

PEMURNIAN DAN KARAKTERISASI KITIN DEASETILASE TERMOSTABIL DARI *Bacillus papandayan* ASAL KAWAH KAMOJANG JAWA BARAT

Emma Rochima
Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Padjadjaran
Jatinangor, Bandung 40600

ABSTRAK

Tujuan penelitian ini adalah untuk memurnikan dan mengkarakterisasi kitin deasetilase termostabil yang diproduksi oleh *Bacillus papandayan* asal Kawah Kamojang Jawa Barat. Tahap awal penelitian meliputi produksi dan pemurnian kitin deasetilase meliputi pengendapan amonium sulfat, dialisis, dan kromatografi pertukaran anion. Tahap berikutnya, karakterisasi kitin deasetilase hasil pemurnian terdiri dari optimasi suhu dan pH, termostabilitas, pengaruh ion logam, EDTA dan Na-asetat, serta perkiraan berat molekul dengan metode SDS-PAGE.

Hasil pemurnian dengan kromatografi pertukaran anion menunjukkan bahwa kitin deasetilase memiliki 3 (tiga) buah fraksi aktif dengan aktivitas tertinggi pada fraksi ke-76. Karakterisasi biokimiawi menunjukkan bahwa kitin deasetilase mempunyai pH dan suhu optimum masing-masing 8 dan 55 °C, stabil terhadap panas selama 5 jam. Aktivitas enzim dihambat oleh ion logam Mn, Ni dan Ca (1 mM), namun tidak dipengaruhi oleh EDTA. Ion Mg dan Na-asetat dapat meningkatkan aktivitasnya. Hasil analisis SDS-PAGE menunjukkan adanya dengan perkiraan berat molekul 15-67 kDa.

Kata kunci: pemurnian, karakterisasi, kitin deasetilase

ABSTRACT

The aims of the research were to purify and characterize thermostable chitin deacetylase which produced by *Bacillus papandayan* isolated from Kamojang Creater, West Java. The preliminary research covered produced and purified chitin deacetylase through ammonium sulfate precipitation, dialysis, and anion exchanger chromatography. Characterization biochemically consisted of the effect of temperature, pH, thermostability, metal ion, EDTA, Na-asetat and also molecular weight analysis by SDS PAGE.

The result showed that the anion exchanger chromatography purification resulted 3 major active fraction. The highest activity reached by fraction no. 76. Characterization performed following the precipitation showed that chitin deacetylase functioned optimally at 55 °C pH 8, and thermostable for 5 hours. Stability test showed that the enzyme's activity was decreased by presence of Mn, Ni, and Ca (1 mM), but unaffected by the presence of EDTA. It also found that the enzyme's activity was increased by addition of 1 mM Mg²⁺ and also Na-asetat. The SDS PAGE analysis showed that the molecular weight of chitin deacetylase was 15-67 kDa.

Keywords: purification, characterization, chitin deacetylase

PENDAHULUAN

Kitin, polimer berantai lurus tersusun atas residu N-asetilglukosamin melalui ikatan β -(1,4) yang terdapat berlimpah di alam setelah selulosa. Secara umum kitin banyak terdapat pada eksoskeleton atau kutikula serangga, *crustacea*, dan jamur (Tsigos *et al.*, 2000). Lebih dari 80.000 metrik ton kitin diperoleh dari limbah laut dunia per tahun (Patil *et al.*, 2000), Di Indonesia limbah kitin yang belum dimanfaatkan sebesar 56.200 metrik ton per tahun (Departemen Kelautan dan Perikanan, 2000).

Penyebaran kitin yang relatif luas menjadikan enzim pendegradasi kitin, kitin deasetilase, berpotensi diaplikasikan untuk menghidrolisis kitin menjadi kitosan. Kitosan adalah kitin yang telah dihilangkan gugus asetilnya menyisakan gugus amina bebas yang menjadikannya bersifat polikationik. Dengan sifat polikationiknya maka kitosan dapat berfungsi sebagai agen penggumpal dalam penanganan limbah terutama limbah berprotein (Suhartono, 1989) dan lebih mudah diolah menjadi bentuk lain (Hirano, 1996, Dodane dan Vilivalam, 1998).

Saat ini kitosan komersial diproduksi secara termokimiawi. Cara ini dalam banyak hal tidak menguntungkan diantaranya tidak ramah lingkungan, prosesnya tidak mudah dikendalikan, dan kitosan yang dihasilkan memiliki berat molekul dan derajat deasetilasi tidak seragam (Chang *et al.*, 1997 dan Tsigos *et al.*, 2000). Hal ini karena proses deasetilasi rantai kitin yang berlangsung secara acak menghasilkan kitosan dengan derajat deasetilasi bervariasi (Tsigos dan Bouriotis, 1995; Kolodziejska *et al.*, 2000; Win dan Stevens, 2001). Derajat deasetilasi minimal 70% umumnya dimanfaatkan untuk industri pangan, industri kosmetika dan biomedis sedikitnya 80 dan 90% (Tsugita, 1997).

Untuk memperoleh kitosan dengan derajat deasetilasi tertentu dapat dilakukan secara enzimatik dengan memanfaatkan kitin deasetilase yang bekerja spesifik memotong gugus asetil dari kitin. Salah satu kitin deasetilase yang berpeluang diaplikasikan untuk pembuatan kitosan diproduksi oleh bakteri termofilik *Bacillus papandayan* yang berhasil diisolasi dari Kawah Kamojang Gunung Papandayan Garut Jawa Barat (Subianto, 2001).

