrophenyl-N-asetil-D-glukosamin digunakan untuk mengukur aktivitas ekso-
kitinase. Stivil (1997) mengatakan bahwa aktifitas kitinase per unit sama dengan
p-nitrophenol yang dilepaskan per menit.

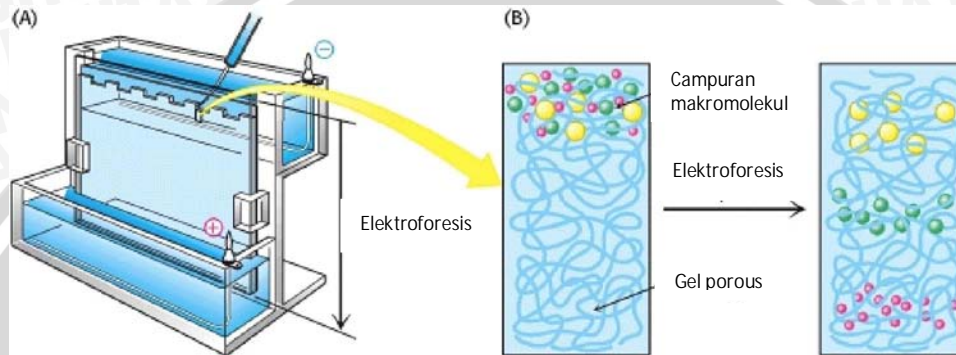
2.7.2 Metode zimogram

Metode zimogram akan mendeteksi aktifitas kitinase dengan elektroforesis
poliakrilamid gel dalam keadaan terdenaturasi dan tidak terdenaturasi (native).
Substrat yang digunakan adalah glikol kitin. Prinsipnya adalah penentuan zona
bening pada media padat yang mengandung glikol kitin. 2 tahap yang harus
dilakukan adalah pemisahan dengan elektroforesis dan deteksi penentuan
aktivitas kitinase. Gel poliakrilamid dan glikol kitin akan mengalami
kopolimerisasi, kitinase akan mendegradasi kitin sehingga terbentuk zona
bening. Gel diwarnai dengan Congo red sehingga zona bening terlihat jelas.
Buffer renaturasi digunakan untuk melipat kembali protein sehingga
mengaktifkan kembali sisi katalitik enzim. Pada tahap ini gel juga direndam
dalam bufer natrium fosfat pH 7 (pH optimum) dan diinkubasi pada suhu
optimumnya. Kondisi optimum ini berfungsi untuk memberi kesempatan bagi
enzim agar dapat menghidrolisis substrat (Kleiner dan Stevenson, 1997).
Menurut Transmo dan Harman (1993) metode ini lebih mudah, efektif dan
sederhana, tetapi tidak dapat digunakan untuk pewarnaan protein lebih lanjut
dan mobilitas kitinase dalam gel terganggu karena adanya polisakarida dalam
gel.

2.7.3 Metode staining pada plate agar kitin dan SDS-PAGE

SDS-PAGE (Sodium Dodecylsulphate Gel Electrophoresis) merupakan suatu
pemisahan molekul protein berdasarkan ukurannya dalam medan listrik pada
poliakrilamid gel dalam kondisi terdenaturasi karena penambahan SDS (sodium
dodecyl sulfat). "Pada kondisi terdenaturasi, enzim dapat terpisah pada keadaan
monomer sedangkan pada kondisi tidak terdenaturasi, enzim dalam keadaan
utuh atau sebenarnya" (Haliza dan Suhartono, 2012). Prinsip dari metode ini
adalah migrasi komponen akrilamida N.N' bisakrilamida yang berfungsi untuk

menyaring molekul sehingga konsentrasi atau rasio akrilamid dengan bisakrilamid dapat diatur agar kondisi migrasi komponen protein optimal (Anam, 2009). Kualitas pemisahan elektroforesis ini dipengaruhi oleh beberapa faktor yaitu kekuatan ionik dan pH buffer, input power, dan matriks penyangga (Aulanni'am, 2005).



Gambar 7 Elektroforesis gel poliakrilamid (Berg, 2002)

Metode ini sederhana, sensitif, mudah dan harganya terjangkau untuk mendeteksi kitinase natural dan terdenaturasi pada gel poliakrilamid. Pada metode ini, kitinase dipisahkan pada gel poliakrilamid dan ditransfer pada cawan petri yang telah mengandung agar kitin (Gohel, 2008). Gel penahan menentukan terbentuknya pita protein sehingga dapat diperoleh pita protein yang jelas (Situmorang, 2003). Gel pemisah berfungsi untuk memisahkan pita-pita protein berdasarkan berat molekulnya. Akrilamida bersifat karsinogenik dan berfungsi untuk menyusun gel. Bis akrilamida berperan dalam proses cross-linking sehingga dapat membentuk kisi-kisi bersama polimer akrilamida. Ammonium persulfate merupakan inisiator yang mengaktifkan akrilamida sehingga mampu bereaksi dengan akrilamida yang lain membentuk rantai polimer panjang. TEMED merupakan katalisator sehingga terjadi reaksi polimerisasi akrilamid menjadi gel poliakrilamid yang digunakan dalam pemisahan protein (Wilson dan Walker, 2000).

Sampel protein ditambah dengan buffer yang mengandung gliserol, SDS dan merkaptoetanol yang berfungsi untuk mereduksi ikatan disulfida, lalu didenaturasi menjadi rantai primer dengan cara direbus (Wilson dan Walker,

2000). SDS merupakan detergen anionik yang akan memberikan muatan negatif pada protein yang akan dianalisa. SDS akan mengikat kuat protein terdenaturasi dalam jumlah yang setara dengan berat molekul protein membentuk kompleks protein-SDS yang bermuatan negatif dan protein akan tertarik ke arah anoda apabila ditempatkan pada suatu medan elektrik (Dunn, 1989 dalam Situmorang, 2003). Bromophenol blue merupakan pewarna yang dapat terionisasi dan diinjeksikan dalam sumur gel untuk memonitor proses elektroforesis. Gliserol berfungsi sebagai pemberat sehingga sampel mudah masuk dalam sumuran gel (Wilson dan Walker, 2000). Penentuan berat molekul dilakukan dengan menghitung Rf (Retardation faktor) dari tiap pita dan dibandingkan dengan protein standar yang berat molekulnya telah diketahui (Wilson dan Walker, 2000).

2.8 Kromatografi Lapis Tipis

Kromatografi lapis tipis merupakan metode yang digunakan dalam pemisahan komponen senyawa kimia di antara dua fase yaitu fase diam dan fase gerak (Kartasubrata, 1987 dalam Hayani dan Sukmasari, 2005). Fase diam akan menahan komponen campuran sedangkan fase gerak akan melarutkan zat komponen campuran. Metode ini murah, sederhana, dan dapat menganalisis beberapa komponen secara bersama-sama (Hernani, 1999 dalam Hayani dan Sukmasari, 2005). Fase diam yang umum digunakan adalah silika gel, aluminium oksida, kieselgur, selulosa dan turunannya, poliamida, dan lain-lain. Fase diam atau zat penyerap pada metode ini adalah lapisan tipis serbuk halus yang dilapiskan pada lempeng kaca, plastik, atau logam secara merata. Jenis penyangga, cara pembuatan, dan jenis pelarut yang digunakan mempengaruhi pemisahan hasil kromatografi yang didasarkan pada adsorbs, partisi atau kombinasi kedua efek (Sherma dan Fried, 2003).

2.9 Karakteristik Kitinase

Kitinase memiliki karakteristik yang sangat beragam. Beberapa sifat kitinase tersebut adalah berat molekul, suhu, pH, substrat spesifik, titik isoelektrik (pI), activator, inhibitor dan komposisi asam amino.

2.9.1 Berat molekul

Kitinase pada umumnya memiliki berat molekul antara 30-120 kDa. Untuk mengetahui berat molekul ini dapat dilakukan dengan 2 cara yaitu SDS-PAGE dan gel filtrasi. Berdasarkan penelitian pendahuluan, terdapat beberapa kitinase dengan sumber mikroba berbeda dan berat molekul yang berbeda pula. Jenis kitinase FI dari *Pseudomonas aeruginosa* K-187 memiliki berat molekul 30 kDa dengan menggunakan SDS-PAGE yang berarti berat molekul tersebut merupakan berat molekul monomer dari enzim. Kitinase FI merupakan dimer, sehingga pada pengukuran berat molekul dengan gel filtrasi menghasilkan 60 kDa (Wang^a dan Chang, 1997). Mikroba *Bacillus* sp. MH-1 dengan jenis kitinase Chi L memiliki berat molekul 71 kDa dengan SDS-PAGE, kitinase Chi M memiliki berat molekul 62 kDa dengan SDS-PAGE, kitinase Chi S memiliki berat molekul 53 kDa dengan SDS-PAGE (Sakai et al, 1998).

2.9.2 Suhu dan pH

Pada umumnya kitinase memiliki range pH optimum 3,5-9 dan suhu 40-75°C. Jenis kitinase FI dari *Pseudomonas aeruginosa* K-187 memiliki pH optimum 8 dan suhu optimum 50°C (Wang^a dan Chang, 1997). Mikroba *Bacillus* sp. MH-1 dengan jenis kitinase Chi L memiliki pH optimum 6,5 dan suhu optimum 75°C, kitinase Chi M memiliki pH optimum 5,5 dan suhu optimum 65°C, kitinase Chi L memiliki pH optimum 5,5 dan suhu optimum 75°C (Sakai et al, 1998). Kitinase Chi A dari *Streptomyces* sp. J-13-3 memiliki pH optimum 6 dan suhu optimum 45°C (Okazaki et al, 1995 dalam Haliza dan Suhartono, 2012).

2.9.3 Substrat spesifik

Sebagian besar substrat spesifik yang dihidrolisis oleh kitinase adalah koloidal kitin. Akan tetapi, terdapat substrat lain yang dapat dihidrolisis yaitu etilen glikol kitin yang dihidrolisis oleh kitinase dari *Aeromonas* sp. No.10S-24 (Ueda, 1992 dalam Haliza dan Suhartono, 2012), *Bacillus circulans* WL-12 (Watanabe, 1992 dalam Haliza dan Suhartono, 2012), dan *P. aeruginosa* K-187 (Wang^a dan

Chang, 1997). Pada *P. aeuroginosa* K-187, etilen glikol kitin berfungsi untuk menguji aktifitas kitinase dan lisozim.

2.9.4 Titik isoelektrik (pI)

Titik isoelektrik dapat ditentukan dengan kromatofocusing atau isoelektrik focusing. pI kitinase FI dari *P. aeuroginosa* K-187 adalah sebesar 5,2 (Wang^a dan Chang, 1997). pI kitinase Chi L dari *Bacillus* sp. MH-1 adalah 5,3; pI kitinase Chi M sebesar 4,8 dan pI kitinase Chi S adalah sebesar 4,7 (Sakai et al, 1998). Titik isoelektrik (pI) memiliki peran sangat penting karena akan menentukan muatan enzim yang akan berpengaruh pada matriks yang digunakan dalam kromatografi. Perbedaan pI suatu enzim dapat berbeda karena komposisi dari asam amino enzim (Haliza dan Suhartono, 2012).

2.9.5 Aktivator dan inhibitor

Suatu enzim memiliki aktivator dan inhibitor yang berbeda. Kitinase dari *Arthrobacter* sp. NHB-10 dapat dihambat oleh Hg^{2+} dan p-cloromercuribenzoic acid (Okazaki et al, 1995 dalam Haliza dan Suhartono, 2012). Kitinase dari *Aeromonas* sp. No.10S-24 memiliki inhibitor Ag^{2+} dan iodoacetic acid sertadapat ditingkatkan dengan p-CMB dan Ni^{2+} (Ueda, 1992 dalam Haliza dan Suhartono, 2012). Kitinase dari *Enterobacter* sp.G-1 dapat dihambat oleh EDTA dan p-CMB, tetapi dapat ditingkatkan dengan Ca^{2+} dan NaCl (Park et al, 1997 dalam Haliza dan Suhartono, 2012). Hal ini berbeda dengan kitinase dari *P. aeuroginosa* K-187 yang memiliki inhibitor Mn^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} , glutathione, dithiothreito, 2-mercaptopoethanol dan aktovator Cu^{2+} (Wang^a dan Chang, 1997).

2.9.6 Komposisi asam amino

Komposisi asam amino dari setiap mikroba berbeda, tetapi ada yang memiliki komposisi asam amino yang hamper sama dan hanya berbeda konsentrasi. Hal ini ditemukan pada kitinase dari *Aeromonas* sp. No.10S-24 memiliki komposisi

yang hampir sama dengan Pseudomonas aeruginosa K-187 tetapi berbeda konsentrasi. Pada kitinase dari Pseudomonas aeruginosa K-187 kaya akan asam amino Glx, Ser, Gly, Ala, Met, Leu (Wang^a dan Chang, 1997). Akan tetapi kitinase dari Aeromonas sp. No.10S-24 kaya akan Asx, Thr, Gly, Ala (Ueda, 1992 dalam Haliza dan Suhartono, 2012).



III METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Tempat dan Waktu Pelaksanaan

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Sentral Ilmu Hayati Universitas Brawijaya, Laboratorium Bioteknologi Pangan, Laboratorium Mikrobiologi Pangan dan Laboratorium Kimia & Biokimia Pangan Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Brawijaya Malang. Jangka waktu penelitian adalah 8 bulan terhitung sejak Oktober 2013 hingga Juni 2014.

3.2 Alat dan Bahan

3.2.1 Alat

Peralatan yang digunakan dalam penelitian adalah autoklaf, incubator (Binder), kompor listrik (Maspion), *vortex*, *Laminar Air Flow*, oven, sentrifugator (Thermo scientific), lemari asam, *shaker waterbath* (Memmert), timbangan digital (Ohaus), spektrofotometer (Jenway), mikropipet, *magnetic stirrer* (Star), pH meter, elektroforesis (Bio-Rad).

Perangkat gelas dan non gelas yang digunakan dalam penelitian ini adalah gelas beaker, tabung reaksi, cawan petri, erlemeyer, labu ukur, pipet ukur, pipet tetes, gelas ukur, kuvet, *blue tip*, *yellow tip*, *tube sentrifuse*, *hockey glass*, *plastic wrap*, *aluminium foil*, spatula, ose, Bunsen, rak tabung reaksi, dan kantong Selofan.

3.2.2. Bahan

Sampel yang digunakan untuk isolasi mikroorganismen diambil dari tanah di sekitar limbah industri petis. Bahan kimia yang digunakan antara lain akuades, alkohol 70%, NaOH 1%, HCl pekat 37%, *Dinitrosalicylic acid*, fenol, natrium sulfit, NaOH, Na-K-Tartarat, 0,4 M Na₂HPO₄, 0,4 M NaH₂PO₄, reagen Bradford, *Bovine Serum Albumin* (BSA), 1 M NaOH, 50 mM Tris-HCl pH 7, 5 mM 2-

merkaptotanol, 1 mM EDTA, tris-base, glisin, SDS 10%, 1 M tris-HCl pH 6,8, gliserol 50%, *bromophenol blue*, stok akrilamid 30%, 1,5 M tris-Cl pH 8,8, TEMED, APS 10%, etilen glikol kitin 0,5%, 1 M tris-Cl pH 6,8, *commassie brilliant blue*, metanol, asam asetat, etanol 95%, Congo Red 0,1%, N-asetil-D-glukosamin, butanol, ammonia 25% plat KLT gel silika 60 F₂₅₄, H₂SO₄, ZnSO₄.7H₂O. Bahan yang digunakan dalam pembuatan media yaitu kitin, agar, KH₂PO₄, pepton, NaCl, dan MgSO₄.7H₂O.

3.3 Metode Penelitian

Metode penelitian yang digunakan adalah deskriptif. Hasil penelitian dipaparkan secara deskriptif berdasarkan tahapan penelitian yang dilakukan. Hasil pengujian aktivitas enzim kitinase dipaparkan secara kuantitatif.

3.4 Pelaksanaan

3.4.1 Preparasi koloidal kitin

Kitin sebanyak 30 gram dihomogenkan dengan 330 ml HCl pekat (37%) dalam beaker glass 1 L selama \pm 1 jam. Dituang ke dalam ember yang telah berisi es dan akuades, kemudian dibiarkan semalaman. Endapan dicuci dengan akuades hingga mencapai pH 6-7. Kemudian dipisahkan antara bagian bening dengan pellet (koloidal kitin). Pellet dihitung berat keringnya dengan cara dioven selama \pm 5 jam.

3.4.2 Isolasi bakteri

Sampel tanah ditimbang sebanyak 5 g dan dihomogenkan dengan 45 ml akuades sehingga menjadi suspensi pengenceran 10^{-1} . Suspensi tersebut kemudian dilakukan pengenceran hingga 10^{-7} . Pengenceran 10^{-4} hingga 10^{-7} diinokulasikan pada media agar koloidal kitin dengan metode *pour plate*. Media agar koloidal kitin mengandung koloidal kitin 3 g/L, pepton 8 g/L, NaCl 1 g/L,

KH_2PO_4 1 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,5 g/L, dan agar 15 g/L. Inkubasi dilakukan pada suhu 37 °C selama 48-72 jam. Koloni bakteri kitinolitik akan membentuk zona bening. Selanjutnya koloni dengan zona bening terbesar tersebut dimurnikan dengan metode streak kuadran. Koloni tunggal yang tumbuh disimpan dalam agar miring pada tabung reaksi.

3.4.3 Pewarnaan Gram

Gelas obyek dibersihkan dengan alkohol 70% kemudian ditetesi dengan aquades. Sebanyak 1 ose mikroba dari biakan miring isolat dioleskan pada gelas obyek kemudian dilewatkan di atas api hingga terbentuk apusan. Apusan bakteri tersebut ditetesi dengan larutan Gram A yaitu Kristal violet dan dibiarkan selama 1 menit kemudian dicuci dengan tetesan air mengalir dan dikering anginkan. Setelah itu ditetesi dengan larutan Gram B (iodin) selama 1 menit kemudian dicuci dengan tetesan air mengalir dan dikering anginkan kembali. Preparat ditetesi dengan larutan Gram C yaitu etanol-aseton dan didiamkan selama setengah menit. Preparat dicuci kembali dengan tetesan air mengalir dan dikering anginkan. Preparat ditetesi kembali dengan larutan Gram D yaitu safranin dan didiamkan selama 1 menit. Kemudian preparat dicuci dengan tetesan air mengalir dan dikering anginkan. preparat diberi tetesan aquades dan ditutup dengan gelas penutup.

3.4.4 Kurva Pertumbuhan

Isolat bakteri diinokulasikan ke dalam 20 ml media koloidal kitin cair dan diinkubasi pada *shaker waterbath* dengan kecepatan 120 rpm, suhu 37°C selama 24 jam. Suspensi dituang ke dalam 200 ml media koloidal kitin cair dan diinkubasi dalam *shaker waterbath* dengan kecepatan 120 rpm, suhu 37°C. Suspensi diambil setiap 2 jam sekali sampai jam ke 14 dan selanjutnya diambil tiap 6 jam. Absorbansi diukur pada panjang gelombang 581 nm.

3.4.5 Isolasi dan Pemurnian Enzim Kitinase

Kultur bakteri diinokulasikan dalam 30 ml media koloidal kitin cair. Kultur diinkubasi selama 24 jam dalam inkubator bergoyang dengan kecepatan 120 rpm pada 37°C. Suspensi tersebut dituang ke dalam 300 ml media koloidal kitin cair dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 14 jam. Suspensi disentrifugasi dengan kecepatan 7000 rpm selama 20 menit. Supernatan yang dihasilkan merupakan ekstrak enzim kasar. Supernatan ditambah dengan koloidal kitin sebanyak 0,15% dari total volume supernatan dan diinkubasi pada suhu 4°C selama 1 jam. Kemudian dilakukan sentrifugasi pada suhu 4°C dengan kecepatan 7000 rpm selama 20 menit sehingga diperoleh endapan enzim. Supernatan yang diperoleh dibuang, sedangkan endapan dicuci dalam buffer natrium fosfat pH 7 dan disentrifugasi kembali pada suhu 4°C dengan kecepatan dan waktu yang sama. Pencucian dengan buffer natrium fosfat pH 7 dilakukan sebanyak 3-4 kali. Endapan yang diperoleh ditambah dengan buffer natrium fosfat pH 7 dan diinkubasi pada suhu optimum (37°C) sampai koloidal kitin habis sekitar 48 jam. Larutan enzim yang diperoleh dimasukkan ke dalam kantong selofan dan dilakukan dialisis dengan merendam kantong selofan dalam buffer natrium fosfat pH 7 pada gelas beaker. Tahap dialisis dilakukan pada suhu 4°C dan diaduk menggunakan *magnetic stirrer* selama semalam. Buffer natrium fosfat diganti setiap 6 jam. Larutan enzim yang diperoleh diuji aktivitasnya.

3.4.6 Uji Aktivitas Enzim Kitinase

Sampel enzim sebanyak 0,5 ml ditambah dengan 0,5 ml koloidal kitin 0,3% (dalam buffer natrium fosfat pH 7) diinkubasi pada suhu 37°C selama 1 jam. Reaksi dihentikan dengan menambahkan 1 ml NaOH 1% dan dididihkan selama 5 menit. Kemudian dilakukan sentrifugasi pada suhu 4°C dengan kecepatan 7000 rpm selama 15 menit sehingga didapatkan pelet dan supernatan 1 ml supernatan ditambah dengan 1 ml DNS 1% dan dididihkan selama 5 menit. Absorbansi diukur pada panjang gelombang 575 nm. Aktivitas enzim dihitung dengan rumus:

$$\text{Aktivitas (U/ml)} = \frac{[N - \text{asetil} - D - \text{glukosamin}] \times V \times fp}{Mr N - \text{asetil} - D - \text{glukosamin} \times p \times q}$$

Keterangan : V = volume larutan

q = waktu inkubasi (menit)

P = volume enzim

fp = faktor pengenceran

3.4.7 Pengaruh pH pada Aktivitas Enzim Kitinase

0,5 ml enzim ditambah dengan 0,5 ml koloidal kitin 0,3% dalam buffer natrium fosfat dengan variasi pH 5; 5,5; 6; 6,5; 7; 7,5; 8. Kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 1 jam. Reaksi dihentikan dengan menambahkan 1 ml NaOH 1% dan dididihkan selama 5 menit. Selanjutnya disentrifugasi pada suhu 4°C dengan kecepatan 7000 rpm selama 15 menit. 1 ml supernatan yang diperoleh ditambah dengan 1 ml DNS 1% dan dididihkan selama 5 menit. Kemudian diukur absorbansi pada panjang gelombang 575 nm.

3.4.8 Pengaruh Suhu pada Aktivitas Enzim Kitinase

Enzim sebanyak 0,5 ml ditambahkan dengan 0,5 ml koloidal kitin 0,3% dalam buffer natrium fosfat pH 7 dengan variasi suhu 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60°C. Kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 1 jam. Reaksi dihentikan dengan menambahkan 1 ml NaOH 1% dan dididihkan selama 5 menit. Selanjutnya disentrifugasi pada suhu 4°C dengan kecepatan 7000 rpm selama 15 menit. Sebanyak 1 ml supernatan yang diperoleh ditambah dengan 1 ml DNS 1% dan dididihkan selama 5 menit. Kemudian diukur absorbansi pada panjang gelombang 575 nm.

3.4.9 Kestabilan Enzim Kitinase Terhadap pH

Enzim sebanyak 0,5 ml ditambah dengan 0,5 ml buffer natrium fosfat dengan variasi pH 5; 5,5; 6; 6,5; 7; 7,5; 8 dan diinkubasi selama 1 jam pada suhu 35°C. Ditambahkan 0,5 ml koloidal kitin 0,3% dalam buffer natrium fosfat pH 7 dan diinkubasi pada suhu 35°C selama 1 jam. Reaksi dihentikan dengan

menambahkan 0,5 ml NaOH 1% dan dididihkan selama 5 menit. Kemudian disentrifugasi pada suhu 4°C dengan kecepatan 7000 rpm selama 15 menit. Supernatan sebanyak 1 ml ditambah dengan 1 ml DNS dan dididihkan selama 5 menit. Absorbansi diukur pada panjang gelombang 575 nm.

