

## EKSPLORASI BAKTERI TERMOFILIK PENGHASIL ENZIM KITINASE ASAL INDONESIA

Rahayu, S.<sup>1)</sup>, Fredy T.<sup>1)</sup>, Maggy T.S.<sup>1)</sup>, J.K. Hwang<sup>2)</sup>, dan Y.R. Pyun<sup>2)</sup>.

<sup>1)</sup> Laboratorium Mikrobiologi dan Biokimia, PAU Bioteknologi-Institut Pertanian Bogor

<sup>2)</sup> Bioproduct Research Centre-University Yonsei Korea

### ABSTRAK

Aplikasi enzim termostabil lebih disukai di bidang industri mengingat keuntungan yang diperoleh jika proses produksi dilakukan pada suhu tinggi. Enzim kitinase banyak dimanfaatkan untuk menghasilkan senyawa kitosan yang digunakan secara luas pada berbagai bidang industri. Enzim termostabil dihasilkan oleh bakteri termofilik karena lingkungan hidupnya yang ekstrem seperti daerah sumber air panas, daerah kawah gunung berapi, dan daerah ekstrem lain. Sampel berasal dari berbagai daerah gunung berapi di Jawa Barat. Isolasi dilakukan dengan menyebarkan sampel pada media termus yang dimodifikasi yaitu : 0.01 %  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ; 0.1 %  $K_2HPO_4$ ; 0.1 % NaCl; 0.7 %  $(NH_4)_2SO_4$ ; 0.2 % yeast ekstrak; 0.1 % tripton; 1.0 % koloidal kitin dan 2.0 % agar. Inkubasi dilakukan mulai suhu 55°C hingga 70°C selama satu sampai lima hari. Isolat yang mampu mendegradasi kitin ditandai dengan terbentuknya halo yaitu zona bening di sekitar koloni. Isolat kemudian diseleksi lagi berdasar indeks kitinolitik (IK) yaitu perbandingan diameter halo dengan diameter koloni. Diperoleh 31 isolat yang mampu tumbuh pada suhu 55°C dan lima isolat yang mampu tumbuh pada suhu 65°C. Dari 31 isolat diperoleh tujuh isolat yang potensial dengan indeks kitinolitik 4.0 – 5.0. Ketujuh isolat yang berasal dari Kamojang (K-29) kemudian diidentifikasi untuk mengetahui bentuk sel, jenis gram bakteri, motilitas, spora, sifat aerob/anaerob. Ketujuh isolat potensial selanjutnya akan diuji secara kuantitatif dengan metode reduksi kitin dan metode kitin deasetilase pada berbagai suhu dan pH.

### PENDAHULUAN

Pada beberapa dekade terakhir, aplikasi enzim di bidang bioteknologi semakin menuntut adanya enzim-enzim yang tahan terhadap lingkungan terutama temperatur. Hal tersebut berkaitan –utamanya-- dengan kebutuhan industri, karena penggunaan enzim termostabil dalam proses produksi pada suhu tinggi memberi berbagai keuntungan. Enzim-enzim termostabil umumnya dihasilkan oleh bakteri termofil, ekstremofil, dan hipertermofil karena lingkungan hidupnya yang ekstrem panas.

Kitinase (EC.3.2.1.14) adalah enzim yang aktif mengkatalisis konversi kitin menjadi menjadi senyawa kitosan (Tsujiro *et.al.*, 1998). Kitinase ditemukan secara luas pada berbagai organisme seperti bakteri, kapang, insekta, tanaman, dan hewan.

Kitin merupakan polimer terbesar yang terdapat di alam setelah selulosa dan merupakan komponen struktural utama pada eksoskeleton arthropoda seperti kepiting,

udang, dan cumi-cumi. Kitin adalah homopolimer dari residu N-acetyl-D-glukosamin (GlcNAc) yang diasetilasi dan diikat oleh ikatan  $\beta$ -1,4 dan disusun dalam untai antiparalel ( $\alpha$ ), paralel ( $\beta$ ) dan campuran ( $\chi$ ) (Tsujiho *et.al.*,1998; Svitil *et.al.*,1997 dan Sakai *et.al.*,1998).

