

# Enzim Kitinase Hasil Produksi Bakteri Kitinolitik *Indigenous* Isolat 26 pada Tepung Cangkang Udang

## *(Chitinase from Chitinolytic Indigenous Bacteria Isolate 26 on Shrimp Shell Powder)*

Rion Faizah Muammaroh, Kahar Muzakhar, Siswanto  
Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Jember (UNEJ)  
Jln. Kalimantan 37, Jember 68121  
E-mail: kaharmzk@unej.ac.id

### Abstrak

Kitinase adalah enzim yang mampu menghidrolisis senyawa kitin pada ikatan  $\beta$ -(1,4) glikosidik dan menghasilkan oligosakarida atau monomer N-Asetil-D-glukosamin. Hasil hidrolisis kitinase tersebut telah banyak dimanfaatkan dalam bidang kesehatan, kosmetik, tambahan dalam pembuatan produk makanan, serta sebagai agen antibakteri. Enzim kitinase banyak dihasilkan oleh organisme meliputi bakteri, fungi, insekta, tumbuhan, hewan, dan bahkan manusia. Aktivitas kitinase dihitung berdasarkan N-Asetil-D-glukosamin yang terbentuk dari hidrolisis kitin. Satu unit aktivitas kitinase didefinisikan sebagai jumlah enzim yang menghasilkan 1  $\mu$ mol N-asetilglukosamin per menit pada kondisi tertentu. Isolat 26 merupakan isolat bakteri kitinolitik yang diisolasi dari limbah cangkang udang yang telah mengalami pelapukan. Penelitian bertujuan untuk mengetahui produksi kitinase optimum yang dihasilkan oleh bakteri kitinolitik Isolat 26 pada variasi waktu inkubasi 8, 16, 24, 32, dan 40 jam. Hasil penelitian menunjukkan bahwa bakteri kitinolitik *indigenous* isolat 26 memproduksi kitinase optimum setelah inkubasi selama 32 jam dengan aktivitas enzim sebesar 3,5 U/ml.

Kata Kunci: Bakteri Kitinolitik, Cangkang Udang, Enzim Kitinase, N-Asetil-D-glukosamin.

### Abstract

*Chitinase is an enzyme that hydrolyze chitin  $\beta$ -(1,4) glycosidic bond and produced oligosaccharides or monomer N-acetyl-D-glucosamine. Chitinase hydrolysis results has widely used in health, cosmetics, food products, and antibacterial as well. Chitinase enzyme are produced by organisms include bacteria, fungi, insects, plants, animals, and even humans. Chitinase activity was calculated based on N-acetyl-D-glucosamine which are formed from the hydrolysis of chitin. One unit of chitinase activity is defined as the amount of enzyme that produces 1  $\mu$ mol of N-acetylglucosamine per minute under certain conditions. Isolate 26 is a chitinolytic bacteria isolated from shrimp shell waste which has experienced weathering. The purpose of the research is to determine the optimum production of chitinase from chitinolytic bacteria 26 on the variation of incubation time 8, 16, 24, 32, and 40 hours. Experiment showed that chitinolytic indigenous bacteria 26 produce chitinase maximum after 32 hours incubation with the enzyme activity of 3.5 U/ml.*

Keywords: Chitinase Enzyme, Chitinolytic Bacteria, N-acetyl-D-glucosamine, Shrimp Shell

## PENDAHULUAN

Kitinase (EC 3.2.1.14) merupakan kelompok enzim hidrolase yang mampu menghidrolisis ikatan  $\beta$ -(1,4) pada kitin [1] dan menghasilkan monomer N-Asetil-D-glukosamin. Kelimpahan kitin di alam menempati urutan terbesar kedua setelah selulosa [1] dan biasanya ditemukan pada golongan *crustaceae* (kepiting, udang, dan lobster), insekta, fungi, hewan maupun tumbuhan [2]. Sumber kitin terbesar diperoleh dari cangkang *crustaceae*, dengan kandungan kitin yang terdapat didalamnya berkisar antara 17% - 40% [3]. Monomer N-Asetil-D-Glukosamin banyak

dimanfaatkan sebagai tambahan pada produk kosmetik, kesehatan dan bahan tambahan dalam pembuatan produk makanan [4]. Selain itu, kito-oligosakarida yang dihasilkan cukup potensial dalam menghasilkan senyawa aktif yang berfungsi sebagai agen antibakteri [5]. Enzim kitinase sendiri dapat diperoleh dari berbagai organisme, termasuk virus, bakteri, tumbuhan tingkat tinggi maupun hewan [6].