3.4.10 Kestabilan Enzim Kitinase Terhadap Suhu

Enzim sebanyak 0,5 ml ditambah dengan 0,5 ml buffer natrium fosfat pH 7 dan diinkubasi selama 1 jam pada variasi suhu 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60°C. Ditambahkan 0,5 ml koloidal kitin 0,3% dalam buffer natrium fosfat pH 7 dan diinkubasi pada suhu 35°C selama 1 jam. Reaksi dihentikan dengan menambahkan 0,5 ml NaOH 1% dan dididihkan selama 5 menit. Kemudian disentrifugasi pada suhu 4°C dengan kecepatan 7000 rpm selama 15 menit. Supernatan sebanyak 1 ml ditambah dengan 1 ml DNS dan dididihkan selama 5 menit. Absorbansi diukur pada panjang gelombang 575 nm.

3.4.11 Uji Spesifisitas Substrat

Enzim sebanyak 0,5 ml ditambah dengan 0,5 ml serbuk kitin, serbuk kitosan, etilen glikol kitin, koloidal kitin, koloidal kitosan dalam buffer natrium fosfat pH 7. Kemudian diinkubasi selama 1 jam pada suhu 35°C. Reaksi dihentikan dengan penambahan 0,5 ml NaOH 1% dan dididihkan selama 5 menit. Kemudian disentrifugasi pada suhu 4°C dengan kecepatan 7000 rpm selama 15 menit. supernatan sebanyak 1 ml ditambah dengan 1 ml DNS dan dididihkan selama 5 menit. Absorbansi diukur pada panjang gelombang 575 nm.

3.4.12 Penentuan Berat Molekul Enzim dengan SDS-PAGE dan Zimogram

Enzim sebanyak 30 µl ditambahkan dengan 10 µl RSB (*Running Sample Buffer*). Kemudian dipanaskan dalam air dengan suhu 100°C selama 5 menit untuk SDS-PAGE dan dipanaskan pada suhu 35°C (suhu optimum) untuk zimogram. Setelah dingin, sampel dimasukkan ke dalam sumur-sumur gel SDS-

PAGE dengan volume 30 μ l untuk tiap sumur. Power supply dihubungkan ke listrik dengan arus listrik 120 volt selama \pm 4 jam. Proses pemisahan dihentikan setelah warna biru penanda \pm 0,5 cm dari batas bawah plate gel. Gel hasil elektroforesis dipotong menjadi 2 bagian. Gel bagian pertama digunakan untuk pewarnaan dengan staining solution sedangkan gel bagian kedua untuk zimogram.

Gel pertama direndam dalam staining solution selama 30 menit kemudian direndam dalam destaining solution. Gel bagian kedua direndam dalam buffer renaturasi selama 2 jam (diganti tiap 30 menit) sambil digoyang konstan. Kemudian dibilas dengan aquades. Gel direndam dalam 25% propanol selama 15 menit dan dibilas dengan aquades. Gel direndam dalam buffer natrium fosfat 0,2 M pH 7 selama semalam dan diinkubasi pada *shaker waterbath* suhu 35°C. Setelah itu bufer natrium fosfat diganti dengan yang baru dan diinkubasi kembali selama 15 menit. Gel direndam dalam pewarna *congo red* selama 15 menit kemudian dicuci dengan NaCl 1 M selama 10 menit (diganti beberapa kali).

3.4.13 Kromatografi Lapis tipis

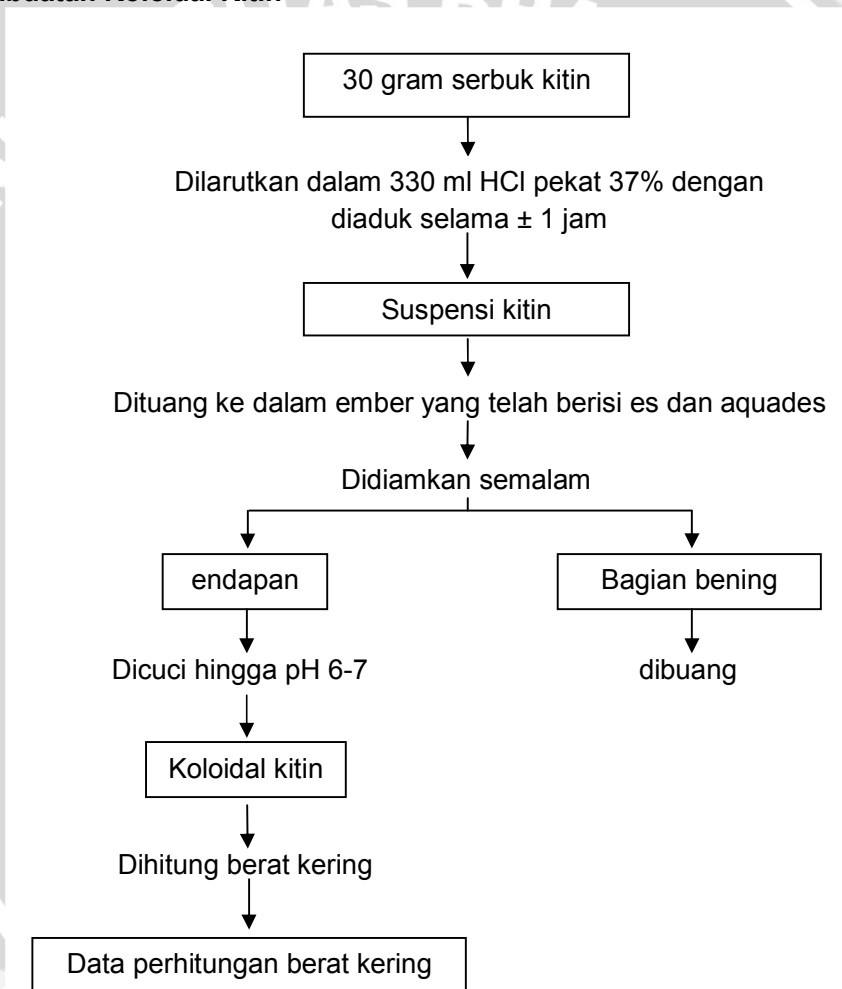
Kromatografi lapis tipis menggunakan plat KLT gel silica 60 F₂₅₄ sebagai fase diam dengan n-butanol, methanol, ammonia 25%, aquades (5:4:2:1/v:v:v) sebagai fase gerak. Visualisasi dilakukan dengan menggunakan reagen sulfat dan dipanaskan pada suhu 120°C selama 10 menit. 0,3 ml enzim ditambah dengan 0,3 ml koloidal kitin 0,3% dalam bufer natrium fosfat 0,2 M pH 7 dan diinkubasi pada suhu 35°C selama 1 jam. Kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 8000 rpm selama 15 menit suhu 4°C. Supernatan yang diperoleh ditotolkan pada plat KLT menggunakan pipa kapiler. Standar yang digunakan adalah 0,5 ml N-asetil-D-glukosamin 0,5% dan kontrol negatif 0,3 ml koloidal kitin 0,3% dalam 0,2 M buffer natrium fosfat pH 7. Kontrol negatif diberi perlakuan yang sama dengan sampel. Eluen dicampur terlebih dahulu dan dijenuhkan dalam chamber serta ditutup rapat. Hal tersebut bertujuan agar udara dalam chamber terjenuhkan dengan uap pelarut (Wibowo, 2010). Lalu plat KLT yang telah ditotol dengan sampel dimasukkan ke dalam eluen hingga eluen mencapai batas atas. Plat KLT disemprot dengan reagen sulfat dan ditunggu hingga kering, kemudian plat KLT dipanaskan dalam oven suhu 120°C selama 10 menit.

3.5 Pengamatan dan Analisis Data

Pengamatan dilakukan pada enzim hasil dialisis. Pengamatan yang dilakukan meliputi uji aktivitas enzim, kadar protein, pengaruh suhu dan pH pada aktivitas enzim kitinase, kestabilan enzim kitinase terhadap suhu dan pH, SDS-PAGE dan pewarnaan aktivitas enzim dengan zimogram. Data yang diperoleh akan dibahas secara kuantitatif.

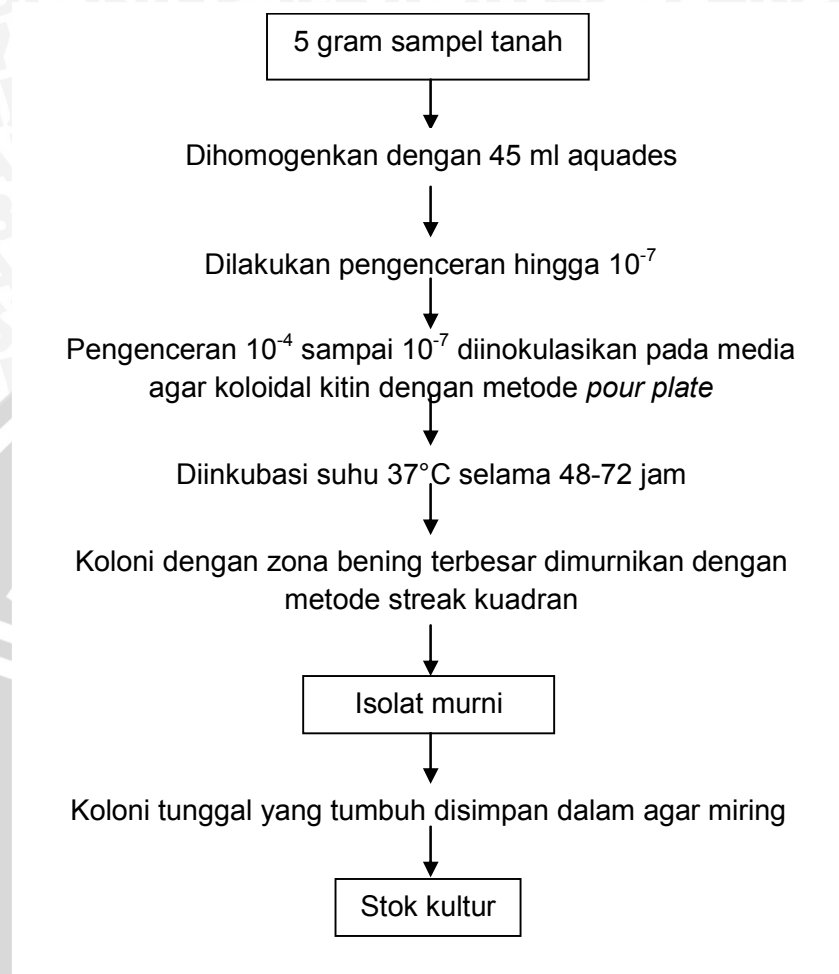
3.6 Diagram Alir

3.6.1 Pembuatan Koloidal Kitin



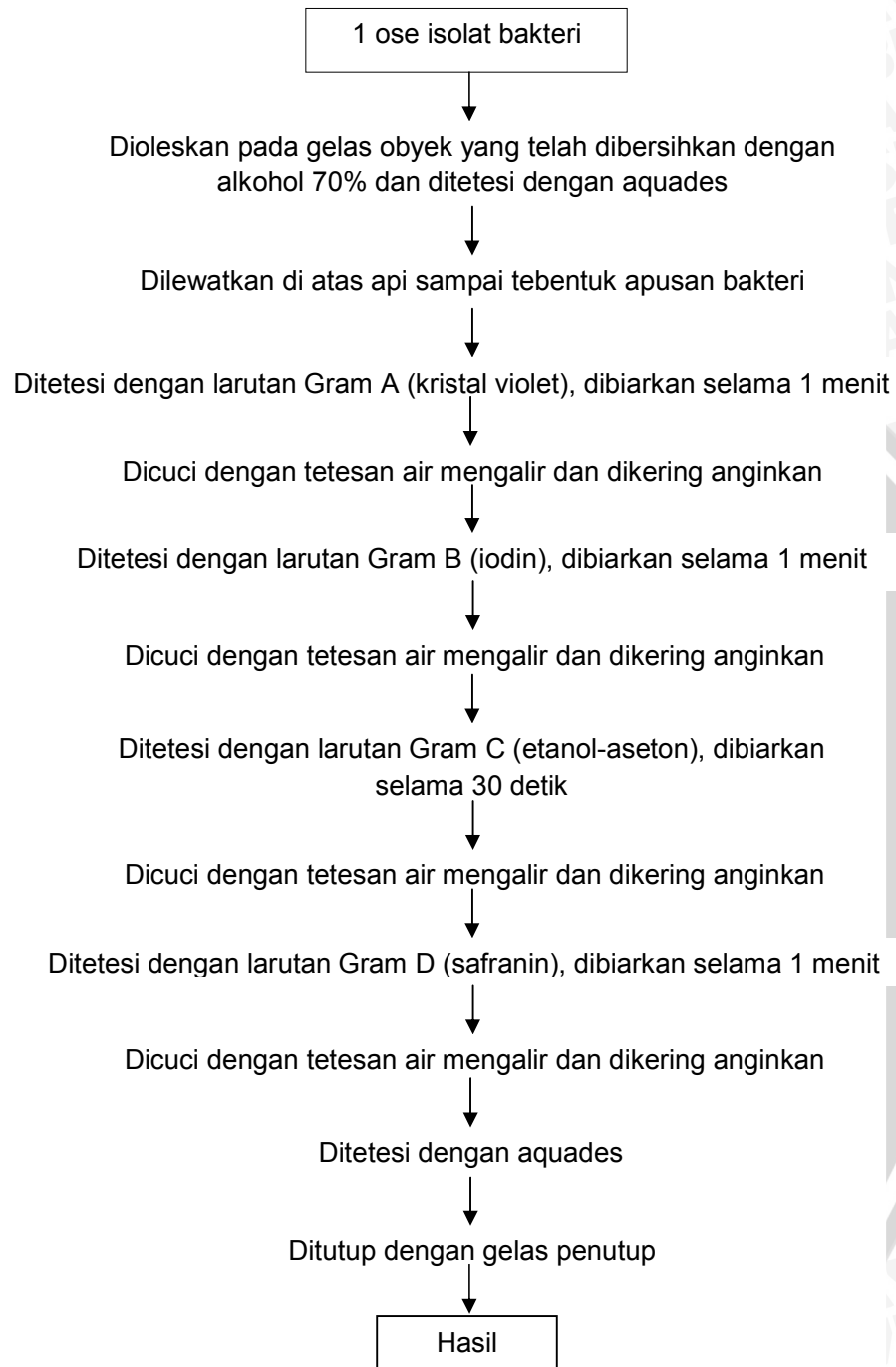
Gambar 8 Diagram Alir Pembuatan Koloidal Kitin (Modifikasi Kurniawan, 2009)

3.6.2 Isolasi Bakteri



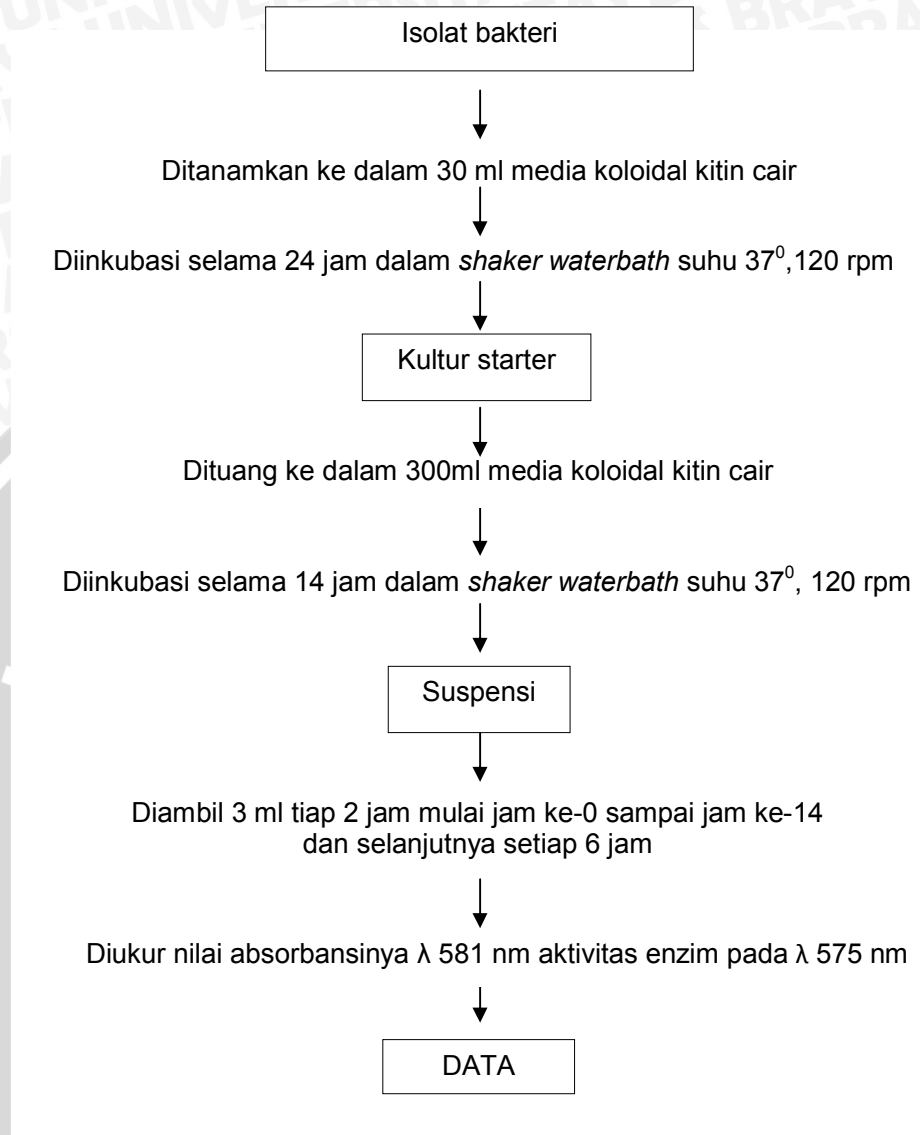
Gambar 9 Diagram Alir Isolasi Bakteri (Modifikasi Kurniawan, 2009)

3.6.3 Pewarnaan Gram



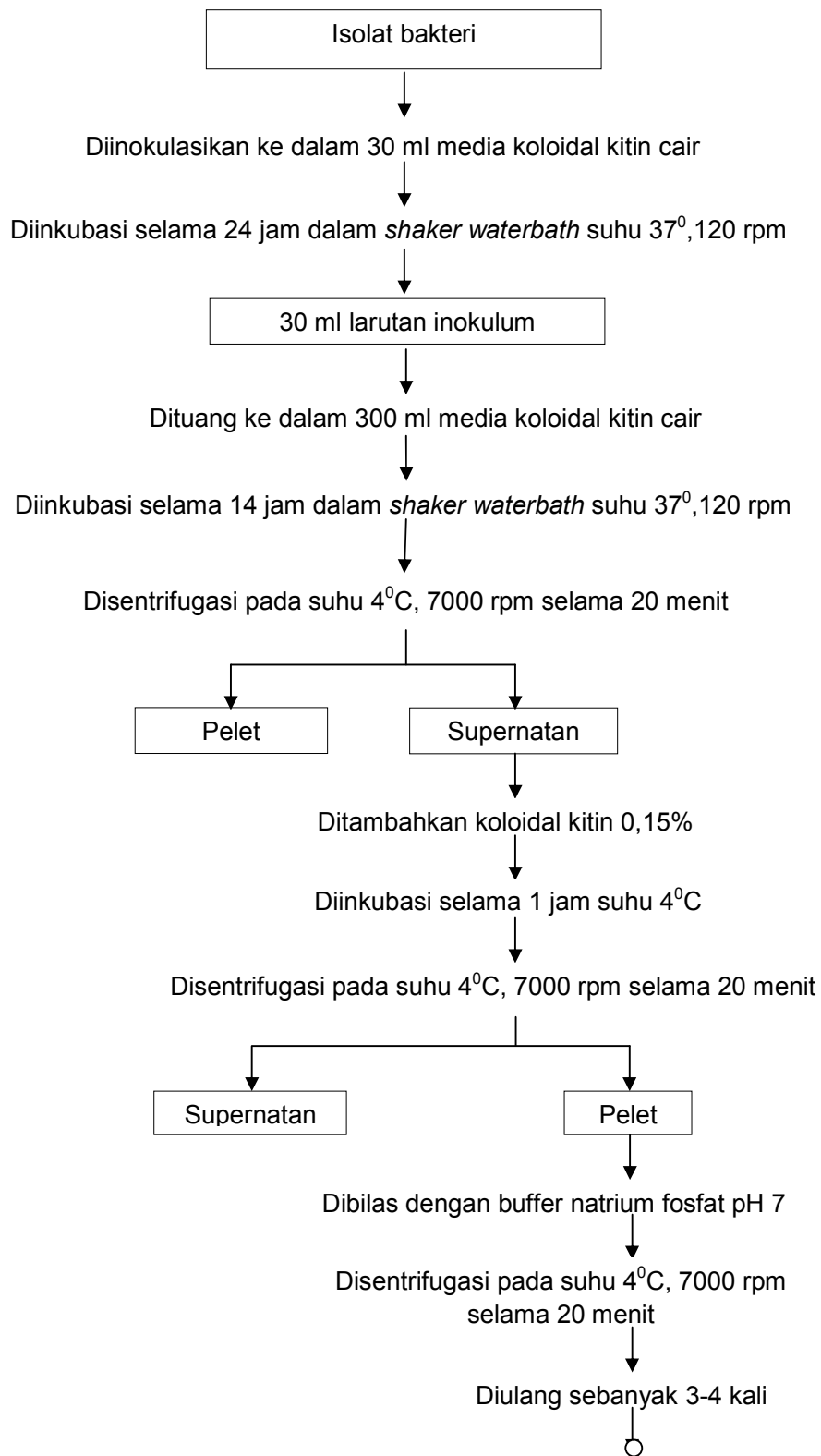
Gambar 10 Diagram Alir Pewarnaan Gram (Modifikasi Kurniawan, 2009)

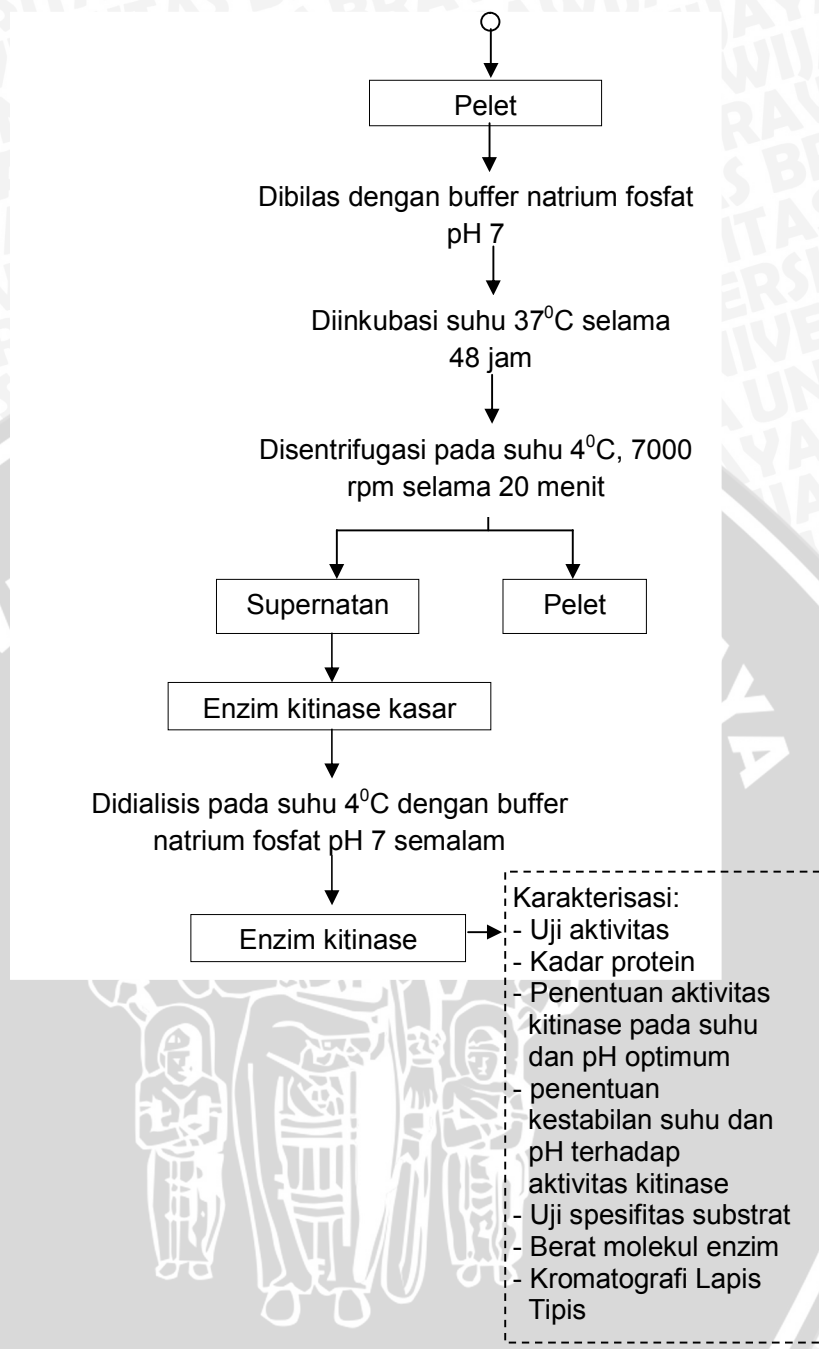
3.6.4 Kurva Pertumbuhan Mikroba



Gambar 11 Diagram Alir Kurva Pertumbuhan Mikroba (Modifikasi Kurniawan, 2009)