Tujuan penelitian ini adalah untuk memurnikan dan mengkarakterisasi kitin deasetilase yang dihasilkan isolat *Bacillus papandayan* asal Kawah Kamojang Jawa Barat. Hasil penelitian berupa preparat enzim kitin deasetilase murni yang telah dikarakterisasi secara menyeluruh sehingga dapat dimanfaatkan untuk memproduksi kitosan dari kitin secara enzimatik. Hal ini merupakan langkah awal aplikasi produksi kitosan yang bersifat bioaktif khususnya dalam industri pangan dan biomedis.

METODE PENELITIAN

Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Teknologi Hasil Perikanan Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Padjadjaran Bandung dan Laboratorium Mikrobiologi dan Biokimia, Pusat Penelitian Bioteknologi, Institut Pertanian Bogor mulai Pebruari sampai Nopember 2005.

Bahan dan Alat

Bahan-bahan yang digunakan antara lain: isolat *Bacillus papandayan* hasil skrining koleksi Laboratorium Mikrobiologi dan Biokimia PAU Institut Pertanian Bogor, akuades, buffer borat pH 8, Na-bikarbonat 2%, 1 mM EDTA, K_2HPO_4 , NaCl, $(NH_4)_2SO_4$, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, ekstrak kamir, bacto tripton, bacto agar, glikol kitosan, dan

koloidal kitin. Untuk pengukuran aktivitas enzim digunakan glikol kitin sebagai substrat, buffer dengan pH optimum, NaNO_2 5%, asam asetat 33%, amonium sulfamat 12.5%, HCl 5%, Indol regen 0,1%, etanol absolut, dan glukosamin standar.

Alat-alat yang digunakan antara lain inkubator goyang, sentrifus, pH-meter, alat timbang, pipet mikro, bulb, peralatan gelas, *evendorph*, *fraction collector*, kolom kromatografi pertukaran anion matrik DEAE Sephadex A-50, spektrofotometer UV, dan piranti SDS-PAGE.

Metodologi

Penelitian ini dilakukan beberapa tahap yaitu tahap awal meliputi pengkayaan dan pembuatan starter, pembuatan koloidal kitin sebagai substrat pertumbuhan *Bacillus papandayan* dan glikol kitin sebagai substrat uji aktivitas kitin deasetilase. Tahap berikutnya produksi dan pemurnian kitin deasetilase dengan cara pengendapan, dialisis, dan kromatografi pertukaran anion. Karakterisasi kitin deasetilase terdiri dari optimasi suhu dan pH, termostabilitas, pengaruh ion metal dan EDTA, serta penentuan berat molekul dengan SDS-PAGE.

Tahap Awal terdiri dari:

1. Pengkayaan dan Pembuatan Starter

Isolat *Bacillus papandayan* yang sudah dikeluarkan dari ruang pendingin didiamkan selama 1 jam pada suhu ruang, lalu diambil satu ose untuk diinokulasikan pada media termus cair dan diinkubasi 24 jam suhu optimum. Dengan komposisi media termus yang terdiri dari 0.1% K_2HPO_4 , 0.1% NaCl 0.5% koloidal kitin, 0.1% tripton, 0.7% $(\text{NH}_3)_2 \text{SO}_4$, 0.01% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, dan 0.2% ekstrak kamir.

2. Pembuatan Koloidal Kitin (Metode Arnold dan Solomon, 1986)

Duapuluh g kitin komersial dilarutkan dalam 400 ml HCl, lalu didiamkan selama 24 jam pada suhu 4 °C, selanjutnya disaring *glass wool* dan diambil filtratnya. Filtrat ditambah 200 ml akuades dingin dan 10 N NaOH sampai pH 7, disentrifus pada 7.000 rpm 20 menit hingga terbentuk pelet. Pelet diresuspensi akuades, disentrifus kembali 15 menit. Pelet yang dihasilkan disimpan pada suhu 4°C .

3. Pembuatan Glikol Kitin (Metode Trudel dan Asselin, 1989)

Satu gram glikol kitosan dilarutkan dalam asam asetat 10%, dibiarkan 24 jam pada suhu ruang. Campuran ditambah 100 ml metanol perlahan-lahan lalu disaring vakum dengan kertas saring Whatman No.4. Filtratnya ditampung dalam gelas piala ditambah 7,5 ml asetat anhidrat sambil terus diaduk. Gel yang terbentuk dibiarkan pada suhu kamar, kemudian diiris kecil-kecil, air yang keluar dibuang. Gel ditambahkan dengan 150 ml metanol dan dihomogenkan. Suspensi disentrifugasi pada 7000 rpm selama 15 menit. Pelet yang terbentuk ditambahkan 100 ml metanol, lalu dihomogenkan dan disentrifugasi kembali. Peletnya ditambahkan 100 ml 0.02% sodium azida selanjutnya dihomogenkan kembali selama 4 menit. Larutan yang terbentuk merupakan glikol kitin 1% (b/v).

Tahap Produksi dan Pemurnian Kitin Deasetilase:

1. Produksi Enzim Kasar

Media termus yang telah diinokulasi starter difermentasi pada inkubator goyang pada suhu optimum dengan agitasi 150 rpm selama 3 hari. Hasilnya disentrifugasi dengan kecepatan 9.000 rpm selama 20 menit, filtrat yang

terbentuk diukur aktivitas enzimnya (Tokuyasu *et al.* (1996), dan aktivitas spesifiknya (metode Bradford ,1976).

2. Pengendapan Protein Dengan Amonium Sulfat

Enzim yang telah diproduksi, selanjutnya diendapkan semalam pada suhu 4 °C dengan amonium sulfat 12.5% dengan konsentrasi 30-90% kelarutan, disentrifugasi selama 60 menit pada 4.200 rpm (Jayanti, 2002). Endapan yang dihasilkan diambil dengan melarutkannya pada buffer enzim, lalu didialisis.

