

Isolasi dan Karakterisasi Kitinase Isolat Jamur Akuatik Kitinolitik KC3 dari Kecoa (Orthoptera)

by Sriatun Siatun

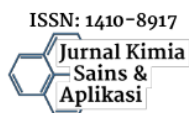
Submission date: 23-May-2019 01:19PM (UTC+0700)

Submission ID: 1134766994

File name: 18242-45696-2-PB.pdf (517.4K)

Word count: 4050

Character count: 25191



Isolasi dan Karakterisasi Kitinase Isolat Jamur Akuatik Kitinolitik KC3 dari Kecoa (*Orthoptera*)

Karso^a, Wuryanti^{a*}, Sriatun^a

^a Chemistry Department, Faculty of Sciences and Mathematics, Diponegoro University, Jalan Prof. Soedarto, Tembalang, Semarang

Corresponding author: wuryanti@live.undip.ac.id

Article Info

Keywords:
chitinases, N-acetylglucosamina, KC3 aquatic fungi, cockroach

Kata Kunci:
kitinase, N-asetilglukosamin, jamur akuatik KC3, kecoa

Abstract

The isolation and characterization of chitinase from the chitinolytic aquatic fungal isolate KC3 from isolation of cockroach carcasses have been performed. The objective of this study was to obtain chitinase from KC3 aquatic fungal isolates and to obtain isolated chitinase characterization information that included optimum pH and optimum temperature. Chitinase is a complex enzyme composed of endocytinase, kitobiosidase and N-acetylglucosaminidase. The production medium contained choloidal chitin as an inducer. Fractionation was done with ammonium sulfate to a saturation level of 90% (F5). Chitinase activity was measured by Ueda-Arai method based on substrate reduction. The highest specific activity was obtained at fraction one (F1) that was equal to 73.258 U/mg. The chitinase characterization result was obtained by optimum chitinase pH profile at pH 3.8 whereas the temperature profile obtained two peaks at 28,5°C and 29,5°C. The temperature profile of the two peaks/dots indicated if there were two possible types of chitinase in the enzyme under test.

Abstrak

Isolasi dan karakterisasi kitinase dari isolat jamur akuatik kitinolitik KC3 hasil isolasi bangkai kecoa telah dilakukan. Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan kitinase dari isolat jamur akuatik KC3 dan mendapatkan informasi karakter kitinase hasil isolasi yang meliputi pH optimum dan suhu optimum. Kitinase adalah enzim kompleks terdiri dari endokitinase, kitobiosidase dan N-asetilglukosaminidase. Media produksi mengandung kitin koloidal sebagai inducer. Fraksinasi dilakukan dengan amonium sulfat sampai tingkat kejenuhan 90% (F5). Aktivitas kitinase diukur dengan metode Ueda-Arai berdasarkan pengurangan substrat. Aktivitas spesifik paling tinggi diperoleh pada fraksi satu (F1) yaitu sebesar 73,258 U/mg. Hasil karakterisasi kitinase diperoleh profil pH optimum kitinase pada pH 3,8 sedangkan profil suhunya diperoleh dua puncak yaitu pada 28,5°C dan 29,5°C. Profil suhu dua puncak/titik menunjukkan jika kemungkinan terdapat dua jenis kitinase pada enzim yang diuji.

1. Pendahuluan

Kitinase adalah enzim golongan glikosil hidrolase yang mengkonversi kitin menjadi monomernya yakni N-asetil glukosamin yang dapat digunakan sebagai substrat dalam berbagai aplikasi industri [1, 2]. N-asetil glukosamin merupakan komponen dari glikoprotein dan glikosaminoglikan yang berperan sebagai substrat untuk perbaikan jaringan dan reaksi anti-inflamasi [3].

N-asetil glukosamin memiliki aktivitas anti-inflamasi pada kondrosit manusia untuk mengatasi gejala osteoarthritis [4]. Selain itu, N-asetil glukosamin juga diaplikasikan pada kosmetik untuk mencegah hiperpigmentasi, penuaan dan menjaga elastisitas kulit [5]. Semua enzim yang dapat mendegradasi kitin disebut sebagai kitinase total atau kitinase non spesifik. Berdasarkan *mode of action*, kitinase dapat diklasifikasikan ke dalam dua kategori utama,

endokitinase (EC.3.2.1.14) dan eksokitinase yang terdiri dari kitobiohidrolase dan N-asetilglukosaminidase (EC.3.2.1.30) [6]. Endokitinase menghidrolisis kitin secara acak dari bagian dalam menghasilkan kitoologomer. Eksokitinase terdiri dari kitobiohidrolase yang menghidrolisis kitin secara berurutan dari ujung nonreduksi menghasilkan kitobiosa sebagai produk akhir dan β -N-asetilheksosaminidase yang menghidrolisis kitin secara berurutan dari ujung nonreduksi menghasilkan N-asetilglukosamin [7]. Saat ini, kitinase banyak diaplikasikan dalam bidang pertanian dan bioteknologi. Kitinase dapat digunakan sebagai agen biokontrol untuk jamur patogen, menghambat kerusakan makanan kemasan dan sebagai insektisida [8]. Selain itu, kitinase diantaranya juga digunakan sebagai biokontrol larva nyamuk, preparasi protoplasts, produksi protein sel tunggal dari limbah perikanan, produksi senyawa kitoooligosakarida dan N-asetilglukosamin [7, 9].