3.6.5 Isolasi dan Pemurnian Enzim Kitinase

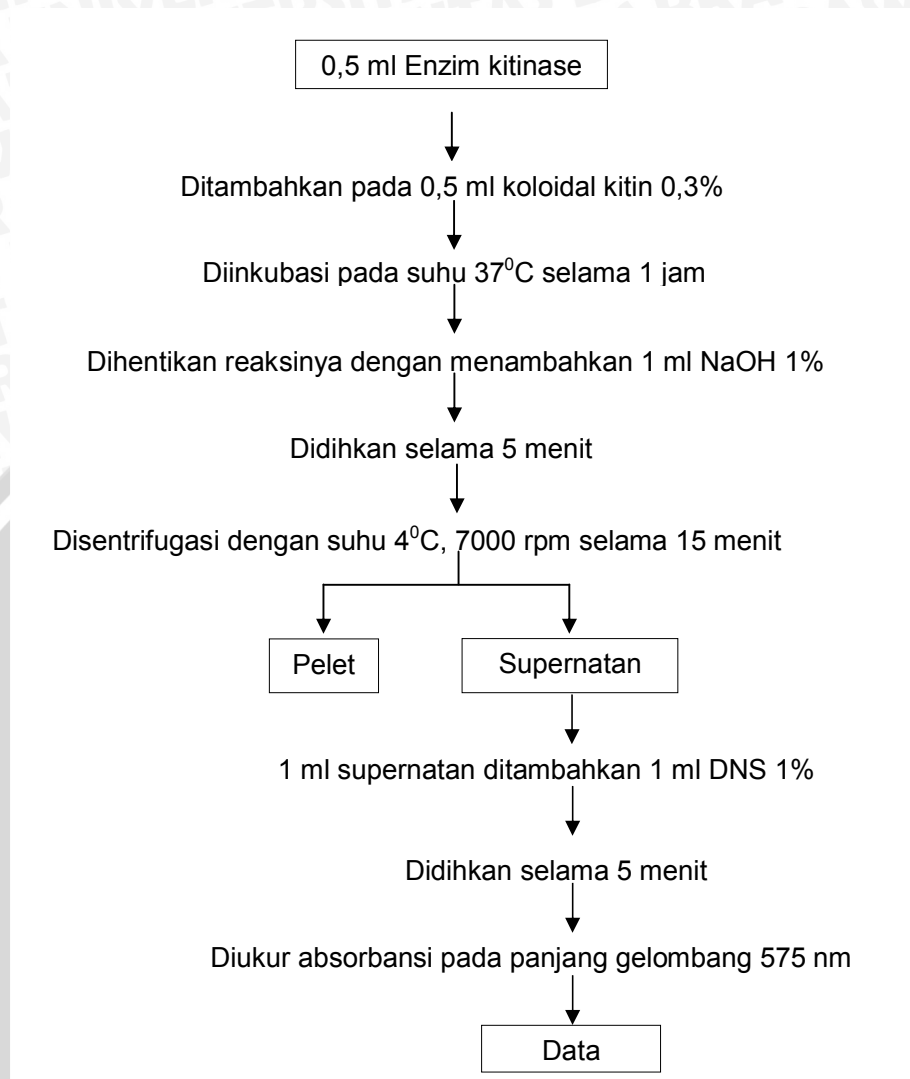




Gambar 12 Diagram Alir Isolasi dan Pemurnian Enzim Kitinase (Modifikasi Apriani, 2008; Kurniawan, 2009)

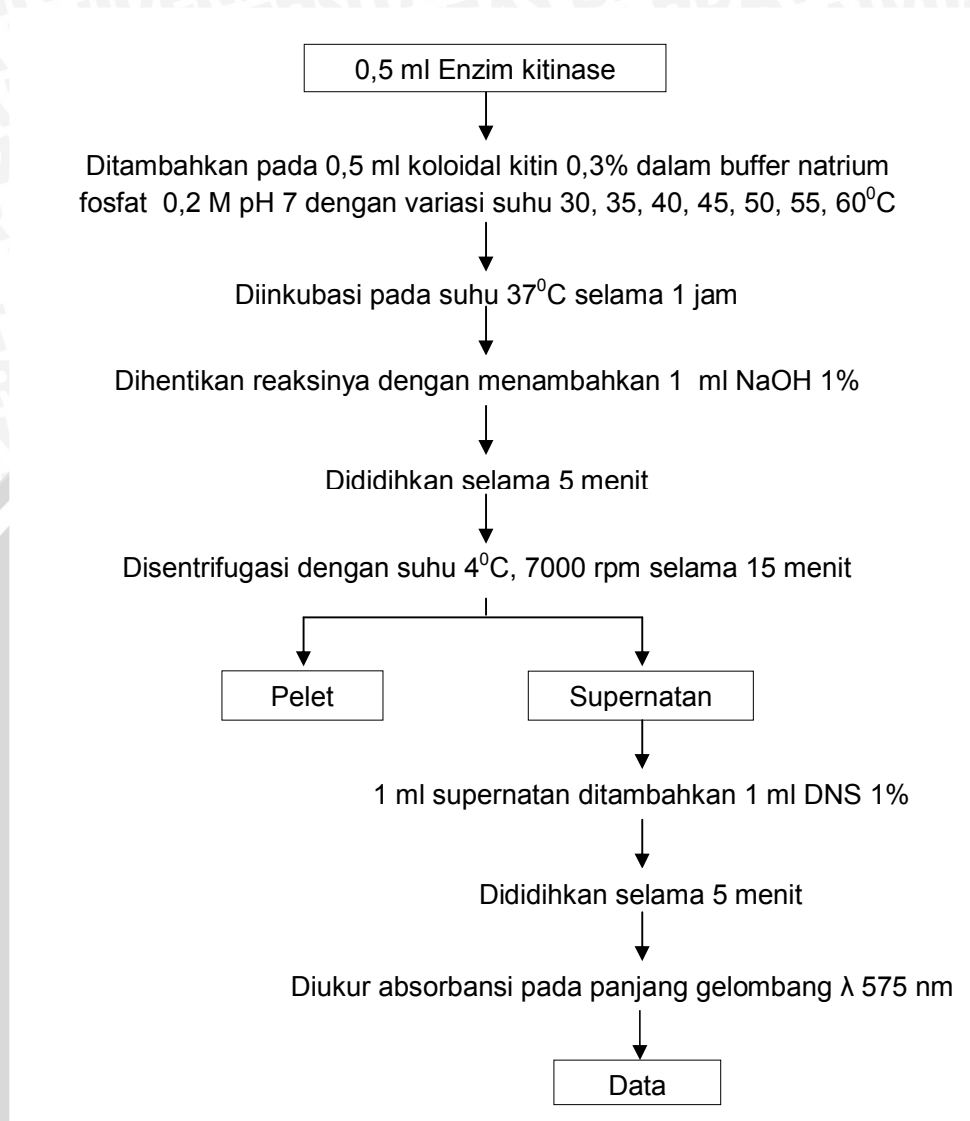


3.6.6 Pengukuran Aktivitas Enzim Kitinase



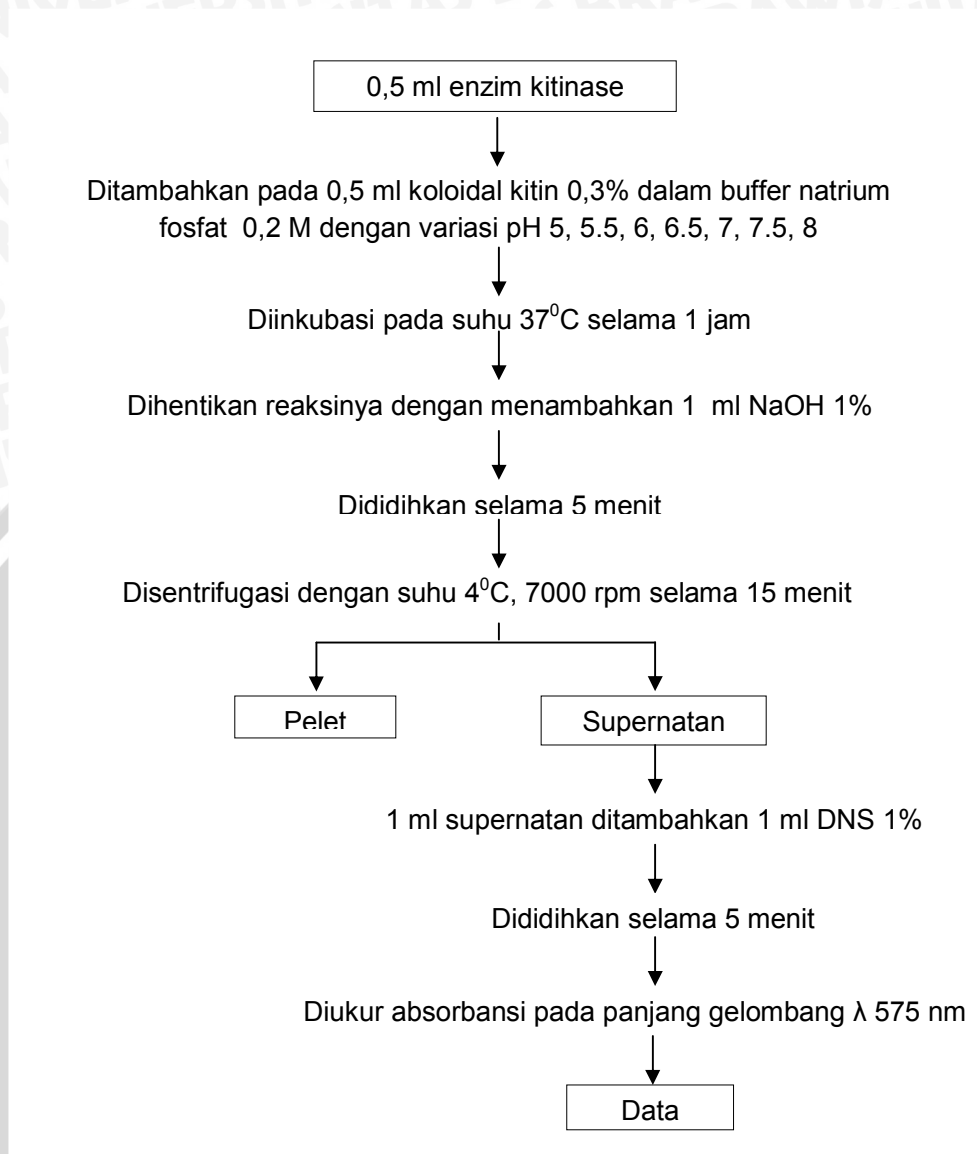
Gambar 13 Diagram Alir Pengukuran Aktivitas Enzim Kitinase (Modifikasi Ramirez-Cautino *et al*, 2006)

3.6.7 Pengaruh Suhu pada Aktivitas Enzim Kitinase



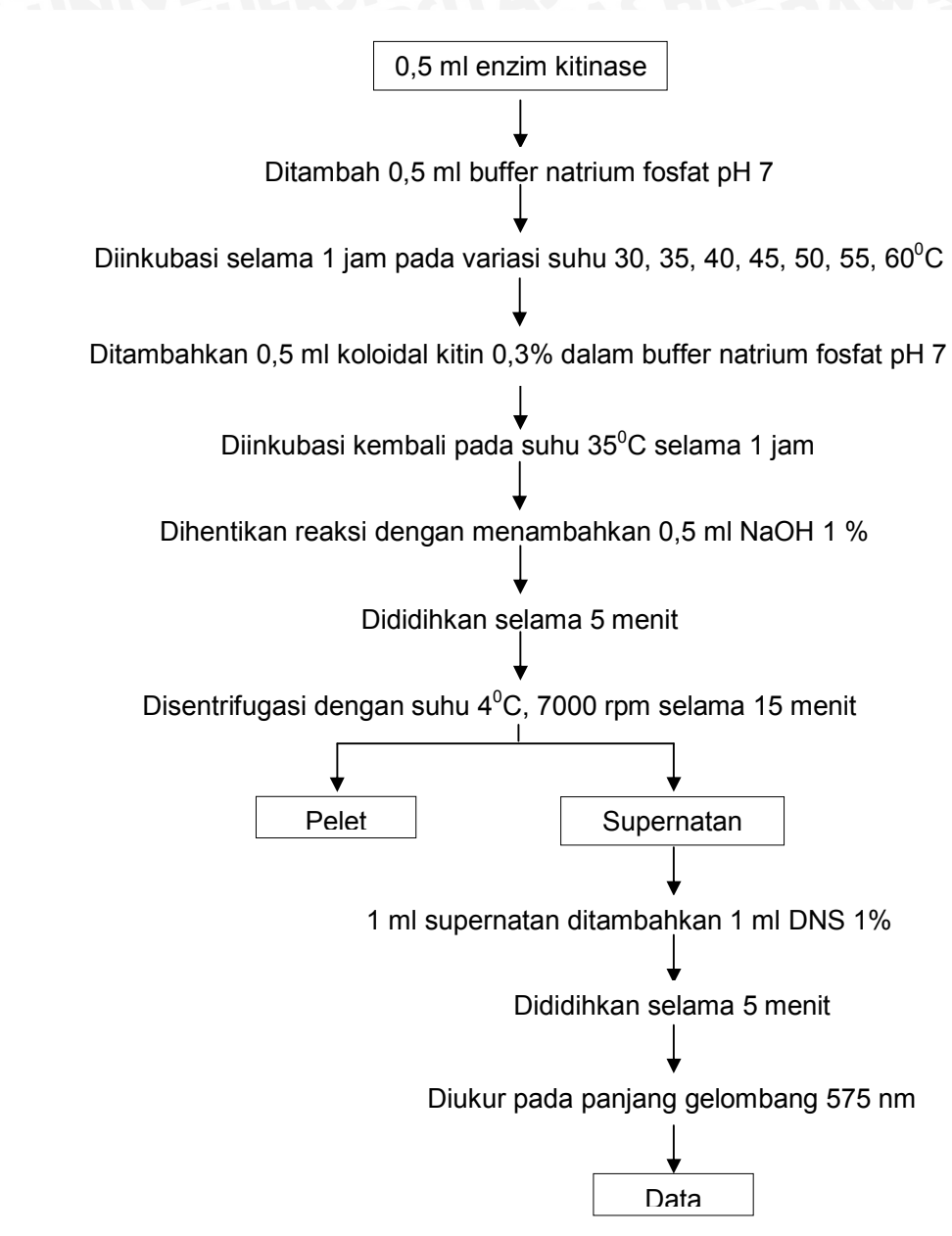
Gambar 14 Diagram Alir Pengaruh Suhu pada Aktivitas Enzim Kitinase (Modifikasi Apriani, 2008; Cho et al, 2011)

3.6.8 Pengaruh pH pada Aktivitas Enzim Kitinase



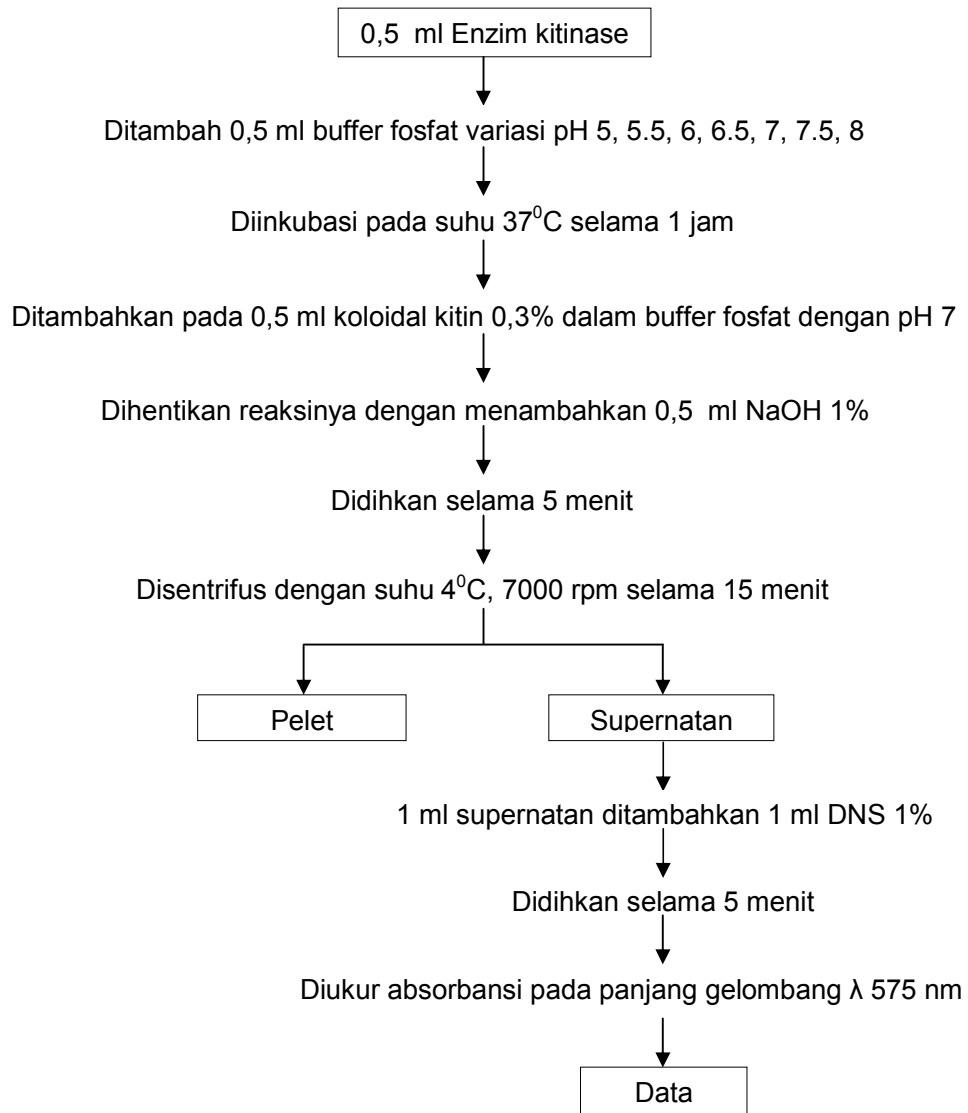
Gambar 15 Diagram Alir Pengaruh pH pada Aktivitas Enzim Kitinase (Modifikasi Apriani, 2008; Cho *et al*, 2011)

3.6.9 Kestabilan Enzim Kitinase Terhadap Suhu



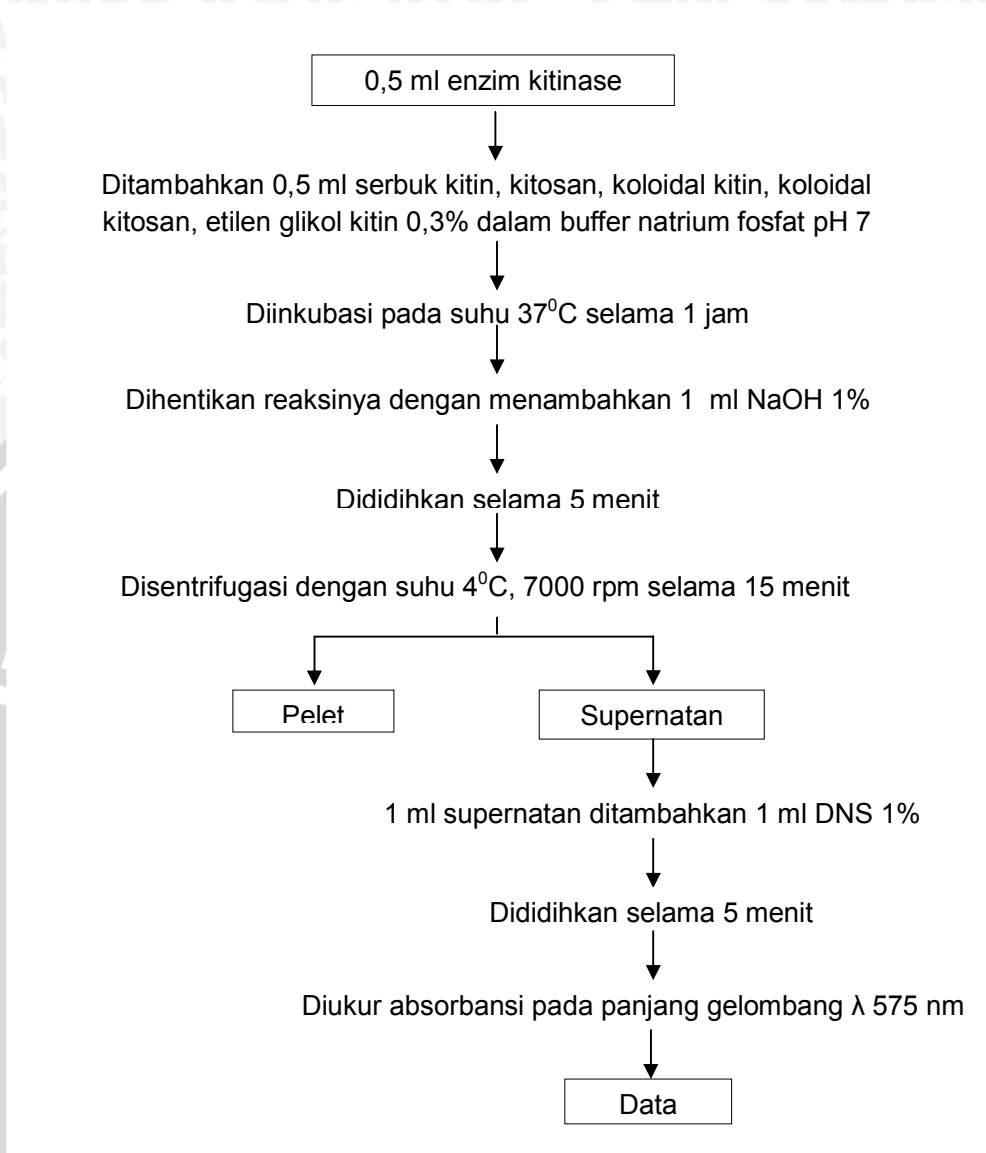
Gambar 16 Diagram Alir Kestabilan Enzim Kitinase Terhadap Suhu (Modifikasi Kurniawan, 2009)

3.6.10 Kestabilan Enzim Kitinase Terhadap pH



Gambar 17 Diagram Alir Kestabilan Enzim Kitinase Terhadap pH (Modifikasi Kurniawan, 2009)

