

EKSPLORASI MIKROBA ASIDOFILIK PENGHASIL ENZIM KITINASE ASAL INDONESIA

Natsir, H., Debbie T., Maggy T., J.K.Hwang, dan Y.R.Pyun.

Laboratorium Mikrobiologi dan Biokimia PAU-Bioteknologi Institut Pertanian Bogor

ABSTRAK

Enzim kitinase merupakan suatu enzim yang mempunyai banyak manfaat dalam berbagai aspek. Adanya enzim kitinase memungkinkan konversi kitin yang berlimpah di alam menjadi produk yang berguna seperti kitosan. Kitosan ini merupakan produk dari kitin deasetilase yang aplikasinya mempunyai range yang luas dalam berbagai bidang, seperti industri pangan, kesehatan, kosmetik, bioteknologi, pengolahan limbah, membran dan industri kertas. Kitinase banyak terdapat pada tanaman, bakteri, kapang dan organisme laut. Kitinase asam merupakan enzim yang dapat memecah kitin pada pH rendah (dibawah pH 5,0). Kitinase asam dari bakteri dapat mendegradasi kitin menjadi kitosan, dimana kitosan hanya larut pada pH dibawah 6,5. Mikroba asidofil penghasil kitinase diisolasi dari sampel tanah dan air yang berasal dari beberapa lokasi antara lain kawah gunung Kamojang, Papandayan, dan Tangkuban Perahu, serta Pasar Ikan. Sampel tersebut ditumbuhkan di media padat yang mengandung koloidal kitin 1 % pada pH bervariasi (pH 3, 4, dan 5), kemudian diamati terbentuknya zona bening disekitar koloni. Dari hasil penelitian diperoleh 15 isolat dari Kamojang 22 (K22), 13 isolat dari Kamojang 24 (K24) dan 8 isolat dari Kamojang 1 (K1) yang dapat tumbuh pada pH 5 – 4. Sedang 7 isolat dari pasar ikan yang dapat tumbuh pada pH 5,0 dan 3 isolat pada pH 4,0. Dari ke-36 isolat diperoleh 4 isolat yang dapat tumbuh pada pH 5 – 4 dengan kecepatan pertumbuhan 4 hari dengan indeks kitinolitiknya (IK) masing-masing K22-2 (IK 1,6); K22-21 (IK 1,5); K24-23 (IK 1,4); dan K24-24 (IK 1,2). Keempat isolat yang potensial tersebut diidentifikasi dan diperoleh hasil bahwa semua merupakan bakteri gram positif, berspora, berbentuk batang, aerob dan bersifat motil. Kemudian selanjutnya dilakukan uji secara kuantitatif dengan berdasarkan metode reduksi kitin dan kitin desasetilase untuk mengetahui pH dan suhu optimum masing-masing isolat.

PENDAHULUAN

Dewasa ini perkembangan bioteknologi sudah demikian pesatnya dan menunjukkan hasil-hasil yang cukup menarik perhatian dunia, dimana salah satu produk bioteknologi yang menjadi primadona sekarang ini adalah molekul enzim. Melihat begitu pentingnya peranan enzim maka para ilmuwan berusaha mencari mikroba penghasil enzim yang tahan terhadap lingkungan ekstrim seperti termofil, asidofil, alkalofil, metalotoleran dan sebagainya (Suharsono, 1989).

Kitin merupakan polimer linier dari suatu residu N-asetilglukosamin yang terikat β -1,4 glikosidik. Senyawa ini merupakan salah satu polimer yang paling berlimpah di alam,

diperoleh mikroba penghasil kitinase, maka mikroba tersebut diidentifikasi dengan menggunakan Bergey's Manual, untuk mengetahui bentuk mikroba, jenis gram, berspora atau tidak, motilitas, aerob atau anaerob

Penyiapan Inokulum :

Persiapkan 10 ml media cair dengan komposisi : ; 0,7 % $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 0,1 % K_2HPO_4 ; 0,1 % NaCl ; 0,1 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,05 % yeast dalam keadaan steril ,
Kemudian inokulasikan bakteri yang terpilih pada pH 5,0 dan suhu 37 °C , selanjutnya inkubasikan pada shaker 170 rpm dengan suhu 37 °C selama 16 sampai 20 jam .

