

Skrining dan evaluasi aktivitas kitinase dari sembilan isolat bakteri lokal

Screening and Chitinolytic Activity Evaluation of Nine indigenous bacteria isolate

Baitha Palanggatan Maggadani^{1*}, Siswa Setyahadi S², Harmita¹

¹Fakultas Farmasi Universitas Indonesia, Depok. 16424

²Badan Pengkajian dan Penerapan Teknologi, PUSPIPTEK, Serpong

Email : baitha.p@farmasi.ui.ac.id; *corresponding author

Abstrak

Kitinase merupakan enzim yang mendegradasi kitin pada ikatan β -1,4-asetamido-2-deoksi-D-glikosida menjadi produk turunannya yaitu kitin oligosakarida atau monomer N-asetilglukosamin (NAG). Enzim kitinase dihasilkan oleh mikroorganisme kitinolitik yang sebagian besar terdapat di lingkungan tanah dan air. Kitinase dimanfaatkan pada bidang pertanian sebagai agen biokontrol. Produk hasil hidrolisisnya dimanfaatkan dalam bidang kesehatan dan kosmetik sebagai suplemen anti inflamasi dan anti hiperpigmentasi. Penelitian kali ini bertujuan untuk skrining dan evaluasi kemampuan 9 bakteri isolat dalam menghasilkan kitinase. Isolat yang terbaik adalah isolat yang menghasilkan kitinase dengan aktivitas yang tinggi dan mampu menghidrolisis kitin menjadi monomer NAG. Dari 9 isolat bakteri tersebut, bakteri BPPTCC-2 merupakan bakteri yang terpilih karena mampu menghasilkan kitinase dengan aktivitas tertinggi yaitu 0,1780 U/mL. Kitinase tersebut dapat menghidrolisis substrat kitin dan menghasilkan NAG sebagai produk tunggal dan dengan rendemen NAG paling tinggi yaitu 11,5%.

Abstract

Chitinase is an enzyme that degrades chitin on β -1,4-acetamido-2-deoxy-D-glycoside bound to produce Chitin oligosaccharide or its soluble monomer, N-acetylglucosamine (NAG). Chitinase are usually produced naturally by chitinolytic microorganism that are found in soil or water environment. Chitinase have been widely used for biocontrol agents of plant pests. The product from chitinase hydrolysis can be used as antiinflammatory agent and anti hyperpigmentation. This research was aimed to screen and evaluate the chitinolytic ability of 9 isolate. The best isolate was the one which produced high chitinolytic activity and hydrolyzed chitin into NAG. 9 isolate were examined and BPPTCC-2 was the best isolate which produced highest level of chitinolytic activity 0.1780 U/ml. The chitinase was able to hydrolyzed chitin resulting high yields of NAG 11.5% as the only product.

Keywords: chitin, chitinase, enzymatic hydrolysis, N-acetylglucosamine, NAG

PENDAHULUAN

Kitinase adalah enzim yang menghidrolisis senyawa kitin pada ikatan β -1,4-glikosidiknya dan menghasilkan monomer N-asetil-D-glukosamin (NAG). Hasil hidrolisis kitinase dapat digunakan sebagai anti tumor, suplemen, mengontrol kadar gula dalam darah, bahan dasar pembuatan benang operasi, dan agen anti inflamasi (Pratiwi *et al.*, 2014). Kitinase dihasilkan oleh mikroorganisme kitinolitik yang sebagian besar terdapat di lingkungan tanah dan air (Haliza *et al.*, 2012). Karakteristik kitinase bervariasi tergantung pada jenis mikroorganisme penghasil dan jenis substrat kitin yang dipilih. Sebagian besar kitinase lebih spesifik terhadap substrat kitin koloidal, namun pada beberapa penelitian juga menyebutkan bahwa kitin dalam bentuk *flake* menghasilkan aktivitas spesifik yang lebih baik. Secara umum, aktivitas optimum enzim kitinase berada pada kisaran suhu 30-40°C dan pH 5-7 serta kestabilan enzim kitinase berada pada kisaran suhu 30-45°C dan pH 4-8 (Hamid *et al.*, 2014). Namun ada juga beberapa kitinase yang memiliki kestabilan di luar kondisi-kondisi tersebut. Kitinase telah banyak digunakan untuk pengolahan limbah dan agen biokontrol hama tanaman. Hasil hidrolisis kitinase dapat digunakan sebagai anti tumor, suplemen kesehatan, mengontrol kadar gula dalam darah, bahan dasar pembuatan benang operasi, dan agen antiinflamasi (Wang *et al.*, 2006; Pratiwi, *et al.*, 2014).