Senyawa kitosan dibuat secara komersial dari kitin dengan bantuan kitinase melalui proses deasetilase secara termokimia. Dibandingkan kitin, aplikasi kitosan lebih luas dan dapat ditemukan pada berbagai bidang seperti industri pangan, pengolahan limbah, kesehatan, bioteknologi, pertanian, kosmetik, dan industri kertas.

Mengingat manfaat kitinase dan aplikasi kitosan yang luas, maka diperlukan usaha-usaha eksplorasi bakteri termofilik yang diharapkan memproduksi enzim kitinase yang bersifat termostabil.

## MATERI DAN METODA

Sampel air, lumpur, dan tanah berasal dari Kamojang, Tangkuban Perahu, Papandayan, Gunung Gede, Ciater, Dieng, Ciseeng dan Pasar Ikan Jakarta. Berbagai bahan kimia untuk pembuatan media (LA, LB dan media termus), koloidal kitin, uji kitin deasetilase, pewarnaan gram, pewarnaan spora, dan lain-lain.

*Persiapan koloidal kitin.* Ke dalam erlenmeyer masukkan 100 gram kitin komersial (practical grade Sigma) dan 2 liter HCl pekat, simpan pada 4°C selama 24 jam. Menggunakan *glasswool* disaring, supernatan ditambah 1 liter air dingin. Ukur pH menjadi 7.00 dengan menambah NaOH 5N. Sentrifugasi larutan pada 7000 rpm, 4°C selama 10 menit. Supernatan ditambah dengan 2 liter air dingin. Ulangi sentrifugasi. Buang filtrat, pelet (koloidal kitin) dikoleksi untuk disimpan pada suhu dingin.

*Persiapan media.* Koloidal kitin dilarutkan dalam air dan disterilisasi terpisah dari agar dan bahan pelengkap lain. pH keduanya diatur pada pH 7.0. Saat akan dituang ke dalam cawan kedua bahan dicampur. Digunakan dua macam media padat yaitu media Luria Agar (LA) dan modifikasi media termus, keduanya mengandung 1 % koloidal kitin.

*Metode isolasi.* Masing-masing sampel dari berbagai daerah diberi perlakuan pengkayaan dengan menginkubasi sampel selama 24 jam dalam media LB dengan perbandingan 3 : 1. Kemudian ambil 100  $\mu$ l untuk disebar pada agar cawan dan diinkubasi pada berbagai suhu selama beberapa hari. Koloni bakteri yang tumbuh dan membentuk zona

bening (halo) dikoleksi untuk dimurnikan (gores kuadran), diidentifikasi dan disimpan dalam gilserol 50 %.

*Identifikasi bakteri.* Tiap isolat yang membentuk halo diidentifikasi dengan menggunakan Bergey's manual, untuk mengetahui bentuk bakteri, jenis gram, berspora atau tidak, motilitas, sifat aerob atau anaerob.

*Persiapan glikol kitosan.* Larutkan 5 gram glikol kitin ke dalam 100 ml asam asetat 10 %. Diamkan semalam pada suhu kamar. Tambahkan 450 ml metanol secara perlahan dan dilakukan filtrasi vakuum dengan kertas Whatman No. 41. Filtrat yang diperoleh diaduk dalam gelas ukur dan tambahkan 7.5 ml asetat anhidrat. Diamkan 30 menit. Saat gel terbentuk tambahkan sejumlah kecil metanol dan dihomogenkan. Sentrifugasi pada 7000 rpm, 4°C selama 15 menit. Pelet yang terbentuk dilarutkan dengan metanol dan dihomogenkan. Ulang sentrifugasi, pelet yang terbentuk dilarutkan dalam 500 ml sodium azide 0,02 % dan dihomogenkan lagi selama 4 menit. Larutan yang terbentuk adalah glikol kitosan 1 % (w/v).

