AKTIVITAS ANTIBAKTERI OLIGOMER KITOSAN YANG DIPRODUKSI MENGGUNAKAN KITONASE DARI ISOLAT *B. licheniformis* MB-2

Meidina[1)], Sugiyono[2)] , B. Sri Laksmi Jenie[2)] , M.T. Suhartono[2)]

[1)] *Mahasiswa Pascasarjana S2 Institut Pertanian Bogor, Darmaga, Bogor*
[2)] *Departemen Teknologi Pangan dan Gizi, Institut Pertanian Bogor, PO Box 220, Kampus Darmaga, Bogor 16002*

Abstrak

Senyawa bioaktif oligomer kitosan diproduksi menggunakan kitosanase dari isolat B. licheniformis MB-2. Enzim kitosanase hasil pengendapan amonium sulfat 80% jenuh dengan aktivitas 0,005; 0,0085; 0,1 dan 0,17 Unit ditambahkan pada substrat kitosan dengan derajat deasetilasi minimum 85%, dan diinkubasi pada 70^{0}C selama 1, 2, dan 3 jam. Uji aktivitas antibakteri menggunakan metode difusi agar terhadap bakteri patogen menunjukkan hasil yang positif dengan indeks penghambatan berturut-turut: 2,47; 3,23; 3,26; 2,23; 2,3, dan 2,07 untuk Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus aureus, Salmonella typhimurium, Escherichia coli, Listeria monocytogenes, dan Bacillus cereus. Penghambatan terbaik dihasilkan dari oligomer kitosan yang diproduksi menggunakan enzim dengan aktivitas 0,1 Unit per miligram kitosan untuk semua jenis patogen. Waktu produksi 1, 2, dan 3 jam untuk unit enzim per miligram substrat yang sama tidak menunjukkan perbedaan penghambatan yang signifikan. Analisis HPLC menunjukkan bahwa oligomer kitosan yang dihasilkan dalam penelitian ini terdiri dari monomer sampai hexamer (DP 1-6).

Kata kunci: aktivitas antibakteri, kitosan oligomer, kitosanase

1. Pendahuluan

Kitosan adalah produk terdeasetilasi dari kitin yang merupakan biopolimer alami kedua terbanyak di alam setelah selulosa, yang banyak terdapat pada serangga, krustasea, dan fungi (Sanford dan Hutchings, 1987). Diperkirakan lebih dari 10^9-10^{10} ton kitosan diproduksi di alam tiap tahun (Peter, 1997). Sebagai negara maritim, Indonesia sangat berpotensi menghasilkan kitin dan produk turunannya. Limbah cangkang rajungan di Cirebon saja berkisar 10 ton perhari yang berasal dari sekurangnya 20 industri kecil. Kitosan tersebut masih menjadi limbah yang dibuang dan menimbulkan masalah lingkungan. Data statistik menunjukkan negara yang memiliki industri pengolahan kerang menghasilkan sekitar 56.200 ton limbah. Pasar dunia untuk produk turunan kitin menunjukkan bahwa oligomer kitosan adalah produk yang termahal, yaitu senilai $ 60.000/ton (Sandford, 2003).

Oligomer kitosan dapat dihasilkan dengan iradiasi *sonik*, *hydrodynamic shearing*, dan hidrolisis secara kimiawi. Akan tetapi cara-cara tersebut menghasilkan oligomer dengan derajat polimerisasi (DP) yang rendah karena efisiensi yang rendah dan pemotongan yang acak. Degradasi kitosan secara enzimatis adalah cara yang lebih baik untuk mendapatkan oligomer kitosan dengan derajat polimerisasi yang lebih tinggi. Beberapa tahun belakangan banyak studi mengenai berbagai enzim yang berbeda untuk mendegradasi kitosan. Aiba (1993; 1994a; 1994b) menghidrolisis kitosan yang terdeasetilasi sebagian menggunakan kitinase dan lisozim. Pantaleone et.al. (1992) dan Brine et.al. () melaporkan hidrolisis kitosan menggunakan berbagai jenis enzim, yaitu glikanase, protease, lipase, dan tannase, yang didapatkan dari berbagai bakteri, fungi, mamalia, dan tanaman. Muzzarelli, Xia, Tomasetti dan Ilari (1995; 1994) menggunakan papain dan lipase untuk depolimerisasi kitosan. Dari berbagai hasil tersebut banyak enzim komersial yang dikembangkan untuk menghasilkan proses hidrolisis yang efisien terhadap kitosan. Akan tetapi penggunaan enzim-enzim tersebut membutuhkan konsentrasi yang relatif tinggi, sedangkan kitosanase menunjukkan aktivitas yang cukup baik pada konsentrasi yang kecil.