Pengamatan pada Medium Produksi

Inokulum yang telah di shaker sekitar 16 sampai 20 jam (pada poin 3.3) diinokulasikan ke dalam medium cair (medium produksi) yang mengandung : 0,5 % koloidal kitin ; 0,7 % $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 0,1 % K_2HPO_4 ; 0,1 % NaCl ; 0,1 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,05 % yeast ekstrak ; 1,5 % agar, dan 0,03 % DMCD (2,6-O-dimethyl- β -cyclodextrin) (Sakai *et.al.*, 1998). Pada setiap empat jam sampel diambil untuk diukur OD (376 nm), dan aktivitas enzim kitinase dan kitin deasetilase. Untuk pengukuran konsentrasi protein dan aktivitas enzim, filtrat atau supernatan protein diperoleh dengan mensentrifugasi sampel pada 12.000 rpm, suhu 4 °C selama 5 menit. Pengukuran dilakukan selama 5 hari.

Pengukuran Aktivitas Kitinase (Ueda dan Arai, 1992)

Campuran reaksi yang mengandung 1,0 ml koloidal kitin 0,3 % dan 2,0 ml *buffer Melvaine* (buffer sitrat – fosfat) dengan pH tertentu dan 1,0 ml larutan enzim, kemudian vortex dan inkubasi selama satu jam pada shaker 170 rpm , 37 °C. Sisa kitin dalam campuran reaksi diukur turbiditasnya pada panjang gelombang 660 nm. Satu unit aktivitas diukur sebagai sejumlah enzim yang menyebabkan penurunan absorbansi reaksi sebesar 0,001 pada 660 nm tiap menit.

Pengujian Kitin Deasetilase (Tokuyasu, 1996)

160 μl campuran reaksi (0,15 % glikol kitin + buffer pH bervariasi (3 sampai 6), kemudian tambahkan 40 μl larutan enzim. Vortex dan inkubasi selama 20 menit pada shaker suhu 37 °C dan 55 °C (dalam effendop). Tambahkan 200 μl asam asetat 33 % sebagai tanda akhir reaksi, untuk kontrol penambahan asam asetat 33% dilakukan sebelum penambahan larutan enzim. Sekitar 0,4 ml larutan di atas + 0,4 ml sodium nitrit + 0,4 ml asam asetat 33% (dalam tabung), vortex dan biarkan 10 menit. Kemudian tambahkan 0,4 ml amonium

sulfamat 12,5 % ,2 ml HCl 0,5 % dan indole 1 % dalam alkohol. Tabung dipanaskan selama 5 menit dalam waterbath Angkat dan biarkan dingin, kemudian ukur absorbansinya pada panjang gelombang 492 nm

Satu unit aktivitas enzim didefinisikan sebagai jumlah enzim yang memproduksi 1 μ mol glukosamine per menit.

Karakterisasi Sifat Biokimiawi Mikroba penghasil Enzim Kitinase

Dengan menggunakan substrat glikol kitin dan koloidal kitin dilakukan karakterisasi terhadap beberapa parameter seperti penentuan pH dan suhu optimum dalam pengukuran kitinase dan kitin deasetilase.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Mikroba asidofilik penghasil enzim kitinase asal Indonesia di isolasi, diidentifikasi dan dikoleksi dari beberapa lokasi dengan tujuan mencari mikroba asidofilik penghasil enzim kitinase. Sebagaimana kita ketahui bahwa pada kawah gunung banyak mengandung sulfur yang menyebabkan pH lingkungan tersebut bersifat asam. Sedangkan pengambilan sampel dari pasar ikan berdasar pada kenyataan bahwa di pasar ikan terdapat limbah udang yang telah tertimbun lama di dalam tanah sehingga diharapkan banyak didapatkan mikroba penghasil kitinase.

Berikut ini adalah tabel hasil isolasi dari sampel Kamojang, Papandayan, Tangkuban Perahu, dan Pasar Ikan.

Tabel 1. Hasil Isolasi dari Berbagai Sampel

No.	Sampel	pH 5,0		pH 4,0		pH 3,0		pH 2,0	
		Kol.	Kit.	Kol.	Kit.	Kol.	Kit.	Kol.	Kit.
1	Kamojang	7391	36	7055	-	1083	-	-	-
2	Papandayan	-	-	325	-	212	-	99	-
3	Tangkuban Perahu	1090	-	292	-	103	-	-	-
4	Pasar Ikan	2324	7	1031	-	183	-	-	-

Keterangan :

Kol. = Jumlah koloni yang didapatkan dari hasil penyebaran sampel

Kit. = Jumlah isolat yang mempunyai aktivitas kitinolitik

Hasil penyebaran ini disebar berdasar suhu pada tempat asalnya dimana

sampel Kamojang, Papandayan, dan Tangkuban Perahu disebar pada suhu 37 °C sampai 70 °C. Sampel Pasar Ikan hanya disebar pada suhu 37 °C. Sampel Papandayan tidak disebar pada pH 5,0 karena pH tempat asalnya yang rendah yaitu sekitar pH 2,0 – 4,0.