Kitinase mampu menghidrolisis senyawa polimer kitin menjadi kitin oligosakarida atau monomer NAG dengan menghidrolisis kitin secara acak pada ikatan glikosidik. Secara umum jenis kitinase dibedakan menjadi 3 berdasarkan cara kerjanya dalam mendegradasi kitin, yaitu eksokitinase, endokitinase dan N-asetil-glukosaminidase. Eksokitinase memotong polimer kitin hanya dari ujung nonreduksi. Endokitinase memotong polimer kitin secara acak dan menghasilkan dimer, trimer, tetramer, dan oligomer gula. N-asetil-glukosaminidase yang memutuskan diasetilkitobiosa dan menghasilkan NAG (Dahiya *et al.*, 2006; Herdyastuti *et al.*, 2009).

Kitinase dimanfaatkan secara luas dalam bidang pertanian dalam pengolahan limbah dan agen biokontrol hama tanaman (Melent'ev *et al.*, 2001). Penelitian Nagpure *et al.* tahun 2014 menyatakan bahwa protein manusia yang memiliki aktivitas kitinase dan *chitinase-like* protein telah dapat diidentifikasi dan digunakan sebagai penanda alami untuk berbagai penyakit pada manusia. Kitinase berguna dalam produksi kitooligosakarida. Kitooligosakarida berperan sebagai pertahanan tanaman dan juga digunakan dalam kesehatan manusia. Sebagai contoh, kitoheksosa dan kitoheptosa memperlihatkan aktivitas antitumor. NAG sebagai monomer juga memperlihatkan aktivitas antiinflamasi (Nagpure *et al.*, 2014). NAG juga dimanfaatkan dalam bidang kosmetika karena memperlihatkan aktivitas antihiperpigmentasi (Bisset *et al.*, 2007).

Beberapa enzim kitinase telah diisolasi, dipurifikasi dan dikarakterisasi dari beberapa mikroba seperti *Bacillus sp* (Wen *et al.*, 2002), *Vibrio sp* (Park *et al.*, 2000), *Aeromonas sp* (Jamialahmadi, 2012), *Vibrio parahaemolyticus*, *Trichoderma viridae*, *Aspergillus niger*, dan *Aeromonium sp* (Sashiwa *et al.*, 2002). Beberapa dari enzim tersebut telah diteliti kemampuannya dalam menghidrolisis kitin dan menghasilkan NAG. Sashiwa *et al.*, 2002 menghidrolisis α -kitin menggunakan enzim hasil isolasi *Aeromonas hydrophila* H-2330 dan memberikan rendemen sebanyak 70%. Mikroba lain seperti *Trichoderma hamatum* AB 10282 dan *Trichoderma harzianum* AB10283 mampu menghasilkan NAG di medium tanpa kitin ataupun derivatnya (Abd-Aziz *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2010). Percobaan produksi NAG juga pernah dilakukan dalam skala besar oleh Aiba (2005). Prosesnya menggunakan enzim kasar yang diisolasi dari *Trichoderma viridae* (Chen *et al.*, 2010). Penelitian kali ini menitikberatkan pada pencarian potensi isolat lokal yang diambil didaerah sekitar Serpong. Isolat ini telah berhasil diisolasi dari berbagai sumber air dan menunjukkan aktivitas kitinolitik ketika ditumbuhkan di media mengandung kitin. Berbagai pengujian pada studi ini akan membuktikan apakah enzim kasar dari isolat lokal juga dapat memberikan aktivitas kitinolitik yang baik dan juga mempelajari karakter hidrolisis dari enzim kasar tersebut.

METODE

Isolat BPPTCC-2 adalah kultur koleksi BPPT, Kitin didapatkan dari kulit udang yang telah mengalami proses deproteinasi dan demineralisasi sebelumnya. Kitin yang digunakan untuk uji aktivitas adalah kitin koloidal. Untuk membuat kitin koloidal 5%, sebanyak 5,0 g serbuk kitin dimasukkan secara bertahap ke 60,0 mL HCl pekat pada suhu 40°C disertai dengan pengadukan kuat. Proses pengadukan ini dilakukan selama semalaman pada suhu 40°C. Suspensi kitin dalam HCl pekat ini kemudian ditambahkan kedalam 2,0 L etanol 95% dan disertai pengadukan kuat. Proses ini kembali dilakukan selama semalam pada suhu ruang. Campuran ini kemudian disentrifugasi pada kecepatan 6000 rpm selama 20 menit pada suhu 40°C. Endapan yang diperoleh kemudian dicuci dengan akuades hingga netral (pH 7,0). Lalu tambahkan air atau dapar yang sesuai sampai 100 mL (Wen *et al.*, 2002).

Skrining isolat potensial

Skrining isolat potensial dilakukan dengan melihat zona bening yang terbentuk pada media M9 yang mengandung kitin koloidal 2%. Peremajaan bakteri dilakukan dalam media *Luria Bertani* (LB) cair steril dan diinkubasikan pada suhu 37°C selama 12 jam. Isolat kemudian digoreskan pada media padat M9 yang terdiri dari Na₂HPO₄ 0,065%; KH₂PO₄ 0,15%; NaCl 0,025%; NH₄Cl

0,05%; $MgSO_4$ 0,012%; $CaCl_2$ 0,0005%, mengandung 2% kitin koloidal dan diinkubasi pada suhu 37°C. Isolat yang menghasilkan kitinase akan menunjukkan zona bening disekelilingnya (Wen *et al.*, 2002).