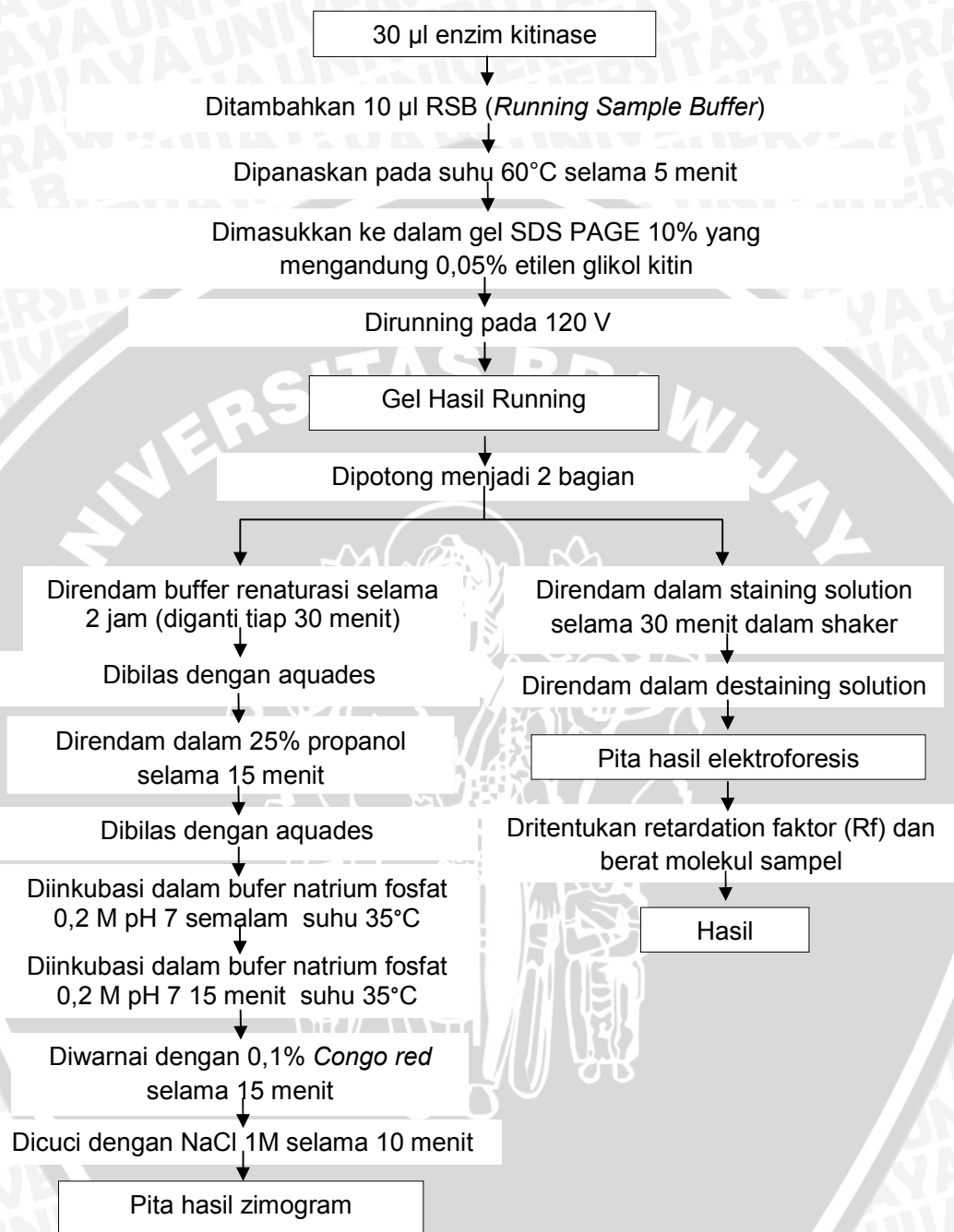
3.6.11 Uji Spesifisitas Substrat



Gambar 18 Diagram Alir Uji Spesifisitas Substrat (Modifikasi Kurniawan, 2009)



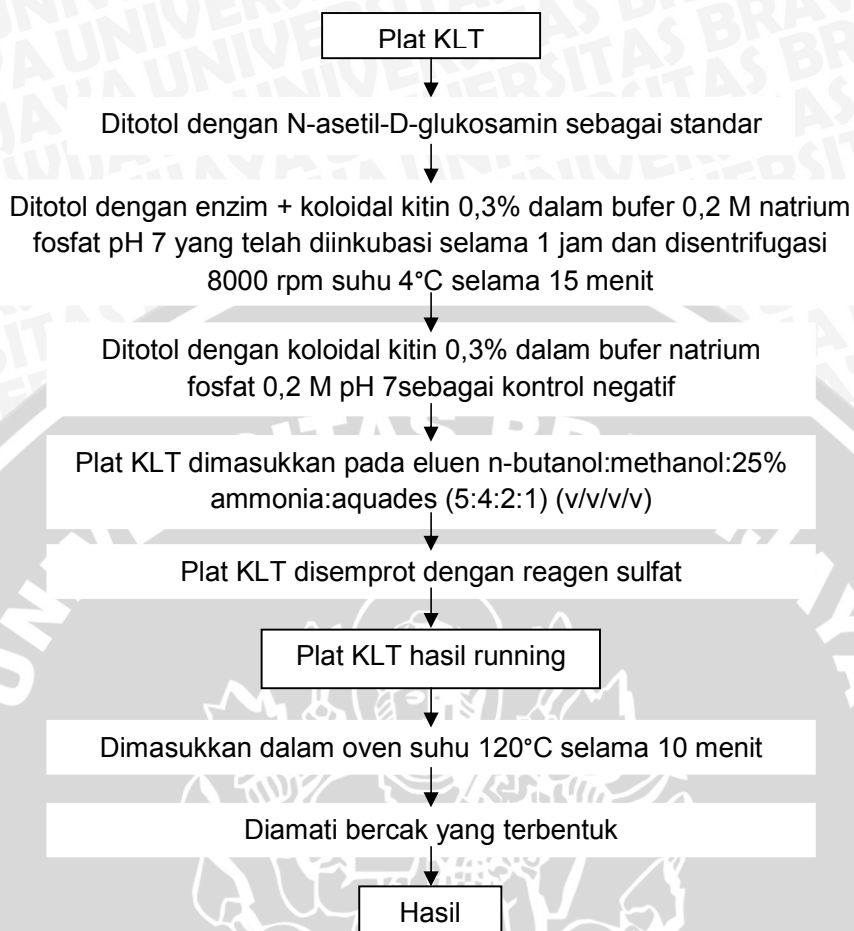
3.6.12 Penentuan Berat Molekul Enzim dengan SDS-PAGE dan Zimogram



Gambar 19 Diagram Alir Penentuan Berat Molekul Enzim dengan SDS-PAGE dan Zimogram (Modifikasi Situmorang, 2003)



3.6.13 Deteksi Produk Hidrolisis dengan Kromatografi Lapis Tipis



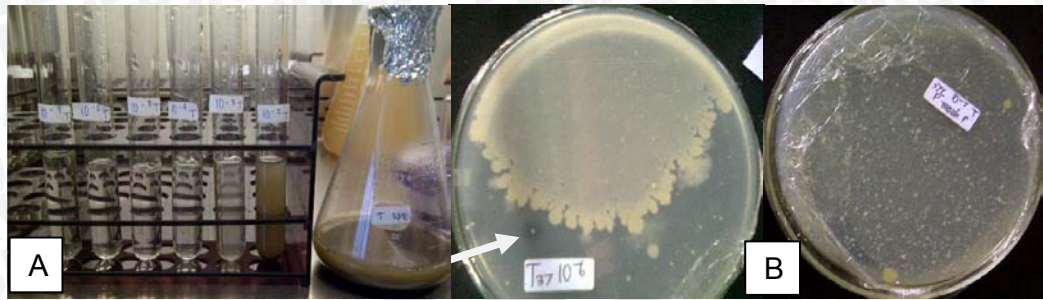
Gambar 20 Diagram Alir Deteksi Produk Hidrolisis dengan Kromatografi Lapis Tipis (Modifikasi Maggadani, 2012)

IV HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Isolasi dan Seleksi Mikroba Kitinolitik

Tanah diduga mengandung nutrisi yang sangat kompleks sehingga berbagai macam mikroorganisme dapat tumbuh dengan baik. Pada penelitian ini sampel diambil dari tanah limbah industri petis udang Sidoarjo. Sampel dilakukan pengenceran hingga 10^{-7} dengan aquades steril dan diinokulasikan pada media agar koloidal kitin. Pengenceran bertujuan agar mikroba yang tumbuh tidak terlalu banyak sehingga mudah untuk melakukan skrining mikroba kitinolitik. Pada penelitian ini mikroba kitinolitik lebih cepat diperoleh karena sampel telah mengalami pengkayaan dengan substrat secara alami dalam waktu yang lama. Hal tersebut disebabkan karena tanah terletak pada pembuangan limbah industri petis udang sehingga tanah tidak perlu dilakukan pengkayaan dengan kitin (substrat).

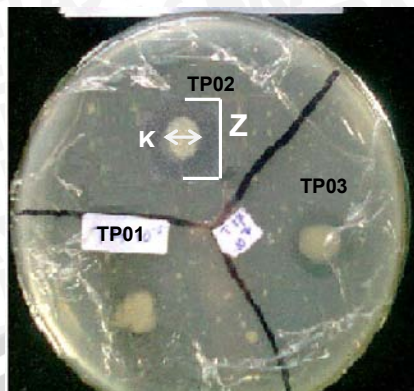
Isolasi mikroba merupakan suatu tahapan yang dilakukan untuk memisahkan satu mikroba dengan mikroba yang lain sehingga dapat mempelajari morfologi mikroba dan sifat mikroba yang lainnya (Waluyo, 2008). Isolasi mikroba berfungsi untuk mendapatkan biakan murni (Yulneriwarni, 2008). Media atau substrat yang digunakan untuk pertumbuhan mikroba akan mempengaruhi hasil isolasi dan pemeliharaan mikroba. Jenis dan ketersediaan substrat menentukan proses fermentasi dan proses produksi. Oleh karena itu media dan substrat yang digunakan harus tepat untuk mendukung keberhasilan proses isolasi. Media selektif merupakan media yang dapat digunakan dalam proses isolasi mikroba karena dapat merangsang pertumbuhan mikroba yang diinginkan dan menghambat pertumbuhan mikroba yang tidak diharapkan (Yulneriwarni, 2008). Isolasi mikroba dilakukan pada 3 suhu yang berbeda yaitu 37°C , 46°C , dan 55°C dengan metode agar tuang pada media agar koloidal kitin selama 72 jam. Hal tersebut dilakukan untuk mengetahui suhu pertumbuhan mikroba. Hasil isolasi pada media agar koloidal kitin menunjukkan adanya pertumbuhan mikroba pada suhu 37°C yang ditandai dengan adanya zona bening di sekitar koloni mikroba.



Gambar 21 Pengenceran (A) dan Hasil Isolasi Mikroba Kitinolitik pada Suhu 37°C (B)

Mikroba kitinolitik yang diperoleh diremajakan dan dimurnikan dalam media agar koloidal kitin. Menurut Yulneriwarni (2008), pemurnian mikroba hasil isolasi perlu dilakukan berulang kali untuk memastikan bahwa koloni yang tumbuh merupakan koloni yang berasal dari satu sel. Hal tersebut dikarenakan tidak semua mikroba dapat membentuk mikrokoloni yang terpisah sempurna. Mikroorganisme kitinolitik dapat diseleksi dengan adanya zona bening yang muncul di sekitar bakteri yang berarti kitinase telah berhasil mendegradasi media agar koloidal kitin (Rebecca *et al*, 2013). Zona bening terbentuk akibat putusnya ikatan β -1,4 homopolimer N-asetilglukosamin pada kitin menjadi monomer N-asetilglukosamin (Muharni, 2010). Enzim kitinase yang dihasilkan oleh mikroba merupakan metabolit yang tidak berwarna sehingga terbentuk zona bening di sekitar koloni (Dewi, 2008). Kitinase digunakan oleh mikroba kitinolitik untuk menghidrolisis kitin menjadi GlcNAc sebagai sumber nitrogen dan karbon (Wu *et al*, 2001). GlcNAc akan dimetabolisme oleh mikroba hingga menghasilkan energi, CO₂, H₂O, dan NH₃ (Thompson *et al*, 2001)

Enzim kitinase merupakan enzim ekstraselular (Tsujiro *et al*, 1999). Enzim ekstraselular merupakan enzim yang dihasilkan di dalam sel mikroba tetapi dikeluarkan ke media pertumbuhannya (Wijaya, 2002). Indeks kitinolitik diukur setiap hari selama 3 hari inkubasi. Nilai indeks kitinolitik merupakan pengujian aktivitas kitinolitik secara kualitatif. Indeks kitinolitik dapat dihitung dari perbandingan diameter zona bening (Z) dengan diameter koloni (K) di sekitar mikroba. Cara menghitung indeks kitinolitik dapat dilihat pada Gambar 22.



Gambar 22 Zona Bening Mikroba 72 Jam

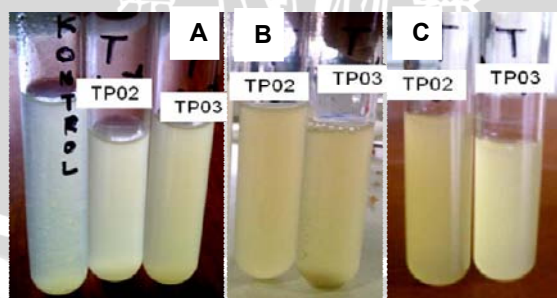
Hasil pengukuran indeks kitinolitik dapat dilihat pada Tabel 1. Zona bening pada ketiga isolat mulai terlihat sejak hari pertama inkubasi (24 jam). Hasil pengukuran indeks kitinolitik dengan waktu inkubasi 24 jam menunjukkan bahwa isolat TP03 memiliki indeks kitinolitik tertinggi yaitu 1,40, sedangkan setelah waktu inkubasi 48 jam dan 72 jam isolat TP02 memiliki indeks kitinolitik paling tinggi sebesar 1,88 dan 2,22. Indeks kitinolitik paling kecil ditunjukkan oleh isolat TP01 yaitu sebesar 1,22 pada jam ke-72. Penelitian yang dilakukan oleh Muharni (2010), indeks kitinolitik tertinggi yang ditunjukkan oleh *Bacillus* setelah waktu inkubasi 48 jam adalah sebesar 1,25. Berdasarkan indeks kitinolitik yang diukur, isolat TP02 dan TP03 dilakukan uji pada media cair koloidal kitin. Hal tersebut bertujuan untuk mengetahui pertumbuhannya secara kualitatif pada media cair. Selain itu untuk memastikan kemampuan enzim yang dihasilkan dalam mendegradasi substrat. Isolat mikroba yang nantinya terpilih akan digunakan dalam tahap selanjutnya yaitu produksi dan pemurnian enzim serta karakterisasi enzim.

Perbedaan besarnya zona bening tiap mikroba berbeda karena aktivitas enzim tiap mikroba berbeda. Setiap mikroba memiliki kemampuan mendegradasi substrat yang berbeda. Hal ini diduga disebabkan karena perbedaan gen yang mengkodonya (Tronsmo dan Harman, 1993 dalam Dewi, 2008). Menurut Susi (2002), indeks kitinolitik yang dihasilkan oleh setiap mikroba berbeda tergantung jumlah monomer N-asetilglukosamin hasil hidrolisis kitin. Semakin besar zona bening, berarti semakin banyak jumlah monomer N-asetilglukosamin.

Tabel 1 Indeks Kitinolitik Isolat Terpilih

Waktu	Nama Isolat	Koloni (cm)	Zona Bening (cm)	Indeks Kitinolitik
24 jam	TP01	0,9	1,1	1,22
	TP02	0,6	0,8	1,33
	TP03	0,5	0,7	1,40
48 jam	TP01	1	1,2	1,2
	TP02	0,8	1,5	1,88
	TP03	0,9	1,4	1,56
72 jam	TP01	1,1	1,3	1,18
	TP02	0,9	2	2,22
	TP03	1,1	1,8	1,64

Isolat TP02 dan TP03 ditumbuhkan pada media cair koloidal kitin selama 48 jam dan diamati perubahan yang terjadi. Hasil pengamatan dapat dilihat pada Gambar 23. Pada jam ke-12, media cair dari kedua isolat masih menunjukkan adanya koloidal kitin yang dilihat dari endapan yang terbentuk pada media. Apabila dibandingkan dengan kontrol, warna media telah berubah menjadi lebih kuning. Hal tersebut disebabkan karena adanya pertumbuhan sel mikroba. Pada jam ke-24, isolat TP02 telah mampu mendegradasi substrat koloidal kitin lebih cepat dibandingkan dengan isolat TP03 yang ditunjukkan dengan semakin berkurangnya endapan koloidal kitin pada media cair isolat TP02. Pengamatan pada jam ke-48 terlihat perubahan warna media. Pada media cair isolat TP02 telah berubah warna menjadi semakin kuning kecoklatan, sedangkan media cair isolat TP03 berwarna kuning. Hal tersebut menunjukkan bahwa sel mikroba isolat TP02 memiliki pertumbuhan sel yang lebih cepat dan kemampuan mendegradasi substrat lebih cepat dibandingkan dengan isolat TP03.



Gambar 23 Pertumbuhan Isolat TP02 dan TP03 pada Media Cair 12 jam (A), 24 jam (B) dan 48 jam (C)

4.1.1 Karakterisasi Morfologi Isolat TP02

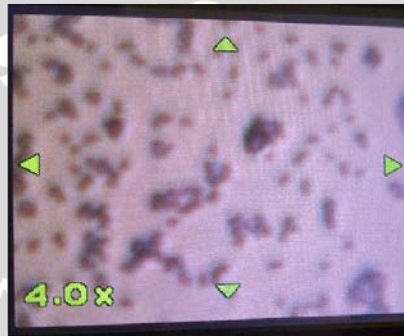
Sifat fisiologis mikroba penting untuk diketahui karena akan memudahkan pemeliharaan dan optimasi proses fermentasi. Beberapa sifat mikroba tersebut antara lain morfologi dan struktur sel, sifat Gram, morfologi koloni pada media padat, sifat pertumbuhan pada medium cair, suhu dan pH optimal untuk pertumbuhan, kebutuhan oksigen, kebutuhan energi dan nutrisi, serta kurva pertumbuhan (Yulneriwarni, 2008). Mikroba kitinolitik terpilih diamati morfologi koloninya melalui penampakan pertumbuhan koloni di atas media agar dan penampakan mikroba menggunakan mikroskop dengan perbesaran 1000 \times . Hasil pengamatan morfologi koloni mikroba terdapat dalam Tabel 2.

Tabel 2 Karakteristik Morfologi Isolat TP02

Karakterisasi	Isolat TP02
Bentuk sel	<i>Coccus</i>
Gram	Positif
Warna koloni	Putih
Bentuk koloni	Bulat
Tepi	Bergelombang
Elevasi	Timbul
Diameter Koloni	0,9
Diameter Zona Bening	2

Hasil pengamatan mikroskopis dengan pengecatan Gram menunjukkan bahwa isolat TP02 merupakan bakteri Gram positif yang ditunjukkan dengan warna ungu (Gambar 24) dan berbentuk *coccus*. Bakteri Gram positif memiliki lapisan peptidoglikan yang tebal (Suratmo, 2007) dan mampu membentuk kompleks kristal violet-yodium ribonukleat serta tidak larut dalam aseton alkohol (Dewi, 2008). Penampakan koloni menunjukkan bentuk koloni bulat dengan tepi bergelombang, berwarna putih dan permukaan koloni timbul halus mengkilap. Menurut Holt *et al* (1994) dalam Suwarsih (2011), beberapa ciri-ciri morfologi genus *Staphylococcus sp.* antara lain tidak memiliki spora, Gram positif, fakultatif anaerob, tidak motil, warna koloni biasanya putih, krem atau kuning keorange-orangan. Menurut Suwarsih (2011), bakteri yang mendekati genus

Staphylococcus sp. memiliki ciri-ciri morfologi warna koloni putih susu atau agak krem, bentuk koloni bulat, tepian timbul, sel berbentuk bola, Gram positif, terjadi satu demi satu, berpasangan dan dalam kelompok tidak teratur, tumbuh optimum pada suhu 30-37°C. Penelitian yang dilakukan oleh Dewi (2008), bakteri kitinolitik termofil asal Tinggi Raja hasil isolasi memiliki karakteristik morfologi antara lain warna putih, bentuk bulat, tepi bergelombang, elevasi tinggi, warna ungu dan termasuk dalam Gram positif. Ciri-ciri morfologi bakteri tersebut sebagian besar memiliki kesamaan dengan morfologi pada isolat TP02.



Gambar 24 Pengecatan Gram Isolat Mikroba TP02

4.1.2 Kurva Pertumbuhan dan Produksi Enzim

Sebelum melakukan kurva pertumbuhan, isolat terpilih ditumbuhkan dalam media cair koloidal kitin dan diinkubasi pada variasi suhu 37°C, 46°C dan 55°C untuk mengetahui suhu pertumbuhan mikroba. Pengamatan dilakukan setiap hari secara kualitatif hingga hari ke-5 melalui perubahan warna dan degradasi koloidal kitin dalam media cair. Perubahan yang terjadi pada variasi suhu (Gambar 25) menunjukkan bahwa mikroba dapat tumbuh baik pada suhu 37°C yang ditunjukkan dengan perubahan warna media cair menjadi semakin keruh dan substrat koloidal kitin semakin berkurang. Berdasarkan hasil tersebut, kurva pertumbuhan isolat TP02 dilakukan pada media cair koloidal kitin dengan suhu inkubasi 37°C.

Kurva pertumbuhan isolat TP02 diikuti dengan kurva produksi enzim. Hal ini bertujuan untuk mengetahui fase logaritmik dari pertumbuhan sel dan produksi

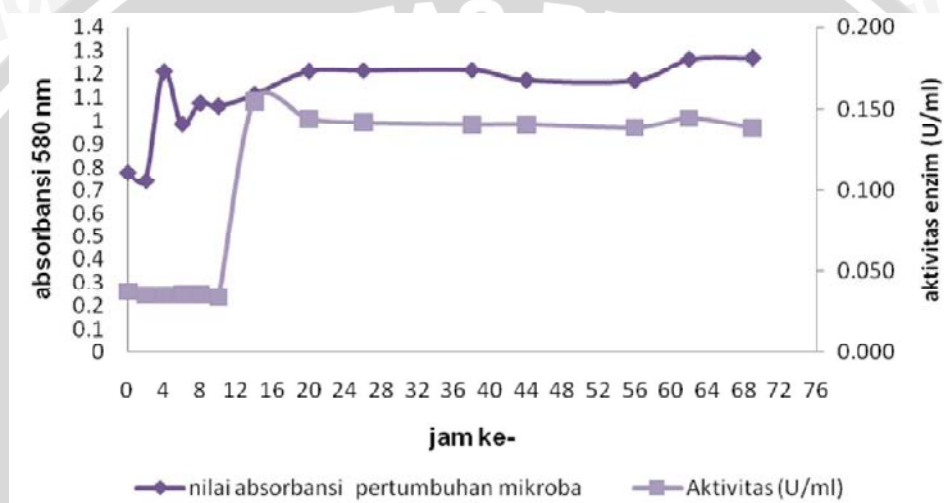
enzim yang akan digunakan dalam tahap isolasi enzim kitinase. Kurva pertumbuhan isolat TP02 dilakukan pada media cair koloidal kitin dan diukur absorbansinya pada panjang gelombang 581 nm. Isolat TP02 diinokulasikan pada media cair koloidal kitin untuk membuat starter kultur dan ditumbuhkan selama 24 jam dengan shaker waterbath. Kultur starter yang berumur 24 jam di-*scale up* dan kembali ditumbuhkan pada shaker waterbath dengan kecepatan 120 rpm dan suhu 37°C. Aktivitas enzim dan jumlah sel mikroba diukur setiap 2 jam sampai jam ke 14 dan dilanjutkan setiap 6 jam.



Gambar 25 Pertumbuhan Isolat TP02 pada Media Cair Koloidal Kitin Suhu 37°C, 46°C, 55°C

Hasil kurva produksi dan pertumbuhan sel dapat dilihat pada Gambar 26. Berdasarkan hasil yang diperoleh, fase adaptasi mikroba sangat pendek. Menurut Yulneriwarni (2008), salah satu sifat yang harus dimiliki oleh isolat terpilih adalah memiliki fase adaptasi yang singkat atau bahkan tidak ada. Nilai absorbansi awal adalah sebesar 0,779. Pada jam ke 4, pertumbuhan mikroba menunjukkan fase logaritmik dengan nilai absorbansi sebesar 1,209. Pada kurva aktivitas enzim, fase logaritmik ditunjukkan pada jam ke-14 dengan aktivitas enzim sebesar 0,186 U/ml. Menurut Tortora (2001), fase logaritmik merupakan periode metabolisme sel mikroba paling aktif. Terdapat 2 jenis fermentasi yaitu produk berhubungan dengan pertumbuhan sel karena produk terbentuk diakibatkan oleh aktifnya pertumbuhan sel (*growth-associated*) dan produk tidak

berhubungan dengan pertumbuhan sel karena produk terbentuk bukan diakibatkan oleh aktifnya pertumbuhan sel (*growth-independent*) (Hidayat *et al*, 2006). Perbedaan waktu fase logaritmik sel mikroba dengan aktivitas enzim diduga disebabkan karena adanya senyawa atau metabolit lain hasil proses biosintesis mikroba yang mampu memicu pertumbuhan mikroba. Hal ini didukung oleh Rachman (1989) yang menyatakan bahwa proses biosintesis oleh mikroba akan menghasilkan berbagai jenis metabolit yang mendukung pertumbuhan sel mikroba.