Dari setiap lokasi didapatkan isolat penghasil enzim kitinase, kemudian dihitung persen kitinolitiknya yaitu perbandingan jumlah isolat yang mempunyai aktivitas kitinolitik dengan jumlah seluruh isolat yang didapatkan pada lokasi tersebut. Tabel berikut ini adalah perhitungan persen kitinolitik dari tiap lokasi yang didapatkan isolat yang mempunyai aktivitas kitinolitik.

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

No.	Lokasi Sampel	JIK	JS	Kitinolitik (%)
1	Kamojang 1	8	154	5,20
2	Kamojang 22	15	143	10,49
3	Kamojang 24	13	162	8,02
4	Pasar Ikan 13	1	89	1,12
5	Pasar Ikan 18	1	36	2,77
6	Pasar Ikan 19	2	192	1,04
7	Pasar Ikan 20	6	116	5,17

Keterangan :

JIK = Jumlah isolat yang mempunyai aktivitas kitinolitik

JIS = Jumlah seluruh isolat

Isolat-isolat yang mempunyai aktivitas kitinolitik ini kemudian diukur indeks kitinolitiknya. Indeks kitinolitik merupakan pengukuran secara semi kuantitatif. Pengukuran secara kuantitatif dilakukan dengan menuji aktivitas enzim untuk mengetahui pH dan suhu optimum menggunakan metode reduksi kitin dan kitin deasetilase.

Pengujian ketahanan terhadap asam dilakukan dengan menurunkan pH media secara bertahap yang dimulai dari pH 5,0. Ternyata semua isolat dapat tumbuh pada pH 5,0 begitu pula dengan media pH 4,5. Sedangkan pada pH 4,0 tidak semua isolat dapat tumbuh dan hanya dua isolat yang dapat tumbuh dan menghasilkan halo yaitu K24-23 dan K24-24. Kecepatan pertumbuhan isolat dan kemampuan isolat untuk membentuk halo yang bervariasi disebabkan adanya perbedaan jenis isolat tersebut. Berikut ini adalah hasil pengukuran indeks kitinolitik isolat-isolat yang berasal dari Kamojang beserta ketahannya pada pH 4,0.

Tabel 3. Indeks kitinolitik isolat-isolat penghasil enzim kitinase pada suhu 37 °C

No.	Sumber dan Nama Isolat	Indeks Kitinolitik (IK)	
		pH 4,5	pH 4,0
1	K22 - 1	1,33 setelah 4 hari	---
2	K22 - 2	1,6 setelah 4 hari	---
3	K22 - 3	1,14 setelah 4 hari	---
4	K22 - 4	1,1 setelah 4 hari	---
5	K22 - 5	1,1 setelah 4 hari	---
6	K22 - 7	1,33 setelah 4 hari	---
7	K22 - 8	1,3 setelah 6 hari	---
8	K22 - 9	1,5 setelah 4 hari	---
9	K22 - 16	1,33 setelah 7 hari	---
10	K22 - 17	1,5 setelah 7 hari	---
11	K22 - 18	1,17 setelah 6 hari	---
12	K22 - 19	1,3 setelah 4 hari	---
13	K22 - 20	1,3 setelah 4 hari	---
14	K22 - 21	1,5 setelah 4 hari	---
15	K22 - 22	1,33 setelah 4 hari	---
16	K24 - 10	1,37 setelah 4 hari	---
17	K24 - 11	1,2 setelah 6 hari	---
18	K24 - 12	1,2 setelah 5 hari	---
19	K24 - 13	1,1 setelah 7 hari	---
20	K24 - 14	1,4 setelah 4 hari	1,4 setelah 5 hari
21	K24 - 23	1,33 setelah 4 hari	1,4 setelah 4 hari
22	K24 - 24	1,33 setelah 4 hari	1,2 setelah 4 hari
23	K24 - 25	1,2 setelah 7 hari	---
24	K24 - 26	1,2 setelah 5 hari	---
25	K24 - 27	1,08 setelah 5 hari	---
26	K24 - 28	1,07 setelah 4 hari	---
27	K24 - 27	1,11 setelah 4 hari	---
28	K24 - 27	1,14 setelah 4 hari	---
29	K1 - 5	1,5 setelah 5 hari	---
30	K1 - 6	1,33 setelah 5 hari	---
31	K1 - 7	1,25 setelah 7 hari	---
32	K1 - 8	1,11 setelah 7 hari	---
33	K1 - 13	1,11 setelah 7 hari	---
34	K1 - 14	1,25 setelah 5 hari	---
35	K1 - 15	1,6 setelah 5 hari	---
36	K1 - 16	1,75 setelah 5 hari	---