Pengujian aktivitas kitinase

Aktivitas enzim dihitung berdasarkan jumlah gula pereduksi yang dihasilkan menggunakan kurva standar NAG. Satu unit aktivitas kitinase adalah jumlah enzim yang menghasilkan 1 μ mol NAG permenit (Wen *et al.*, 2002).

Didalam suatu tabung dimasukkan campuran yang terdiri dari 0,3 mL 1% kitin koloidal dan 0,3 mL larutan enzim. Campuran tersebut diinkubasi pada temperatur 37°C selama 30 menit. Reaksi dihentikan dengan penambahan 0,6 mL reagen Asam dinitrosalisilat. Campuran kemudian disentrifugasi untuk mengendapkan sisa kitin yang tidak terhidrolisis dan diinkubasi dalam air mendidih selama 15 menit dan didinginkan sampai suhu ruang. Pengukuran dilakukan dengan metode spektrofotometri pada panjang gelombang 540 nm. Kontrol dibuat dengan kondisi sama seperti sampel, namun enzim ditambahkan setelah penambahan asam dinitrosalisilat.

Kurva standar NAG dibuat dari variasi konsentrasi NAG. Sebanyak 0,6 mL larutan standar NAG dari masing-masing konsentrasi kemudian ditambahkan 0,6 mL reagen asam dinitrosalisilat dan diinkubasi dalam air mendidih selama 15 menit. Campuran ini

didinginkan sampai suhu ruang. Pengukuran absorbansi dilakukan pada panjang gelombang 540 nm.

Produksi kitinase

Isolat bakteri yang sudah diremajakan di agar miring kemudian diinokulasi ke media LB cair selama 18 jam. 1 mL inokulat tersebut dimasukkan ke media produksi yaitu media M9 dengan substrat kitin koloidal. Inokulum starter sebanyak 30 mL ditambahkan ke 300 mL media produksi yang mengandung serbuk kitin. Serbuk kitin divariasi pada 1,5% dan 3%. Setelah inkubasi pada 37°C selama 3-5 hari, kultur supernatan diambil dengan cara sentrifugasi 6000 rpm selama 30 menit suhu 40°C (Wen *et al.*, 2002).

Hidrolisis kitin secara enzimatik

Dalam sebuah tabung reaksi, dimasukkan 1,0mL substrat kitin koloidal dan 0,5 Unit larutan enzim dalam dapar fosfat pH 7.0. Campuran tersebut diinkubasi pada suhu 37°C selama 4 jam. Reaksi dihentikan dengan merendam tabung pada air mendidih selama 3 menit. Larutan dipisahkan dengan zat tak terlarut dengan cara sentrifugasi. N-asetilglukosamin yang dihasilkan dapat diidentifikasi dengan kromatografi lapis tipis dan dihitung konsentrasinya menggunakan kromatografi cair kinerja tinggi.

Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

KLT dilakukan menggunakan lempeng *silica gel* 60F254 dan sebagai eluennya yaitu N-propanol-air-NH₄OH (70:30:1) (v/v). Supernatan pada sampel yang telah

disentrifugasi kemudian disaring dan ditotolkan sebanyak 10,0 μ L pada lempeng. Elusi dilakukan sepanjang 8,5 cm. Lempeng kemudian dikeringkan dan Gula amino dideteksi dengan menyemprotkan penampak noda anilin/difenilamin dan dioven pada suhu 120°C selama 5 menit (Kuk *et al.*, 2014).

Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT)

Kuantitasi NAG menggunakan KCKT dengan kondisi: kolom LiChrospher 100NH₂ (5 μ m, 4 \times 250 mm), fase gerak asetonitril-air (75:25), laju alir 1 mL/menit, isokratik, deteksi pada panjang gelombang maksimum 205 nm. (Sashiwa *et al.*, 2012). Setelah proses enzimatik, material tidak larut disentrifugasi pada 6000 rpm 5 menit. Supernatan dipipet dan disaring dengan membran filter ukuran 0,45 μ m. Supernatan kemudian disuntikkan sebanyak 20,0 μ l. Hasil NAG dinyatakan sebagai persen rendemen NAG yang didapatkan dibandingkan dengan bobot substrat kitin koloidal yang ditambahkan (Sashiwa *et al.*, 2013) (Chang *et al.*, 2000).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Proses seleksi bertujuan untuk mendapatkan isolat terbaik yang dapat menghasilkan kitinase dengan aktivitas tertinggi dan dapat menghidrolisis kitin untuk menghasilkan NAG dengan rendemen yang tinggi. Tahapan yang dilakukan untuk memilih isolat terbaik dimulai dengan mendapatkan data zona bening, Seluruh isolat bakteri menunjukkan pembentukan zona bening ketika dibiakkan pada media produksi padat yang mengandung kitin koloidal 3%. Zona bening terbentuk mulai hari kedua dan makin lama akan semakin melebar diameternya sampai seluruh substrat kitin koloidal habis didegradasi oleh bakteri sehingga menjadi bening seluruhnya (Kuk *et al.*, 2014). Diameter zona bening isolat beragam dari 7 sampai 22 mm (Tabel 1).