Bakteri kitinolitik Isolat 26 merupakan isolat bakteri yang berhasil diisolasi oleh [7] dari limbah cangkang udang yang telah mengalami pelapukan. Menurut [8] inokulum untuk produksi kitinase isolat 26 dipilih pada pertengahan atas fase logaritmik

yaitu jam ke-9 dari puncak fase pertumbuhan logaritmik yang terjadi pada jam ke-12. Aktivitas kitinase tertinggi yang dimiliki isolat 26 sebesar 0,1 U/ml pada media yang mengandung 2,5% tepung cangkang udang. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui produksi kitinase optimum yang dihasilkan oleh bakteri kitinolitik Isolat 26 pada variasi waktu inkubasi 8, 16, 24, 32, dan 40 jam.

## METODE PENELITIAN

### Peremajaan Bakteri Kitinolitik Isolat 26

Bakteri kitinolitik *Indigenus* Isolat 26 dari stok koleksi penelitian sebelumnya diremajakan dengan cara menginokulasikan secara goresan pada media *Nutrient Agar* (NA) kitin dan diinkubasi pada suhu 30°C selama 24 jam. Tujuan dari peremajaan isolat bakteri untuk meregenerasi atau memperbarui sel bakteri, menjaga ketersediaan nutrisi dan untuk menghindari adanya perubahan karakteristik dari kultur murni yang ditanam.

### Pembuatan Tepung Cangkang Udang

Cangkang udang bagian kepala, kulit, dan bagian ekor dicuci dengan air sampai bersih, kemudian dioven pada suhu 60°C selama ± 48 jam sampai beratnya konstan. Selanjutnya cangkang udang yang sudah kering dihaluskan. Cangkang udang yang sudah halus merupakan tepung cangkang udang yang siap digunakan sebagai media produksi kitinase.

### Pembuatan Koloidal Kitin

Sebanyak 5 gram kitin dilarutkan dalam 100 ml HCl pekat, kemudian ditutup rapat dan diinkubasi semalam pada suhu 4°C. Larutan tersebut kemudian disaring menggunakan *glasswool*, filtrat yang didapat selanjutnya ditambahkan dengan 50 ml akuades dingin dan pH larutan dinetralkan dengan menambahkan secara perlahan-lahan NaOH 10 N. Kemudian dilakukan sentrifugasi 8.000 rpm selama 20 menit pada suhu 4°C. Endapan yang terbentuk dikumpulkan dan dicuci menggunakan akuades dingin, selanjutnya disentrifugasi kembali. Penyucian diulang beberapa kali hingga didapatkan endapan berwarna putih kecoklatan yang merupakan koloidal kitin.

### Produksi Kitinase Ekstrak Kasar

Sebanyak 1 ose isolat bakteri kitinolitik 26 yang telah diremajakan, diinokulasikan ke dalam 5 ml media *Luria Broth* (LB) dan diinkubasi pada *shaker* suhu 30°C selama 9 jam sesuai dengan waktu pertumbuhan eksponensial bakteri. Selanjutnya dilakukan subkultur dengan cara menginokulasikan sebanyak 10% dari kultur awal saat fase eksponensial ke dalam media LB baru dan diinkubasi pada *shaker* suhu 30°C selama 9 jam sebagai inokulum produksi kitinase.

Sebanyak 10% inokulum hasil sub kultur diinokulasikan pada media produksi kitinase yang terdiri dari tepung cangkang udang, 0,1%  $K_2HPO_4$ ; 0,01%  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ; 0,05% ekstrak yeast; 0,1% trypton, konsentrasi tepung udang yang digunakan adalah 2,5% dengan pengulangan sebanyak 3 kali. Selanjutnya kultur diinkubasi dengan waktu inkubasi selama 40 jam dalam *shaker* pada suhu 30°C. Setiap interval 8 jam kitinase diekstraksi dengan sentrifugasi pada suhu 4°C dengan kecepatan 8.000 rpm selama

10 menit. Supernatan yang dihasilkan merupakan kitinase ekstrak kasar.