3. Pemanasan 55 °C

Enzim hasil pengendapan amonium sulfat selanjutnya dipanaskan pada 55 °C selama 20-24 jam. Setelah itu enzim disentrifus pada 10.000 rpm selama 10 menit. Filtrat enzim yang dihasilkan kemudian didialisis.

4. Dialisis (Metode Boyer, 1986)

Dialisis dilakukan menggunakan kantong selofan yang memiliki *cutoff* 12.000 dalton dengan buffer enzim yang sama namun konsentrasinya lebih rendah di bagian luar kantong. Dialisis berlangsung selama semalam pada 4 °C, hasilnya dimurnikan lebih lanjut dengan kromatografi gel filtrasi.

5. Kromatografi kolom pertukaran anion (Modifikasi Harris dan Angal, 1989)

Pemurnian lebih lanjut dengan kromatografi kolom pertukaran anion matriks DEAE Sephadex A-50. Eluen yang digunakan 20 mM Tris-Cl pH 7 yang mengandung NaCl 0,1 M. Sebanyak 1.5 g matriks dikembangkan dengan akuades (buffer) bebas ion selama 2 hari (akuades diganti 2-3 kali). Hasil kolom sebanyak 3 ml/tabung ditampung pada *fraction collector*. Kolom yang digunakan berukuran panjang 20 cm berdiameter 3 cm. Larutan eluen dan NaCl diletakkan dalam *gradient mixer* berkapasitas 250-300 ml. Tinggi matriks sekitar

12-15 cm adanya udara yang terperangkap di dalam matriks. Selanjutnya matriks dicuci dengan eluen yaitu bufer borat 50 mM sebanyak tiga kali dan matriks yang telah dipak didiamkan semalam, kemudian dimasukkan sampel sebanyak 5 ml ke dalamnya.

6. Uji aktivitas kitin deasetilase (Tokuyasu *et al.*, 1996)

Larutan digesti meliputi 50 µl substrat glikol kitin 1%, 100 µl bufer, dan 150 µl enzim diinkubasi 30 menit pada suhu optimumnya lalu direbus selama 7 menit, kontrol enzim adalah enzim yang telah direbus 5 menit. Larutan digesti diambil 200 µL, kemudian ditambahkan 200 µl asam asetat 33% dan 200 µl NaNO₂ 5%, divorteks dan didiamkan 10 menit suhu ruang. Setelah itu ditambahkan 200 µl amonium sulfamat 12.5%, dideaminasi sambil digoyang 30 menit suhu ruang. Selanjutnya ditambahkan 800 µl HCl 5%, 80 µl indol 1%, direbus 10 menit. Konsentrasi glukosamin yang bereaksi dengan indol membentuk warna merah bata, dan absorbansinya diukur pada panjang gelombang 492 nm. Sebelumnya ditambahkan 800 µl etanol absolut. Standar yang digunakan adalah 200 µl glukosamin standar dengan konsentrasi 50 ng/ml.

7. Penentuan konsentrasi protein (Metode Bradford, 1976)

Mencampurkan 100 µl enzim dengan 2 ml larutan Bradford. Campuran diinkubasi 2 menit, dan absorbansinya dibaca pada panjang gelombang 595 nm. Kurva standar dibuat menggunakan standar protein BSA (Bovine Serum Albumin) konsentrasi 0-100 µg/ml. Kadar protein sample (mg/ml) diperoleh dari persamaan regresi kurva standar.

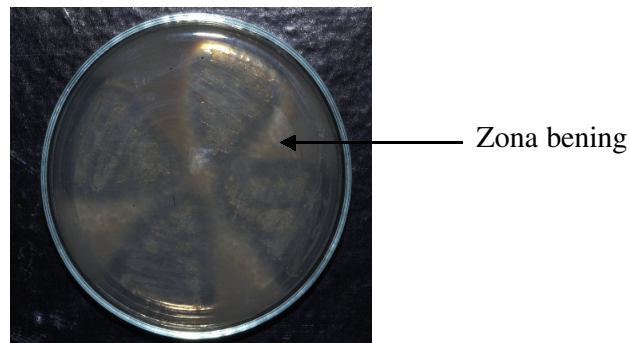
Karakterisasi Kitin Deasetilase

Suhu optimum. Ditentukan dengan cara menginkubasi enzim bersama substrat pada suhu 25 °C-75 °C untuk enzim murni, lalu diukur aktivitasnya. Untuk pH optimum, enzim dianalisis pada berbagai buffer pH yaitu buffer pH 5-10 pada suhu optimum enzim. Penentuan termostabilitas dilakukan dengan cara enzim tersebut dipanaskan (tanpa substrat dan buffer enzim) pada suhu pada suhu 55 °C dan 70 °C selama 0, 1, 2, 3, 4, 6 jam, kemudian diukur aktivitas spesifiknya pada setiap waktu inkubasi. Pengaruh ion logam dan EDTA, dianalisis dengan berbagai senyawa aditif seperti Ca^{2+} , Co^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} , dan EDTA ditambahkan ke dalam enzim sampai konsentrasi akhir 1 mM.lalu diukur aktivitasnya. Adapun pengaruh Na-asetat terhadap aktivitas kitin deasetilase dilakukan pada konsentrasi 20, 40 dan 100 mM. Penentuan berat molekul dengan SDS-PAGE (Metode Bollag dan Edelstein, 1991), dilakukan menggunakan piranti elektroforesis. Pembuatan gel dengan komposisi gel pemisah (10%): akrilamid, Larutan B, akuades, APS 10% dan TEMED, sedangkan gel penahan (5%) komposisinya sama dengan gel pemisah kecuali larutan B menjadi larutan C. Running dilakukan pada 100 V dan 100 mA kondisi dingin dalam larutan buffer sekitar 1 jam. Selanjutnya gel difiksasi dengan *silver staining*.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Isolat *Bacillus papandayan*

Isolat *Bacillus papandayan* diperoleh dari hasil skrining sampel tanah dan air kawah Kamojang di Jawa Barat. Hasil penelitian Tanuwijaya, 1999 menyebutkan bahwa isolat ini memiliki indeks kitinolitik 5 dan 4,5 dengan pH dan suhu optimal masing-masing 7 dan 55 °C. Dalam substrat cair yang mengandung koloidal kitin 0.5% atau 2% koloidal kitin dalam substrat padat menjadi media pertumbuhan yang baik bagi isolat ini.