*Assay kitinase.* Menggunakan metode reduksi kitin menurut Ueda dan Arai (1992), sebagai berikut : - Campuran reaksi mengandung 1.0 ml koloidal kitin 0.3 %, 2.0 ml bufer Mellvaine pH 7.0 dan 1.0 ml ekstrak enzim diinkubasi pada suhu pertumbuhan optimal selama 60 menit. Baca absorbansi larutan pada panjang gelombang 660 nm. Satu unit aktivitas enzim didefinisikan sebagai jumlah enzim yang menyebabkan penurunan absorbansi sebesar 0.001 pada 660 nm dari campuran reaksi per menit.

*Assay kitin deasetilase.* Menggunakan metode Dische dan Borefreund (1950) sebagai berikut : - Pertama campurkan 0.15 % glikol kitosan dan bufer. Ke dalam 160 µl campuran tersebut ditambahkan 40 µl larutan enzim kemudian diinkubasi selama 20 menit pada suhu optimal. Reaksi distop dengan menambahkan 200 µl asam asetat 33%. Untuk kontrol tambahkan enzim setelah penambahan asam asetat. Sebanyak 0.4 ml larutan di atas ditambah dengan 0.4 ml sodium nitrit dan 0.4 ml asam asetat dalam tabung. Tabung kemudian dikocok dan biarkan selama 10 menit. Tambahkan 0.4 ml amonium sulfomat 12.5 %, 2.0 ml HCl 5 % dan 0.2 ml indol dalam alkohol. Kemudian tabung direndam dalam air mendidih selama 5 menit. Ukur absorbansi larutan pada panjang gelombang 492 nm.

Satu unit aktivitas enzim didefinisikan sebagai jumlah enzim yang menghasilkan 1 µmol residu glukosamin per menit saat diinkubasi dengan substrat glikol kitin.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

Bakteri termofilik merupakan kelompok bakteri yang mampu tumbuh pada suhu 45<sup>o</sup>C sampai 65<sup>o</sup>C (Brock, 1986 dan Rudiger *et.al.*, 1994). Suhu di atas 60<sup>o</sup>C di alam bagi mikroorganisme terdapat pada daerah-daerah tertentu seperti daerah geotermal dan kompos (Brock, 1978). Menurut Brock dan Madigan (1991) mikroba termofil memiliki beberapa keistimewaan di antaranya enzim dan protein yang dihasilkan bersifat termostabil dan mampu berfungsi optimal pada suhu tinggi

Sampel diambil dari beberapa daerah geotermal di wilayah Jawa Barat, Indonesia. Seleksi daerah berdasar pada jarak, waktu, dan biaya. Daerah pengambilan sampel adalah : - Sumber air panas Gunung Gede (10 lokasi), kawah Domas di Tangkuban Perahu (16 lokasi), kawah Gunung Papandayan (20 lokasi), Kamojang (23 lokasi), sumber air panas Ciater-Bandung (10 lokasi) , kawah di dataran tinggi Dieng, Ciseeng (10 lokasi), dan Pasar Ikan Jakarta (20 lokasi).

Sampel berupa air, tanah, lumpur, batu pasir, sampah, atau deposit. Sampel diambil dan disimpan dalam botol, sampel segera disegarkan di laboratorium. Menurut Blochl *et.al.*(1995) sampel dapat dibawa ke laboratorium dari lokasi tanpa pengendalian suhu, dan di laboratorium sampel dapat disegarkan kembali dengan berbagai variasi media dengan suhu inkubasi seperti tempat asalnya.

Hasil isolasi sampel dari berbagai daerah dapat dilihat pada Tabel 1. Dalam tabel tersebut tampak bahwa wilayah potensial penghasil bakteri termofilik yang mempunyai aktivitas kitinolitik adalah Kamojang dengan jumlah isolat 16 buah.