Sumber kitinase dari golongan mikroorganisme misalnya adalah bakteri *Bacillus sp.* DAU101 [10], *Enterobacter sp.* NRG4 [9]. Organisme lain yang dapat menghasilkan kitinase adalah aktinomiset [11]. Kitinase juga dapat ditemukan pada jamur *Trichoderma viride* [12].

Salah satu jamur yang memiliki potensi sebagai sumber kitinase adalah jamur akuatik. Jamur akuatik adalah jamur yang hidup dalam habitat berair. Jamur akuatik kitinolitik merupakan jamur akuatik yang memiliki kemampuan untuk menghasilkan kitinase sehingga mampu mendegradasi kitin. Al-Rekabi, dkk (2005) melaporkan kemampuan kitinolitik dari dua jamur akuatik yaitu *Saprolegnia turfosa* dan *Achlya sp.* Isolat jamur akuatik KC3 koleksi Laboratorium Mikrobiologi Jurusan Biologi FSM Undip juga berpotensi menjadi sumber kitinase. Jamur akuatik ini telah berhasil diisolasi oleh tim penelitian tematik DBD FSM Undip dari bangkai kecoa yang ditempatkan dalam air. Kecoa merupakan spesies serangga dari ordo *orthoptera*. Tubuh kecoa mengandung kitin sebesar 35% [13]. Karena itu, jamur akuatik KC3 mampu tumbuh pada bangkai kecoa dengan mendegradasi kitin pada tubuh kecoa sebagai sumber karbon dan nitrogen untuk pertumbuhannya

Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan kitinase yang diisolasi dari jamur akuatik kitinolitik KC3 dan mendapatkan informasi karakteristik kitinase hasil isolasi yang meliputi pH dan suhu optimum.

2. Metode Penelitian

Alat dan Bahan

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini adalah peralatan gelas laboratorium kimia, autoklaf (*Napco Model 8000-DSE*), mikropipet (*Nichiryo Model 5000F*), sentrifus (*Centrifuc-228*), Spektrofotometer UV-Vis (*T60u Spectrometer*), *Shaker incubator* (*ES-20 Giant*), neraca analitik (*Kern*), oven (*LG*), kompor listrik (*Maspion*). Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah biakan murni jamur akuatik KC3 koleksi Laboratorium Mikrobiologi Jurusan Biologi FSM Undip, koloidal kitin, KH_2PO_4 , NaNO_3 , BaCl_2 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$,

CuSO_4 , Kalium natrium tartrat, KCl, FeSO_4 , pepton, *yeast extract*, BSA, *Follin-Ciocalteu*, bufer asetat 0,2 M, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

Peremajaan dan Aktivasi Jamur Akuatik KC3

Jarum ose yang telah disterilkan dengan autoklaf dan pemijaran digoreskan pada spora biakan murni sel jamur akuatik dari stok awal media agar miring. Kemudian secara aseptik spora tersebut diinokulasikan pada media padat kitin yang terdiri dari KH_2PO_4 0,1 %, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,05 %, KCl 0,05 %, agar 3 % dan kitin koloidal 0,5 %. Media yang telah diinokulasi dengan spora jamur kemudian diinkubasi pada suhu ruang di inkubator. Tahap selanjutnya sebanyak satu mata jarum ose dari hasil peremajaan yang sudah tumbuh pada media padat kitin diinokulasikan pada media cair yang mengandung komposisi seperti tabel I, kemudian dilakukan inkubasi pada *inkubator shaker* selama 3 hari dengan kecepatan 50 rpm.

Tabel 1: Komposisi 100 mL media fermentasi cair

Bahan	gram
Koloidal kitin	5
NaNO_3	0,2
KH_2PO_4	0,1
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,05
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,05
KCl	0,05
<i>Yeast extract</i>	0,25
Pepton	0,25

Pembuatan Kurva Pertumbuhan

Sebanyak 10 buah botol gelas masing-masing diisi dengan 20 mL media cair dengan komposisi seperti pada tabel I dalam bufer asetat pH 5, kemudian disterilisasi dengan autoklaf selama 20 menit. Pada 10 buah botol gelas masing-masing ditambahkan 0,8 mL inokulum jamur akuatik (sebagai sampel) secara aseptik. Kemudian ke-10 botol tersebut dimasukkan dalam *inkubator shaker* dengan kecepatan 50 rpm pada suhu ruang, selanjutnya sampel diambil tiap 6 jam untuk diukur berat keringnya. Penentuan kurva pertumbuhan jamur akuatik dilakukan dengan menggunakan metode pengukuran berat kering sel. Data yang didapatkan adalah jumlah berat kering sel jamur. Data yang diperoleh kemudian diplotkan terhadap waktu sehingga diperoleh grafik waktu vs jumlah berat kering sel jamur.