Gambar 1. Koloni *Bacillus papandayan* dalam media padat

Enzim kitinolitik (pendegradasi kitin) merupakan enzim yang bersifat *inducible*. Selain koloidal kitin, yang dapat berperan sebagai agen penginduksi antara lain etilen glikol kitin, kitin, kitosan, dinding sel *M.lysodeikticus*, N-N-diasetilkitobiose dan *pNPGlcNAc* (Ueda dan Arai, 1992). Adapula N-asetil-D-glucosamin dari dinding sel *R. solani*, tepung cangkang rajungan, atau laminarin murni dari *Laminaria digitata* (Tweddel *et al.*, 1994)

Hasil penelitian Emmawati, 2004 menunjukkan bahwa media penginduksi terbaik untuk produksi enzim kitin deasetilase dari isolat *Bacillus papandayan* adalah media campuran antara kitin kulit punggung udang sejumlah 1% dengan koloidal kitin

0.5%. Koloidal kitin tetap digunakan sebagai pemicu awal produksi kitin deasetilase oleh bakteri.

Pemurnian kitin deasetilase

Pemurnian dilakukan beberapa tahap yaitu presipitasi amonium sulfat 80%, inkubasi 55 °C selama 24 jam, dialisis, dan kromatografi kolom. Hasil pengukuran aktivitas kitin deasetilase pada setiap tahapan pemurnian ditunjukkan pada Tabel 1 di bawah ini:

Tabel 1 Hasil Pemurnian Kitin deasetilase

Tahap	Akt (U/ml)	Protein (mg/ml)	Akt.Sp (U/mg)	Kemurnian	Yield %
Filtrat Bebas Sel	0.005	0.085	0.059	1	100
Amonium Sulfat 80%	0.017	0.135	0.126	2.14	4.08
Pemanasan 55 °C	0.013	0.061	0.213	3.61	3.6
Dialisis	0.010	0.018	0.529	8.96	2.4
Kromatografi kolom A-50	0.043	0.092	0.467	7.91	8.6

Tahap awal pemurnian dengan presipitasi menggunakan amonium sulfat. Menurut Wang *et al.* 1997, presipitasi adalah suatu metode menggunakan penambahan reagen atau mengubah kondisi lingkungan yang menyebabkan protein meninggalkan larutan dan membentuk partikel tidak larut dalam bentuk endapan. Pada penelitian ini, presipitasi dengan amonium sulfat 80% mampu meningkatkan aktivitas spesifik kitin deasetilase sampai 2.14 kali dengan *yield* aktivitas 4,08%. Pada prinsipnya, penambahan amonium sulfat sampai jenuh bertujuan untuk mengendapkan protein yang terdapat dalam larutan ekstrak kasar enzim. Karena enzim adalah protein, maka setelah pengendapan, konsentrasi kitin deasetilase dalam campuran akan meningkat. Dengan

konsentrasi yang lebih besar, aktivitas enzim terhadap substrat yang sama juga akan meningkat. Keuntungan menggunakan garam ammonium sulfat karena mempunyai kelarutan tinggi, pH moderat, relatif lebih murah, non toksik, dan tidak mempengaruhi enzim. Aktivitas kitin deasetilase dari *C. lindemuthianum* meningkat enam kali dengan presipitasi 80% (Tokuyasu *et al.* 1996).

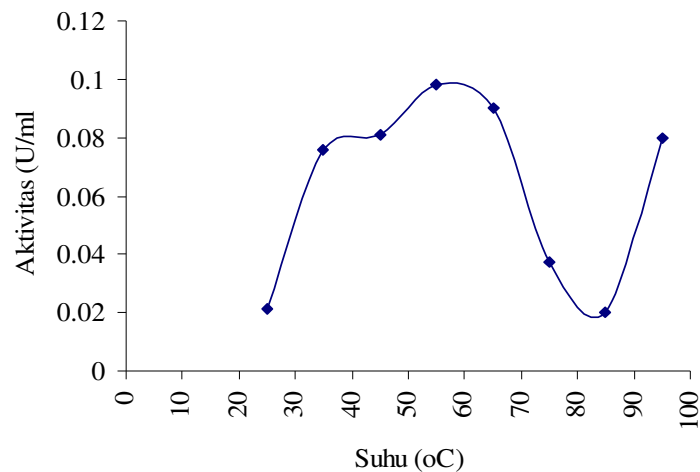
Tahap kedua adalah inkubasi kitin deasetilase hasil presipitasi pada suhu optimal 55 °C selama 24 jam. Hal ini dilakukan untuk menghilangkan enzim-enzim lain yang non termostabil sehingga terdenaturasi dan mengendap setelah disentrifugasi pada 10.000 g selama 10 menit. Perlakuan pemanasan 40-60 °C menyebabkan protein yang labil akan terdenaturasi. Dengan tereliminasi enzim non termostabil maka aktivitas spesifik CDA meningkat hampir empat kali dengan *yield* aktivitas sebesar 3.6%. Penurunan nilai *yield* aktivitas menunjukkan bahwa enzim menjadi relatif lebih murni daripada dengan presipitasi saja. Pemanasan 55 °C dapat meningkatkan aktivitas hampir empat kalinya sehingga perlakuan ini menjadi salah satu alternatif untuk seleksi enzim termostabil.