Dari tabel di atas tampak bahwa densitas bakteri termofilik penghasil enzim kitinase relatif rendah dibanding total bakteri termofilik. Hal tersebut diduga substrat kitin di daerah geotermal atau kawah gunung berapi adalah sangat sedikit mengingat daerah tersebut merupakan daerah ekstrem panas, sehingga hanya sedikit makhluk hidup yang dapat bertahan. Kalaupun terdapat kitin di daerah tersebut biasanya berasal dari insektisida atau jamur. Kitin sebagai substrat banyak terdapat sebagai komponen utama pada eksoskeleton arthropoda yaitu kepiting, udang, cumi-cumi, serta insektisida (Tsujiro *et.al.*, 1998).

Tabel 1. Hasil isolasi dari berbagai sampel

No.	Asal Sampel	55°C		60°C		70°	
		Kol.	Kit.	Kol.	Kit.	Kol.	Kit.
1.	Kamojang	4320	16	2912	-	1726	-
2.	Papandayan	173	-	107	-	202	-
3.	Tangkuban Perahu	333	3	100	-	1136	-
4.	Ciseeng	705	1	538	-	456	-
5.	Ciater	1002	2	613	-	191	-
7.	Pasar Ikan	1850	7	927	5	140	-

Keterangan: Kol = jumlah koloni hasil penyebaran sampel  
Kit = isolat yang mempunyai aktivitas kitinolitik

Kemampuan bakteri termofilik untuk bertahan hidup di lingkungan panas disebabkan bakteri termofil mempunyai membran sel yang kaya akan asam lemak jenuh dan membran ribosom yang juga tahan panas. Menurut Brock dan Madigan (1991) organisme termofil merupakan prokariot, karena eukariot tidak dapat bertahan hidup pada suhu tinggi.

Setiap isolat yang mempunyai aktivitas kitinolitik kemudian dimurnikan dan dihitung persen kitinolitik yaitu perbandingan jumlah isolat yang mempunyai aktivitas kitinolitik dengan jumlah seluruh isolat yang diperoleh dari lokasi sampling. Pada Tabel 2 disajikan hasil persen kitinolitik dari beberapa daerah potensial.

Isolat dengan aktivitas kitinolitik kemudian diseleksi lagi secara semi Kuantitatif dengan mengukur indeks kitinolitiknya. Hasilnya dapat dilihat pada Tabel 3.

Indeks kitinolitik diukur setelah isolat ditumbuhkan pada media termus modifikasi dengan 1 % koloidal kitin sebagai substrat dan induser. Induser dalam media agar dapat menginduksi sintesis enzim yang diharapkan (Ward, 1983).

Tujuh isolat yang potensial untuk diteliti lebih lanjut adalah isolat K29 nomor 7, 8, 10, 13, 14, 15 dan 16 yang memiliki indeks kitinolitik relatif besar serta waktu pembentukan zona bening (halo) tercepat yaitu 24 jam.

Tabel 2. Persen kitinolitik tiap lokasi didapatkannya isolat yang mempunyai aktivitas kitinolitik

No.	Lokasi	JIK	JS	Persen kitinolitik (%)
1.	Kamojang 29	16	91	17,58
2.	Tangkuban Perahu 1	3	55	5,45
3.	Ciseeng 7	1	47	2,12
4.	Ciater 2	1	89	1,12
5.	Ciater 3	1	63	1,58
6.	Pasar Ikan 13	2	88	2,27
7.	Pasar Ikan 14	1	45	2,22
8.	Pasar Ikan 18	2	36	5,55
9.	Pasar Ikan 19	5	76	6,57
10.	Pasar Ikan 20	2	42	4,76

Keterangan : JIK = Jumlah isolat yang mempunyai aktivitas kitinolitik  
JS = Jumlah seluruh isolat

Tabel 3. Indeks kitinolitik isolat-isolat penghasil enzim kitinase pada suhu 55°C

No.	Isolat	Indeks Kitinolitik
1.	K29-A	2,16
2.	K29-B	1,40
3.	K29-C	1,50
4.	K29-D	1,92
5.	K29-E	1,50
6.	K29-D7	3,00
7.	K29-15F	1,27
8.	K29-16F1	2,30
9.	K29-16F2	1,60
10.	K29-7	4,80
11.	K29-8	4,00
12.	K29-10	4,50
13.	K29-13	5,00
14.	K29-14	5,00
15.	K29-15	5,00
16.	K29-16	4,50

Tujuh isolat yang potensial untuk diteliti lebih lanjut adalah isolat K29 nomor 7, 8, 10, 13, 14, 15 dan 16 yang memiliki indeks kitinolitik relatif besar serta waktu pembentukan zona bening (halo) tercepat yaitu 24 jam.