Hal ini menandakan isolat-isolat tersebut mensekresi enzim kitinolitik secara ekstraseluler, karena zona bening yang

Tabel 1. Data perbandingan 9 isolat bakteri lokal

Isolat	Diameter zona bening (mm)	Aktivitas kitinase (U/mL)	Rendemen NAG (%)
BPPT CC 1	7	0,1350	11,35
BPPT CC 2	22	0,1780	11,50
BPPT CC 3	17	0,1292	11,30
BPPT CC 4	16	0,0310	-
BPPT CC 5	10	0,0699	-
BPPT CC 6	21	0,0652	2,36
BPPT CC 7	7	0,0799	-
BPPT CC 8	18	0,0520	3,67
BPPT CC 9	21	0,0713	6,77

terbentuk menandakan bahwa kitin yang terdapat dalam media telah didegradasi oleh enzim. Diameter yang berbeda-beda dari tiap isolat menunjukkan perbedaan aktivitas masing-masing enzim kitinolitik yang disekresi (Kuk *et al.*, 2014) (Jamialahmadi *et al.*, 2011).

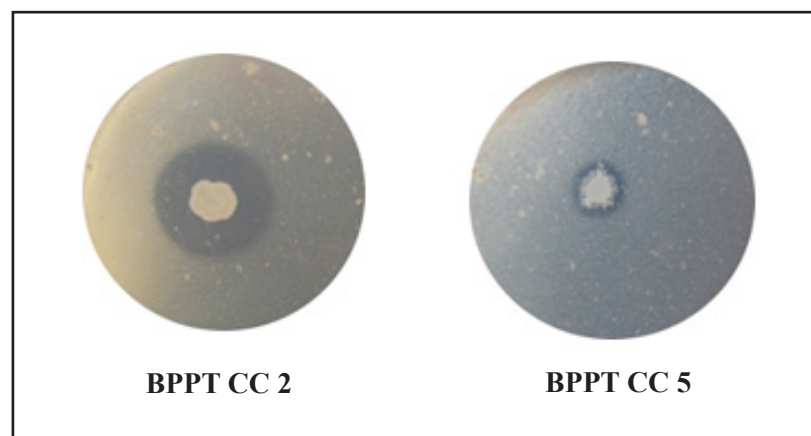
Dalam percobaan ini substrat yang digunakan adalah kitin yang diperoleh dari kulit udang dengan proses deproteinasi dan demineralisasi sebelumnya. Kitin merupakan substrat yang dapat digunakan untuk produksi baik endo maupun eksokitinase. Degradasi substrat kitin bergantung pada aktivitas kitinase, factor lingkungan seperti pH, suhu dan aerasi, serta sumber nutrisi yang digunakan dalam media, serta karakter metabolisme mikroorganisme penghasil kitinase (Herdyastuti *et al.*, 2009) (Setia *et al.*, 2015).

Aktivitas kitinase dari mikroorganisme sangat bervariasi dan tergantung pada beberapa faktor. Dari beberapa penelitian faktor-faktor

yang menyebabkan variasi antara lain waktu reaksi enzimatik, konsentrasi substrat dan enzim, waktu inkubasi, jenis media serta faktor lingkungan seperti pH dan suhu (Jamialahmadi *et al.*, 2011) (Setia *et al.*, 2015).

Data aktivitas kitinase dari sembilan isolat menunjukkan hasil yang beragam dari yang terendah yaitu kitinase BPPT CC 4 dengan aktivitas 0,0310 U/mL sampai yang tertinggi yaitu BPPT CC 2 sebesar 0,1780 U/ml. terdapat 3 isolat yang menunjukkan aktivitas kitinase lebih tinggi dibandingkan dengan isolat lainnya yaitu BPPT CC 1, BPPT CC 2 dan BPPT CC 3, dengan aktivitas 0,1350U/ml ; 0,1780 U/ml ; dan 0,1292 U/ml.

Organisme yang berbeda akan membedakan sistem regulasi dalam sintesis enzim didalamnya. Kompleksitas dari mekanisme tersebut berbeda dari yang paling sederhana, sistem induksi dan represi yang mudah dimengerti sampai yang melibatkan



Gambar 1. Zona bening yang dihasilkan isolat uji pada media produksi padat yang mengandung koloidal kitin 3%