Di Indonesia, sejumlah bakteri yang mempunyai aktivitas enzim kitinolitik telah diisolasi dari berbagai sumber air panas di daerah Tompasso, Manado. Dari 45 isolat yang didapat, *Bacillus licheniformis* MB-2 menunjukkan indeks kitinolitik yang terbesar (Jayanti, 2002). Enzim kitosanase yang dihasilkan dari isolat MB-2 tersebut telah dimurnikan dan dikarakterisasi (Chasanah, 2004).

Kitosan dan oligomer kitosan potensial sebagai antimikroba karena senyawa ini merupakan polimer alami sehingga diharapkan aman bagi manusia. Tsai dan Su (1999) menunjukkan adanya efek bakterisidal dari kitosan udang terhadap *E. Coli.* Tsai et.al (2000) menghasilkan antibakteri kitooligosakarida dengan DP 1-8 yang didegradasi dari kitosan udang menggunakan selulase. Sampai saat ini aktivitas antibakteri oligomer kitosan masih menjadi hal baru yang terus diteliti.

2. Metodologi

Bahan

Kitosan dengan derajat deasetilasi minimum 85% berasal dari kulit udang yang diperoleh dari Sigma Chemical Company Ltd (C3646-25G 014K0674). Semua media mikrobiologi dan pelarut diperoleh dari Oxoid Ltd. Bakteri termofil *B. licheniformis* MB-2 diisolasi dari daerah Tompasso, Manado, Indonesia. Isolat bakteri patogen terdiri dari *Pseudomonas aeruginosa, Listeria monocytogenes, Staphylococcus aureus, Salmonella typhimurium, Escherichia coli,* dan *Bacillus cereus,* diperoleh dari koleksi Rumah Sakit Pertamina Jakarta dan Balai Penelitian Veteriner Bogor.

Kultivasi bakteri

Satu ose isolat bakteri uji masing-masing diinokulasikan ke dalam 5 ml media LB (Luria Bertani), lalu dinkubasi 37^{0}C selama 24 jam. Sebanyak 10 µL kultur 24 jam tersebut diambil dan diinokulasikan ke dalam 10 mL media LB dan diinkubasi 37^{0}C sampai akhir fase logaritmik (*Pseudomonas aeruginosa, Listeria monocytogenes* 24 jam; *Staphylococcus aureus, Salmonella typhimurium* 16 jam; *Escherichia coli*; *Bacillus cereus* 12 jam. Dari hasil TPC, jumlah bakteri pada akhir fase log tersebut adalah 2.5x10^8, 9.5x10^7, 2.8x10^6, 1.6x10^7, 2.1x10^8, dan 4.7x10^6 CFU/mL berturut-turut untuk *P. aeruginosa, L. monocytogenes, S. aureus, S.typhimurium, E.coli,* dan *B.cereus*.

Degradasi kitosan

Kitosan terlarut 1% dipersiapkan dalam larutan asam asetat Satu liter supernatan bebas sel diendapkan dengan ammonium sulfat 80% jenuh, kemudian disentrifus 10.000 rpm selama 15 menit. Endapan dilarutkan dalam buffer fosfat 0,05 M pH 6,0. Unit enzim yang digunakan adalah 0,005, 0,0085; 0,1 dan 0,17 Unit per miligram kitosan. Reaksi hidrolisis enzim dengan substrat dilakukan pada suhu 70^{0}C (suhu optimum enzim) selama 1, 2, dan 3 jam. Reaksi enzimatik dihentikan dengan cara direbus selama 10 menit. Setelah itu sampel disentrifus dan di-*freeze dry.* Untuk uji antibakteri sampel disterilisasi 121^{0}C selama 15 menit.

Uji aktivitas enzim

Aktivitas enzim diuji menggunakan metode Yoon *et al* (2000) yang dimodifikasi. Jumlah gula reduksi ditentukan dengan metode Schales dengan glukosamin sebagai standar (Uchida and Ohtakara, 1998). Satu unit aktivitas enzim didefinisikan sebagai jumlah enzim yang menghasilkan 1 µmol glucosamine per menit.