Hasil identifikasi terhadap tujuh isolat potensial umumnya menunjukkan bakteri gram positif, berspora, berbentuk batang dan bersifat motil, dengan demikian diduga semua isolat termasuk dalam keluarga *Bacillus*.

Selanjutnya ketujuh isolat saat ini tengah diuji secara kuantitatif menggunakan metode reduksi kitin dan metode uji kitin deasetilase untuk mengetahui kuantitas enzim yang diproduksi oleh tiap-tiap isolat. Pengujian dilakukan pada berbagai tingkatan suhu dan pH.

### KESIMPULAN

Densitas bakteri termofilik penghasil enzim kitinase relatif rendah dibanding total bakteri termofilik yang ada.

Diperoleh tujuh isolat bakteri termofilik potensial penghasil enzim kitinase yang berasal dari kawah Kamojang yaitu isolat K29 nomor 7, 8, 10, 13, 14, 15 dan 16.

Hasil identifikasi terhadap tujuh isolat potensial, menunjukkan bahwa semua isolat mengarah pada keluarga *Bacillus*.

### DAFTAR PUSTAKA

- Bloch, E., Burggraf, S., Fiala, G., Laurer, G., Huber, R., Rachel, R., Segerer, A., Stetter, K.O. Dan Volki, P. 1995. *Isolation, Taxonomy and Phylogeny of Hyperthermophilic Microorganism*. World J.Mic.Biotech. 11 : 9 – 16.
- Brock, T.D. 1978. *Thermophilic Microorganisms and Life at High Temperature*. Springer-Verlag, New York.
- Brock, T.D. 1986. *Thermophiles: General, Molecular and Applied Microbiology*. John Wiley and Sons, New York.
- Dische and Borefreund. 1950. *Purification and Characterization of Extracellular Chitin Deaseylase from C.lindemuthianum*. Biosci. Biotech.Biochem. 60 (10).
- Madigan, M.T. and B.L. Marrs. 1997. *Extremophiles*. Sci. American. April 82-87.
- Rudiger, A., Sunna A., Antranikian G. 1994. *Carbohydrases Handbook of Enzyme Catalysis in Organic Sybthesis*. Drauz and Waldmann (Ed.). Wenheim, Germany.
- Sakai, K., Yokota A., Kurosawa H., Wakayama M., Moriguchi M. 1998. *Purification and Characterization of Three Thermostable Endochitinases of a Bacillus Noble Strain MH-1 Isolated from Chitin Containing Compost*. Appl. and Enviromental Microbiology Vol.64 No.9.
- Svitil, A.L., Ni Chadhain S.M., Moore J.A., Kirchman D.L. 1997. *Chitin Degradation Proteins Produced by the Marine Bacterium V. Harveyi Growing on Different Forms of Chitin*. Appl. and Enviromental Microbiology Vol.63 No.2

- Tsujibo, H., Orikoishi H., Shiotani K., Hayashi M., Umeda J., Miyamoto K., Imada C., Okami Y., Inamori Y. 1998. *Characterization of Chitinase C from Marine Bacterium Alteromonas sp. Strain O-7 and Its Corresponding Gene and Domain Structure*. . Appl. and Environmental Microbiology Vol. 64 No. 2.
- Ueda, M. and Arai M. 1992. Purification and some properties of Chitinases from *Aeromonas* sp. No. 10s-24. Biosci. Biotech. Biotech. Biochem. Vol. 56 No. 3: 460-464.
- Ward, O.P. 1983. Proteinases. *In: Microbial enzymes and biotechnology*. Ed. Fogarty, W.M. Applied Science Pub. London and New York.