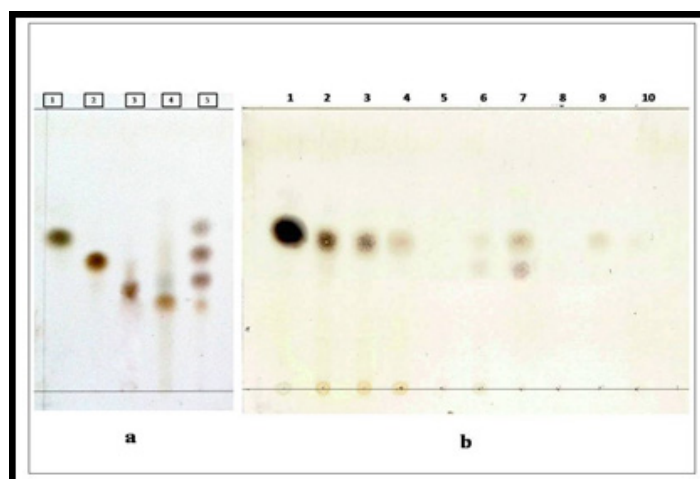
mekanisme yang kompleks. Kompleksitas inilah yang harus dimengerti ketika ingin meningkatkan kemampuan suatu strain untuk produksi enzim tertentu. Cara yang dapat ditempuh ada dua, yang pertama adalah meningkatkan karakteristik struktural atau elemen-elemen yang mempengaruhi sintesis didalam selnya atau yang kedua dengan menyesuaikan kondisi fermentasi (substrat, pH, atau suhu fermentasi) (Illanes, 2008).

BPPT CC 1, 2 dan 3 menunjukkan karakteristik yang baik untuk produksi kitinase dengan aktivitas yang lebih tinggi dibanding isolat lainnya. Tingginya aktivitas belum tentu membuktikan bahwa kitinase tersebut mampu menghidrolisis kitin dan memproduksi NAG sebagai produk utama dan dengan rendemen yang tinggi. Untuk itu perlu dilakukan percobaan selanjutnya yaitu hidrolisis menggunakan kitinase dengan

jumlah yang sebanding antara enzim dan substrat lalu dibandingkan rendemen NAG yang terbentuk

Perbandingan Rendemen NAG

Produk hasil hidrolisis diidentifikasi menggunakan KLT dan konsentrasinya dihitung menggunakan KCKT. Sebagai pembanding, pada Gambar 2 disajikan kromatogram KLT dari baku pembanding NAG dengan Rf 0,56; kitobiosa dengan Rf 0,48; kitotriosa dengan Rf 0,37; dan glukosamin HCl dengan nilai Rf 0,32. Masing-masing bercak baku pembanding dapat terpisah dengan baik menggunakan kondisi analisis terpilih. Kromatogram KLT menunjukkan perbedaan yang signifikan antar isolat dalam memproduksi NAG. Bercak yang dihasilkan BPPT CC 2 dan 3 lebih pekat dibandingkan bercak dari sampel isolat lainnya. Bercak

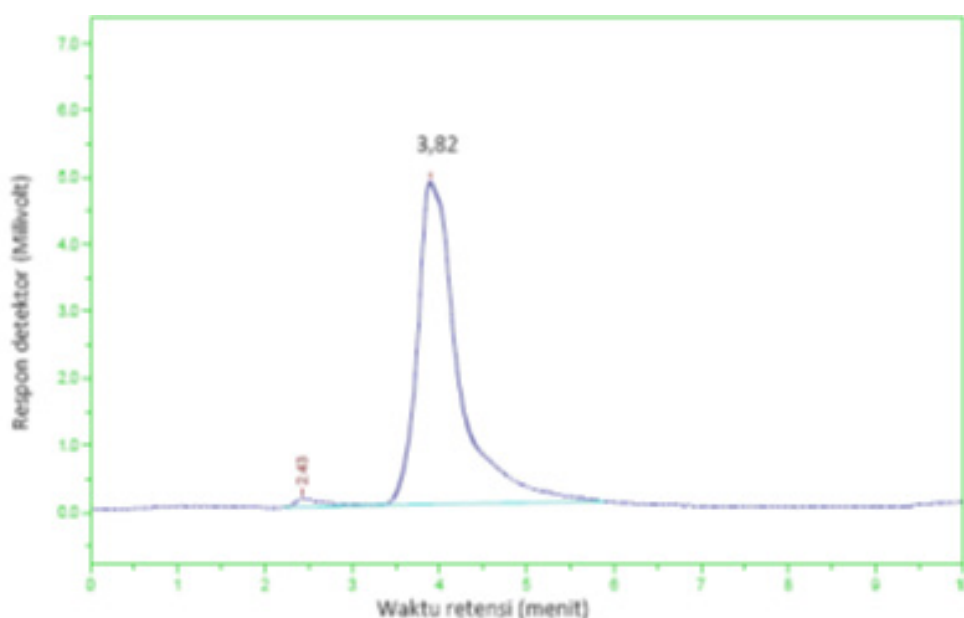


Gambar 2. (a) kromatogram KLT baku pembanding (1) N-asetilglukosamin, (2) Kitobiosa (3) Kitotriosa (4) Glukosamin HCl (5) Gabungan nomor 1-4 ; (b) Kromatogram produk hidrolisis kitinase masing-masing isolat uji (1) N-asetilglukosamin (2) BPPT CC 1 (3) BPPT CC 2 (4) BPPT CC 3 (5) BPPT CC 4 (6) BPPT CC 5 (7) BPPT CC 6 (8) BPPT CC 7 (9) BPPT CC 8 (10) BPPT CC 9