Uji antibakteri dengan difusi agar

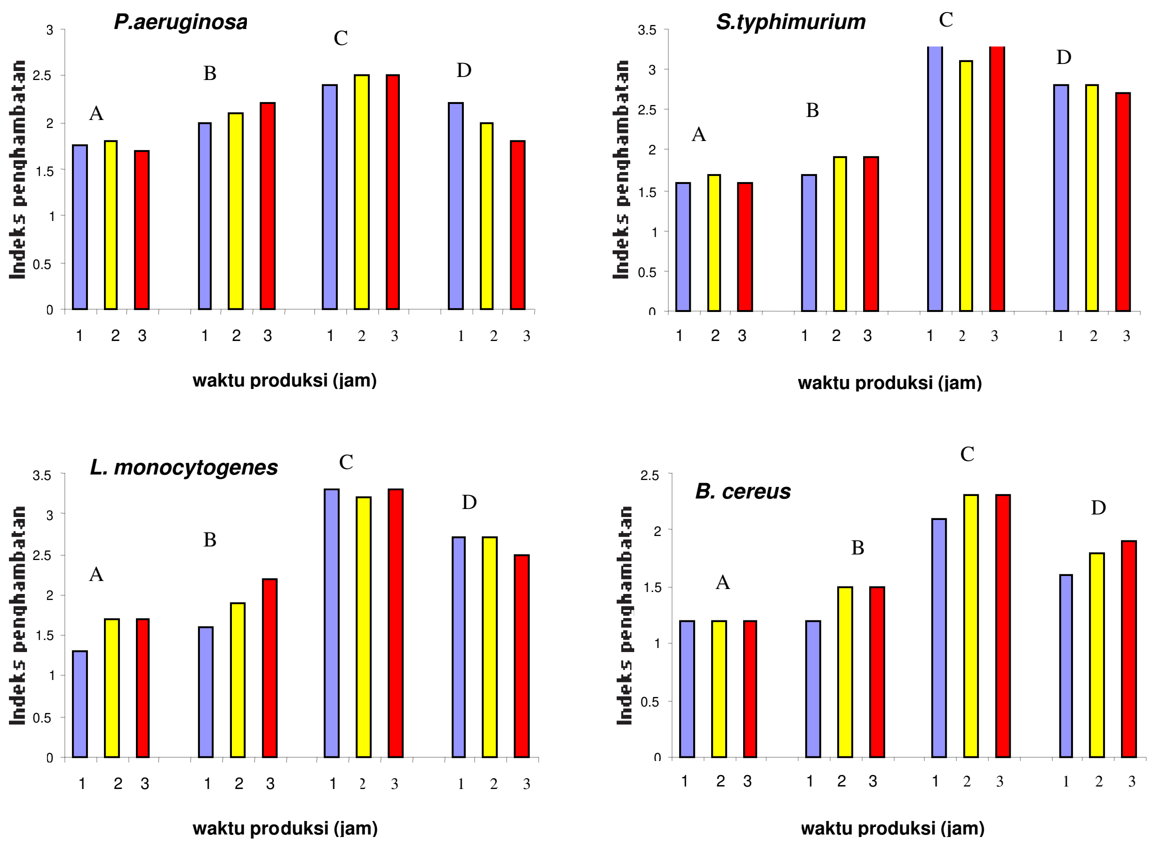
Metode yang digunakan mengacu pada Carson dan Riley (1995). Kultur dengan jumlah bakteri 10^5 CFU/mL sebanyak 1 mL dimasukkan ke dalam cawan petri dan dituangkan media agar sebanyak 20 mL, dibiarkan membeku lalu dibuat sumur dengan diameter 8 mm. Sampel antibakteri dimasukkan ke dalam sumur, diinkubasi 37^{0}C, dan diamati zona bening yang terbentuk setelah 20 jam.

