

ENZIM EKSTRASELULER KITINASE DARIBurkholderia pseudomallei YANG DIISOLASI DARI LUMPUR SAWAH**Nuniek Herdyastuti^{1*}, Tri Joko Raharjo², Mudasir², & Sabirin Matsjeh²**¹ Department of Chemistry, Surabaya State University,
Jl. Ketintang Surabaya 60231² Department of Chemistry, Gadjah Mada University,
Sekip Utara Yogyakarta, 55281* E-mail : nherdyastuti@yahoo.com**ABSTRACT**

Chitinase was produced from bacteria has been isolated and screened from field mud in Ketintang area Surabaya. Based on morphology and physiology identification gram negative bacteria was *Burkholderia pseudomallei*. After growth in medium containing 0,4% colloidal chitin at temperature 29°C with 45 hour incubation was produced crude extract chitinase. Partial purification enzyme with 50% ammonium sulphate. Chitinase was optimally active at pH of 5.0 and at 35°C. The enzyme was stable from pH 2 to 8 and up to 30°C.

Key words : *B.pseudomallei*, chitinase, colloidal chitin

PENDAHULUAN

Kitin adalah senyawa polimer dari β -(1,4)-N-Asetil glukosamin, polisakarida alam yang melimpah menempati urutan kedua setelah selulosa, pertama kali diidentifikasi pada 1884, mudah diperoleh, dan banyak sekali manfaatnya [Rinaudo M., 2006]. Kitin banyak digunakan sebagai substrat pada media fermentasi enzim kitinase, karena aktivitas kitinolitik diinduksi dalam media pertumbuhan strain dengan adanya kitin sebagai sumber karbon [Chernin et al, 1998].

Kitinase (EC.3.2.1.14) adalah kelompok enzim yang mampu mendegradasi kitin secara langsung dengan menghasilkan produk yang mempunyai berat molekul rendah. Kitinase banyak ditemukan secara luas pada organisme yang berbeda termasuk jamur, bakteri dan tumbuhan [Huang and Chen, 2004 ; Yong Tao et al, 2005]. Kitinase banyak dimanfaatkan sebagai agen biokontrol terutama bagi tanaman yang terserang infeksi jamur. Hal ini dikarenakan kitin yang merupakan

komponen utama dinding sel jamur dapat didegradasi enzim kitinase menghasilkan produk yang ramah lingkungan dibandingkan penggunaan zat kimia. Dalam dua dekade terakhir banyak dikaji peran enzim kitinase sebagai antifungi. Sebagai contoh *Trichoderma* banyak digunakan sebagai antifungi yang efektif terhadap serangan *Rhizoctonia solani* pada tanaman kapas atau *Fusarium* pada tanaman strawberi, dan tidak toksik terhadap tanaman pada konsentrasi tinggi [Wang,2003].

BAHAN DAN CARA KERJA

Bahan-bahan yang digunakan adalah : Koloidal kitin, *bacto-tripton* (Difco), *yeast extract* (Difco), Bahan kimia dengan kemurnian p.a : NaCl, K_2HPO_4 , KH_2PO_4 , $MgSO_4 \cdot 5H_2O$, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, $MnCl_2$, N-asetilglukosamin (SIGMA), 3,5-asam dinitrosalisilat (SIGMA). Peralatan yang digunakan adalah : Spektrofotometer UV-Vis (UV-1700, Shimadzu), sentrifuse, *autoclave*, *shaker*, *waterbath* dan peralatan gelas yang umum digunakan.

Produksi Enzim Kitinase. Enzim kitinase diproduksi dari bakteri *B.pseudomallei* yang telah diisolasi dari Lumpur sawah. Sel dibiakkan dalam media LB cair selama 20 jam dengan pengocokan 150 rpm. Biakan diambil 10% dan dimasukkan dalam media produksi yang mengandung 0,4% koloidal kitin, 0,7% K_2HPO_4 , 0,3% KH_2PO_4 , 0,5% $MgSO_4 \cdot 5H_2O$, 0,01% $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,001% $MnCl_2$ dan 0,5% peptone kemudian diinkubasi 45 jam dengan pengocokan 150 rpm. Sel bakteri dipisahkan dari media dengan cara sentrifugasi 4000 rpm selama 20 menit. Supernatan yang diperoleh diendapkan dengan amonium sulfat 50% pada suhu 4°C. Endapan diperoleh dengan cara sentrifugasi 4000 rpm selama 30 menit pada suhu 4°C dan pelet diendapkan dalam larutan buffer fosfat 0,1M pH 7. Larutan kemudian didialisis 1 malam dalam larutan buffer yang sama.