Produksi Kitinase

Produksi kitinase diawali dengan membuat media *starter* sebanyak 50 mL dengan langkah sama seperti tahap aktivasi pada media cair. Sebanyak 10 mL *starter* jamur akuatik KC3 dipindahkan secara aseptik kedalam media produksi 250 mL (4% *starter*). Komposisi media produksi sama dengan komposisi media *starter* dengan komposisi seperti tabel I. Media produksi diinkubasi pada *shaker incubator*. Setelah mencapai waktu sesuai fase log, media produksi disaring menggunakan kertas saring untuk memisahkan sel jamur akuatik dengan media produksi. Media produksi selanjutnya

disentrifugasi dengan kecepatan 5000 rpm pada suhu 5°C selama 30 menit untuk memisahkan filtrat (ekstrak kasar kitinase) dan endapan.

Fraksinasi Kitinase dengan Amonium Sulfat

Amonium sulfat ditambahkan kedalam ekstrak kasar enzim sambil diaduk dengan *magnetic stirrer* dengan kecepatan lambat sampai padatan amonium sulfat larut sempurna. Tingkat kejenuhan amonium sulfat 0-20% dikelompokkan menjadi F1, 20-40% F2, 40-60% F3, 60-80% F4 dan 80-90% F5. Campuran tersebut didiamkan selama satu malam dalam keadaan dingin. Selanjutnya campuran disentrifugasi dengan kecepatan 5000 rpm selama 20 menit pada suhu 5°C. Hasil sentrifugasi akan diperoleh endapan yang terpisah dari filtratnya. Endapan diambil dan disuspensikan dengan bufer asetat 0,2 M pH 5. Filtrat yang diperoleh kemudian dilanjutkan dengan perlakuan yang sama untuk fraksi berikutnya.

Dialisis Kitinase

Membran selofan yang berisi enzim direndam dalam 800 mL bufer asetat 0,002 M pH 5,0 lalu diaduk dengan *magnetic stirrer* dalam kondisi dingin. Tiap dua jam bufer diganti serta diuji kandungan amonium sulfatnya dengan BaCl₂ sampai tidak terbentuk endapan putih. Pada tahap ini diperoleh kitinase F1 bebas amonium sulfat. Perlakuan yang sama diterapkan pada F2, F3, F4 dan F5, untuk mendapatkan enzim kitinase F2, F3, F4 dan F5 yang bebas amonium sulfat.

Penentuan Aktivitas Kitinase

Aktivitas kitinase diuji menurut metode Veda dan Arai [14] dengan substrat koloidal kitin. Sebanyak 1,0 mL koloidal kitin 0,3 %, 2,0 mL bufer asetat 0,2 M pH 5 dan 1,0 mL filtrat enzim dimasukkan kedalam tabung reaksi dan diinkubasi pada suhu ruang selama waktu tertentu. Kemudian campuran tersebut dipanaskan dalam air mendidih selama 20 menit untuk menghentikan reaksi enzimatis dalam campuran tersebut lalu didinginkan. Aktivitas enzim dalam campuran tersebut ditentukan secara spektrofotometri pada $\lambda = 660$ nm.

$$\text{Unit aktivitas} = \frac{x-y}{0,001} \times \frac{1}{\text{waktu inkubasi (menit)}}$$

Keterangan: x = serapan kontrol

y = serapan sampel

Penentuan Kadar Protein

Kadar protein total enzim ditentukan dengan metode Lowry, menggunakan BSA sebagai larutan standar.

Penentuan Aktivitas Spesifik Kitinase

Aktivitas spesifik kitinase ditentukan dengan menghitung unit aktivitas kitinase dibagi dengan kadar protein total.

Karakterisasi Kitinase

Penentuan pH optimum dilakukan dengan mereaksikan 1 mL kitinase ditambah 1 mL substrat

koloidal kitin 0,3% yang telah dilarutkan dalam bufer asetat 0,2 M dengan variasi pH 3,6; 3,8; 4,0; 4,2; 4,4 ditambah buffer asetat 0,2 M sesuai dengan variasi pH tersebut sebanyak 2 mL, kemudian diinkubasi pada suhu ruang selama 90 menit. Hasil inkubasi kemudian dipanaskan dalam air mendidih selama 20 menit. Aktivitas enzim dalam campuran tersebut ditentukan secara spektrofotometri pada $\lambda = 660$ nm.