dari BPPT CC 1, BPPT CC 2, dan BPPT CC 3 menunjukkan bercak tunggal pada Rf yang sama dengan baku N-asetil glukosamin. Sedangkan pada BPPT CC 5 dan 6 terdapat dua bercak. Secara kualitatif dapat dilihat bahwa kitinase dari BPPT CC 1, BPPT CC 2, BPPT CC 3, dan BPPT CC 8 menghasilkan NAG sebagai produk tunggal. Kitinase dari BPPT CC 5 dan 6 menghasilkan produk NAG dan kitobiosa. Sedangkan kitinase BPPT CC 4, 7 dan 9 tidak menghasilkan NAG sama sekali atau dalam jumlah yang terlalu kecil sehingga tidak terdeteksi oleh metode ini

Dari hasil KCKT, kromatogram baku pembanding NAG menghasilkan puncak yang sempit pada waktu retensi disekitar 3,80 (Gambar 3). Pengujian pada hasil hisrolisis masing-masing isolat menunjukkan

hasil yang berbeda signifikan. Gambar 4 menunjukkan kromatogram yang dihasilkan dari isolat BPPT CC 2 dimana hanya terdapat satu puncak di waktu retensi 3,81. Berbeda dengan yang ditunjukkan pada Gambar 5 dimana BPPT CC 6 menghasilkan kromatogram dengan puncak lebih dari satu. Rendemen NAG yang dihasilkan oleh masing-masing kitinase dapat dilihat di Tabel 1. Rendemen NAG tertinggi dihasilkan oleh BPPT CC 2 dengan jumlah 11,5%. Dua isolat lainnya yang menghasilkan rendemen yang mendekati adalah BPPT CC 1 dan BPPT CC 3 yaitu dengan jumlah 11,34% dan 11,30%. Ketiganya menghasilkan kromatogram yang baik dengan puncak tunggal dan sempit pada waktu retensi di sekitar 3,8 menit yang menunjukkan puncak dari NAG.

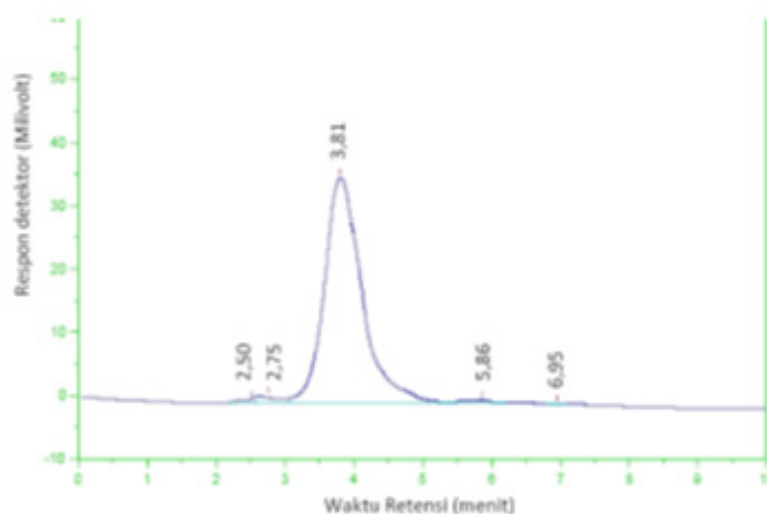


Gambar 3. Kromatogram Baku pembanding NAG 102 µg/mL dalam pelarut air

BPPT CC 4, 5 dan 7 tidak menunjukkan puncak sama sekali di waktu retensi 3,8 menit, maka tidak dapat dihitung konsentrasi NAGnya. Hal ini sebenarnya sudah terlihat dari hasil KLT yang sama sekali tidak menunjukkan adanya bercak. Tiga isolat lainnya yaitu BPPT CC 6, 8 dan 9 hanya menunjukkan rendemen NAG yang kecil yaitu 2,36%; 3,67%; dan 6,77% serta adanya puncak-puncak lain yang menandakan bahwa NAG bukan merupakan produk utama.