Penentuan Aktivitas Enzim Kitinase. Aktivitas enzim ditentukan berdasarkan N-asetilglukosamin yang dilepaskan dan diukur secara kolorimetri [Monreal and Reese, 1969]. 2 mL larutan kitin 1,25% (b/v) dilarutkan dalam 200 mM buffer kalium fosfat dan ditambahkan 0,5 mL

larutan enzim. Campuran diinkubasi selama 2 jam pada suhu kamar kemudian tabung ditempatkan ke dalam air mendidih selama 5 menit dan dinginkan pada suhu kamar. Suspensi disentrifugasi selama 10 menit pada kecepatan 4000 rpm kemudian 1,5 mL supernatan dipindahkan dan disentrifugasi kembali 10 menit pada kecepatan 10000 rpm. Sebanyak 1 mL supernatan pada tabung sampel ditambahkan 2 mL air deionisasi dan 1,5 mL reagen pewarna yang mengandung 5,3 M larutan Natrium kalium tartrat dan Asam 3,5 Dinitrosalisilat 96 mM. Campuran dipanaskan dalam air mendidih selama 5 menit setelah dingin diukur serapannya dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 540 nm. 1 unit aktivitas enzim setara dengan 1 μ mol N-Asetilglukosamin yang dihasilkan selama 1 jam.

Penentuan Kadar Protein. Kadar protein ditentukan dengan menggunakan metode Bradford dan sebagai standart digunakan *Bovine serum albumin* [Bradford, 1976].

Pengaruh Suhu Terhadap Aktivitas dan Stabilitas. Penentuan suhu optimum dilakukan dengan cara menginkubasi campuran reaksi pada beberapa suhu yang berbeda untuk menguji aktivitas enzim. Stabilitas termal dilakukan menentukan larutan enzim dalam buffer sitrat fosfat pH 5 pada beberapa suhu yang berbeda selama 30 menit. Aktivitas residu enzim ditentukan pada kondisi standart dengan menggunakan koloidal kitin sebagai substrat.

Penentuan pH Optimum. Penentuan pH optimum untuk aktivitas kitinase dilakukan pada beberapa harga pH yang berbeda dengan menggunakan koloidal kitin sebagai substrat diinkubasi pada suhu 35°C selama 2 jam. Larutan buffer yang digunakan adalah : glisin-HCl (pH 2), sitrat-fosfat 0,1M (pH 3-6), fosfat (pH 7-8) dan Tris-HCl (pH 9). Stabilitas pH enzim dievaluasi dengan inkubasi larutan enzim pada beberapa pH pada suhu yang sama. Aktivitas residu enzim ditentukan pada kondisi uji aktivitas standart.

HASIL DAN PEMBAHASAN

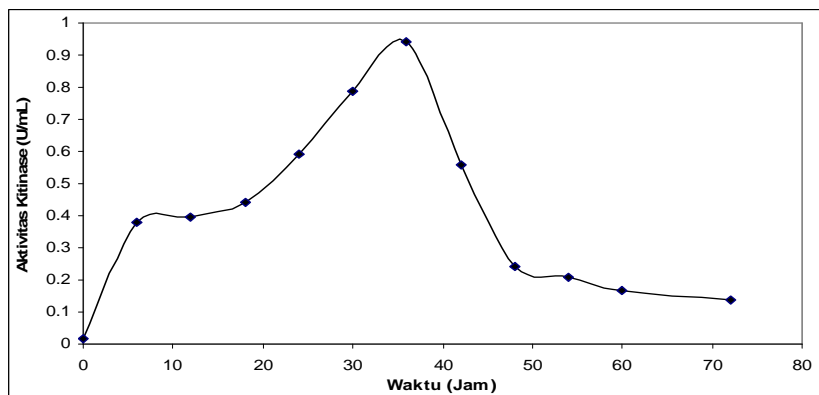
Mikroorganisme yang telah diisolasi dari lumpur sawah di sekitar kampus Universitas Negeri Surabaya pada media screening yang