Bagi mikroba asidofilik, lingkungan atau media dengan pH netral akan membuat mikroba tersebut tidak dapat tumbuh. Faktor utama yang mempengaruhi ketahanan mikroba terhadap lingkungan asam adalah membran plasma. Jika pH meningkat mencapai netral atau lebih, plasma membran mikroba asidofilik akan larut dan selnya lisis. Jadi

kestabilan membran sangat ditentukan oleh konsentrasi hidrogen yang tinggi (Brock dan Madigan, 1991).

Berdasarkan hasil identifikasi mikroba, didapatkan kesimpulan sementara bahwa mikroba tersebut mengarah ke ciri *Bacillus*, karena berdasarkan *Bergey's Manual Bacillus* mempunyai ciri-ciri antara lain gram positif, berbentuk batang, berspora, dan motil. Sedangkan mikroba penghasil enzim kitinase lainnya seperti yang telah disebutkan di atas tidak memenuhi syarat-syarat seperti *Bacillus*. Berikut adalah hasil identifikasi mikroba isolat-isolat yang potensial.

Tabel 4 Hasil identifikasi mikroba

No.	Isolat	Gram	Spora	Bentuk	Aerob/ anaerob	Motilitas
1	K22 - 2	Positif	Berspora	Batang	Aerob	Motil
2	K22 - 21	Positif	Berspora	Batang	Aerob	Motil
3	K22 - 23	Positif	Berspora	Batang	Aerob	Motil
4	K22 - 24	Positif	Berspora	Batang	Aerob	Motil

KESIMPULAN

Dari hasil penelitian ini diperoleh empat isolat yang dapat tumbuh pada pH 4,0 – 5,0 dan cukup potensial yaitu K22 – 2 ; K22 – 21 ; K24 – 23 ; dan K24 – 24. Keempat isolat tersebut telah diidentifikasi dan diperoleh hasil bahwa semuanya termasuk golongan *Bacillus*.

DAFTAR PUSTAKA

- Bough, W.A., 1975. Coagulation with Chitosan an Aid to Recovery of by Product Egg Breaking Wastes. *Poultry Sci. J.* 54 : 1904 – 1911
- Brock, T.D., dan Madigan, M.T., 1991. *Biology of Microorganism*. Sixth Edition. Prentice Hall International Inc, Englewoos Cliffs, New Jersey.
- Cabib, E., 1987. The Synthesis and Degradation of Chitin. *In: Meister, A., (Ed.) Advances in Enzymology*. Vol: 59. John Wiley and Sons. New York. Pp 59 – 101.
- Frobisher, M.Sc.D., 1962. *Fundamentals of Microbiology*. Seventh edition. W.B. Saunders Company, Philadelphia, London.

- Gooday, G.W., 1983. The Microbial Synthesis of Sellulose, Chitin and Chitosan. Prog. Indust. Microbiol. 18: 85 – 127.
- Gooday, G.W., 1990. The Ecology of Chitin Degradation. In: KC. Marshall (Ed): Advances and Biotechnology. Vol. 34 : 715 – 719.
- Knorr, D., 1984. Use of Chitinous Polymers in Food. Food Tech. J. 38 : 84 - 95
- Sakai, K., *et. al.*, 1998. Purification and Characterization of Three Termostable Endochitinases of a Noble *Bacillus* Strain, MH-1, Isolated from Chitin-Containing Compost. *Appl. And Environmenttal Microbiology*. Vol. 64 (9) : 3397 – 3402.
- Suhartono, M.T., 1989. Enzim dan Bioteknologi. Depdikbud, Dikti, PAU Bioteknologi - IPB. Bogor.
- Tokuyasu, K., Ohnishi-Kameyama, M., Hayashi, K. 1996. Purification and Characterization of Extracellular Chitin Deacetylase from *Colletrotrichum lindemuthianum*. Biosci. Biotech. Biochem. Vol. 60 (10): 1598-1603.
- Ueda, M., dan Motoo, A., 1992. Purification and Some Properties of Chitinases from *Aeromonas sp.* No. 10S-24. Biosci. Biotech. Biochem. Vol. 56 (2): 460 – 464.