Tahap ketiga, dialisis dengan bufer borat 0.025M pH 8 tujuannya menghilangkan molekul garam dan kontaminan berberat molekul rendah yang berlebihan yang berpengaruh terhadap kestabilan enzim. Hal ini terjadi karena konsentrasi bufer di luar tabung dialisis lebih rendah sehingga molekul garam dan ion berdifusi ke luar. Dengan dialisis, aktivitas spesifik kitin deasetilase meningkat sembilan kali dengan *yield* aktivitas sebesar 2.4%. Penurunan nilai *yield* menunjukkan bahwa derajat kemurnian enzim CDA semakin baik. Menurut Irawadi *et al.*, 1992 bahwa *recovery* digunakan untuk kemurnian suatu enzim. Keberhasilan suatu tahap pemurnian, ditandai dengan semakin meningkatnya aktivitas spesifik enzim setelah mengalami pemurnian.

Tahap keempat adalah kolom kromatografi penukar ion menggunakan DEAE Sephadex A-50 dengan gradien linier NaCl (0-1 M) dan bufer TrisCl 0.1 M pH 7. Pemurnian dengan kromatografi pertukaran anion menghasilkan 3 fraksi aktif yaitu pada fraksi 53, 71 dan 76. Tingkat kemurnian enzim tertinggi terdapat pada fraksi ke 76. Banyaknya fraksi yang terlihat menunjukkan bahwa pemurnian dengan satu kolom kromatografi pertukaran anion belum cukup efektif untuk memisahkan enzim.

Pengaruh Suhu

Suhu mempengaruhi aktivitas kitin deasetilase. Aktivitas kitin deasetilase akan semakin meningkat seiring dengan kenaikan suhu sampai ke tingkat optimal, setelah itu akan menurun. Hal ini disebabkan enzim mengalami denaturasi sehingga kehilangan sebagian aktivitasnya (Gambar 2).



Gambar 2. Pengaruh suhu terhadap aktivitas kitin deasetilase

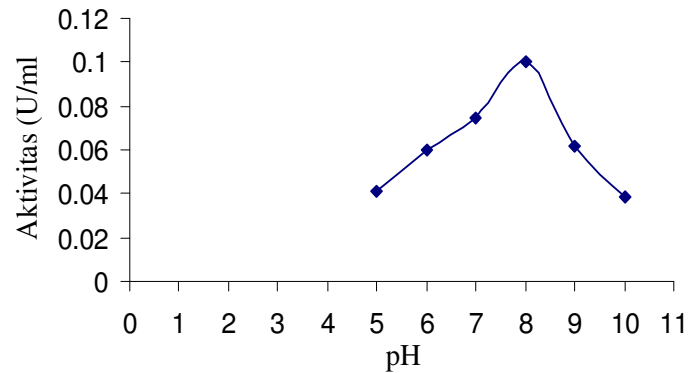
Meningkatnya suhu menyebabkan energi kinetik enzim semakin tinggi. Akibatnya, gerakan vibrasi, translasi, dan rotasi enzim dengan substrat akan meningkat sehingga peluang keduanya bereaksi bertambah besar. Menurut Brock (1986), kecepatan tumbuh maksimal dari beberapa bakteri termofilik berkisar pada suhu optimal

55-70 °C. Pada kisaran suhu tersebut maka diharapkan produk enzim yang disekresikan memiliki ketahanan terhadap panas. Pada Gambar 3 terlihat bahwa aktivitas tertinggi kitin deasetilase dicapai pada suhu 55 °C. Aktivitas selanjutnya menurun pada suhu 65 °C hingga tersisa 68 persen. Kitin deasetilase yang diproduksi *Colletotrichum lindemuthianum* diketahui memiliki aktivitas optimal pada 60 °C dengan substrat glikol kitin (Tokuyasu *et al.*,1996). *Bacillus thermoleovorans* LW-4-11 yang diisolasi dari perairan Sulawesi Utara juga memiliki aktivitas kitin deasetilase yang aktivitasnya optimum pada suhu 80 °C (Toharisman, 2004). Isolat ini merupakan salah satu dari suhu optimum tertinggi untuk aktivitas kitin deasetilase seperti yang umumnya dilaporkan sejauh ini hanya sampai suhu 50 °C (Gao *et al.*, 1995; Deising and Siegrist, 1995; Alfonso *et al.*, 1995; Tokuyasu *et al.*, 1996; Tsigos and Bouriotis, 1995; Christodoulidou *et al.*, 1999).

Pengaruh pH

Semua reaksi enzim dipengaruhi oleh pH medium tempat reaksi terjadi. Pada umumnya enzim aktif pada pH netral atau dengan kisaran pH 5-9. Untuk mengetahui pH optimal, kitin deasetilase isolat *Bacillus papandayan* digunakan tiga macam bufer yaitu bufer sitrat posfat (pH 5-7), bufer borat (pH 8-9), dan bufer borax NaOH (pH 10).

Hasil pengujian pengaruh pH terhadap aktivitas enzim tampak pada Gambar 3. Aktivitas tertinggi kitin deasetilase diperoleh saat pH 8, karena saat kondisi ini, pada sisi aktif enzim terjadi ionisasi asam-asam amino sedemikian rupa, sehingga antara enzim dan substrat berinteraksi secara optimal.