Setelah diperoleh pH optimum, dilakukan penentuan suhu optimum. Sebanyak 1 mL kitinase hasil fraksinasi ditambah 1 mL substrat koloidal kitin 0,3% yang telah dilarutkan dalam bufer asetat 0,2 M pada pH optimum yang telah diperoleh sebelumnya, kemudian diinkubasi selama 90 menit dengan variasi suhu inkubasi 28°C, 28,5°C, 29°C, 29,5°C, dan 30,0°C. Hasil inkubasi kemudian dipanaskan dalam air mendidih selama 20 menit. Aktivitas enzim dalam campuran tersebut ditentukan secara spektrofotometri pada $\lambda = 660$ nm.

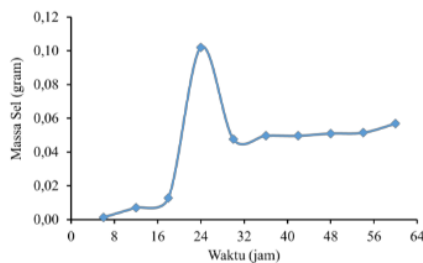
3. Hasil dan Pembahasan

Peremajaan dan Aktivasi Jamur Akuatik Kiti nolitik KC3

Peremajaan dilakukan pada media padat mengandung kitin. Peremajaan dilakukan 2 kali agar diperoleh sel jamur yang semakin murni dan bebas dari kontaminasi mikroba lainnya. Peremajaan akan menghasilkan sel yang lebih muda. Media yang digunakan untuk peremajaan adalah media padat, sedangkan media untuk produksi adalah media cair, karena itu sel jamur akuatik dari media peremajaan diaktivasi pada media cair terlebih dulu. Media cair yang digunakan mengandung kitin koloidal. Kandungan kitin pada media cair akan menjadi *inducer* sehingga sel jamur mensekresikan kitinase untuk memecah kitin pada media.

Pembuatan Kurva Pertumbuhan Jamur Akuatik KC3

Kurva pertumbuhan menunjukkan fase-fase pertumbuhan mikroorganisme. Jika fase hidup sel jamur akuatik diketahui akan memudahkan proses isolasi kitinase. Enzim biasanya diisolasi pada fase log karena pada fase ini sel jamur sedang mengalami pertumbuhan yang cukup pesat dengan jumlah sel yang banyak. Jika jumlah sel yang tumbuh banyak maka enzim yang dihasilkan juga banyak karena masing-masing sel mensekresikan enzim. Kurva pertumbuhan yang diperoleh dapat dilihat pada gambar 1.



Gambar 1. Kurva Pertumbuhan Jamur Akuatik Kiti nolitik KC3

Pada gambar 1 dapat dilihat terjadi peningkatan massa sel secara signifikan pada jam ke-24, kemudian menurun drastis pada jam ke-30. Kurva yang diperoleh tidak memiliki fase stasioner, mungkin karena rentang waktu pengukuran masih terlalu lebar sehingga fase stasioner tidak diperoleh. Lonjakan massa sel yang signifikan mungkin juga disebabkan karena adanya pengaruh dari sisa-sisa media (terutama kitin koloidal) yang tidak larut dalam bufer. Sisa media yang tidak larut ataupun tidak digunakan oleh jamur dapat mempengaruhi pengukuran berat sel karena metode yang digunakan dalam pembuatan kurva pertumbuhan ini menggunakan pengukuran berat kering sel jamur. Kurva pertumbuhan isolat jamur tersebut perlu diteliti lebih lanjut dengan mempersempit rentang waktu pengukuran dan memperbesar volume media pertumbuhan yang digunakan untuk menghindari terbawanya sisa media saat penyiangan. Waktu panen yang tepat berdasarkan kurva pertumbuhan di atas adalah jam ke-24 karena pada jam ini massa sel paling besar dengan demikian diharapkan jumlah enzim yang disekresikan juga besar

Produksi Kitinase

Tahap awal proses produksi adalah pembuatan starter. Starter adalah biakan yang siap difermentasikan. Starter memenuhi syarat untuk difermentasikan karena telah dikondisikan sesuai dengan kondisi fermentasi produksi. Media untuk starter dibuat dengan komposisi yang sama dengan media untuk produksi. Selain komposisi media, suhu inkubasi dan kecepatan *incubator shaker* juga sama. Penggunaan starter akan mempercepat waktu produksi karena fase adaptasi menjadi lebih singkat.