Gambar 26 Kurva Pertumbuhan Mikroba dan Produksi Enzim

Peningkatan jumlah sel mikroba diduga disebabkan karena meningkatnya produksi N-asetil-glukosamin hasil degradasi kitinase untuk pertumbuhan mikroba. Hal ini didukung oleh Thompson (2001) yang menyatakan bahwa GlcNAc digunakan mikroba untuk metabolisme dan hasil metabolisme mikroba dapat memicu pertumbuhan mikroba. Aktivitas enzim mulai mengalami penurunan pada jam ke-20 dengan aktivitas enzim sebesar 0,173 U/ml dan nilai aktivitas enzim pada jam selanjutnya menunjukkan nilai yang konstan. Fase ini disebut dengan fase stasioner. Demikian pula pada pertumbuhan sel mikroba mengalami fase stasioner hingga jam ke-69. Fase stasioner ini disebabkan karena semakin berkurangnya nutrisi dalam media sehingga sel mikroba tidak lagi mengalami peningkatan. Nutrisi yang semakin berkurang akan menyebabkan

banyak mikroba mati. Selain itu adanya senyawa hasil metabolisme mikroba yang bersifat racun juga dapat menyebabkan kematian sel mikroba (Hidayat *et al*, 2006). Berdasarkan kurva pertumbuhan dan aktivitas enzim yang diperoleh, isolasi enzim kitinase dilakukan pada jam ke 14.

4.2 Pemurnian Enzim Kitinase

Wijaya (2002) menyatakan bahwa enzim kitinase merupakan enzim ekstraselular yaitu enzim yang dihasilkan di dalam sel mikroba tetapi dikeluarkan ke media pertumbuhannya. Tahap awal isolasi dan pemurnian enzim ini dilakukan dengan menumbuhkan isolat terlebih dahulu pada media agar untuk memastikan mikroba aktif. Menurut Yulneriwarni (2008), inokulum berupa kultur kerja perlu dilakukan propagasi sebelum digunakan untuk fermentasi yaitu dengan menumbuhkan kembali sehingga diperoleh inokulum yang sehat, aktif, dan kaya akan sel vegetatif. Tahap selanjutnya adalah membuat starter kultur. Starter kultur yang berumur 24 jam dilakukan *scale up* atau peningkatan produksi pada media cair koloidal kitin yang baru dengan volume lebih banyak. Media cair koloidal kitin mengandung 0,3% (b/v) koloidal kitin. Produksi enzim kitinase dilakukan pada suhu pertumbuhan mikroba 37°C dalam *shaker waterbath* dengan kecepatan 120 rpm. Isolasi enzim dilakukan pada jam ke-14 karena pada jam tersebut menunjukkan aktivitas kitinase paling tinggi.

Produksi enzim kitinase dilakukan dengan proses sentrifugasi dengan suhu 4°C kecepatan 7000 rpm selama 20 menit untuk memisahkan sel bakteri dengan ekstrak kasar enzim kitinase. Supernatan yang mengandung ekstrak kasar enzim kitinase kemudian dilakukan pemurnian menggunakan metode afinitas koloidal kitin dan dialisis. Supernatan ditambah dengan koloidal kitin sebesar 0,15% (b/v). Ekstrak kasar enzim kitinase yang telah ditambah dengan koloidal kitin diinkubasi selama 1 jam pada suhu 4°C sehingga kitin dapat berikatan dengan enzim kitinase. Kemudian campuran supernatan dengan koloidal kitin dilakukan proses sentrifugasi 7000 rpm selama 20 menit pada suhu 4°C untuk memisahkan kitin-Kitinase yang berupa pelet. Tahap selanjutnya adalah dengan mencuci pelet dengan bufer natrium fosfat pH 7 sebanyak 3 kali untuk mencuci protein selain kitinase sehingga didapatkan enzim kitinase yang lebih murni. Setelah 3 kali pencucian, pelet yang didapatkan ditambah dengan bufer natrium fosfat dan

diinkubasi pada suhu 37°C selama 48 jam untuk memberi kesempatan pada enzim dalam memecah substrat. Kemudian disentrifugasi kembali dan dilakukan dialisis.

Tabel 3 Pemurnian Enzim Kitinase Isolat TP02

Tahapan Pemurnian	Volume (ml)	Total Aktivitas (U)	Total Protein (mg)	Aktivitas Spesifik (U/mg)	Hasil (%)	Kemurnian (Kali)
Enzim kasar	600	17, 370	2181,6	0,008	100	1
afinitas koloidal kitin	10	0,588	11,270	0,052	3,382	6,548

Enzim kasar dari supernatan kultur, enzim setelah pemurnian dengan afinitas koloidal kitin dan dialisis diukur aktivitas dan kadar proteinnya sehingga dapat diketahui aktivitas spesifik enzim kitinase. Pengukuran aktivitas kitinase diukur dengan panjang gelombang 575 nm. aktivitas kitinase diukur dari N-Asetilglukosamin yang terbentuk hasil hidrolisis kitin. Satu unit aktivitas kitinase didefinisikan sebagai jumlah enzim yang menghasilkan 1 μ mol GlcNAc / menit pada kondisi tertentu (Wen *et al*, 2002).

Berdasarkan tabel pemurnian tersebut, diketahui total aktivitas enzim kasar sebesar 17,370 Unit dan kadar protein 2181,6 mg sehingga diperoleh aktivitas spesifik sebesar 0,008 U/mg. Nilai aktivitas spesifik tersebut mengalami peningkatan setelah dilakukan pemurnian dengan afinitas koloidal kitin dan dialisis. Total aktivitas enzim menurun menjadi 0,588 Unit dan kadar protein menurun menjadi 11,27 mg sehingga diperoleh aktivitas spesifik sebesar 0,052 U/mg dan rendemen 3,382%. Penurunan kadar protein disebabkan karena protein lain selain kitinase tidak dapat berikatan dengan koloidal kitin sehingga ikut terbuang bersama supernatan ketika proses pencucian dengan sentrifugasi menggunakan bufer natrium fosfat. Hasil pemurnian enzim pada Tabel 3 menunjukkan bahwa metode pemurnian dengan afinitas koloidal kitin merupakan metode pemurnian yang efektif. Pemurnian metode afinitas koloidal kitin dapat meningkatkan kemurnian hingga 6,548 kali. Penelitian yang dilakukan oleh Hamid (2013), enzim kitinase hasil purifikasi dengan afinitas koloidal kitin memiliki tingkat kemurnian sebesar 2,88 kali dengan aktivitas spesifik sebesar 20 U/mg dan rendemen 59%.

Penelitian tentang pemurnian enzim kitinase telah banyak dilakukan. Metode pemurnian yang paling umum digunakan adalah pengendapan dengan ammonium sulfat. Penggunaan garam ammonium sulfat lebih banyak digunakan karena garam ini mempunyai kelarutan yang tinggi, pH moderat, harga relative lebih murah, tidak bersifat toksik, dan tidak mempengaruhi enzim (Rochima, 2006). Akan tetapi metode pemurnian dengan garam ammonium sulfat kurang spesifik bekerja terhadap enzim yang diinginkan, karena garam tersebut berfungsi mengendapkan protein. Kelemahan dari ammonium sulfat yaitu tidak dapat mengendapkan seluruh protein yang telah larut, bila mengandung logam dapat merusak enzim (Scopes, 1994 dalam Dewi, 2008). Purwani *et al* (2002) menyatakan bahwa enzim kitinase yang mengalami pengendapan dengan ammonium sulfat 50% mengalami peningkatan aktivitas spesifik sebesar 1,4 kali dibandingkan dengan aktivitas ekstrak kasar enzim kitinase. Kang *et al* (1999) melaporkan tingkat kemurnian kitinase dari isolat *Metarhizium anisopliae* dengan pengendapan ammonium sulfat 85% mencapai 2,21 kali dan mencapai 4,98 kali setelah dimurnikan dengan metode kromatografi yaitu DEAE-Sephacel dan CM-Sephacel CL-6B. Enzim kitinase dari *Streptomyces* sp. M-20 yang diendapkan dengan ammonium sulfat 75% memiliki tingkat kemurnian sebesar 1,9 kali dan kemurnian meningkat hingga 6 kali dengan menggunakan DEAE-cellulose dan Sephadex G-100 *filtration* (Kim *et al*, 2003). Hasil penelitian Cahyani (2013), enzim kitinase isolat 26 sebelum diendapkan dengan ammonium sulfat 80% memiliki aktivitas spesifik sebesar 0,308 U/mg dan setelah diendapkan dengan ammonium sulfat 80% memiliki aktivitas spesifik sebesar 0,475 U/mg. Hal tersebut berarti memiliki tingkat kemurnian sebesar 1,54 kali. Yong *et al* (2005) melaporkan kitinase ekstraseluler yang dihasilkan oleh bacterium C4 memiliki tingkat kemurnian sebesar 2,7 kali dengan pengendapan ammonium sulfat dan 5,64 kali dengan metode kromatografi DEAE-Sephadex A-50. Kitinase dari *Streptomyces* sp. ANU 6277 memiliki tingkat kemurnian 2,2 kali dengan ammonium sulfat dan 5 kali dengan Sephadex G-100 gel *filtration* (Narayana dan Vijayalakshmi, 2009). Berdasarkan dari beberapa penelitian tersebut, dapat diketahui bahwa pemurnian satu tahap dengan metode afinitas kitin merupakan metode yang efektif digunakan.

Proses dialisis dilakukan selama semalam pada suhu 4°C sehingga didapatkan enzim kitinase murni. Kantong dialisis yang digunakan berukuran 14 kDa. Tahap dialisis berfungsi untuk menghilangkan protein lain yang merupakan

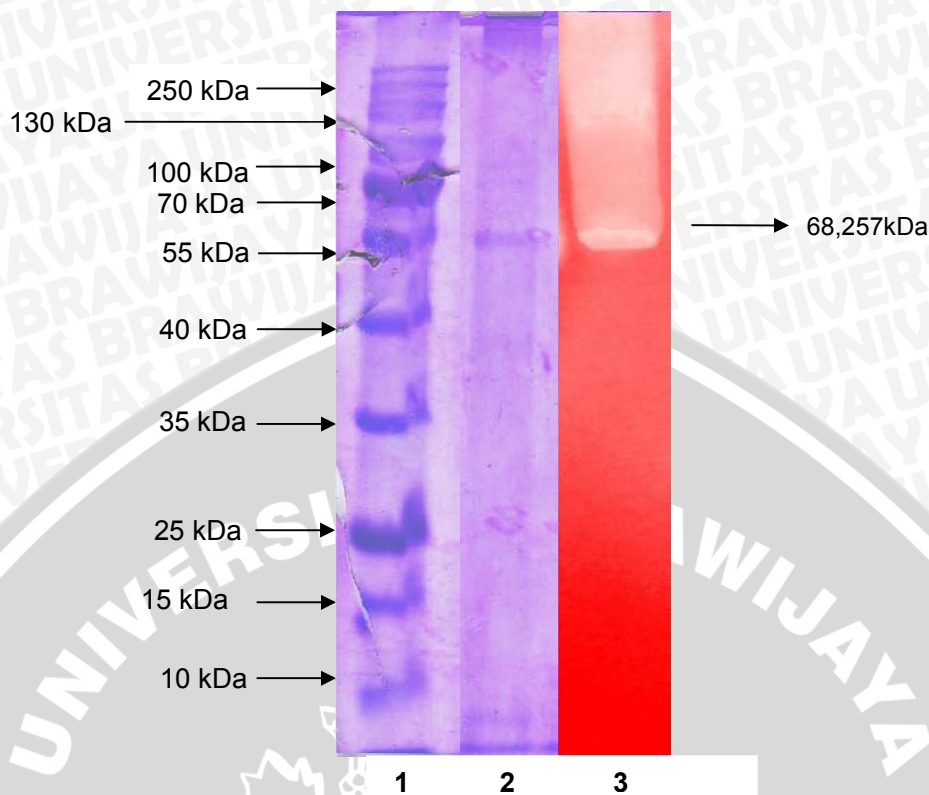
kontaminan dan hasil dari hidrolisis kitin yang berukuran lebih kecil, sehingga diharapkan yang berada dalam kantong dialisis hanya enzim kitinase. Kitinase memiliki berat molekul antara 30-120 kDa (Haliza dan Suhartono, 2012). Buffer natrium fosfat diganti beberapa kali untuk mendapatkan hasil yang maksimal berupa enzim kitinase murni. Penurunan rendemen ini disebabkan banyaknya protein yang hilang selama dialisis. Hal ini juga dibuktikan dengan menurunnya total aktivitas dan total protein enzim kitinase. Tingkat pemurnian enzim kitinase dari *Beauveria bassiana* setelah proses dialisis sebesar 1,9 kali dari ekstrak kasar dengan aktivitas spesifik 0,1916 U/mg, dan rendemen sebesar 0,9285% (Lawati, 2013).

4.3 Karakterisasi Enzim Kitinase

4.3.1 Penentuan Berat Molekul Enzim Kitinase

Berat molekul enzim kitinase ditentukan dengan metode SDS-PAGE dan dikonfirmasi dengan zimogram. SDS-PAGE (*Sodium Dodecylsulphate Gel Electrophoresis*) merupakan suatu pemisahan molekul protein berdasarkan ukurannya dalam medan listrik pada poliakrilamid gel dalam kondisi terdenaturasi karena penambahan SDS (sodium dodecyl sulfat) (Haliza dan Suhartono, 2012). Gel penahan yang digunakan mengandung substrat etilen glikol kitin sehingga pita yang dihasilkan dapat digunakan untuk pewarnaan dengan *Coomasiie Brilliant Blue* dan pewarnaan untuk zimogram.

Gel hasil elektroforesis dibagi menjadi dua bagian. Gel yang satu digunakan untuk pewarnaan dengan *Coomasiie Brilliant Blue*, sedangkan gel yang lain digunakan untuk zimogram. Zimogram merupakan suatu proses yang berfungsi untuk menganalisa aktivitas kitinolitik (Leber dan Balkwil, 1997). Gel direndam dalam *congo red* yang berfungsi untuk memvisualisasi gel. Zona bening yang terbentuk menunjukkan adanya aktivitas enzim yang telah mendegradasi substrat etilen glikol kitin.



Gambar 27 Hasil SDS-PAGE pada Marker (1), SDS-PAGE Enzim Kitinase Murni (2), dan Zimogram Enzim Kitinase Murni (3)

Penentuan berat molekul protein dihitung berdasarkan pita marker yang telah terbentuk. Jarak masing-masing pita marker diukur dan menghitung nilai *retardation factor* (Rf) sehingga didapatkan kurva standar marker. Berdasarkan hasil SDS-PAGE, tidak banyak pita protein yang terbentuk dari enzim kitinase isolat TP02. Hal tersebut membuktikan bahwa metode pemurnian dengan afinitas kitin merupakan metode pemurnian yang efektif dan bersifat spesifik. Berat molekul enzim kitinase dari isolat TP02 sebesar 68,257 kDa. Hasil ini dikonfirmasi dengan hasil zimogram (Gambar 27). Berat molekul yang dihasilkan pada penelitian ini masih termasuk dalam kisaran berat molekul enzim kitinase. Menurut Haliza dan Suhartono (2012), berat molekul enzim kitinase dari mikroba berkisar antara 30-120 kDa. Enzim kitinase dari *Streptomyces* sp. ANU 6277 dengan metode SDS-PAGE masih menunjukkan banyak pita protein yang terbentuk dengan metode pemurnian ammonium sulfat (Narayana dan Vijayalakshmi, 2009). Enzim kitinase dari *Metarhizium anisopliae* memiliki 4 pita

protein yang terbentuk setelah dimurnikan dengan pengendapan ammonium sulfat, kromatografi DEAE-Sephacel, dan kromatografi CM-Sepharose CL-6B (Kang *et al*, 1999).

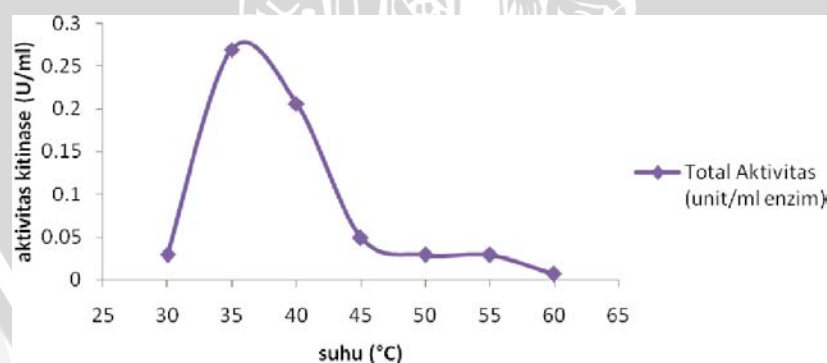
Beberapa penelitian yang telah dilakukan mengungkapkan bahwa berat molekul enzim kitinase dari isolat *Bacillus* sp. BPPT CC 2 diprediksi sebesar 103 kDa (Sugiarto, 2013), kitinase dari isolat *Beauveria bassiana* sebesar 60,255 kDa (Lawati, 2013), kitinase dari isolat *Verticillium chlamyosporium* sebesar 32 kDa dan *Verticillium suchlasporium* sebesar 43 kDa (Tikhonov, 2002). Hasil elektroforesis dikonfirmasi dengan hasil zimogram yang ditandai dengan terbentuknya zona bening (Gambar 27). Pita protein lain yang terbentuk pada gel elektroforesis tetapi pada gel dengan pewarnaan zimogram tidak terbentuk zona bening, berarti enzim tersebut tidak memiliki aktivitas dalam mendegradasi substrat. Leber dan Balwil (1997) menyatakan bahwa data hasil elektroforesis belum tentu menunjukkan aktivitas enzim yang sebenarnya karena adanya kontaminan atau enzim yang lain.

Berat molekul ditentukan oleh banyaknya asam amino. Berat molekul dinyatakan dengan satuan kilo Dalton. Satu Dalton berarti satu hidrogen molekul. Konformasi tiga dimensi molekul protein ditentukan oleh urutan asam aminonya. Struktur pelipatan dimantapkan oleh interaksi non-kovalen antara bagian-bagian yang berbeda dengan rantai polipeptida. Asam amino dengan rantai samping yang bersifat hidrofobik akan cenderung berada di sebelah dalam molekul. Interaksi ikatan hidrogen lokal antara ikatan-ikatan peptida yang berdekatan akan membentuk alpha helix dan beta sheet (Pratiwi, 2001). Struktur tiga dimensi protein terdiri dari struktur primer, sekunder, tersier dan kuartener. Pada struktur primer protein akan berikatan dengan ikatan peptida antara asam amino dengan urutan asam amino dalam molekul. Alpha helix dan beta sheet termasuk dalam struktur sekunder yang merupakan struktur tiga dimensi lokal dari berbagai rangkaian asam amino pada protein yang distabilkan oleh ikatan hidrogen antara N dari gugus amida dan O dari gugus karbonil. Struktur tersier merupakan pola pelipatan rantai menjadi suatu satuan yang padat dan distabilkan oleh ikatan hidrogen, gaya Van der Waals, jembatan disulfida dan interaksi hidrofobik. Semakin besar berat molekul dari enzim maka enzim akan semakin stabil karena adanya ikatan hidrogen. Selain itu, asam amino memiliki rantai samping yang akan menentukan struktur, ukuran, bentuk, muatan elektrik dan kelarutan dalam air (Pratiwi, 2001). Ketika enzim mengalami denaturasi, maka terjadi perubahan

terhadap struktur sekunder, tersier dan kuartener tanpa pemecahan ikatan-ikatan kovalen (tidak melibatkan perubahan dalam urutan asam amino). Hal tersebut menyebabkan susunan rantai polipeptida menjadi kurang teratur.

4.3.2 Pengaruh Suhu pada Aktivitas Enzim Kitinase

Suhu merupakan salah satu faktor yang mempengaruhi aktivitas enzim. Nelson dan Cox (2000) mengungkapkan bahwa kenaikan suhu akan meningkatkan energi kinetik sehingga tumbukan antar molekul akan semakin cepat. Semakin sering tumbukan terjadi, maka akan semakin mudah pembentukan kompleks enzim-substrat. Menurut Purves *et al* (2003), pemanasan dapat meningkatkan laju reaksi. Pada suhu yang lebih tinggi, fraksi molekul reaktan yang lebih besar memiliki energi yang cukup dalam menyediakan energi aktivasi untuk reaksi. Uji karakterisasi enzim kitinase isolat TP02 dilakukan pada rentang suhu 30-60°C dengan interval suhu 5°C. Hasil pengaruh suhu terhadap aktivitas enzim kitinase terdapat dalam Gambar 28. Aktivitas enzim kitinase pada suhu 30°C sebesar 0,029 U/ml dan mencapai aktivitas optimal pada suhu 35°C dengan aktivitas enzim sebesar 0,269 U/ml. Aktivitas enzim mengalami penurunan setelah suhu 35°C dan memiliki aktivitas paling rendah sebesar 0,007 U/ml pada suhu 60°C.



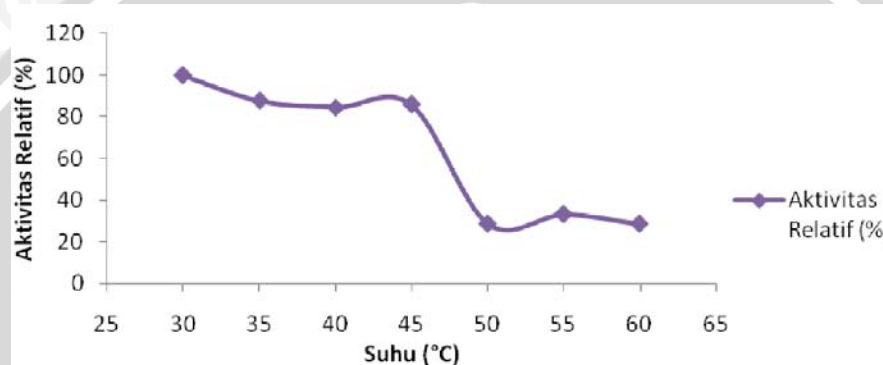
Gambar 28 Pengaruh Suhu pada Aktivitas Enzim Kitinase Isolat TP02

Pada suhu optimum, aktivitas enzim meningkat karena terjadi peningkatan energi kinetik yang mempercepat gerak rotasi substrat dan enzim sehingga enzim dan substrat saling bertumbukan (Sugiarto, 2013). Penurunan aktivitas enzim diduga disebabkan karena enzim mengalami denaturasi sehingga daya kerja enzim menurun. Menurut Rochima (2006), suhu yang tinggi menyebabkan energi kinetik enzim semakin tinggi sehingga gerakan vibrasi, translasi dan rotasi dengan substrat makin meningkat dan protein akan terdenaturasi. Suhu yang terlalu tinggi akan menyebabkan inaktivasi enzim karena adanya vibrasi molekul enzim sehingga memecah beberapa ikatan non kovalen (Purves *et al*, 2003). Panas dapat merubah struktur tersier enzim sehingga menjadi inaktif atau terdenaturasi. Penelitian lain yang dilakukan oleh Narayana dan Vijayalakshmi (2009) mengungkapkan bahwa *Streptomyces* sp. ANU 6277 memiliki suhu optimum 35°C. Penelitian oleh Margino *et al* (2012), *Bacillus* sp. D2 memiliki suhu optimum 30°C. Kim *et al* (2003) melaporkan bahwa kitinase dari isolat *Streptomyces* sp. M-20 memiliki aktivitas optimum pada suhu 30°C. Bansode dan Bajekal (2006) melaporkan bahwa kitinase dari *actinomycete* isolat SB1 dan isolat VB3 serta isolat bakteri SB5 memiliki suhu optimum 37°C. Suhu optimum enzim kitinase *Streptomyces* sp. PTK19 40°C (Thiagarajan, 2011).