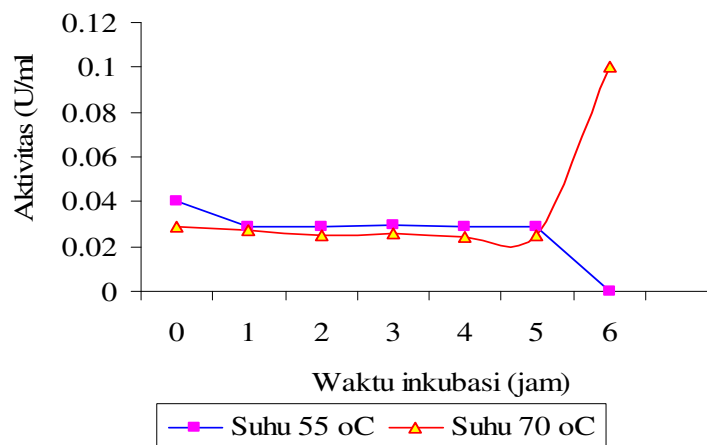


Gambar 3. Pengaruh pH terhadap aktivitas kitin deasetilase

Hasil pH optimum 8 yang cenderung alkalis ini didukung oleh hasil penelitian Tokuyasu *et.al.* (1996) yakni memurnikan kitin deasetilase dari *Colletotrichum lindemuthianum* dan diketahui memiliki pH optimal 11,5-12.

Termostabilitas

Pengujian termostabilitas kitin deasetilase dilakukan pada dua tingkatan suhu yaitu 55 °C dan 70 °C. Inkubasi dilakukan selama 48 jam, saat lima jam pertama dilakukan pengambilan contoh setiap jam sekali, selanjutnya pengambilan contoh dilakukan pada jam ke-24 dan 48. Hasil pengujian termostabilitas kitin deasetilase terlihat pada Gambar 4 berikut.

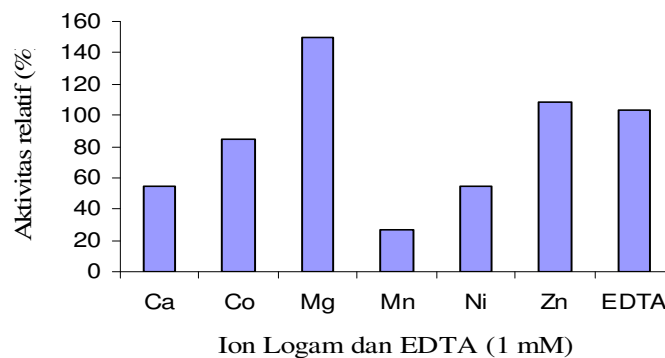


Gambar 4. Stabilitas panas kitin deasetilase pada 55 °C dan 70 °C

Setelah satu jam inkubasi, aktivitas kitin deasetilase pada 55 °C menurun cukup besar berkisar 34% dibandingkan dengan 20% pada 70 °C. Saat pengambilan contoh pada jam kelima, aktivitas tersisa 55% pada 55 °C dan 75% pada 70 °C. Hal ini menunjukkan bahwa kitin deasetilase telah mengalami kerusakan/ denaturasi yang semakin meningkat seiring dengan bertambahnya waktu inkubasi. Hasil ini didukung oleh penelitian Tokuyasu *et.al.* (1996) yang menunjukkan aktivitas kitin deasetilase dari *Colletotrichum lindemuthianum* stabil sampai suhu 45 °C, kemudian menurun pada 50 °C dengan aktivitas yang tersisa sebesar 20 persen.

Pengaruh Ion Logam dan EDTA

Ion logam diperlukan sebagai aktivator untuk meningkatkan aktivitas pada enzim-enzim tertentu. Namun ion logam tersebut dapat pula sebagai penghambat (inhibitor) pada konsentrasi yang berbeda. Ion logam diperlukan oleh enzim sebagai komponen pada sisi aktifnya. Kitin deasetilase direaksikan dengan beberapa kation logam dan inhibitor pada konsentrasi 1 mM. Hasil pengujian terlihat pada Gambar 5 berikut.



Gambar 5. Pengaruh ion logam dan EDTA terhadap aktivitas kitin deasetilase

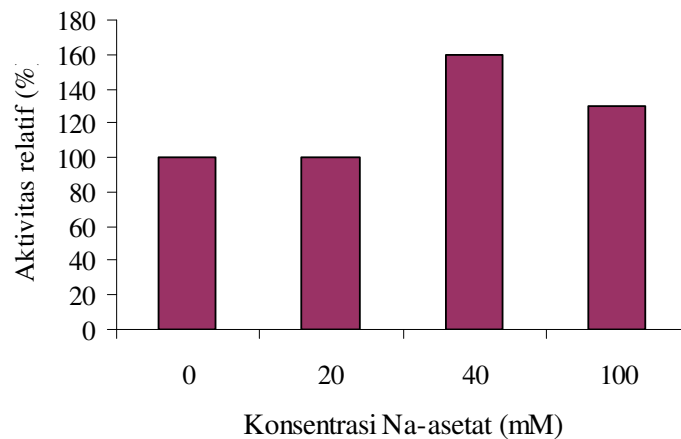
Pada Gambar 5 nampak bahwa aktivitas kitin deasetilase meningkat dengan adanya ion Mg, sedangkan ion Ca, Co, M, dan Ni menghambat aktivitasnya. Sementara

EDTA tidak menghambat aktivitas enzim. Kitin deasetilase dari *Colletotrichum lindemuthianum* dihambat oleh ion Co pada konsentrasi 10 mM, namun pada konsentrasi 1 mM, ion Co, Cu, Ni, Fe, dan Zn justru meningkatkan aktivitasnya.

Pengaruh Na-asetat

Kitin deasetilase direaksikan dengan senyawa Na-asetat untuk mengetahui pengaruhnya terhadap aktivitas enzim (Gambar 6). Menurut Tokuyasu *et.al.*(1999), beberapa enzim pendeasetilase seperti kitin deasetilase dari Zygomycetes dan suatu peptidoglikan deasetilase dari *Bacillus cereus* dihambat kuat oleh adanya asetat. Sebaliknya, kitin deasetilase dari Deuteromycetes tidak dihambat, bahkan enzim dari *Aspergillus nidulans* diaktifkan dengan penambahan asetat.