### Pengukuran Aktivitas Enzim

Pengukuran aktivitas kitinase ekstrak kasar berdasarkan metode *Schale* [9]. Aktivitas kitinase diuji dengan menggunakan substrat koloidal kitin 1%. Sebanyak 0,15 ml enzim, 0,3 ml koloidal kitin 1%, dan 0,15 ml buffer fosfat 0,02 M pH 7 dihomogenisasi pada tabung reaksi dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 120 menit. Kontrol terdiri dari campuran 0,15 ml buffer fosfat dan 0,3 ml koloidal kitin 1% tanpa penambahan enzim, selanjutnya diinkubasi pada kondisi yang sama dengan sampel. Reaksi dihentikan dengan inkubasi pada air mendidih selama 5 menit dan didinginkan selama 10 menit. Selanjutnya pada kontrol ditambahkan 0,15 ml enzim dan disentrifuse dengan kecepatan 5000 rpm selama 5 menit.

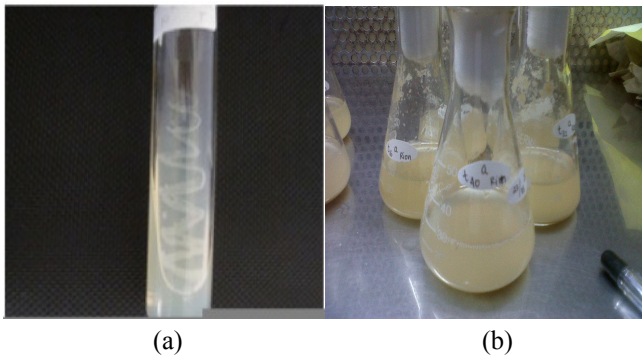
Pengukuran kandungan N-asetilglukosamin hasil hidrolisis kitinase pada koloidal kitin diawali dengan membuat larutan sampel yang terdiri dari 0,5 ml akuades, 0,5 ml campuran enzim, dan 1 ml reagen *Schale*, komposisi yang sama juga diberikan pada kontrol, sedangkan untuk blanko terdiri dari 1 ml akuades dan 1 ml reagen *Schale*. Masing-masing campuran diinkubasi pada air mendidih selama 10 menit dan diukur absorbansinya pada spektrofotometer dengan panjang gelombang 420 nm. Kadar N-asetilglukosamin dihitung berdasarkan konversi dari kurva standar. Satu unit aktivitas enzim kitinase didefinisikan sebagai jumlah enzim yang membebaskan N-asetilglukosamin sebesar 1  $\mu$ mol permenit pada kondisi analisis yang disebutkan.

### Penentuan Standar N-Asetilglukosamin

Konsentrasi larutan N-asetilglukosamin yang digunakan dalam pembuatan standar N-asetilglukosamin berkisar antara 0-250  $\mu$ g/ml. Sebanyak 0,5 ml larutan N-asetilglukosamin dicampur dengan 0,5 ml akuades dan direaksikan dengan 1 ml reagen *Schale*. Selanjutnya diinkubasi pada air mendidih selama 10 menit. Setelah larutan dingin, diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 420 nm. Selanjutnya dibuat kurva standar, yang merupakan regresi hubungan antar konsentrasi N-asetilglukosamin dan nilai absorbansi, dengan persamaan  $y=ax+b$ .

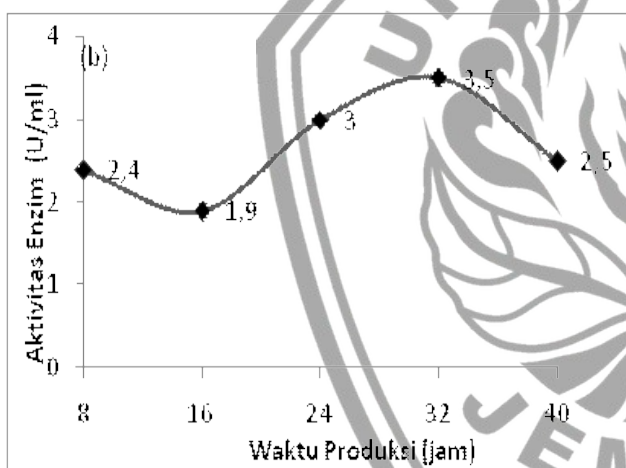
## HASIL PENELITIAN

Sebelum dilakukan produksi enzim kitinase ekstrak kasar, Isolat 26 ditumbuhkan pada media *Nutrient Agar* (NA) kitin dengan tujuan meregenerasi sel bakteri dan untuk menghindari adanya perubahan karakteristik dari kultur murni yang ditanam. Perbanyak kultur bakteri dilakukan dengan caramenumbuhkan Isolat 26 pada media *Luria Broth* (LB). Hasil peremajaan bakteri kitinolitik dan pembuatan inokulum pada **Gambar 1**.