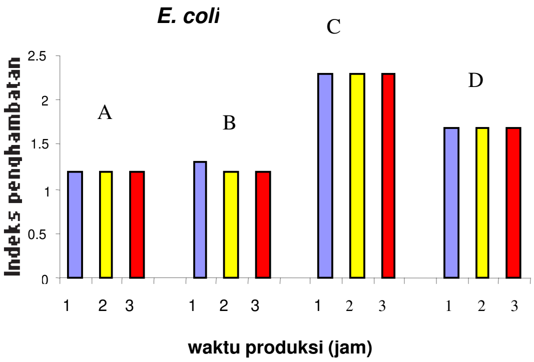
3. Hasil dan Diskusi

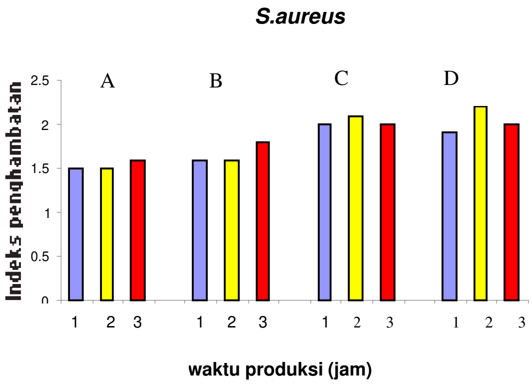
Aktivitas antibakteri ditunjukkan oleh indeks penghambatan yang merupakan hasil bagi antara diameter zona bening yang diamati dengan diameter sumur. Dari keempat Unit enzim yang digunakan yaitu 0,005; 0,0085; 0,1 dan 0,17 Unit/mg kitosan, perlakuan yang mempunyai aktivitas penghambatan yang terbaik adalah 0,1 Unit/mg kitosan untuk keenam jenis patogen yang diujikan (Gambar 1). Perlakuan waktu 1, 2, dan 3 jam tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan untuk unit enzim yang sama per miligram kitosan. Hasil pengamatan terhadap indeks penghambatan adalah: 2,47; 3,23; 3,26; 2,23; 2,3 dan 2,06 berturut-turut untuk *P. aeruginosa, S. typhimurium, L. monocytogenes, B. cereus, E. coli, dan S. aureus* (Gambar 2).

Berdasarkan analisis HPLC diketahui bahwa oligomer kitosan yang dihasilkan dalam penelitian ini terdiri dari monomer sampai hexamer (DP 1-6). Uji difusi agar terhadap monomer glukosamin tidak menunjukkan adanya penghambatan bakteri, sehingga diduga campuran oligomer DP 2-6 inilah yang memberikan aktivitas penghambatan terhadap bakteri uji.