Pada Gambar 6 terlihat bahwa pada konsentrasi 20 mM penambahan Na-asetat tidak mempengaruhi aktivitas enzim. Akan tetapi pada saat penambahan 40 mM, aktivitas relatif enzim meningkat menjadi 160 persen, lalu menurun menjadi 130 persen pada konsentrasi 100 mM.



Gambar 6. Pengaruh Na-asetat terhadap aktivitas kitin deasetilase

Hasil tersebut memiliki kemiripan dengan kitin deasetilase dari *Colletotrichum lindemuthianum* yang ternyata memiliki aktivitas sisa sekitar 95% sampai konsentrasi

Na-asetat 100 mM, dan 70% pada konsentrasi 800 mM (Tokuyasu *et.al.*, 1996). Dengan demikian, kitin deasetilase dari *Bacillus papandayan* tidak dihambat oleh adanya asetat. Enzim kitin deasetilase dari Deuteromycetes yang tidak dihambat oleh asetat dapat digunakan untuk reaksi hidrolisis dapat-balik (*reverse hydrolysis*) dengan penambahan asetat yang berlebihan (Tokuyasu *etal.*, 1999)

Perkiraan Berat Molekul

Berat molekul kitin deasetilase diperkirakan dengan metode SDS-PAGE. Selain itu analisis SDS-PAGE bisa digunakan untuk memperkirakan jumlah pita protein yang memiliki aktivitas kitin deasetilase dalam larutan enzim kasar. Gel penahan yang digunakan untuk analisis SDS Page sebesar 4% dangel pemisah 10%. Penggunaan SDS hanya 0.5% saja karena enzim tidak tahan terhadap SDS. Marker yang digunakan adalah marker dengan berat molekul rendah (*Low Molecular Weight*) yang mengandung α -laktalbumin (14.4 kDa), soybean trypsin inhibitor (20.1 kDa), carbonic anhidrase (30 kDa), ovalbumin (43 kDa), BSA (67 kDa) dan posforilase-b (94 kDa).

Hasil analisis SDS PAGE menunjukkan pada sumur presipitat terdapat sekitar sepuluh buah pita dengan perkiraan berat molekul 67, 60, 55, 35, 30, dan 15 kDa. Hal ini menunjukkan bahwa pemisahan enzim menggunakan satu kolom saja belum dapat memurnikan enzim secara sempurna, terbukti masih banyaknya pita enzim yang ditemukan pada sumur fraksi hasil pemurnian kolom.

VI. KESIMPULAN DAN SARAN

Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan sebagai berikut:

1. Pemurnian kitin deasetilase asal *Bacillus papandayan* melalui tahapan pengendapan amonium sulfat 80%, pemanasan 55 °C, dialisis dan kolom kromatografi DEAE Sephadex A-50. Hasil kromatografi kolom menghasilkan tiga fraksi aktif dengan aktivitas tertinggi pada fraksi ke-76.
2. Karakterisasi biokimiawi kitin deasetilase hasil pemurnian dengan presipitasi menghasilkan suhu dan pH optimum adalah 55 °C dan 8, stabil terhadap panas, diaktifkan oleh ion Mg dan dihambat oleh ion Mn, Ca, dan Ni serta tidak dihambat oleh Na-asetat. Berat molekul kitin deasetilase berkisar antara 15-67 kDa.

Saran

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai pemurnian kitin deasetilase menggunakan metode yang lebih baik. Studi aplikasi kitin deasetilase dari sumber lain, terutama kapang, perlu dilakukan karena dari beberapa hasil penelitian menyatakan bahwa aktivitasnya lebih tinggi daripada kitin deasetilase asal bakteri.

UCAPAN TERIMAKASIH

Penulis menyampaikan ucapan terima kasih kepada semua pihak yang telah membantu pelaksanaan penelitian ini khususnya kepada Dirjen DIKTI dan Ketua Lembaga Penelitian Universitas Padjadjaran beserta staf atas bantuan biaya yang diberikan.

DAFTAR PUSTAKA

- Alfonso C., Nuero OM., Santamaria F., Reyes F. 1995. Purification of a heat-stable chitin deacetylase from *Aspergillus nidulans* and its role in cell wall degradation. *Current Microbiol* (30): 49-54
- Arnold, L.D. dan N.A. Solomon. 1986. *Manual of Industrial Microbiology*. American Society for Microbiology, Washington D.C.
- Boyer, R.F. 1986. *Modern Experimental Biochemistry*. The Benjamin/ Cummings Pub.Co.Inc. Canada.
- Bradford, M.M. 1976. *Anal.Biochem.* 72:248-254. *A Rapid and Sensitive Method for The Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding*. Di dalam; D.M. Bollang dan S.J. Edelstein. *Protein Methods*. John Wiley & Sons, Inc., Publication, Oxford.
- Brock TD. 1986. *Thermophiles: General molecular and applied microbiology*. John Wiley and Sons. New York. USA
- Chang, K.L.B., G. Tsai, J. Lee and W.R. Fu. 1997. Heterogeneous N-deacetylation of Chitin in Alkaline Solution. *Carbohydr. Res.*, 303: 327- 332.
- Christodoulidou A, P. Briza, A. Ellinger, and V. Bouriotis 1999. Yeast Ascospore Wall Assembly Requires Two Chitin Deacetylase Isozymes. *FEBS Lett.* 29:275-279.
- [DKP] Departemen Kelautan dan Perikanan Republik Indonesia. 2003. Perkembangan ekspor komoditi hasil perikanan Indonesia 1998-2002. url: <http://www.dkp.go.id/>
- Dodane V, Vilivalam VD. 1998. Pharmaceutical applications of chitosan. *PSTT* 1:246-253
- Deising H and J. Siegrist. 1995. Chitin Deacetylase Activity of the Rust *Uromyces viciae-fabae* is Controlled by Fungal Morphogenesis. *FEMS Microbiol. Lett.*, 127: 207-212
- Edwards, C. 1990. *Thermophiles*, Di dalam: Edwards, C. (ed). *Microbiology of Extreme Environments*. Alden Press, Oxford.
- Emmawati, A. 2004. Produksi kitosan dengan kombinasi metode kimia dan enzimatis menggunakan NaOH dan kitin deasetilase. Tesis IPB. Bogor.
- Gao XD., Katsumoto T., Onodera K. 1995. Purification and characterization of Chitin deacetylase from *Absidia coerulea*. *J. Biochem.*117:257-263
- Harris, E.L.V. dan Angal, S. 1989. *Protein Purification Methods*. Oxford University. Press. New York.