**Gambar 1.** Hasil peremajaan bakteri kitinolitik dan pembuatan inokulum (a) Hasil peremajaan bakteri kitinolitik isolat 26 pada media *Nutrient Agar* (NA) kitin (b) Inokulum produksi kitinase.

Isolat 26 Bakteri Kitinolitik *Indigenus* ditumbuhkan selama fase eksponensial yaitu 9 jam, pada media produksi yang mengandung substrat tepung cangkang udang. Substrat tepung cangkang udang mengandung kitin yang cukup besar, yaitu 18,7% [10]. Hasil uji pengaruh waktu produksi terhadap aktivitas kitinase dapat dilihat pada **Gambar 2**.



**Gambar 2.** Kurva pengaruh waktu produksi terhadap aktivitas kitinase isolat 26 dengan waktu inkubasi 8, 16, 24, 32, dan 40 jam

## PEMBAHASAN

Kandungan kitin dalam tepung cangkang udang akan menginduksi sel bakteri untuk mensekresikan kitinase yang akan digunakan untuk memecah kitin menjadi monomernya, yakni N-Asetilglukosamin. Dari **Gambar 2**, dapat diketahui bahwa pada waktu inkubasi jam ke 8 aktivitas kitinase sebesar 2,4 U/ml, sedangkan pada jam ke 16 mengalami penurunan sebesar 1,9 U/ml. Aktivitas kitinase mengalami kenaikan pada jam ke 24 sebesar 3,0 U/ml dan mencapai titik tertinggi pada jam ke 32 yakni sebesar 3,5 U/ml, selanjutnya mengalami penurunan kembali pada jam ke 40 sebesar 2,5 U/ml. Sehingga dapat diketahui bahwa waktu produksi optimum untuk kitinase Isolat 26 adalah 32 jam. Berdasarkan penelitian [11], waktu produksi

enzim kitinase dari isolat *Streptomyces* sp. ANU 6277 memiliki aktivitas maksimal sebesar 7 U/ml pada waktu inkubasi jam ke 60.

Pengaturan biosintesis kitinase melalui sistem represor-induser. Kitin dan produk hasil degradasinya (oligomer/monomer) berperan sebagai induser sedangkan substrat seperti selulosa, xilan, pektin, lignin, dan sebagainya tidak dapat menginduksi kitinase. Glukosamin dapat menginduksi kitinase karena pada kitosan (kitin yang mengalami deasetilasi) masih terdapat sekitar 10-20 % residu asetil [12]. Pengaturan sintesis kitinase dipengaruhi juga oleh produk akhir (katabolit) berupa N-Asetilglukosamin.

Enzim sebagai produk yang dihasilkan oleh sel bakteri, dapat berperan dalam proses pertumbuhan bakteri itu sendiri. N-Asetilglukosamin yang diperoleh dari degradasi kitin digunakan sebagai sumber karbon dan nitrogen untuk pertumbuhan bakteri [13]. N-Asetilglukosamin yang diperoleh akan dimetabolisme lebih lanjut oleh bakteri hingga menghasilkan energi, CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O, dan NH<sub>3</sub> [14]. N-Asetilglukosamin yang dihasilkan digunakan pula untuk membentuk peptidoglikan pada dinding sel bakteri. Peptidoglikan bakteri merupakan polimer linear yang terdiri dari unit N-Asetilglukosamin dan asam N-Asetilmuramat yang saling terkait satu sama lain dengan rantai peptida. Berkurangnya produksi kitinase pada jam ke 40 diduga akibat akumulasi N-Asetilglukosamin hasil degradasi dalam medium, hal ini disebabkan N-Asetilglukosamin dalam jumlah yang berlimpah dapat menghambat produksi enzim kitinolitik [15]. Sehingga waktu produksi 32 jam dianggap sebagai waktu produksi yang lebih baik bakteri kitinolitik isolat 26.

Aktivitas kitinase dideteksi dengan menggunakan metode *Schale*. Metode ini didasarkan pada pengurangan oksidan anorganik seperti ferrisianida atau ion tembaga (Cu) dengan kelompok aldehyd/hemiasetal pada gula pereduksi, sehingga menyebabkan perubahan warna pada Reagen *Schale* yang berwarna kuning ketika direaksikan dengan gula reduksi warna akan memudar dan dapat dideteksi secara spektrofotometri pada panjang gelombang 420 nm [16].