4.3.3 Kestabilan Enzim Terhadap Suhu

Suhu merupakan salah satu faktor yang mempengaruhi aktivitas enzim. Karakterisasi kestabilan enzim terhadap suhu dilakukan pada rentang suhu 30°C hingga 60°C dengan interval suhu 5 °C. Hasil uji karakterisasi dapat dilihat pada Gambar 28 yang dinyatakan dengan aktivitas relatif yaitu nilai yang diperoleh dari nilai aktivitas pada kondisi tertentu dibagi dengan nilai aktivitas tertinggi. Grafik tersebut menunjukkan bahwa enzim kitinase isolat TP02 memiliki kestabilan pada suhu 30°C sampai 45°C dengan aktivitas enzim berturut-turut sebesar 0,120 U/ml, 0,105 U/ml, 0,102 U/ml, dan 0,103 U/ml. Aktivitas enzim mulai mengalami penurunan pada suhu 50°C sebesar 0,035 U/ml hingga suhu 60°C dengan aktivitas sebesar 0,035 U/ml. Aktivitas enzim menurun karena enzim telah mengalami denaturasi akibat peningkatan suhu. Hal ini didukung oleh Rochima (2006) yang menyatakan bahwa semakin tinggi suhu maka energi kinetiknya akan semakin tinggi dan menyebabkan enzim terdenaturasi. Panas

dapat mengacaukan ikatan hidrogen dan interaksi hidrofobik ion polar karena suhu tinggi dapat meningkatkan energi kinetik dan mengakibatkan terputusnya interaksi non kovalen yang ada pada struktur alaminya, tetapi tidak memutuskan ikatan kovalen yang berupa ikatan peptida. Suhu tinggi menyebabkan struktur tiga dimensinya rusak sehingga substrat tidak lagi dapat terikat dengan enzim. hal tersebut menyebabkan enzim tidak dapat menjalankan fungsinya sebagai biokatalisator. Denaturasi akan memutuskan ikatan hydrogen, ionik dan Van der Waals, sedangkan ikatan peptida dan disulfida tetap.



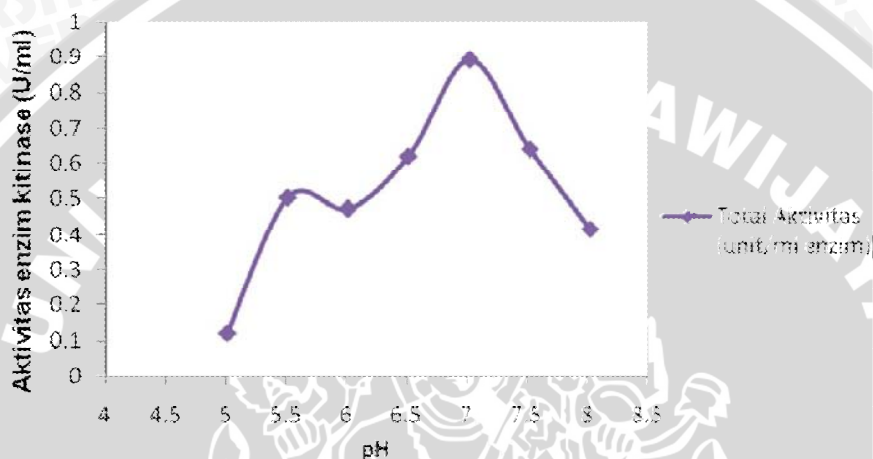
Gambar 29 Kestabilan Enzim Kitinase Terhadap Suhu

Penelitian lain tentang enzim kitinase yang dilakukan oleh Murao *et al* (1992) dalam Haliza dan Suhartono (2012) mengungkapkan bahwa enzim kitinase dari isolat *Vibrio alginolyticus* TK-22 stabil pada rentang suhu 30-40°C. Penelitian oleh Wang^b *et al* (2008) mengungkapkan bahwa enzim kitinase dari isolat *Pseudomonas* sp. TKU015 memiliki kestabilan pada rentang suhu 25-40°C. Enzim kitinase *Streptomyces* sp. PTK19 stabil pada suhu 30-45°C (Thiagarajan, 2011).

4.3.4 Pengaruh pH pada Aktivitas Enzim Kitinase

pH merupakan salah satu faktor yang mempengaruhi aktivitas enzim. pH mempengaruhi sifat ionik gugus karboksil dan gugus amino yang menyebabkan

perubahan daerah katalitik dan konformasi enzim (Girindra, 1993). Menurut Purves *et al* (2003), pada kondisi pH netral atau basa, gugus karboksil ($-\text{COO}$) melepas H^+ menjadi gugus karboksilat bermuatan negatif. Pada kondisi pH netral atau asam, gugus amino ($-\text{NH}_2$) menerima ion H^+ menjadi bermuatan positif (NH_3^+). Pada pH netral, molekul dengan gugus amino tertarik pada molekul dengan gugus karboksil. Hal tersebut disebabkan karena kedua gugus memiliki muatan yang berlawanan dan terionisasi.



Gambar 30 Pengaruh pH pada Aktivitas Enzim Kitinase Isolat TP02

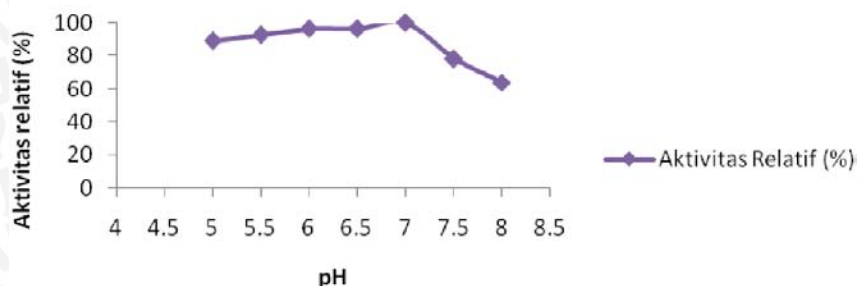
Karakterisasi pada penelitian ini dilakukan menggunakan buffer natrium fosfat pada rentang pH 5 hingga 8 dengan interval pH sebesar 0,5. Hasil pengujian pada Gambar 30 menunjukkan bahwa enzim mencapai titik optimum pada pH 7 dengan aktivitas sebesar 0,895 U/ml. Hal ini sesuai dengan Koga *et al* (1999) dalam Mahata *et al* (2008) yang mengungkapkan bahwa pada umumnya pH optimum enzim kitinase dari mikroorganisme adalah 3,5 sampai 8. Pada pH 5, enzim memiliki aktivitas sebesar 0,124 U/ml dan meningkat hingga mencapai pH 7. Kemudian aktivitas enzim kembali mengalami penurunan pada pH 7,5 dan pH 8 dengan nilai aktivitas masing-masing sebesar 0,644 U/ml dan 0,418 U/ml. Menurut Triana (2012), aktivitas enzim mencapai nilai optimum ketika struktur dan sisi aktif enzim berada pada keadaan yang paling sesuai untuk berikatan dengan substrat dan proses katalisis. Sedangkan di atas pH optimum, terjadi

perubahan ionisasi pada asam amino penyusun enzim sehingga struktur dan sisi aktif enzim mengalami perubahan akibat pelipatan pada struktur enzim.

Hasil penelitian yang dilakukan oleh Wang^a and Chang (1997) dalam Haliza dan Suhartono (2012) menyatakan bahwa kitinase dari *Pseomonas aeuroginosa* K-187 memiliki pH optimum 8 untuk jenis kitinase FI dan 7 untuk jenis kitinase FII. Enzim kitinase dari *Enterobacter* sp. G-1 memiliki pH optimum 7 (Park *et al*, 1997) dalam Haliza dan Suhartono (2012). Hasil penelitian Wang^b *et al* (2008) enzim kitinase dengan mikroba *Pseudomonas* sp. TKU015 memiliki pH optimum 6. Kitinase isolat *Bacillus* sp. D2 memiliki pH optimum 7 (Margino, 2012), *Streptomyces* sp. ANU 6277 memiliki pH optimum 6 (Narayana dan Vijayalakshmi, 2009), *Aphis gossypii* memiliki pH optimum 7 (Nurdebyandaru *et al*, 2010). Enzim kitinase *Streptomyces* sp. PTK19 memiliki pH optimum 5,5 (Thiagarajan, 2011).

4.3.5 Kestabilan Enzim Terhadap pH

Aktivitas enzim juga dipengaruhi oleh adanya pH. Pengujian dilakukan pada rentang pH 5 hingga 8 dengan interval 0,5. Grafik kestabilan enzim terhadap pH terdapat dalam Gambar 31. Berdasarkan hasil yang diperoleh, enzim kitinase isolat TP02 stabil pada rentang pH 5 hingga 7. Kestabilan enzim pada pH 5 hingga 7 memiliki aktivitas masing-masing sebesar 0,046 U/ml, 0,048 U/ml, 0,049 U/ml, 0,049 U/ml dan 0,051 U/ml. Kemudian nilai aktivitas ini mengalami penurunan pada pH 7,5 dan pH 8 masing-masing menjadi sebesar 0,040 U/ml dan 0,033 U/ml. Penurunan aktivitas enzim pada pH 7,5 dan 8 disebabkan karena enzim mengalami perubahan sisi aktif sehingga tidak dapat berikatan dengan substrat (Triana, 2012).



Gambar 31 Kestabilan Enzim Kitinase Terhadap pH

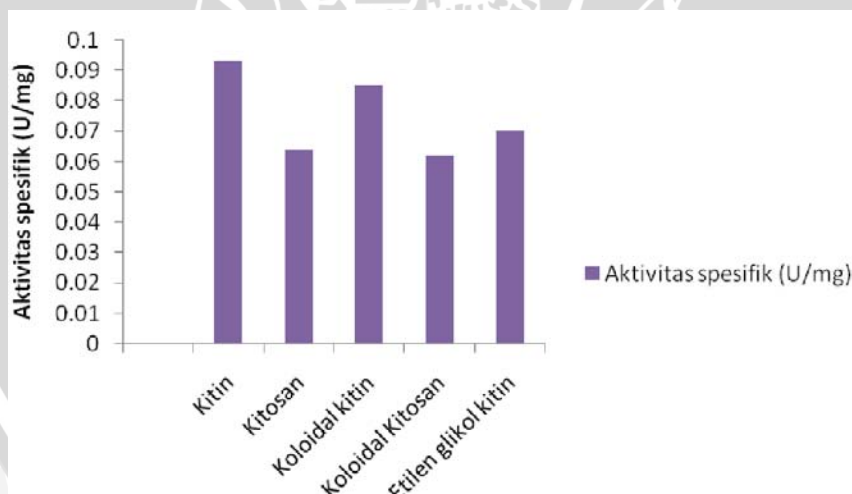
Okazaki *et al* (1995) dalam Haliza dan Suhartono (2012) mengungkapkan enzim kitinase isolat *Streptomyces* sp. J-13-3 dengan jenis kitinase Chi A stabil pada rentang pH 4-6 sedangkan kitinase Chi B stabil pada suhu 3-7. Enzim kitinase dari isolat *Pseudomonas* sp. TKU015 memiliki kestabilan pada pH5-7 (Wang^b *et al*, 2008). Enzim kitinase dari isolat *Streptomyces* sp. M-20 memiliki kestabilan pada pH 4-8 (Kim *et al*, 2003). Enzim kitinase *Streptomyces* sp. PTK19 stabil pada pH 4-7 (Thiagarajan, 2011).

4.3.6 Uji Spesifisitas Substrat

Setiap enzim memiliki kemampuan yang berbeda-beda dalam mendegradasi substrat dan spesifik terhadap substrat yang berbeda-beda pula. Enzim kitinase isolat TP02 memiliki spesifisitas yang cukup luas yaitu pada substrat kitin, koloidal kitin, kitosan, koloidal kitosan, dan etilen glikol kitin. Pada penelitian ini dilakukan pengujian spesifitas substrat untuk mengetahui substrat yang spesifik terhadap enzim dari isolat TP02. Substrat yang digunakan antara lain kitin, kitosan, koloidal kitin, koloidal kitosan dan etilen glikol kitin. Hasil pengujian terdapat pada Gambar 32 yang menunjukkan bahwa enzim dari isolat TP02 lebih spesifik terhadap substrat kitin dengan aktivitas spesifik sebesar 0,093 U/mg dan diikuti oleh koloidal kitin dengan aktivitas spesifik sebesar 0,085 U/mg. Urutan substrat dilihat dari aktivitas spesifik tertinggi hingga paling rendah antara lain kitin, koloidal kitin, etilen glikol kitin, kitosan, dan koloidal kitosan. Aktivitas spesifik dengan substrat etilen glikol kitin sebesar 0,070 U/mg, kitosan 0,064

U/mg, dan aktivitas spesifik paling rendah ditunjukkan pada substrat koloidal kitosan sebesar 0,062 U/mg.

Aktivitas spesifik enzim kitinase isolat TP02 paling tinggi ditunjukkan pada substrat kitin. Hal ini diduga karena mikroba kitinolitik diperoleh dari sampel tanah yang telah mengalami pengkayaan dengan limbah udang secara alami dalam waktu yang cukup lama. Limbah udang yang terdapat pada tanah terdiri dari ampas kulit, kepala, ekor udang dan limbah cair. Limbah udang tersebut mengandung kitin yang berfungsi sebagai substrat pertumbuhan mikroba kitinolitik. Hal tersebut diduga mempengaruhi spesifisitas substrat enzim kitinase isolat TP02. Enzim kitinase memiliki spesifisitas yang luas terhadap substrat karena substrat tersebut memiliki struktur yang hampir sama. Perbedaan terletak pada gugus tertentu, misalnya pada kitin dan kitosan. Kitosan tidak memiliki gugus asetil, sehingga kitinase dapat memecah polimer substrat tersebut menjadi oligomernya. Tetapi ketika kitosan telah terpecah menjadi dimer, kitinase tidak dapat memecahnya menjadi monomernya. Kitinase mampu memecah dimer dari kitin menjadi monomernya. Hal tersebut menyebabkan kitinase memiliki aktivitas yang tinggi pada substrat kitin, karena pada pengujian aktivitas kitinase yang diukur adalah monomer berupa N-asetil-D-glukosamin.

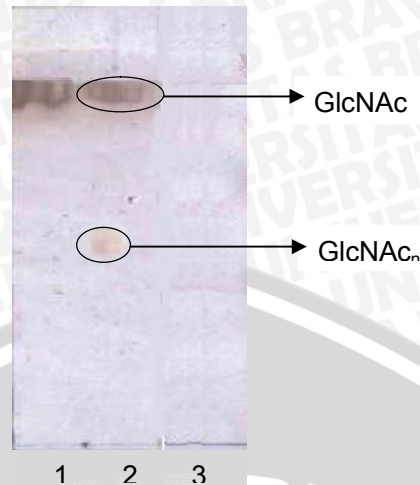


Gambar 32 Uji spesifisitas substrat

Berbagai penelitian mengemukakan hasil yang berbeda untuk substrat spesifik. Penelitian yang dilakukan oleh Wang^b *et al* (2008), enzim kitinase yang diperoleh dari isolat *Pseudomonas* sp. TKU015 spesifik terhadap substrat koloidal kitin dan kitin. Takahashi *et al* (1993) dalam Haliza dan Suhartono (2012) mengemukakan bahwa enzim kitinase dari isolat *Vibrio* sp. spesifik terhadap substrat koloidal kitin. Wang^a dan Chang (1997) dalam Haliza dan Suhartono (2012) mengemukakan bahwa enzim kitinase dari isolat *Pseudomonas auroginosa* spesifik terhadap substrat koloidal kitin dan etilen glikol kitin. Enzim kitinase dari isolat *Streptomyces* sp. M-20 memiliki aktivitas tertinggi pada substrat koloidal kitin (Kim *et al* , 2003). Yong *et al* (2005) melaporkan bahwa kitinase dari bacterium strain C4 memiliki aktivitas paling tinggi terhadap substrat kitin dari kepiting atau kulit udang dan puparium. Kitinase *Streptomyces* sp. PTK19 memiliki aktivitas paling tinggi terhadap substrat glikol kitin (Thiagarajan, 2011). Hal tersebut menunjukkan bahwa enzim kitinase yang berbeda memiliki spesifisitas substrat yang berbeda-beda pula.

4.3.7 Deteksi Produk Hidrolisis dengan Kromatografi Lapis Tipis

Kromatografi lapis tipis dilakukan dengan menggunakan kontrol positif N-asetil-D-glukosamin (GlcNAc) dan kontrol negative berupa koloidal kitin dalam bufer natrium fosfat. Hasil kromatografi lapis tipis dapat dilihat pada Gambar 33. Pada gambar tersebut dapat diketahui bahwa terdapat hasil hidrolisis koloidal kitin yang ditunjukkan dengan terbentuknya 2 spot pada plat. Enzim kitinase isolat TP02 diduga menghasilkan 2 produk hasil hidrolisis yaitu N-asetil-D-glukosamin (GlcNAc) dan GlcNAc_n. GlcNAc ditunjukkan dengan adanya spot yang terletak di bagian atas sejajar dengan kontrol positif. Spot yang lain terletak di bagian bawah spot GlcNAc tetapi tidak diketahui hasil hidrolisis yang terbentuk. Hal ini dikarenakan pada kromatografi ini standar yang digunakan hanya N-asetil-D-glukosamin, sehingga tidak ada yang dijadikan sebagai pembanding untuk menentukan hasil produk yang terbentuk. GlcNAc_n diduga merupakan oligomer kitin.



Gambar 33 Produk Kromatografi Lapis Tipis dengan Standar (1), Enzim Kitinase Isolat TP02 (2) dan kontrol negatif (3)

Berdasarkan hasil yang diperoleh, diduga enzim kitinase isolat TP02 termasuk dalam endokitinase. Dahiya *et al* (2006) mengatakan bahwa kitinase diklasifikasi menjadi 2 yaitu endokitinase dan eksokitinase. Endokitinase akan mendegradasi kitin secara acak dari dalam menghasilkan oligomer pendek yang mudah larut seperti kitotetraosa, kitotriosa, dan diasetilkitobiosa. Eksokitinase dibagi menjadi 2 yaitu kitobiosidase dan β -(1,4) N-asetilglukosaminidase. Kitobiosidase melepaskan diasetilkitobiosa tanpa ada unit-unit monosakarida atau polisakarida, sedangkan β -(1,4) N-asetilglukosaminidase akan memotong diasetilkitobiosa, kitotriosa, dan kitotetraosa menghasilkan monomer GlcNAc. Hasil kromatografi yang dilakukan oleh Maggadani (2012), beberapa isolat yang diperoleh menghasilkan GlcNAc sebagai produk utama hasil hidrolisis. Metode kromatografi lapis tipis ini dapat adalah metode yang cukup mudah dilakukan dan dapat mengidentifikasi produk hasil hidrolisis dengan mudah.

V KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Pada penelitian ini didapatkan 3 macam isolat mikroba kitinolitik yang berasal dari tanah limbah petis udang yang menunjukkan zona bening di sekitar koloni mikroba yaitu TP01, TP02, dan TP03. Indeks kitinolitik terbesar ditunjukkan oleh isolat TP02 yaitu sebesar 2,22. Isolat TP02 digunakan dalam produksi enzim. Enzim diproduksi dan diisolasi pada jam ke-14. Ekstrak enzim kasar dari supernatan memiliki aktivitas 0,029 Unit/ml dan aktivitas spesifik sebesar 0,008 Unit/mg. Kadar protein enzim kasar sebesar 3,636 mg/ml. Enzim kasar dilakukan pemurnian dengan afinitas koloidal kitin dan dialisis. Aktivitas enzim murni sebesar 0,059 Unit/ml dan aktivitas spesifik enzim murni sebesar 0,052 Unit/mg dengan tingkat pemurnian enzim sebesar 6,548 kali dan yield sebesar 3,382%. Kadar protein enzim murni adalah 1,127 mg/ml.

Penentuan berat molekul enzim dilakukan dengan metode SDS-PAGE dan dikonfirmasi aktivitas enzim dengan zimogram. Enzim kitinase dari isolat TP02 memiliki berat molekul sebesar 68,257 kDa. Hasil zimogram menunjukkan ukuran pita yang sama dengan SDS-PAGE. Enzim kitinase dari isolat TP02 memiliki aktivitas optimum pada suhu 35°C yaitu sebesar 0,269 Unit/ml dan pH 7 sebesar 0,895 Unit/ml. Enzim kitinase stabil pada suhu 30°C - 45°C dan stabil pada pH 5-7. Enzim kitinase dari isolat TP02 diuji spesifitasnya pada lima jenis substrat yaitu kitin, koloidal kitin, kitosan, koloidal kitosan, dan etilen glikol kitin. Hasil pengujian menunjukkan bahwa enzim kitinase isolat TP02 spesifik terhadap substrat kitin dengan aktivitas spesifik sebesar 0,093 Unit/mg. Hasil kromatografi lapis tipis enzim kitinase isolat TP02 menunjukkan adanya 2 spot dengan salah satu produk hidrolisisnya berupa N-asetil-D-glukosamin (GlcNAc).

5.2 Saran

1. Perlu dilakukan identifikasi jenis isolat yang berasal dari tanah limbah industri petis udang.

2. Perlu adanya standar kromatografi lapis tipis untuk dijadikan pembanding hasil hidrolisis.



DAFTAR PUSTAKA

- Anam, K. 2009. **SDS PAGE dengan Silver Staining dan Zimogram**. Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Apriani, L. 2008. **Seleksi Bakteri Penghasil Enzim Kitinolitik serta Pengujian Beberapa Variasi Suhu dan pH untuk Produksi Enzim**. Skripsi Sarjana MIPA. Universitas Indonesia. Depok.
- Azhar, M., Efendi, J., Syofeni, E., Marfa, R., dan Novalina, S. **Pengaruh Konsentrasi NaOH dan KOH Terhadap Derajat Deasetilasi Kitin dari limbah Kulit Udang**. EKSAKTA Th. XI. 1:1-8.
- Bansode, V.B. and Bajekal, S.S. 2006. **Characterization of Chitinase from Microorganisms Isolated from Lonar Lake**. Indian Journal of Biotechnology 5: 357-363.
- Berg, J.M., Tymoczko, J.L., and Stryer, L. 2002. **Biochemistry**. 5th ed. W H Freeman and company. New York.
- Cahyani, L. 2013. **Pemanfaatan Tepung Cangkang Udang Sebagai Media Produksi Kitinase Oleh Bakteri Kitinolitik Isolat 26**. Skripsi Sarjana MIPA. Universitas Jember. Jember.
- CAZypedia. **Glycoside hydrolases – CAZypedi**. Dilihat 1 Juli 2014. <<http://www.cazypedia.org/index>>
- Cho, E.K., Choi, I.S., and Choi, Y.J. 2011. **Overexpression and Characterization of Thermostable Chitinase from *Bacillus atrophaeus* SC081 in *Echerichia coli***. BMB reports. 44(3): 193-198.
- Dahiya, N., Tewari, R, Hoondal, G.S. 2006. **Biotechnological Aspect of Chitinolytic Enzymes: a Review**. ApplMicrobiol Biotechnol. 71:773-782
- Dewi, I.M. 2008. **Isolasi Bakteri dan Uji Aktivitas Kitinase Termofilik Kasar dari Sumber Air Panas Tinggi Raja, Simalungun Sumatera Utara**. Tesis Program Pasca Sarjana. Universitas Sumatera Utara. Medan.
- Firlianty. 2009. **Pemanfaatan Limbah Udang (*Panaeus sp*) Sebagai Alternatif Bahan Pengolahan Kerupuk Untuk Mengurangi Resiko Pencemaran Lingkungan**. Journal of Tropical Fisheries 4(2):450-459.