- Hirano S. 1996. Chitin biotechnology applications. *Biotechnol Annu Rev.*2:237-258
- Jayanti, J.F.L. 2002. Studi kitinase dan kitin deasetilase termostabil dari isolat asal Manado. Skripsi FATETA, IPB.
- Kafetzopoulos, D., Martinou, A. , dan Bouriotis, V. 1993. Bioconversion of Chitin to Chitosan : Purification dan Characterization of Chitin Deacetylase from *Mucor Rouxii*. *J. Appl. Bio. Sci.* 90: 2564-2568.
- Kolodziejska I., A. Wojtasz-Pajak, G. Ogonowska, dan Z. E. Sikorski. 2000. Deacetylation of chitin in two-stage chemical and enzymatic process. *Bul. Sea Fisheries Ins.* 2: 15-24
- Kupiec, R.C. dan Ilan, C. 1998. The Molecular Biology of Chitin Degradation. *Current Opinion in Biotech.* 9:270-277.
- Lehninger, A.L. 1997. Dasar-Dasar Biokimia Jilid I. Terjemahan : Suhartono, M.T. Erlangga. Jakarta.
- Natsir, H. 2000. Karakterisasi dan purifikasi enzim pendegradasi kitin dari mikroba Asidofilik asal Kawah Kamojang. Tesis. Program Pascasarjana IPB. Bogor.
- Patil, R. S., V. Ghormade dan M.V., Deshpande. 1999. Chitinolytic Enzymes: An Exploration. *J. Enzyme and Microbial Technol.* 26.473-483.
- Rahayu, S. 2000. Karakteristik dan pemurnian enzim kitinase dan kitin deasetilase termostabil dari *Bacillus* sp. K29-14 asal Kawah Kamojang, Jawa Barat. Tesis. Program Pascasarjana. IPB. Bogor .
- Rianti D. 2003. Mempelajari pemurnian kitin deasetilase dari *Bacillus* sp. 13.26 asal Tompaso. Manado. Skripsi. FATETA. IPB.Bogor.
- Subianto, Y. 2001. Isolasi dan pemilahan bakteri termofilik penghasil enzim. Skripsi. FATETA IPB. Bogor.
- Suhartono, et al. 2002. *Exploration of Indonesian Thermophiles Producing Thermostable Chitinolytic Enzymers*. Report Biochemistry and Microbiology Laboratory Research Center for Biotechnology. IPB. Bogor.
- Suhartono. M.T. 1982. Dasar-dasar Biokimia. Terjemahan: Lehninger Jilid I. Penerbit Erlangga. Jakarta. 269 hal.
- Tanuwijaya, F. 1999. Isolasi dan pemilahan bakteri termofilik penghasil enzim kitinase. Skripsi. Fateta. IPB.Bogor.

- Toharisman A, Chasanah E, Purwani EY, Jayanti JFL, Welan V, Suhartono MT, Hwang JK, and Pyun YR. 2000. Screening of Thermophilic Microorganisms Producing Thermostable Chitin Deacetylase. Indonesian Biotechnology Conference; An International Seminar and Symposium. Yogyakarta, 2000.
- Tokuyasu, K., Ono, H., Hayasi, K., dan Mori, Y. 1996. Purification and characterization of extracellular chitin deacetylase from *Colletotricum lindemuthianum*. Biosc. Biotech. Biochem. 10: 1598-1603.
- Tokuyasu, K., H. Ono, K. Hayasi, Y. 1999. Reverse hydrolysis reaction of chitin deacetylase and enzymatic synthesis of B-D-GlcNAc-(1-4)-GlcN from Chitobiose.. Carbohydr. Res. 322: 26-31.
- Trudel, J. dan A. Asselin 1980. *Detection of Chitinase Activity After Polycrylamide Gel Electroforesis*. Anal. Biochem. 178 : 3620366.
- Tsigos, I dan V. Bouriotis. 1995. Purification and characterization of chitin deacetylase from *Colletotrichum lindemuthianum*. J. Biol. Chem. 270: 26286-26291
- Tsigos, I., Martinou, A., Kafetzopoulos. D., Bouriotis, V. 2000. *Chitin Deacetylase :New, Versatile Tools in Biotechnology.* TIBTECH 18: 305-311.
- Tweddel RJ., SH Jabaji-Hare, PM Charest. 1994. Production of chitinases and β -1,3-glucanases by *Stachybotrys elegans*, a mycoparasites of *Rhizoctonia solani*. J. App Env Microbiol. 60: 489-495
- Welan, V. 2002. Karakteristik enzim kitinase dan kitin deasetilase isolat 13.26 asal Manado, yang diproduksi menggunakan matriks immobilisasi sel. Skripsi. FATETA. IPB. Bogor.
- Ueda M and M. Arai. 1992. Purification and some properties of chitinases from *Aeromonas* sp. No. 10S-24. J Biosci Biotech Biochem. 56 : 460-464