Kitinase dapat dikelompokkan menjadi dua jenis yaitu endokitinase dan eksokitinase. Seperti yang telah dijelaskan dalam tinjauan pustaka, kedua jenis enzim ini ada dalam setiap kitinase kasar dengan perbandingan yang bervariasi. Kedua jenis kitinase tersebut mempunyai karakteristik masing-masing, yang menyebabkan perbedaan aktivitas pemotongannya. Endokitinase akan memotong kitin menjadi oligomer pendek NAG seperti kitotriosa, kitotetraosa

dan diasetilkitobiosa. Eksokitinase, terdiri dari diasetilkitobiosidase, yang mengkatalisis pelepasan diasetilkitobiosa, dan N-asetilglukaminidase yang memotong produk oligomerik endokitinase dan diasetilkitobiosidase menghasilkan monomer NAG (Dahiya *et al.*, 2006). Pada kitinase yang dihasilkan BPPT CC 1, 2, dan 3 menghasilkan hanya NAG sebagai produknya, maka dapat dikatakan bahwa N-asetilglukaminidase didalamnya berada dalam jumlah yang lebih dominan dibanding endokitinasesnya. Berbeda dengan kitinase yang dihasilkan BPPT CC 6,8, dan 9 dimana NAG yang dihasilkan lebih sedikit dan adanya produk oligomer yang lain, menandakan endokitinase dan eksokitinasesnya berada dalam perbandingan yang sama atau bahkan eksokitinasesnya kurang aktif atau berada dalam jumlah lebih rendah daripada endokitinasesnya. Penelitian serupa yang pernah dipublikasikan oleh Sashiwa, *et al.* (2002) berhasil memproduksi NAG secara



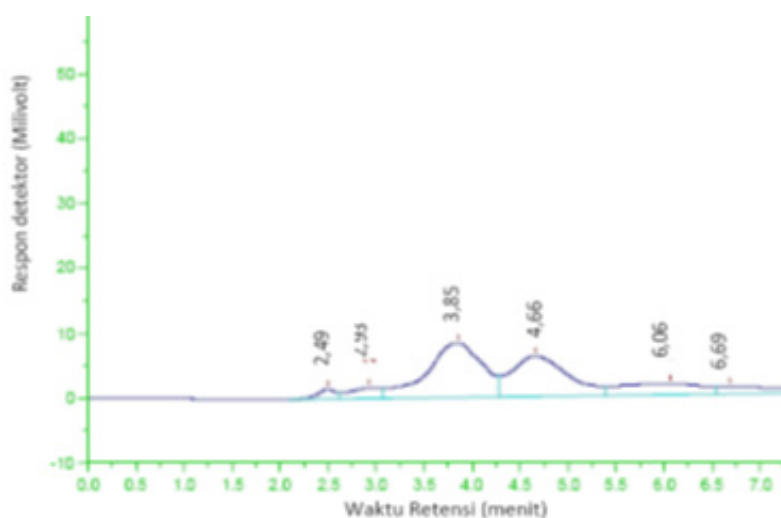
Gambar 4. Kromatogram NAG hasil hidrolisis substrat koloidal kitin menggunakan kitinase BPPT CC 2

efetif dengan rendemen 77% dalam 10 hari dari α -kitin menggunakan enzim kasar isolasi dari *Aeromonas hydrophilla* H2330. Hasil yang berbeda dilaporkan oleh Pichyangkura, *et al.* (2002) dimana *Bacilluslicheniformis* SK-1 digunakan untuk medegradasi α -kitin dan menghasilkan kitobiose lebih banyak dibandingkan NAG.

Alasan dipilihnya isolat BPPT CC 2 karena pada percobaan awal, bakteri ini mampu memproduksi kitinase dengan aktivitas yang tinggi serta menghasilkan NAG sebagai produk utama hasil hidrolisisnya dengan rendemen yang baik. Dalam beberapa kali percobaan produksi, BPPT CC 2 mampu memproduksi kitinase dengan aktivitas yang lebih stabil daripada BPPT CC 1. Hal ini menjadikan BPPT CC 2 menjadi isolat terpilih untuk percobaan selanjutnya.

KESIMPULAN

Dari 9 isolat yang diskroning diperoleh kesimpulan bahwa isolat BPPT CC 2 menunjukkan aktivitas kitinase terbaik dibandingkan dengan isolat lainnya. Isolat BPPTCC2 juga terbukti dapat mendegradasi substrat kitin menjadi NAG sebagai produk tunggal. Rendemen NAG yang dihasilkan yaitu sebesar 11,5%. Hasil ini lebih baik dari rendemen NAG yang dihasilkan isolat lainnya. Namun demikian, rendemen yang dihasilkan ini bukanlah hasil yang optimal karena belum dilakukan optimasi terhadap metode produksi NAG dari kitinase BPPTCC2. Hal ini membuka peluang untuk penelitian selanjutnya agar didapatkan metode yang dapat memproduksi NAG dengan hasil yang optimal.



Gambar 5. Kromatogram NAG hasil hidrolisis substrat koloidal kitin menggunakan kitinase BPPT CC 6

SARAN

Dilakukan penelitian selanjutnya yang bertujuan untuk meningkatkan rendemen NAG dengan cara optimasi produksi kitinase dari BPPT CC 2 dan juga optimasi kondisi hidrolisis substrat kitin menggunakan kitinase tersebut.