Saat proses produksi berlangsung, kitinase disekresikan keluar sel oleh jamur akuatik untuk memecah kitin menjadi unit yang lebih kecil. Hasil hidrolisis kitin digunakan oleh jamur akuatik sebagai sumber karbon dan nitrogen untuk menunjang pertumbuhannya. Kitinase yang telah disekresikan ke luar sel akan bercampur dengan media produksi, karena itu untuk memperoleh kitinase dilakukan penyaringan media produksi. Sel jamur dan sisa media akan terpisah dengan filtrat yang mengandung kitinase.

Fraksinasi dengan Amonium Sulfat

Penambahan amonium sulfat dapat menurunkan kelarutan protein melalui dua mekanisme yaitu *salting in* dan *salting out*. *Salting in* terjadi pada saat konsentrasi garam rendah, ion garam yang dihasilkan akan melindungi molekul-molekul protein dan mencegah bersatunya molekul-molekul protein sehingga protein tetap melarut. *Salting out* terjadi pada saat konsentrasi garam tinggi, ion yang dihasilkan akan meningkatkan muatan listrik di sekitar protein yang mengakibatkan tertariknya mantel air dari koloid protein sehingga interaksi hidrofobik di antara sesama molekul protein menurunkan kelarutan protein.

Protein yang mengendap pada fraksi satu sebagian besar adalah protein yang mengandung asam-asam amino hidrofobik yang cukup banyak, karena itu pada

penambahan garam dengan konsentrasi kecil (0-20%) sudah dapat mengendap. Semakin besar konsentrasi garam yang diperlukan untuk mengendapkan protein berarti kandungan asam aminonya semakin banyak yang hidrofilik.

Dialisis Kitinase

Fraksi kitinase yang diperoleh dari fraksinasi bertingkat masih mengandung amonium sulfat, untuk memisahkan amonium sulfat dari protein dapat dilakukan dengan dialisis menggunakan membran selofan [15]. Dialisis adalah suatu cara yang digunakan untuk desalinasi enzim secara difusi melalui membran semipermeabel berpori dengan ketebalan 10-100 μm , dimana pemisahannya berdasarkan gradien konsentrasi. Konsentrasi bufer asetat yang terdapat dalam kantung membran selofan adalah 0,2 M, sedangkan bufer asetat di luar membran 0,002 M. Perbedaan konsentrasi akan menyebabkan difusi, molekul-molekul yang berukuran kecil seperti sisa-sisa garam amonium sulfat akan keluar dari membran, sedangkan molekul besar seperti protein akan tetap berada di dalam membran. Proses dialisis terus dilakukan sampai protein enzim dalam membran terbebas dari amonium sulfat, untuk mengetahui hal tersebut, bufer di luar membran diambil sekitar 1-2 mL kemudian direaksikan dengan BaCl_2 . Jika masih terbentuk endapan putih berarti protein enzim dalam membran belum terbebas dari amonium sulfat. Endapan putih tersebut terbentuk dari reaksi antara Ba^{2+} dan SO_4^{2-} membentuk endapan putih BaSO_4 .

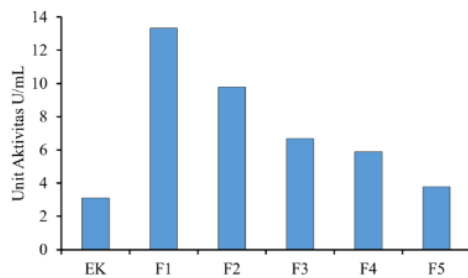
Uji Aktivitas Kitinase

Aktivitas kitinase yang diukur merupakan aktivitas kitinase total atau non-spesifik, yakni meliputi aktivitas endokitinase maupun eksokitinase [16]. Produk yang dihasilkan adalah kitooligosakarida dan N-asetilglukosamin. Aktivitas kitinase diuji dengan metode Veda dan Arai [14] berdasarkan pengurangan substrat koloidal kitin. Turbiditas yang disebabkan karena berkurangnya jumlah kitin di dalam campuran reaksi diukur absorbansinya pada panjang gelombang 660 nm. Satu unit aktivitas enzim diukur sebagai sejumlah enzim yang mengakibatkan pengurangan absorbansi campuran reaksi sebesar 0,001 pada 660 nm tiap menit.

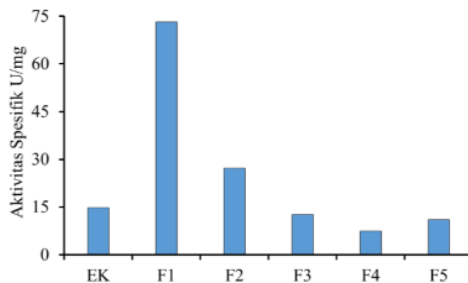
Kadar total protein enzim diukur dengan metode Lowry *dkk*. [17] dengan menggunakan panjang gelombang maksimum larutan standar BSA yang sebelumnya telah diperoleh dari pengukuran yaitu 732 nm. Standar yang digunakan BSA karena BSA tersusun atas semua asam amino yang lengkap.