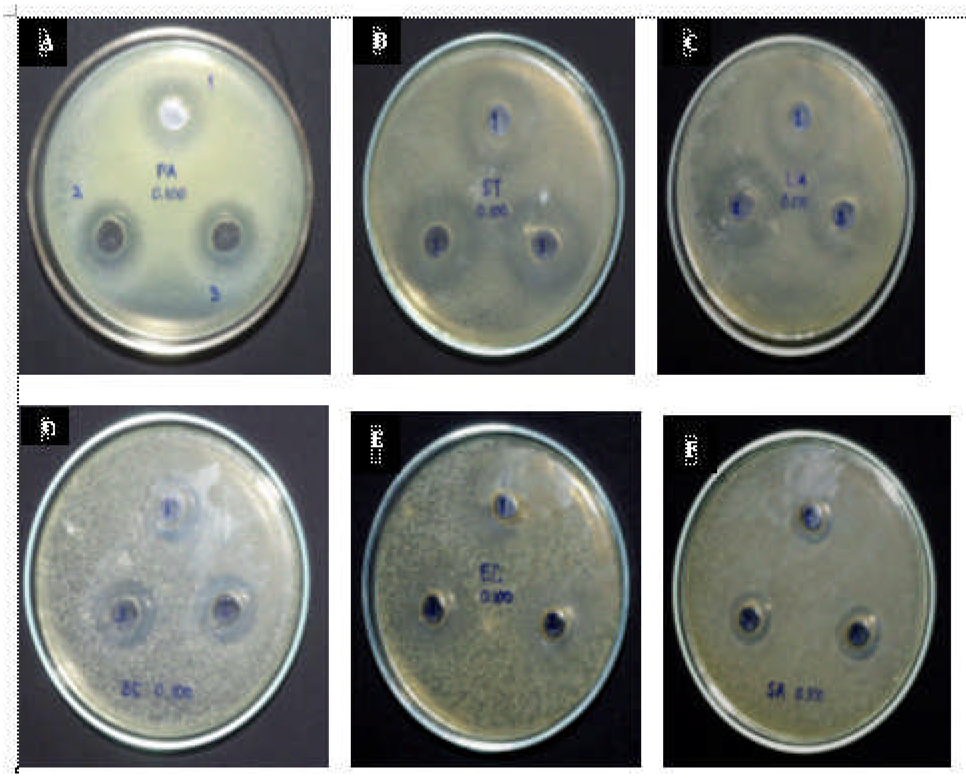
Aktivitas antibakteri oligomer kitosan beragam tergantung jenis bakteri uji. Bakteri gram positif yaitu *L.monocytogenes, B.cereus* dan *S.aureus* lebih dihambat oleh kitosan dibandingkan oligomernya, sedangkan bakteri gram negatif seperti *P.aeruginosa, S.typhimurium, dan E.coli* lebih dihambat oleh bentuk oligomernya (Gambar 3). Tsai et.al (2000) menghasilkan oligomer kitosan dengan DP 1-8 menggunakan selulase. Aktivitas antibakteri oligomer tersebut lebih besar jika dibandingkan kitosan terhadap *Aeromonas hydrophila, E.coli, L.monocytogenes, P.aeruginosa, S.typhimurium, Shigella dysentriae, S.aureus, S.aureus, Vibrio cholerae, dan V.parahaemolyticus.* Tsai et.al. (2004) menghasilkan kitosan berbobot molekul rendah (12 kDa) yang lebih efektif sebagai antibakteri dibandingkan oligomer kitosan dengan DP 1-8. Uji antibakteri enam jenis kitosan dan oligomer kitosan dengan berbagai bobot molekul terhadap 4 bakteri gram negatif dan 7 bakteri gram positif menunjukkan bahwa efek penghambatan bakteri berbeda untuk bobot molekul kitosan dan jenis bakteri yang berbeda (No et.al, 2002). Oligomer kitosan 0,5% dapat menghambat pertumbuhan *E.coli* dengan baik. Aktivitas antibakteri tersebut sama dengan 0,1% kitosan (Jeon dan Kim, 2000). Sebagai kontrol digunakan antibiotik kanamisin dengan konsentrasi 100 ug/mL. Dari hasil difusi agar, terlihat bahwa oligomer kitosan memiliki efektivitas yang cukup baik dibandingkan dengan kanamisin 100 ug/mL. Kanamisin merupakan antibakteri yang dapat menghambat sintesis protein dan enzim. Kanamisin mampu menghambat proses translasi pada sintesis protein. Antibiotik ini ini mengikat 30s subunit ribosom dan mengakibatkan kesalahan pembacaan dari mRNA. Kanamisin memiliki spektrum yang luas yang mampu menghambat gram positif maupun gram negatif.



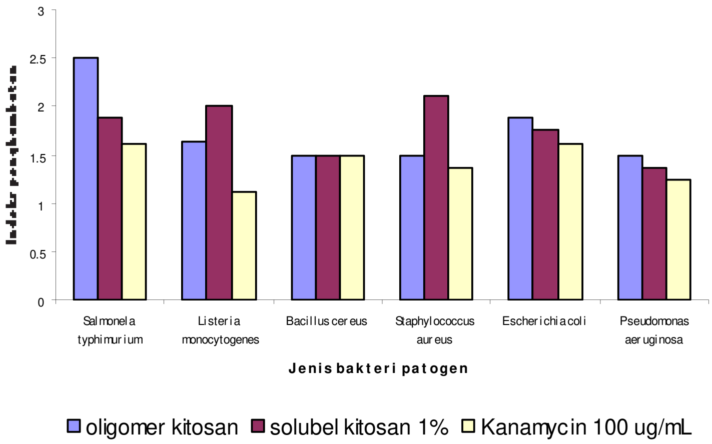




Gambar 1. Aktivitas penghambatan kitosan oligomer terhadap bakteri patogen pada aktivitas Unit enzim yang berbeda dan waktu produksi selam 1, 2, dan 3 jam dengan aktivitas enzim 0.005 (A), 0.0085 (B), 0.1 (C), dan 0.17 (D) Unit per miligram kitosan.



Gambar 2. Aktivitas penghambatan kitosan oligomer (0.100 U/mg kitosan) terhadap bakteri patogen: *Pseudomonas aeruginosa* (A), *Salmonella typhimurium* (B), *Listeria monocytogenes* (C), *Bacillus cereus* (D), *Escherichia coli* (E), *dan Staphylococcuc aureus* (F).