DAFTAR ACUAN

- Abd-Aziz S., Teoh, L.S., Alitheen, N., Shahab, N., Kamaruddin, K. (2008). Microbial degradation of chitin materials by *Trichoderma virens* UKM1. *International Journal of Biological Sciences*, (8)1, 52-59
- Aiba Seiichi. (2005). Production of N-acetyl-D-glucosamine from chitin using crude enzyme preparation in large scale. *Journal of Metal, Material and Minerals*, 15(1), 23-25
- Bissett, D., Robinson, L.R., Raleigh, P.S., Miyamoto, K., Hakozaki, T., Li, J., Klem, G.R. (2007). Reduction in the appearance of facial hyperpigmentation by topical *n*-acetyl glucosamine. *Journal of Cosmetic Dermatology*, 6, 20–26
- Chang, K.L., Lee, J., Wen, F.R. (2000). HPLC analysis of *n*-acetyl-chito-oligosaccharides during the acid hydrolysis of chitin. *Journal of Food and Drug Analysis*, 8(2), 75-83
- Chen, J.K., Shen, C.R., Liu, C.L. (2010). N-acetylglucosamine: Production and applications. *Journal of Marine Drugs*, 8, 2493-2516
- Dahiya, N., Tewari, R., Hoondal, G.S. (2006). Biotechnological aspect of chitinolytic enzymes: a review. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 71,773-782
- Haliza, W., Suhartono, M.T. (2012). Karakteristik kitinase dari mikroba. *Buletin Teknologi Pascapanen Pertanian*, 8(1)
- Hamid, R., Khan, M.A., Ahmad, M., Ahmad, M.M., Musarrat, J., Javed, S. (2014). Chitinases: An Update. *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences*, 5(1), 21-29
- Herdyastuti, N., Raharjo, T.J., Mudasir., Matsjeh, S. (2009). Kitinase dan mikroorganisme kitinolitik : isolasi, karakterisasi dan manfaatnya. *Indonesian Journal of Chemistry*, 9(1), 37 – 47
- Illanes, A. (2008). Enzyme Biocatalysis. Principles and Application. Springer. Chile
- Jamialahmadi, K., Bahravan, J., Najafi, F.M., Yazdi, T.M., Shahverdi, A.R., Fahramarezi, A.M. (2011). Enzymatic production of N-acetyl-D-Glucosamine from chitin using crude enzyme preparation of *Aeromonas* sp PTCC16491. *Biotechnology*, 10(3), 292-297
- Kuk, J.H., Jung, W.J., Jo, G.H., Ahn, J.S., Kim, K.Y., Park, R.D. (2004). Selective preparation of N-acetyl-D-glucosamine and N,N'-diacetylchitobiose from chitin using a crude enzyme preparation from *Aeromonas* sp. *Biotechnology letters*, 27, 7-11

- Melent'ev, A.I., Aktuganov, G.E., Galimzyanova, N.F. (2001). The role of chitinase in the antifungal activity of *Bacillus* sp. 739. *Microbiology* 70(5), 548-552
- Nagpure, A., Choudhary, B., Gupta, R.K. (2014). Chitinases: in agriculture and human healthcare. *Critical Reviews in Biotechnology*, 3(3), 215-232
- Park, S.H., Lee, J.H., Lee, H.K. (2000). Purification and characterization of chitinase from a marine bacterium *Vibrio* sp. 98CJ11027. *The Journal of Microbiology*, 224-229
- Pichyangkura, R., Kudan, S., Kuttiyawang, K., Sukwattanasinitt, M., Aiba, S. (2002). Quantitative Production of 2-Acetoamido-2-D-glucose from Crystalline Chitin by Bacterial Chitinase. *Carbohydrate Research*, 337, 557-559
- Pratiwi, R.S., Susanto, T.E., Wardani, Y.A.K., Sutrisno, A. (2014). Enzim kitinase dan aplikasi di bidang industri. *Jurnal Pangan dan Agroindustri*, 3(3), 878-887
- Sashiwa, H., Fujishima, S., Yamano, N., Kawasaki, N., Nakayama, A., Muraki, E., *et al.* (2002) Production of N-Acetyl-D-glucosamine from α -Chitin by Crude Enzymes from *Aeromonas hydrophila* H2330. *Carbohydrate Research*, 337, 761-763
- Sashiwa, H., Fujishima, S., Yamano, N., Kawasaki, N., Nakayama, A., Muraki, E. (2003). Enzymatic production of N-Acetyl-D-glucosamine from chitin. Degradation study of N-Acetylchitooligosaccharide and the effect of mixing of crude enzymes. *Carbohydrate Polymers*, 51, 391-395
- Setia, IN., Suharjo. (2015). Chitinolytic assay and identification of bacteria isolated from shrimp waste based on 16S rDNA Sequences. *Advances in Microbiology*, 5, 541-548
- Wang, S.L., Lin, T.Y., Yen, Y.H., Liao, H.F., Chen, Y.J. (2006). Bioconversion of shellfish chitin wastes for the production of *Bacillus subtilis* W-118 chitinase. *Carbohydrate Research*, 341, 2507-2515
- Wen, C.M., Tseng, C.S., Cheng, C.Y, Li, Y.K. (2002). Purification, characterization and cloning of a chitinase from *Bacillus* sp. NCTU2. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 35, 213-219