Metode Lowry *dkk*. [17] dipilih karena lebih mudah dan sensitif terhadap residu protein sistein, tirosin dan triptofan. Prinsip metode Lowry adalah reaksi pembentukan kompleks antara nitrogen pada ikatan peptida dengan ion Cu^{2+} pada suasana basa dan reduksi fosfomolibdat serta fosfotungstat pada reagen Follin-ciocalteu oleh rantai samping asam amino tirosin dan triptofan [18]. Jika unit aktivitas suatu fraksi semakin tinggi dan kadar protein totalnya semakin rendah, akan

semakin tinggi nilai aktivitas spesifiknya. Unit aktivitas kitinase dapat dilihat pada gambar 2, sedangkan aktivitas spesifik kitinase disajikan pada gambar 3.



Gambar 2. Grafik Unit Aktivitas Kitinase

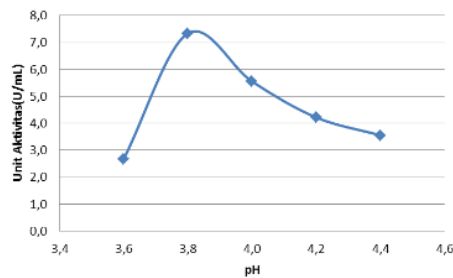


Gambar 3. Grafik aktivitas spesifik kitinase

Fraksi yang memiliki aktivitas spesifik tertinggi adalah F1. Hal ini berarti sebagian besar protein yang terendapkan pada F1 adalah protein kitinase. Fraksi dengan aktivitas spesifik tertinggi selanjutnya dikarakterisasi pH dan suhu optimumnya.

pH Optimum

Sebagian besar kitinase dari mikroba memiliki kondisi optimum pada rentang pH 3,5-9 [6]. Beberapa hasil penelitian menyebutkan jika kitinase dari *Penicillium sp. LYG 0704* memiliki pH optimum 5 [19], sedangkan pada *Isaria fumosorosea* memiliki pH optimum 5,7 [20]. Hasil penelitian Sharaf dkk. [12] menyebutkan jika kondisi optimum kitinase dari *Trichoderma viride* diperoleh pada pH 4. Hasil karakterisasi pH diperoleh pH optimum kitinase adalah pH 3,8 dengan unit aktivitas sebesar 7,333 U/mL. Kondisi pH optimum kitinase dapat dilihat pada gambar berikut ini.



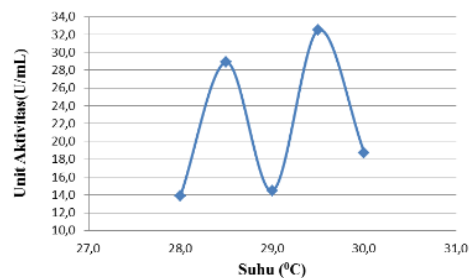
Gambar 4. Grafik pH optimum

Perubahan muatan pada enzim dapat mempengaruhi aktivitasnya, baik dengan perubahan struktur maupun perubahan muatan pada residu asam amino yang memiliki kemampuan katalitik. Perubahan ion H⁺ yang ada dalam larutan enzim memberikan pengaruh pada konformasi bagian katalitik enzim. Jika pH terlalu rendah atau terlalu tinggi akan menyebabkan perubahan konformasi enzim sehingga aktivitas enzim menurun. Perubahan pH yang ekstrim akan menyebabkan enzim mengalami denaturasi karena terganggunya interaksi-interaksi nonkovalen yang menjaga kestabilan struktur tiga dimensi enzim [21].

Suhu Optimum

Di lingkungan alami, aktivitas enzim yang diproduksi mikroorganisme mesofil (termasuk kitinase) umumnya tidak melampaui temperatur 30°C [22]. Hasil penelitian Sharaf dkk. [12] menyebutkan kitinase yang diperoleh dari *Trichoderma Viridae* memiliki suhu optimum yang tidak berbeda jauh yaitu 28°C.

Kitinase merupakan enzim kompleks yang terdiri dari endokitinase, kitobiosidase dan N-asetilglukosaminidase. Satu spesies organisme mampu menghasilkan lebih dari satu kitinase. Organisme dengan kemampuan menghasilkan lebih dari satu kitinase bukan sesuatu yang baru. Bakteri *Pseudomonas aeruginosa* K-187 dilaporkan menghasilkan dua kitinase yang masing-masing memiliki suhu optimum 50°C dan 40°C, sedangkan pH optimumnya pada pH 8 dan 7 [23]. *Bacillus sp* MH-1 menghasilkan tiga kitinase, dua diantaranya memiliki suhu optimum yang sama yaitu 75°C sedangkan pH optimumnya 5,5 dan 6,5 [24]. Isolat jamur akuatik kitinolitik KC3 kemungkinan juga mampu menghasilkan lebih dari satu kitinase. Hal ini dapat dilihat dari hasil karakterisasi suhu optimum kitinase yang ditunjukkan pada gambar 5 terdapat dua puncak menunjukkan bahwa kemungkinan terdapat lebih dari satu kitinase pada enzim yang diuji.