Gambar 3. Aktivitas penghambatan oligomer kitosan, kitosan, dan kanamisin terhadap enam bakteri patogen

4. Kesimpulan

Aktivitas antibakteri oligomer kitosan dan kitosan beragam terhadap bakteri uji yang berbeda. Uji menggunakan metode difusi agar menunjukkan penghambatan yang lebih tinggi terhadap gram negatif dan lebih rendah terhadap gram positif untuk oligomer kitosan. Oliomer kitosan memiliki aktivitas antibakteri yang cukup baik terhadap keenem bakteri uji.

Ucapan terimakasih

Penelitian ini dibiayai oleh Research Grant Program Hibah Kompetisi B, Departemen Teknologi Pangan dan Gizi.

Daftar Pustaka

1. Aiba, S., (1993), "Studies on chitosan: 6. Relationship between N-acetyl group distribution pattern and chitinase digestibility of partially N-acetylated chitosans". International Journal of Biology and Macromolecules"; 15, 241-245.
2. Aiba, S., (1994a), "Preparation of N-acetylchitooligosaccharides by hydrolysis of chitosan with chitinase followed by N-acetylation", Carbohydrates Research, 265, 323-328.
3. Aiba, S., (1994b), "Preparation of N-acetylchitooligosaccharides from lysozymic hydrolysates of partially N-acetylated chitosan. Carbohydrates Research, 261, 297-306.
4. Brine, C. J., P.A. SAndford, dan J.P. Zikakis (editor), (1992). Advanced chitin and chitosan, hal 292-303, Elsevier, Amsterdam.
5. Carson, C.F., dan T.V. Riley, (1995), "Antimicrobial activity of the major components of the essential oil of Melalueca alternifolia", J. Appl Bacteriol 78: 264-269.
6. Chasanah, E., (2004). "Characterization of chitosanase of *Bacillus licheniformis* MB-2 from Manado hot spring water. Institut Pertanian Bogor.
7. Jayanti, J.F.L., (2002). "Thermostable chitinase and chitin deacetylase from Manado isolates", Skripsi sarjana jurusan Teknologi Pangan dan Gizi, Institut Pertanian Bogor.
8. Jeon, Y.J., dan S. K. Kim, (2000), "Production of chitooligosaccharides using an ultrafiltration membrane reactor and their antibacterial activity", Carb. Polymer 41: 133-141.
9. Muzzarelli, R.A.A., M.Tomasetti dan P.Ilari, (1995), "Depolymerization of chitosan with the aid of papain", Enzyme and Microbial Technology, 16, 110-114.
10. Muzzarelli, R.A.A., W. Xia, M.Tomasetti dan P.Ilari, (1995), "Depolymerization of chitosan and substituted chitosans with the aid of a wheat germ lipase preparation", Enzyme and Microbial Technology, 17, 541-545.
11. No, H.K., N.Y. Park, S.H. Lee, dan S.P. Meyers, (2002), "Antibacterial activity of chitosan and chitosan oligomers with different molecular weight. Int. J. Food Microbiol., 74 (1-2): 65-72.

12. Pantaleone, D., M. YAlpani, dan M. Scollar (1992a), "Unusual susceptibility of chitosan to enzymic hydrolysis". Carbohydrates Research, 237, 325-332.
13. Peter, M.G., (1997), "Introduction remarks", Carb. Eur. 19 (1), 9-15.
14. Sanford, P.A., dan G.P. Hutchings, (1987). "Industrial polysaccharides. Di dalam: Genetic Engineering, Structure/Property Relation and Application, hal 363-375, Elsevier, Amsterdam.
15. Sanford, P.T., (2003). "World market of chitin and its derivatives". Di dalam Varum KM, Domard A and Smidsrod O, editors. Advances in Chitin Science. Vol VI. Trondheim, Norway.
16. Tsai G.J., dan W.H. Su., (1999), "Antibacterial activity of shrimp chitosan against *Escherichia coli".* J. Food Prot. 62(3): 239-243.
17. Tsai, G.J., Z.Y. Wu, dan W.H. Su, (2000), "Antibacterial activity of chitooligosaccharide mixture prepared by cellulose digestion of shrimp chitosan and its application to milk preservation", J. Food Prot, 63(6): 747-752.
18. Uchida Y, and Ohtakara A. Chitosanase from *Bacillus* species. Methods in Enzymology 1998; 161: 501-506
19. Yoon HG, Kim HY, Lim YH, Kim HK, Shin DH, Hong BS, Cho HY. 2000. Thermostable chitosanase from *Bacillus* sp. strain CK4: Cloning and expression of the gene and characterization of the enzyme. Appl. and Env. Microbiol., pp 3727-3734