- Gohel V., Singh A, Vimal M, Ashwini P, and Chhatpar HS. 2008. **Bioprospecting and antifungal potensial of chitinolytic microorganisms**. African Journal of Biotechnology. 5(2): 54-72.
- Gooday G.W. 1994. **Physiology of microbial degradation of chitin and chitosan**. In Ratledge C, editor. Biochemistry of Microbial Degradation pp: 279-312. Kluwer Academic Publ. Netherlands.
- Girindra, A. 1993. **Biokimia I, cetakan 3**. Gramedia. Jakarta. Hal. 100-101.
- Haliza, W. dan Suhartono, M.T. 2012. **Karakteristik Kitinase dari Mikrobia**. Buletin Teknologi Pascapanen Pertanian Vol. 8(1):1-12.
- Hamid, R., Ahmad, M., Ahmad, M.M., Abdin, M.Z., Javed, S. 2013. **Purification and Characterization of Thermostable Chitinase from a Novel *S. maltophilia* strain**. Malaysian Journal of Microbiology 9(1): 7-12.
- Harighi M.J., Zamani M.R., and Motallebi M. 2007. **Evaluation of Antifungal Activity of Purified Chitinase 42 from *Trichoderma atroviride* PTCC5220**. Biotechnology. 6(1): 28-33.
- Hayani, E. dan Sukmasari, M. 2005. **Teknik Pemisahan Komponen Ekstrak Purwoceng Secara kromatografi Lapis Tipis**. Buletin Teknologi Pertanian 10(2):83-85.
- Herdyastuti, N., Raharjo, T.J, Mudasir, dan Matsjeh, S. 2009. **Chitinase and Chitinolytic Mikroorganism: Isolation, Characterization and Potential**. J. Chem 9(1):37-47.
- Hidayat, N., Padaga, M.C., dan Suhartini, S.. 2006. **Mikrobiologi Industri**. ANDI. Jakarta
- Itoh, Y., Kawase, T., Nikaedou, N., Fukada, H., Mitsutomi, M., Watanabe, T., Itoh, Y. 2002. **Functional Analysis of The Chitin Binding Domain of A Family 10 Chitinase from *Streptomyces griseus* HUT 6037: Substrat Binding Affinity and *cis*-Dominant Increase of Antifungal Function**. Biosci. Biotechnol. Biochem 66(5): 1084-1092.
- Kang, S.C., Park, S., Lee, D.G. 1999. **Purification and Characterization of a Novel Chitinase from the Entomopathogenic Fungus, *Metarhizium anisopliae***. Journal of Invertebrate Pathology 73: 276-281.
- Khan, T.A., Peh, K.K., and Chang, H.S. 2002. **Reporting Degree of Deacetylation Values of Chitosan; The Influence of Analytical Methods**. J. Pharm. Sci. 5(3): 205-212.

- Kim, K., Yang, Y., and Kim, J. 2003. **Purification and Characterization of Chitinase from *Streptomyces* sp. M-20**. Journal of Biochemistry and Molecular Biology 36(2): 185-189.
- Kleiner, D.E. and Stevenson W.G. 1997. **Quantitative Zymography: Detection of Picogram Quantitive of Gelatinases**. Anal Biochem 228: 325-329.
- Kementrian Kelautan dan Perikanan. 2013. **Kementrian Kelautan Targetkan Produksi udang 600.000 ton**. Dilihat 7 Juli 2014. <kkp.go.id/index.php/mobile///arsip/c/9780/Kementrian-kelautan-targetkan-produksi-udang-600.000-ton/?category_id=>>.
- Kurniawan, D. 2009. **Isolasi, Purifikasi Parsial dan Karakterisasi Enzim Kitinase dari Isolat Bakteri Termofilik Lumpur Lapindo**. Tesis Program Pasca Sarjana. Universitas Brawijaya. Malang.
- Lawati, N. 2013. **Pemurnian Parsial dan Karakterisasi Enzim Kitinase dari *Beauveria bassiana***. Skripsi Sarjana FMIPA. Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Leber, T.M., and Balwil F.R. 1997. **Zimography: A Single Step Staining Method for Quantitative of Proteolytic Activitty on Substrat Gel**. Biochem 249: 24-28.
- Maggadani, B.P. 2012. **Optimasi Produksi N-Asetilglukosamin dari Kitin Menggunakan Kitinase Hasil Isolasi Bakteri**. Tesis Program Pasca Sarjana. Universitas Indonesia. Depok.
- Mahata, M.E., Dharma, A., Ryanto, I., Rizal, Y.. 2008. **Characterization of Extracellular Chitinase from Bacterial Isolate 99 and *Enterobacter* sp. G-1 from Matsue City, Japan**. Journal of Microbiology. 2(1):34-38.
- Margino, S., Behar, C., and Asmara, W. 2012. **Isolation and Purification of Chitinase *Bacillus* sp. D2 Isolated from Potato Rhizosfer**. Indonesian Journal of Biotechnology 17(1): 69-78.
- Mejia-Saules, J.E., Waliszewski, K.N., Garcia, M.A., and Cruz-camarillo, R. 2006. **The Use of rude Shrimp Shell Powder for Chitinase Production by *Serratia marcescens* WF**. Food Technol. Biotechnol. 44(1):95-100.
- Muharni. 2010. **Isolasi dan Identifikasi Bakteri Penghasil Kitinase dari Sumber Air Panas Danau Ranau Sumatera Selatan**. Jurnal Penelitian Sains. 10:06-09.

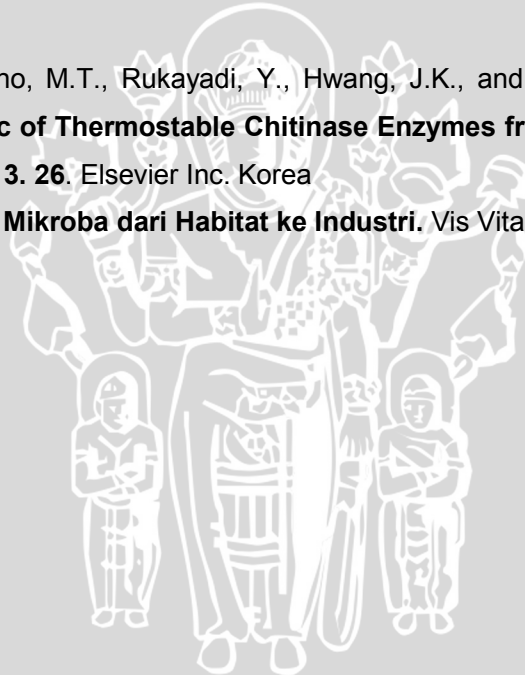
- Murao S., Kawada T., Itoh H., Oyama H., and Shin T. 1992. **Purification and Characterization of a Novel Type of Chitinase from *Vibrio alginoliticus* TK-22**. Bioscience. Biotechnology. Biochemistry. 56(2) : 368-369.
- Narayana, K, and Vijayalakshmi, M. 2009. **Chitinase Production by *Streptomyces* sp. ANU 6277**. J. Microbial. 40:725-733.
- Nelson, D.L. and Cox, M. M. 2000. **Lehninger Principles of Biochemistry – Third Edition**. Worth Publisher. New York.
- Nurdebyandaru, N., Mubarik, N.R., and Prawasti, T.S. 2010. **Chitinolytic Bacteria Isolated from Chili Rhizosphere: Chitinase Characterization and Application as Biocontrol for *Aphis gossypii***. Ind. J. Microbiol. 4(3):103-107.
- Omumasaba C.A, Yoshida N, and Ogawa K. 2001. **Purification and Characterization of a Chitinase from *Trichoderma viride***. Journal of General and Applied Microbiology, 4 7(2):53-61.
- Orikoshi, H., Nakayama, S., Miyamoto, K., Hanato, C., Yasuda, M., Inamori, Y., and Tsujibo, H. 2005. **Roles of Four Chitinases (chia, chib, chic, chid) in The Chitin Degradation System of Marine Bacterium *Alteromonas* sp. Strain O-7**. Appl Environ Microbiol 71(4): 1811-5.
- Pratiwi, R. 2001. **Mengenal Metode Elektroforesis**. Oseana 26(1): 25-31.
- Purves, W.K., Sadava, D., Orians, G.H., Heller, C. 2003. Life: The Science of Biology, Seventh edition. Sianuer Associates and W. H. Freeman. New York.
- Purwani, E.Y., Toharisman, A., Chasanah, E., Laksmi, J.F., Welan, Suhartono, M.T., Purwadaria, T., Hwang, J.K. dan Pyun, Y.R. 2002. **Studi Pendahuluan Enzim Kitinase Ekstraseluler yang Dihasilkan Oleh Isolat Bakteri Asal manado**. Jurnal Teknologi dan Industri Pangan 13: 111-117.
- Purwanti, A. 2012. **Evaluasi Pengaruh Lama Penyimpanan Terhadap Water Sorption Lembaran Plastik dari Kitosan**. Prosiding Seminar Nasional Aplikasi Sains dan Teknologi (SNAST) Periode III, Yogyakarta, pp. 233-240.
- Rachman, A. 1989. **Pengantar Teknologi Fermentasi**. Departemen Pendidikan dan Kebudayaan Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi Pusat Antar Universitas Pangan dan Gizi Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Ramirez-Cautino, L., Marin-Cervantes, M.C., Revah, S.H., and Shirai, K. 2006. **Enzymatic Hidrolysis Of Chitin In The Production Of Oligosaccharides**

- Using *Lecanicillium Fungicola Chitinase*. *Process Biochemistry* (41): 1106-1110.
- Rebecca L.J, Susithra, Sharmila S, and Das M.P. 2013. **Isolation and Screening of Chitinase Producing *Serratia marcescens* from Soil**. *J. Chem. Pharm. Res.* 5(2):192-195.
- Rochima, E. 2006. **Pemurnian dan karakterisasi Kitin Deasetilase Termotabil dari *Bacillus papandayan* Asal Kawah Kamojang Jawa Barat**. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Padjadjaran, Jatinagor. Bandung 8: 193-209.
- Roe, S. 2001. **Protein Purification Technique**. Oxford University Press. Oxford.
- Saguez, J., Vincent, C. and Giordanengo, P. 2008. **Chitinase Inhibitors and Chitin Mimetic for Crop Protection**. *Pest technology.* 2(2): 81-86.
- Sakai K., Yokota A., Kurokawa H., Wakayama M., and Moriguchi M. 1998. **Purification and Characterization of Three Thermostable Endochitinase of a Noble *Bacillus* sp. Strain, MH-1, Isolated from Chitin-Containing Compost**. *Appl. Environ. Microbiol.* p. 3397-3402.
- Shahidi F., Arachchi J.K.V., and Jeon Y.J. 1999. **Food applications of chitin and chitosan**. *Trends in Food Science and Technology.* 10: 37-51.
- Sherma, J., Fried, B. 2003. **Handbook of Thin Layer Chromatography**. Marcell decker Inc. New York.
- Singh, P.P., Shin, Y.C., Park, C.S., and Chung, Y.R. 1999. **Biological Control of *Fusarium wilt* of Cucumber by Chitinolytic Bactery Phytopathol I**. 89: 92-99.
- Situmorang, S.H. 2003. **Karakterisasi Enzim Kitinase Termotabil Isolat *Bacillus licheniformis* MB-2 dari Tompaso Sulawesi Utara Menggunakan Teknik Zimogram**. Skripsi Sarjana Teknologi Pertanian. Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Skaugrud O. and Sargent G. 1990. **Chitin and Chitosan: Crustacean Biopolymers with Potensial**. *International By-products Conference Anchorage. Alaska.* p. 61-72.
- Songsiririthigul C., Lapboonrueng S., and Pechsrichuang P. 2010. **Expression and Characterization of *Bacillus licheniformis* Chitinase (ChiA), Suitable for Bioconversion of Chitin Waste**. *Bioresource Technology.* 101:4096-4103.

- Sorensen, H., Sorensen, S., Bjerregaard, C., and Michelson, S. 1999. **Chromatography and Capillary Electroforesis in Food Analysis**. The Royal Society of Chemistry. Cambridge.
- Sowmya, B., Gomathi, D., Kalaiselvi, M., Ravikumar, G., Arulraj, C., Uma, C. 2012. **Production and Purification of Chitinase by *Streptomyces* sp. from soil**. J. Adv. Sci. Res. 3(3):25-29.
- Sugiarto, O.K. 2013. **Isolasi, Pemurnian Parsial dan Karakterisasi Enzim Kitinase dari *Bacillus* sp BPPT CC2**. Skripsi Sarjana FMIPA. Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Suratmo, T.I. 2007. **Eksperimen Mikrobiologi dalam Laboratorium**. Ardy Agency. Bogor.
- Susi. 2002. **Isolasi Kitinase dari *Scleroderma columnae* and *Trichoderma harzianum***. Jurnal Ilmu Dasar. 3(1): 30-35.
- Suwarsih. 2011. **Isolasi dan Identifikasi Bakteri Probiotik dari Ikan Kerapu Macan (*Ephinephelus fuscogatus*) dalam Upaya Efisiensi Pakan Ikan**. Prospektus Th. IX No. 1.
- Svitil A.L, Chadhain S.M.N, Moore J.A., and Kirchman D.L. 1997. **Chitin Degradation Protein Produced by The Marine Bacterium *Vibrio harveyi* Growing on Different Form of Chitin**. Appl. Environ. Microbiol. 408-413.
- Thiagarajan, V., Revathi, R., Aparanjini, K., Sivamani, P., Girilal, M., Priya, C.S., and Kalaichelvan, P.T. 2011. **Extra cellular Chitinase Production By *Streptomyces* sp. PTK19 in Submerged Fermentation and Its Lytic Activity on *Fusarium oxysporum* PTK2 Cell Wall**. Int. J. Curr. Sci. 1:30-44.
- Thompson, S.E., Smith, M., Wilkinson, M.C. and Peek, K. 2001. **Identification and Characterization of a Chitinase Antigen from *Pseudomonas aeruginosa* strain 385**. Appl. Environ. Microbiol. 67(9):4001-4008.
- Tikhonov, V.E., Lopez-Llorca, L.V., Salinas, J., and Jansson, H. 2002. **Purification and Characterization of Chitinases from the Nematophagous Fungi *Verticillium chlamydosporium* and *V. suchlasporium***. Elsevier Science. USA. p. 35, 67-78.
- Toharisman, A. 2007. **Peluang Pemanfaatan Enzim Kitinase di Industri Gula**. P3GI.
- Tortora, G.S., Frunke, B.R. and Case, C.L. 2001. **Microbiology an Introduction 7th ed**. An Imprint of Addison Wesley Longman Inc. San Fransisco.

- Transmo A. and Harman GE. 1993. **Detection and Quantification of N-Acetyl-D-glucosaminidase, Chitinobiosidase, and Endochitinase in Solution and on Gels.** Anal. Biochem. 208:74-79.
- Triana. 2012. **Pemurnian dan Karakterisasi Enzim Glukosa Oksidase dari Isolat lokal *Aspergillus niger* (IPBCC.08.610).** Skripsi Sarjana FMIPA. Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Tsigos I, Martinou A, Kafetzopoulos D, and Bouriotis V. 2000. **Chitin Deacetylase: New, Versatile Tools in Biotechnology.** TIBTECH. 18: 305-311.
- Tsujibo, H., Kondo, N., Tanaka, K., Miyamoto, K., Bao, N. and Imamori, Y. 1999. **Molecular Analysis of the Gene Encoding a Novel Transglycosylative Enzyme from *Alteromonas* sp strain O-7 and Its Physiological Role in the Chitinolytic System.**J. Bacteriol. 81: 5461-5466.
- Ubhayasekera, W. 2005. **Structural Studies of Cellulose and Chitin Active Enzyme.** Doctoral Thesis. Swedish University. Uppsala.
- Verena, S. 2008. **Chitinases of Filamentous Fungi: A Large Grop of Diverse Proteins with Multiplephysiological Functions.** Fungal Biology Reviews. 22(1) : 36–42.
- Waluyo, L. 2008. **Teknik dan Metode Dasar dalam Mikrobiologi.** UMM Press. Malang. Hal. 180-182.
- Wang^a S.L. and Chang W.T. 1997. **Purification and Characterization of Two Bifunctional Chitinase/Lysozyme Extracellularly Produced by *Pseudomonas aeruginosa* K-187 in Shrimpond Crab Shell Powder Medium.** Appl. Environ. Microbiol. p. 380-386.
- Wang^b, S.L., Chen, S. and Wang, C.L. 2008. **Purification and Characterization of Chitinase and Chitosanases from A New Species Strain *Pseudomonas* sp. TKU015 Using Shrimp Shell as A Substrate.** Carbohydrate Research 343:1171-1179.
- Wen, C.M., Tseng, C.S., Cheng, C.Y., Li, Y.K. 2002. **Purification, Characterization and Cloning of A Chitinase from *Bacillus* sp. NCTU2.** Biotechnol. Appl. Biochem. 35: 213-219.
- Wibowo, S. 2010. **Penelitian Pemanfaatan Limbah Perikanan Udang untuk Produksi Turunan Kitosan dan Aplikasinya untuk Mendukung Industri Pangan.** Badan Penelitian dan Pengembangan Kelautan dan Perikanan. Jakarta.

- Widhyastuti, N. 2010. **Purifikasi N-asetil-D-glukosamina Hasil Sintesa Secara Enzimatis Untuk Bahan Obat dan Pangan Fungsional**. Pusat Penelitian Biologi, Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia. Bogor.
- Wijaya, S. 2002. **Isolasi Kitinase dari Scleroderma columnare dan Thricoderma harzianum**. J. Ilmu Dasar 3: 30-35.
- Wilson, K. and Walker, J. 2000. **Principle and Techniques of Practical Biochemistry**. 5th ed. Cambridge University Press. Cambridge.
- Wu, M.L., Chuang, Y.C., Chen, J.P., Chen, C.S. and Chang, M.C. 2001. **Identification and Characterization of the Three Chitin-Binding Domains within the Multidomain Chitinase Chi92 from *Aeromonas hydrophila* jp 101**. Appl. Environ Microbiol 67:5100-5106.
- Yong, T., Hong, J., Zhangfu, L., Li, Z., Xiuqiong, D., Ke, T., Shaorong, G. and Shigui, L. 2005. **Purification and Characterization of an Extracellular Chitinase Produced by Bacterium C4**. Annals of Microbiology 55(3): 213-218.
- Yuli, P.E., Suhartono, M.T., Rukayadi, Y., Hwang, J.K., and Pyun, Y.R. 2004. **Characteristic of Thermostable Chitinase Enzymes from the Indonesia *Bacillus* sp. 13. 26**. Elsevier Inc. Korea
- Yulneriwarni. 2008. **Mikroba dari Habitat ke Industri**. Vis Vitalis. 1(2): 14-17.



UNIVERSITAS BRAWIJAYA

LAMPIRAN



LAMPIRAN

Lampiran 1. Prosedur Analisa

1.1 Perhitungan Berat Kering Koloidal Kitin

Cawan petri kosong dioven selama 24 jam agar beratnya konstan. Cawan petri diambil dari oven dan diletakkan dalam desikator. Kemudian cawan petri kosong ditimbang dengan timbangan. Pelet yang merupakan koloidal kitin ditambahkan sebanyak 5 gram ke dalam cawan petri. Setelah itu dioven selama 5 jam. Cawan petri dan koloidal kitin yang telah dioven ditimbang dan dihitung berat kering koloidal kitin.

1.2 Uji Aktivitas Enzim Kitinase (Modifikasi Ramirez-Cautino *et al*, 2006)

Larutan standar N-asetil-D-glukosamin dibuat dengan melarutkan 0,01 g N-asetil-D-glukosamin dalam 10 ml aquades. Seri pengenceran disiapkan untuk membuat kurva standar N-asetil-D-glukosamin yaitu 0; 0,05; 0,1; 0,15; 0,2; 0,25 mg/ml dan 1 tabung reaksi berisi aquades sebagai blanko. Masing-masing tabung seri pengenceran diambil sebanyak 1 ml ditambah dengan 1 ml DNS 1% dan dihomogenkan. Kemudian dididihkan selama 5 menit. Absorbansi diukur dengan menggunakan panjang gelombang 575 nm.

Uji aktivitas enzim dilakukan dengan mencampurkan 1 ml sampel enzim dan 1 ml koloidal kitin 0,3% dalam buffer natrium fosfat pH 7 diinkubasi pada suhu 37°C selama 1 jam. Ditambahkan 1 ml NaOH 1% untuk menghentikan reaksi dan dididihkan selama 5 menit. kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 7000 rpm suhu 4°C selama 15 menit. 1 ml supernatan diambil dan ditambah dengan 1 ml reagen DNS 1%. Absorbansi diukur dengan panjang gelombang 575 nm. Aktivitas kitinase dalam satu unit didefinisikan sebagai jumlah enzim yang diperlukan untuk menghasilkan 1 μ mol N-asetil-D-glukosamin dalam 1 menit.

1.3 Penentuan Kadar Protein Enzim Kitinase

Penentuan kadar protein dilakukan menggunakan nanodrop. Alat nanodrop dinyalakan dengan menghubungkannya ke sumber listrik. Kemudian diatur untuk penggunaan penentuan protein dengan memilih kurva standar BSA. Faktor lid yang digunakan adalah lid 5. Lid dipilih sesuai dengan konsentrasi protein.

Semakin tinggi konsentrasi protein maka, semakin tinggi lid yang digunakan. Mula-mula dilakukan pengukuran terhadap blanko yaitu bufer natrium fosfat yang merupakan pelarut untuk isolasi enzim. Bufer natrium fosfat diambil sebanyak 5 μ l dan diukur dengan menekan tombol cal. Kemudian bufer dibersihkan dengan menggunakan tissue. Sampel diambil sebanyak 5 μ l dan diukur nilai absorbansinya. Data hasil pengukuran berupa nilai absorbansi dan kadar protein sampel akan keluar dalam bentuk kertas.

1.4 Penentuan Berat Molekul Enzim dengan SDS-PAGE dan Zimogram

(Modifikasi Situmorang, 2003)

Plate pembentuk gel disusun. Gel pemisah dituang ke dalam plate pembentuk gel menggunakan mikropipet 1 ml sampai batas yang terdapat pada plate dan dijaga agar tidak terbentuk gelembung udara dan permukaan gel tidak bergelombang dengan menambahkan aquades. Gel dibiarkan memadat selama kurang lebih 30 menit. Kemudian gel penahan disiapkan. Larutan gel penahan dituang di atas separating gel. Sebelum memadat, sisiran dipasang sampai gel mengeras sehingga terbentuk sumuran.

Sampel enzim dipersiapkan untuk running SDS-PAGE. 30 μ l sampel dengan 10 μ l RSB (*running sampel buffer*) dicampur sehingga perbandingannya 3:1. Sampel dipanaskan pada suhu 100°C selama 5 menit, sedangkan untuk zimogram dipanaskan pada suhu 35°C selama 5 menit. Plate yang telah berisi gel dimasukkan dalam chamber elektroforesis. *Running buffer* dituang pada alat tersebut sampai bagian atas dan bawah gel terendam. Protein marker dimasukkan sebanyak 8 μ l, sampel enzim dimasukkan sebanyak 30 μ l pada masing-masing sumuran. Pengisian sampel dilakukan dengan urutan yang sama antara sumuran 1-5 dan sumuran 6-10.

Gel hasil SDS-PAGE dipotong menjadi 2. Bagian pertama diwarnai dengan *staining solution* sambil digoyang selama 15 menit. Kemudian larutan staining dituang kembali pada tempatnya. Gel direndam dalam *destaining solution*. *Destaining solution* dihentikan apabila warna gel sudah berubah menjadi bening. Gel hasil SDS-PAGE bagian 2 direndam dalam buffer renaturasi selama 2 jam (diganti tiap 30 menit). Kemudian gel dibilas dengan aquades. Gel direndam dalam propanol 25% selama 15 menit. Gel dibilas dengan aquades hingga bau hilang. Gel direndam dalam bufer fosfat 0,2 M pH 7 dan diinkubasi pada suhu 35°C selama semalam. Kemudian gel direndam kembali dalam bufer fosfat yang

baru dan diinkubasi dalam suhu 35°C selama 15 menit. Gel diwarnai dengan Congo red 0,1% selama 15 menit lalu dicuci dengan NaCl 1 M selama 10 menit.

1.5 Pengaruh pH pada Aktivitas Enzim Kitinase (Modifikasi Apriani, 2008; Cho *et al*, 2011)

Enzim sebanyak 0,3 ml ditambah dengan 0,3 ml koloidal kitin 0,3% dalam buffer natrium fosfat dengan variasi pH 5; 5,5; 6; 6,5; 7; 7,5; 8. Kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 1 jam. Setelah inkubasi, 0,3 ml NaOH 1% ditambahkan ke larutan enzim tersebut untuk menghentikan reaksi dan dididihkan selama 5 menit. Disentrifugasi pada suhu 4°C, 7000 rpm selama 15 menit. Supernatan yang didapatkan diambil sebanyak 0,5 ml dan ditambah 0,5 ml DNS. Dididihkan selama 5 menit dan diukur pada panjang gelombang 575 nm.