## KESIMPULAN DAN SARAN

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan dapat disimpulkan bahwa waktu produksi optimum untuk kitinase ekstrak kasar adalah 32 jam dengan aktivitas enzim sebesar 3,5 U/ml. Untuk mengetahui jenis bakteri kitinolitik Isolat 26 perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai identifikasi molekuler Isolat Bakteri 26 berdasarkan 16S-rRNA.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih pada Esti Utarti, S.P, M. Si yang telah membimbing dan memberikan bantuan dana melalui proyek penelitian Hibah Bersaing dengan judul “ N-Asetil-D-Glukosamin Hasil Produksi Bakteri Kitinolitik *Indigenus* pada Tepung Cangkang Udang dalam Pengobatan Osteoarthritis” yang dibawah oleh DIKTI.

**DAFTAR RUJUKAN**

- [1] Annamalai, N.S. Giji, M. Arumugam, and T. Balasubramanian. 2010. Purification and Characterization of Chitinase from *Micrococcus* sp. AG84 Isolated from Marine Environment. *African Journal of Microbiology*. Vol. 4(24): 2822-2827.
- [2] Herdyastuti, N., Raharjo, T.J., Mudasir., Matsjeh, S. 2009. Chitinase and Chitinolitik Microorganism: Isolation, Characteristic and Potential. *Indo. J. Chem.* Vol 9 (1): 37-47.
- [3] Arbia, W., Arbia, L., Adour, L., Amrane, A. 2013. Chitin Extraction from Crustacean Shells using Biological Methods. *Food Technol, Biotechnol.* 51 (1): 12-25.
- [4] Patil, R.S., Ghormade, V. and Despande, M.V. 2000. Chitinolytic Enzymes: an Exploration. *Enzyme and Microbial Technology* 26: 473-483.
- [5] Wen CM, Tseng CS, Cheng CY, Li YK. 2002. Purification, characterization and cloning of a chitinase from *Bacillus* sp. NCTU2. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 35: 213-219.
- [6] Haliza, W dan Suhartono, M. T. 2012. Karakterisasi Kitinase dari Mikroba. *Buletin Teknologi Pascapanen Pertanian*. Vol 8 (1): 2-14.
- [7] Asmarany, A. 2011. Skrining Bakteri Kitinolitik dan Uji Produksi Kitinase Menggunakan Tepung Cangkang Udang. Skripsi. Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Jember.
- [8] Cahyani, L. 2013. Pemanfaatan Tepung Cangkang Udang Sebagai Media Produksi Kitinase Oleh Bakteri Kitinolitik Isolat 26. *Skripsi*. Jember: Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.
- [9] Wang, San-Lang & Chang, When-Tsu. 1997. Purification and Characterization of two bifunctional chitinases/lysozymes extracellularly produced by *Pseudomonas aeruginosa* K-187 in a shrimp and crab shell powder medium. *Appl. Environ. Microbiol.* 63(2): 380-386.
- [10] Mahata, M.E., Dharma, A., Ryanto, H.I., Rizal, Y. 2008. Effect of Substituting Shrimp Waste Hydrolysate of *Penaeus merguensis* for Fish Meal in Brioler Performance. *Pakistan Journal of Nutrition*, 7(8): 806-810.
- [11] Narayana K, Vijayalaksmi . 2009. Chitinase Production by *Streptomyces* sp. ANU 6277. *Brazillian J Microbiol.* Vol: 40, 725-733.
- [12] Sahai AS, Manocha MS. 1993. Chitinases of Fungi and Plants: Their Involvement In Morphogenesis and Host-Parasite Interaction. *FEMS Microbiol* 11: 317-338.
- [13] Brzezinka, M. S. dan Donderski, W. 2001. Occurence and Activity of The Chitinolytic Bacteria of *Aeromonas* Genus. *Polish Journal of Enviromental Studies*, 10 (1): 27-31.
- [14] Thompson, SE., M. Smith, MC. Wilkinson, & K. Park. 2001. Identification and Characterization of a Chitinase Antigen from *Pseudomonas aeruginosa* strain 385. *J. Appl. Environment Microbiol.* 67(9): 4001-4008.
- [15] Donderski, W. & M.S. Brzezinska. 2001. Occurence of chitinolytic bacteria in water and bottom sediment of eutrophic lakes in Hawski Lake District. *Polish Journal of Environmental Studies*. 10(5): 331-336.
- [16] Ferrari, R.A., Gaber Y., Fraaije, M.W. 2014. A fast, sensitive and easy colorimetric assay for chitinase and cellulase activity detection. *Biotechnology for Biofuels*, 7: 37.