Gambar 5. Grafik suhu optimum

Temperatur ketika aktivitas enzim cukup besar disebut temperatur optimum. Pada suhu optimum substrat akan lebih sering bertumbukan dengan sisi aktif enzim sehingga pembentukan kompleks enzim-substrat optimal. Berdasarkan profil suhu yang diperoleh suhu optimum kitinase jamur akuatik kitinolitik KC3 adalah 28,5°C dan 29,5°C.

Enzim merupakan suatu protein, jika suhu terlalu tinggi dapat menyebabkan terjadinya proses denaturasi. Jika suatu protein terdenaturasi, maka susunan tiga

dimensi khas dari rantai polipeptida terganggu dan molekul ini terbuka menjadi struktur acak, tanpa adanya kerusakan pada struktur kerangka kovalen. Protein yang terdenaturasi dapat membentuk berbagai bentuk acak yang biasanya tidak aktif [25]. Perubahan bentuk ini menyebabkan aktivitas enzim menurun, karena sisi aktif kehilangan kemampuan katalitiknya sehingga produk yang dihasilkan juga sedikit.

4. Kesimpulan

Kitinase dapat diisolasi dari isolat jamur akuatik kitinolitik KC3 dengan menggunakan kitin koloidal sebagai *inducer*. Kondisi optimum reaksi enzimatis kitinase hasil isolasi adalah pada suhu 28,5°C dan 29,5°C serta pH 3,8. Setiap mikroorganisme memiliki karakter yang berbeda sehingga kemampuan menghasilkan kitinase dan karakter kitinase yang dihasilkan juga berbeda. Oleh karena itu, penting untuk dilakukan identifikasi isolat yang digunakan karena dapat membuka ruang eksplorasi kitinase lebih luas. Mikroorganisme yang memiliki hubungan kekerabatan dekat biasanya juga mampu menghasilkan enzim yang sama.