1.6 Kestabilan Enzim Terhadap pH (Modifikasi Kurniawan, 2009)

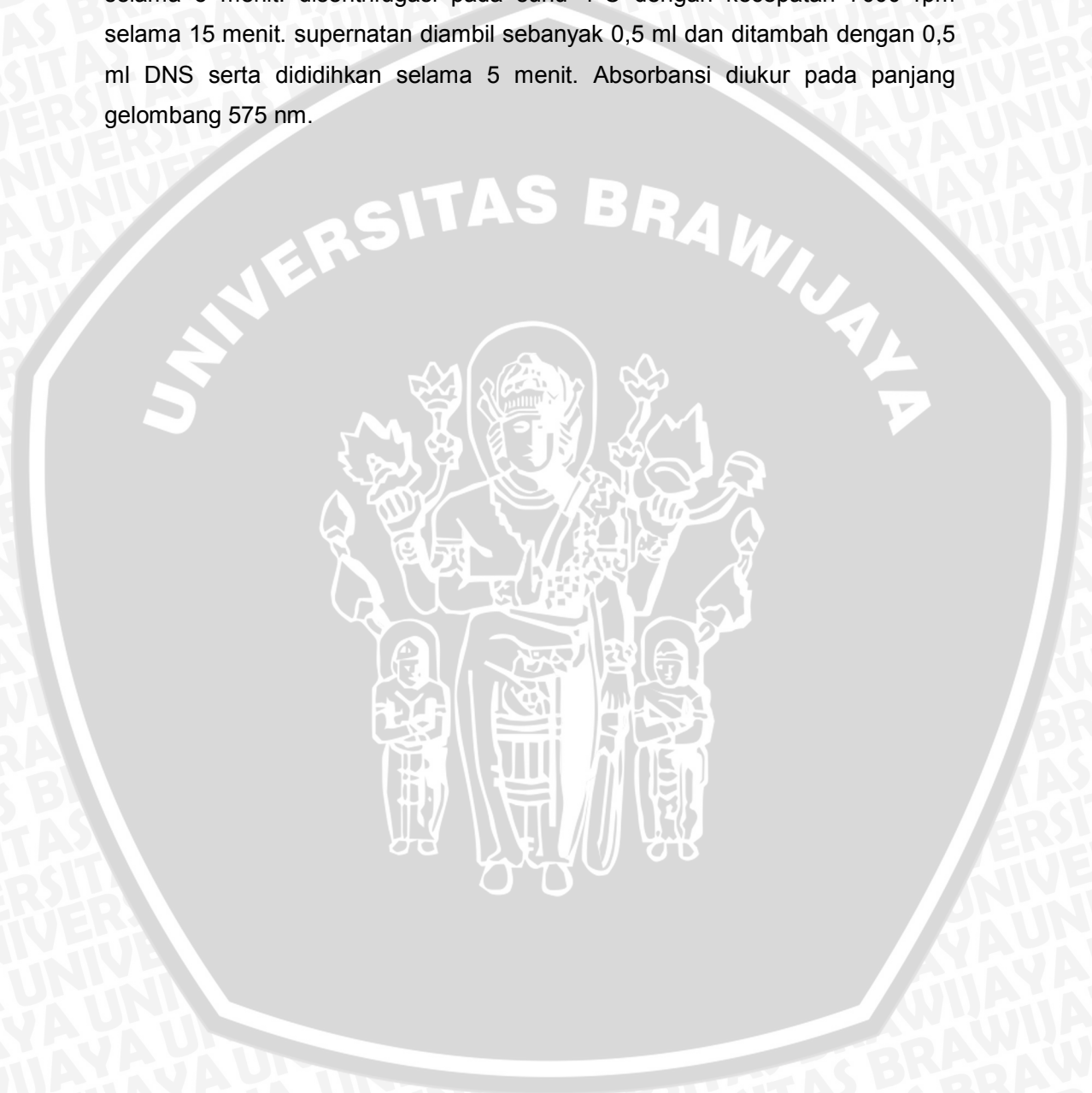
0,3 ml enzim ditambah dengan 0,3 ml buffer natrium fosfat dengan variasi pH 5; 5,5; 6; 6,5; 7; 7,5; 8. Diinkubasi selama 1 jam pada suhu 37°C. Setelah inkubasi, ditambah dengan koloidal kitin 0,3% dalam buffer fosfat pH 7. Diinkubasi pada suhu 37°C selama 1 jam. Ditambah dengan 0,3 ml NaOH 1% untuk menghentikan reaksi dan dididihkan selama 5 menit. Disentrifugasi pada suhu 4°C dengan kecepatan 7000 rpm selama 15 menit. Supernatan diambil sebanyak 0,5 ml dan ditambah dengan 0,5 ml DNS serta dididihkan selama 5 menit. Absorbansi diukur pada panjang gelombang 575 nm.

1.7 Pengaruh Suhu pada Aktivitas Enzim Kitinase (Modifikasi Apriani, 2008; Cho *et al*, 2011)

Enzim sebanyak 0,3 ml ditambah dengan 0,3 ml koloidal kitin 0,3% dalam buffer natrium fosfat pH 7 dengan variasi suhu 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60°C. Kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 1 jam. Setelah inkubasi, 0,3 ml NaOH 1% ditambahkan ke larutan enzim dan dididihkan selama 5 menit. Disentrifugasi pada suhu 4°C, 7000 rpm selama 15 menit. Supernatan yang didapatkan diambil sebanyak 0,5 ml dan ditambah 0,5 ml DNS. Dididihkan selama 5 menit dan diukur pada panjang gelombang 575 nm.

1.8 Kestabilan Enzim Terhadap Suhu (Modifikasi Kurniawan, 2009)

0,3 ml enzim ditambah dengan 0,3 ml buffer natrium fosfat pH 7. Diinkubasi selama 1 jam pada variasi suhu 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60°C. Setelah inkubasi, ditambah dengan koloidal kitin 0,3% dalam buffer fosfat pH 7. Diinkubasi pada suhu 37°C selama 1 jam. Ditambah dengan 0,3 ml NaOH 1% dan dididihkan selama 5 menit. disentrifugasi pada suhu 4°C dengan kecepatan 7000 rpm selama 15 menit. supernatan diambil sebanyak 0,5 ml dan ditambah dengan 0,5 ml DNS serta dididihkan selama 5 menit. Absorbansi diukur pada panjang gelombang 575 nm.



Lampiran 2. Komposisi Reagen, Media, Bahan, dan Pewarna

Komposisi Reagen

No	Nama Reagen	Bahan	Komposisi
1	DNS 1%	<i>Dinitrosalicylic acid</i>	10 (g/L)
		Fenol	2 (g/L)
		Natrium Sulfit	0,5 (g/L)
		NaOH	10 (g/L)
		Garam rochell (Na-K-tartarat)	200 (g/L)
		Akuades	1 L
		DNS dan NaoH dilarutkan dalam akuades, kemudian ditambahkan garam Rochell, Natrium sulfit dan fenol dan diaduk hingga larut	
2	Reagen Sulfat	7 N H ₂ SO ₄	50 ml
		Zn SO ₄ .7H ₂ O	12,5 gr

Komposisi Media

No	Nama Media	Bahan	Komposisi (g/L)
1	Koloidal Kitin Agar	koloidal kitin	3
		Pepton	8
		NaCl	1
		KH ₂ PO ₄	1
		MgSO ₄ .7H ₂ O	0,5
		Agar	15
		Sterilisasi 121°C 15 menit	
2	Koloidal Kitin Broth	koloidal kitin	3
		Pepton	8
		NaCl	1
		KH ₂ PO ₄	1
		MgSO ₄ .7H ₂ O	0,5
		Sterilisasi 121°C 15 menit	

Komposisi Bahan

No	Nama Bahan	Bahan	Komposisi
1	Buffer Natrium Fosfat 0,2 M	0,4 M Na ₂ HPO ₄	27,8 g/L
		0,4 M NaH ₂ PO ₄ anhidrat	28,4 g/L
2	<i>Running Buffer</i> pH 8,3	Tris base	3,03 g
		Glisin	14,2 g
		SDS	1 g
		Aquades	1 L
3	<i>Running Sample Buffer</i>	1 M Tris-HCl pH 6,8	0,6 ml

		Gliserol 50%	5 ml
		SDS 10%	2 ml
		2-merkaptoetanol	0,5 ml
		<i>Bromophenol blue</i> 1%	1 ml
		Aquades	0,9 ml
4	Larutan A	Akrilamid	29,2 gr
		Bis-akrilamid	0,8 gr
		Aquades hingga 100 ml	
5	Larutan B	2 M Tris HCl pH 8,8	75 ml
		10% SDS	4 ml
		aquades	21 ml
6	Larutan C	0,5 M Tris HCl pH 6,8	50 ml
		10% SDS	4 ml
		aquades	46 ml
7	Gel pemisah	Larutan A	2700 µl
		Larutan B	2000 µl
		Etilen glikol kitin	800 µl
		Aquades	2500 µl
		APS 10%	75 µl
		TEMED	10 µl
8	Gel penahan	Larutan A	560 µl
		Larutan C	800 µl
		Aquades	1800 µl
		APS 10%	50 µl
		TEMED	5 µl
9	Bufer renaturasi	EDTA	0,7444 gr
		Kasein	10 gr
		Aquades	850 ml
		Tris base	48,44 gr
		EDTA, kasein dilarutkan dengan aquades. Setelah kasein larut, ditambahkan tris base dan ditepatkan hingga pH 9.	

Komposisi Pewarna

No	Nama Pewarna	Bahan	Komposisi
1	Congo Red 0,1%	Congo Red	0,1 g
		Etanol 95%	100 ml
2	<i>Destaining solution</i>	Metanol	14 ml
		Asam asetat glasial	14 ml
		Aquades	172 ml
3	Staining solution	<i>commassie brilliant blue R-250</i>	0,125 g
		metanol	22,7 ml
		asam asetat glasial	4,6 ml
		aquades sampai dengan 100ml	

Lampiran 3. Perhitungan Enzim Kitinase

Hasil hidrolisis kitin oleh kitinase adalah N-asetil-D-glukosamin. Unit aktivitas kitinase didefinisikan sebagai pelepasan 1 μmol gula reduksi (N-asetil-glukosamin) per menit. konsentrasi N-asetil-D-glukosamin ditentukan dengan mengkonversi nilai absorbansi N-asetil-D-glukosamin menjadi kurva baku N-asetil-D-glukosamin.

Contoh : perhitungan aktivitas kitinase

$$Y = 2,686x + 0,037$$

$$0,1494 = 2,686x + 0,037$$

$$X = 0,041847 \text{ mg/ml} = 41,847 \mu\text{g/ml}$$

$$\text{Aktivitas (U/ml)} = \frac{[\text{N-asetil-D-glukosamin}] \times V \times fp}{\text{Mr N-asetil-D-glukosamin} \times p \times q}$$

Keterangan : V = volume larutan ; q = waktu inkubasi (menit)

P = volume enzim ; fp = faktor pengenceran

$$\text{Aktivitas (U/ml)} = \frac{41,847 \times 2 \times 2}{221,2 \times 0,5 \times 60} = 0,025 \text{ U/ml}$$

$$\text{Kadar protein} = 3,636 \text{ mg/ml}$$

$$\text{Aktivitas spesifik (U/mg)} = \frac{\text{Aktivitas enzim (U/ml)}}{\text{Kadar protein (mg/ml)}} = \frac{0,029}{3,636} = 0,008 \text{ U/mg}$$

$$\text{Total aktivitas (U)} = \text{aktivitas enzim (U/ml)} \times \text{volume (ml)} = 0,029 \times 600 = 17,370 \text{ U}$$

$$\text{Total protein (mg)} = \text{kadar protein (mg)} \times \text{volume (ml)} = 3,636 \times 600 = 2181,600 \text{ mg}$$

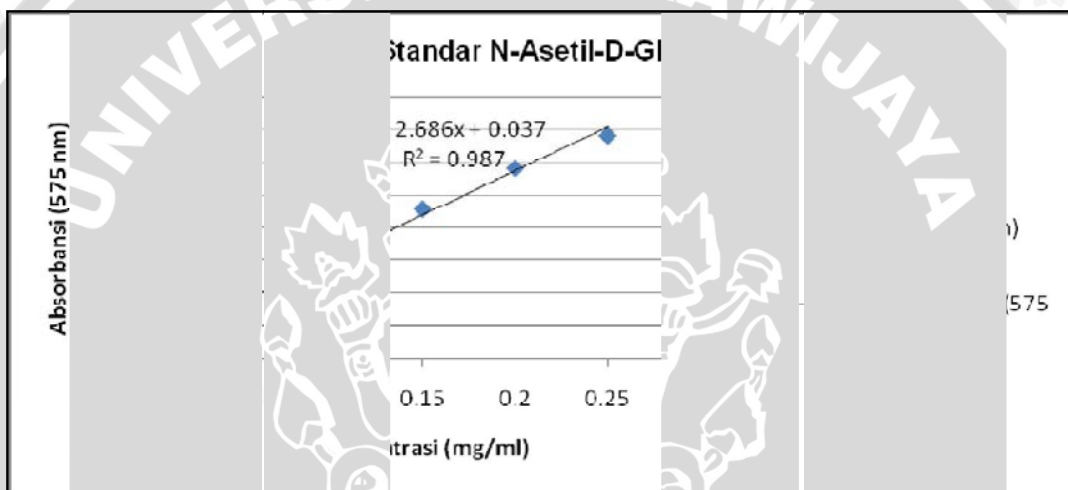
$$\text{Hasil (\%)} = \frac{\text{total aktivitas enzim murni}}{\text{total aktivitas enzim kasar}} = \frac{0,588}{17,370} = 3,382\%$$

$$\text{Tingkat kemurnian (kali)} = \frac{\text{aktivitas spesifik enzim murni}}{\text{aktivitas spesifik enzim kasar}} = \frac{0,052}{0,008} = 6,548 \text{ kali}$$

Lampiran 4. Kurva Standar N-Asetil-D-Glukosamin

Absorbansi N-Asetil-D-Glukosamin

Konsentrasi NAG (mg/ml)	Absorbansi (575 nm)
0	0
0,05	0,183
0,1	0,342
0,15	0,456
0,2	0,579
0,25	0,680



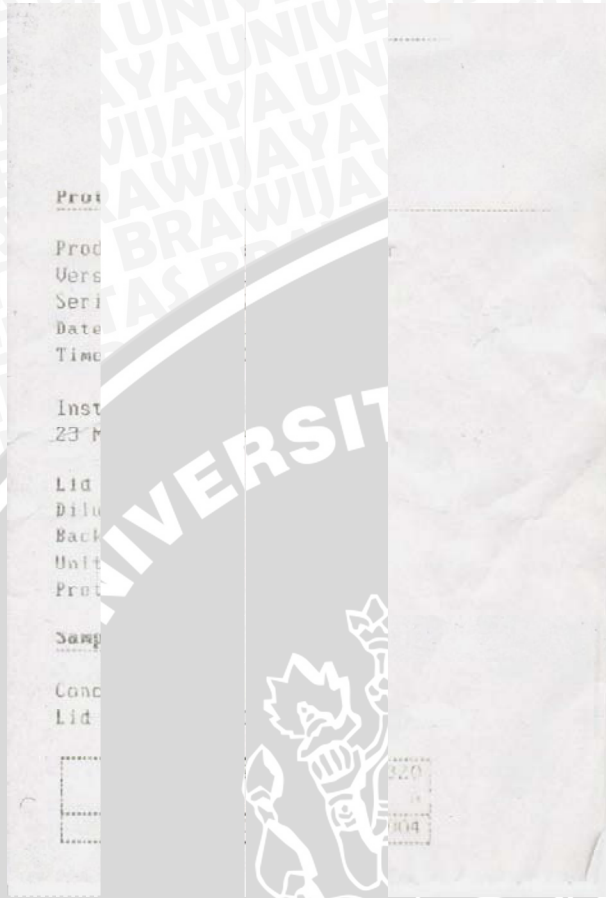
Gambar 1. Kurva Standar N-Asetil-D-Glukosamin

Lampiran 5. Data Kurva pertumbuhan mikroba dan kurva produksi enzim

Absorbansi pertumbuhan mikroba dan aktivitas produksi enzim

jam ke-	nilai absorbansi pertumbuhan mikroba (580 nm)	Nilai absorbansi aktivitas enzim (575 nm)	N-asetil-glukosamin ($\mu\text{g/ml}$)	Aktivitas (U/ml)
0	0,779	0,238	74,832	0,045
2	0,743	0,226	70,365	0,042
4	1,209	0,226	70,365	0,042
6	0,987	0,229	71,482	0,043
8	1,077	0,228	71,109	0,043
10	1,064	0,22	68,131	0,041
14	1,112	0,868	309,382	0,186
20	1,211	0,81	287,789	0,173
26	1,214	0,797	282,949	0,171
38	1,216	0,791	280,715	0,169
44	1,172	0,791	280,715	0,169
56	1,171	0,781	276,992	0,167
62	1,264	0,812	288,533	0,174
69	1,27	0,779	276,247	0,167

Lampiran 6. Kadar Protein dengan Nanodrop



Lampiran 7. Hasil Uji Aktivitas, Kadar Protein dan Aktivitas Spesifik Enzim Kitinase Isolat TP02

Aktivitas enzim kitinase dari isolat TP02

Tahapan pemurnian	Absorbansi (575 nm)		N-asetil-glukosamin (µg/ml)		N-asetil-glukosamin rerata	Aktivitas (U/ml)		Aktivitas rerata
	ulangan		ulangan			ulangan		
	I	II	I	II		I	II	
Enzim kasar	0,149	0,183	41,847	54,207	48,027	0,025	0,033	0,029
Afinitas koloidal kitin	0,266	0,332	85,108	109,829	97,468	0,051	0,066	0,059

Kadar protein enzim kitinase dari isolat TP02

Tahapan pemurnian	Ulangan	Absorbansi	Kadar Protein (mg/ml)
Enzim kasar	A 260	0,562	3,636
	A 280	0,353	
	A 320	0,103	
Afinitas koloidal kitin	A 260	0,029	1,127
	A 280	0,019	
	A 320	0,004	

Aktivitas spesifik enzim kitinase dari isolat TP02

Tahapan pemurnian	Kadar Protein (mg/ml)	Aktivitas (U/ml)	Aktivitas Spesifik (U/mg)
Enzim kasar	3,636	0,029	0,008
Afinitas koloidal kitin	1,127	0,059	0,052

Lampiran 8. Data karakterisasi Enzim Kitinase

Pengaruh Suhu pada Aktivitas Enzim Kitinase

Suhu (°C)	Absorbansi (575 nm)		Rerata Absorbansi	volume enzim (ml)	Konsentrasi (µg/mL)	Aktivitas (unit/ml enzim)
	Ulangan I	Ulangan II				
30	0,166	0,166	0,166	0,5	48,027	0,029
35	1,228	1,245	1,237	0,5	446,649	0,269
40	0,9628	0,9462	0,955	0,5	341,586	0,206
45	0,2656	0,249	0,257	0,5	82,018	0,049
50	0,1328	0,1992	0,166	0,5	48,027	0,029
55	0,1826	0,1494	0,166	0,5	48,027	0,029
60	0,083	0,0498	0,066	0,5	10,946	0,007

Kestabilan Enzim terhadap Suhu

Suhu (°C)	Absorbansi (575 nm)		Rerata Absorbansi	volume enzim (ml)	Konsentrasi (µg/mL)	Aktivitas (unit/ml enzim)	Aktivitas Relatif (%)
	Ulangan I	Ulangan II					
30	0,564	0,581	0,573	0,5	199,442	0,120	100
35	0,581	0,432	0,506	0,5	174,721	0,105	87,61
40	0,531	0,448	0,490	0,5	168,541	0,102	84,51
45	0,564	0,432	0,498	0,5	171,631	0,103	86,06
50	0,183	0,199	0,191	0,5	57,297	0,035	28,73
55	0,199	0,232	0,216	0,5	66,567	0,040	33,38
60	0,199	0,183	0,191	0,5	57,297	0,035	28,73

Pengaruh pH pada Aktivitas Enzim Kitinase

pH	Absorbansi (575 nm)		Rerata Absorbansi	volume enzim (ml)	Konsentrasi (µg/mL)	Aktivitas (unit/ml enzim)
	Ulangan I	Ulangan II				
5	0,564	0,614	0,589	0,5	205,510	0,124
5.5	2,508	2,075	2,292	0,5	839,352	0,506
6	2,158	2,141	2,15	0,5	786,485	0,474
6.5	2,805	2,822	2,814	0,5	1033,693	0,623
7	4,150	3,901	4,026	0,5	1484,922	0,895
7.5	2,888	2,922	2,905	0,5	1067,684	0,644
8	1,909	1,892	1,901	0,5	693,783	0,418



Kestabilan Enzim Terhadap pH

pH	Absorbansi (575 nm)		Rerata Absorbansi	volume enzim (ml)	Konsentrasi (µg/mL)	Aktivitas (unit/ml enzim)	Aktivitas Relatif (%)
	Ulangan II	Ulangan II					
5	0,266	0,216	0,241	0,5	75,838	0,046	89,11
5.5	0,249	0,249	0,249	0,5	78,928	0,048	92,74
6	0,266	0,249	0,257	0,5	82,018	0,049	96,37
6.5	0,216	0,299	0,257	0,5	82,018	0,049	96,37
7	0,266	0,266	0,266	0,5	85,108	0,051	100
7.5	0,216	0,216	0,216	0,5	66,567	0,040	78,22
8	0,183	0,183	0,183	0,5	54,207	0,033	63,69

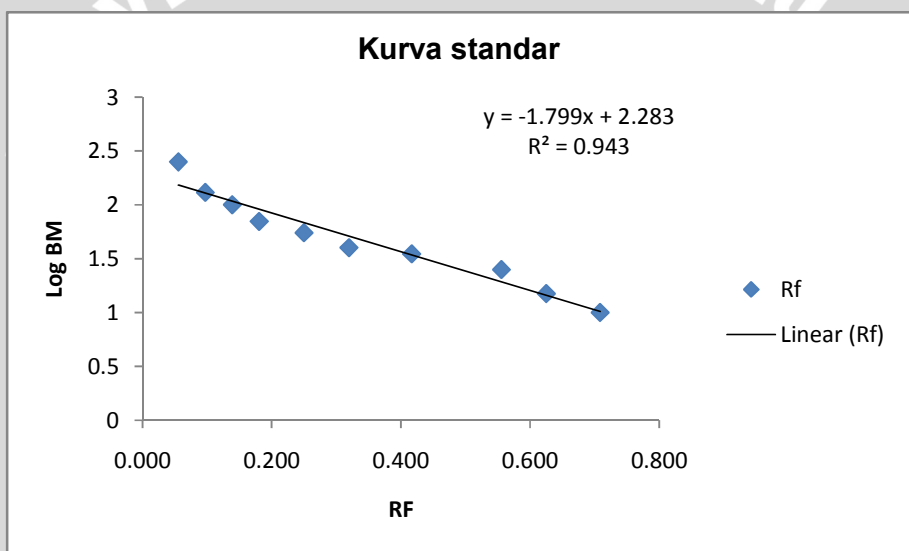
Uji Spesifitas Substrat

Substrat	Absorbansi (575 nm)		Rerata	N-asetil-glukosamin µg/ml	Aktivitas (U/ml)	Aktivitas Spesifik (U/mg)
	I	II				
Kitin	0,515	0,498	0,506	174,721	0,105	0,093
Kitosan	0,349	0,365	0,357	119,099	0,072	0,064
Koloidal kitin	0,448	0,481	0,465	159,270	0,096	0,085
Koloidal Kitosan	0,365	0,332	0,349	116,009	0,070	0,062
Etilen glikol kitin	0,365	0,415	0,390	131,459	0,079	0,070

Lampiran 9. Data Berat molekul Enzim Kitinase

Perhitungan Nilai Kecepatan Mobilitas Marker

Pita Marker	Jarak Pita (cm)	Rf Marker	BM Marker (kDa)	Log BM
1	0,4	0,056	250	2,398
2	0,7	0,097	130	2,114
3	1	0,139	100	2
4	1,3	0,181	70	1,845
5	1,8	0,250	55	1,740
6	2,3	0,319	40	1,602
7	3	0,417	35	1,544
8	4	0,556	25	1,398
9	4,5	0,625	15	1,176
10	5,1	0,708	10	1



Gambar 2. Kurva Standar Berat Molekul Marker

Perhitungan Berat Molekul Enzim Kitinase Isolat TP02

Sampel	Jarak (cm)	Rf Sampel	Log BM	BM (kDa)
enzim murni	1,8	0,25	1,834	68,257



DOKUMENTASI

1. Pembuatan Koloidal Kitin



2. Isolasi dan Skrining Mikroba Kitinolitik





3. Isolasi dan Purifikasi Enzim Kitinase



4. Karakterisasi Enzim Kitinase