5. Daftar Pustaka

- [1] Magdalena A Gutowska, Jeffrey C Drazen, Bruce H Robison, Digestive chitinolytic activity in marine fishes of Monterey Bay, California, *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 139, 3, (2004) 351-358 <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpb.2004.09.020>
- [2] Gemma Reguera, Susan B Leschine, Biochemical and genetic characterization of ChiA, the major enzyme component for the solubilization of chitin by *Cellulomonas uda*, *Archives of microbiology*, 180, 6, (2003) 434-443 <http://dx.doi.org/10.1007/s00203-003-0611-y>
- [3] Jeen-Kuan Chen, Chia-Rui Shen, Chao-Lin Liu, N-acetylglucosamine: production and applications, *Marine drugs*, 8, 9, (2010) 2493-2516 <http://dx.doi.org/10.3390/md8092493>
- [4] Alexander R Shikhman, Klaus Kuhn, Nada Alaaeddine, Martin Lotz, N-acetylglucosamine prevents IL-1 β -mediated activation of human chondrocytes, *The Journal of Immunology*, 166, 8, (2001) 5155-5160 <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.166.8.5155>
- [5] Donald L Bissett, Larry R Robinson, Patricia S Raleigh, Kukizo Miyamoto, Tomohiro Hakozaiki, Jim Li, Gary R Kelm, Reduction in the appearance of facial hyperpigmentation by topical N-acetylglucosamine, *Journal of cosmetic dermatology*, 6, 1, (2007) 20-26 <http://dx.doi.org/10.1111/j.1473-2165.2007.00295.x>
- [6] Winda Haliza, Maggy Thenawidjaya Suhartono, Karakteristik kitinase dari mikrobia, *Buletin Teknologi Pasca Panen*, 8, 1, (2016) 1-14
- [7] Reetarani S. Atil, Vandana Ghormade, Mukund V. Deshpande, Chitinolytic enzymes: an exploration, *Enzyme and Microbial Technology*, 26, 7, (2000) 473-483 [http://dx.doi.org/10.1016/S0141-0229\(00\)00134-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0141-0229(00)00134-4)
- [8] Luis Morales de la Vega, J Eleazar Barboza-Corona, Maria G Aguilar-Uscanga, Mario Ramirez-Lepe, Purification and characterization of an exochitinase from *Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai* and its action against phytopathogenic fungi, *Canadian Journal of Microbiology*, 52, 7, (2006) 651-657 <http://dx.doi.org/10.1139/w06-019>
- [9] Neetu Datta, Rupinder Tewari, Gurinder Singh Hoondal, Biotechnological aspects of chitinolytic enzymes: a review, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 71, 6, (2006) 773-782 <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-005-0183-7>
- [10] Yong-Seok Lee, In-Hye Park, Ju-Soon Yoo, Soo-Yeol Chung, Young-Choon Lee, Young-Su Cho, Soon-Cheol Ahn, Cheol-Min Kim, Yong-Lark Choi, Cloning, purification, and characterization of chitinase from *Bacillus* sp. DAU101, *Bioresource Technology*, 98, 14, (2007) 2734-2741 <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2006.09.048>
- [11] MS Hosny, NA El-Shayeb, Amira Abood, AM Abdel-Fattah, A potent chitinolytic activity of marine Actinomycete sp. and enzymatic production of chitooligosaccharides, *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 4, 4, (2010) 615-623
- [12] Eman Fathi Sharaf, Abd El-Aziz Qablan El-Sarrany, Mai El-Deeb, Biorecycling of shrimp shell by *Trichoderma viride* for production of antifungal chitinase, *African Journal of Microbiology Research*, 6, 21, (2012) 4538-4545 <http://dx.doi.org/10.5897/AJMR12.148>
- [13] Riccardo AA Muzzarelli, Chitin, Elsevier, 2013.
- [14] Mitsuhiro Veda, Motoo Arai, Purification and some properties of chitinases from *Aeromonas* sp. No. 10S-24, *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 56, 3, (1992) 460-464 <http://dx.doi.org/10.1271/bbb.56.460>
- [15] Felix Franks, Characterization of Proteins, Humana Press, 1988.
- [16] H Bielka, HBF Dixon, P Karlson, C Liebecq, N Sharon, EJ Van Lenten, SF Velick, JFG Vliegenthart, EC Webb, A Cornish-Brown, Enzyme nomenclature, in, Academic Press, New York, 1984.
- [17] Oliver H Lowry, Nira J Rosebrough, A Lewis Farr, Rose J Randall, Protein measurement with the Folin phenol reagent, *The Journal of biological chemistry*, 193, 1, (1951) 265-275
- [18] Keith Wilson, John Walker, Principles and techniques of practical biochemistry, Cambridge University Press, 2000.
- [19] Yoon Gyo Lee, Ki-Chul Chung, Seung Gon Wi, Jae Chang Lee, Hyeun-Jong Bae, Purification and properties of a chitinase from *Penicillium* sp. LYG 0704, *Protein Expression and Purification*, 65, 2, (2009) 244-250 <http://dx.doi.org/10.1016/j.pep.2008.12.004>
- [20] Shaukat Ali, Jianhui Wu, Zhen Huang, Shun Xiang Ren, Production and regulation of extracellular chitinase from the entomopathogenic fungus *Isaria fumosorosea*, *Biocontrol science and technology*, 20, 7, (2010) 723-738 <http://dx.doi.org/10.1080/09583151003714091>
- [21] BD Hames, NM Hooper, Biochemistry: The Instant Notes. 2nd edition, Hongkong: Springer-Verlag, (2000)

- [22] Maria Swiontek Brzezinska, Elżbieta LALKE-PORCZYK, Wojciech Donderski, Maciej Walczak, Degradation of chitin in natural environment: role of actinomycetes, *Pol. J. Ecol.*, 57, 2, (2009) 229-238
- [23] San-Lang Wang, Wen-Tsu Chang, Purification and characterization of two bifunctional chitinases/lysozymes extracellularly produced by *Pseudomonas aeruginosa* K-187 in a shrimp and crab shell powder medium, *Applied and environmental microbiology*, 63, 2, (1997) 380-386
- [24] Kenji Sakai, Akira Yokota, Hajime Kurokawa, Mamoru Wakayama, Mitsuaki Moriguchi, Purification and characterization of three thermostable endochitinases of a noble *Bacillus* strain, MH-1, isolated from chitin-containing compost, *Applied and Environmental Microbiology*, 64, 9, (1998) 3397-3402
- [25] Albert L Lehninger, Dasar-Dasar Biokimia, M. Thenawidjaja, Erlangga, Jakarta, 1990.

Isolasi dan Karakterisasi Kitinase Isolat Jamur Akuatik Kitinolitik KC3 dari Kecoa (Orthoptera)

ORIGINALITY REPORT

22%

SIMILARITY INDEX

18%

INTERNET SOURCES

15%

PUBLICATIONS

14%

STUDENT PAPERS

MATCH ALL SOURCES (ONLY SELECTED SOURCE PRINTED)

2%

★ Submitted to Higher Education Commission Pakistan

Student Paper

Exclude quotes On

Exclude matches Off

Exclude bibliography On