mengandung 0,4% koloidal kitin menunjukkan aktivitas kitinase setelah inkubasi selama 45 jam. Hasil uji morfologi dan fisiologi salah satu isolat yang menunjukkan aktivitas kitinase ditunjukkan pada tabel 1. Berdasarkan Bergey's Manual of Systematic Bacteriology menunjukkan bahwa bakteri kitinolitik merupakan *B.pseudomallei* dengan *percent probability* 99,9% (Herdyastuti, 2008).

Kitinase yang diproduksi pada media mengandung 0,4% koloidal kitin menunjukkan aktivitas yang signifikan setelah inkubasi 20 jam dan menunjukkan aktivitas tertinggi pada saat inkubasi 40 jam seperti pada gambar 1.

Tabel 1. Karakteristik Morfologi dan Fisiologi mikroorganisme kitinolitik yang diisolasi dari lumpur sawah

Karakteristik	Hasil
Karakteristik Morfologi	
Bentuk	Batang – kokoid, 3-5 mm
Pewarnaan gram	Negatif
Pembentukan spora	Negatif
Motilitas	Positif
Karakteristik Fisiologi	
Lisin dekarboksilase	Positif
Arginin dihidrolase	Positif
Ornitin dekarboksilase	Positif
Triptofan deaminase	Negatif
Voges proskauer test	Positif
Gelatin liquefaction	Negatif
Hidrolisis Esculin	Negatif
Hidrolisis Urea	Positif
Pembentukan Indol	Negatif
Produksi H ₂ S	Negatif
Penggunaan Sitrat	Positif
Inhibisi Malonat	Positif
Asam dari :	
Glukosa	Positif
Sorbitol	Positif
Laktosa	Negatif
Raffinosa	Positif
Manitol	Positif
Rhamnosa	Negatif
Arabinosa	Positif
Salisin	Positif
Xilosa	Positif
Inositol	Positif
Sukrosa	Positif
Adonitol	Negatif



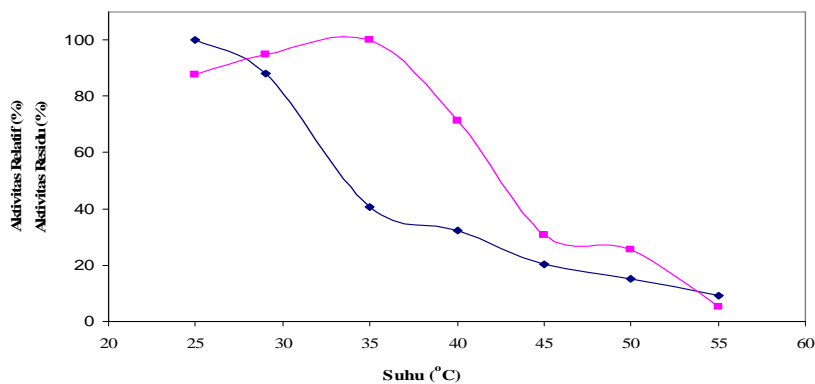
Gambar 1. Kurva aktivitas *B.pseudomallei* menunjukkan bahwa aktivitas kitinase dicapai saat inkubasi sekitar 40 jam

Enzim kitinase yang diproduksi ekstraseluler selanjutnya diendapkan dengan amonium sulfat 50% yang dilanjutkan dengan proses dialisis selama satu malam pada suhu 4°C. Pada tabel 2 menunjukkan hasil perhitungan aktivitas dan kemurnian yang diperoleh setelah ekstrak kasar enzim dimurnikan parsial. Enzim kitinase yang telah difraksinasi dengan amonium sulfat menunjukkan tingkat kemurnian 1,31 kali dibandingkan ekstrak kasarnya.

Tabel 2. Pemurnian Parsial Kitinase dari *Burkholderia pseudomallei*

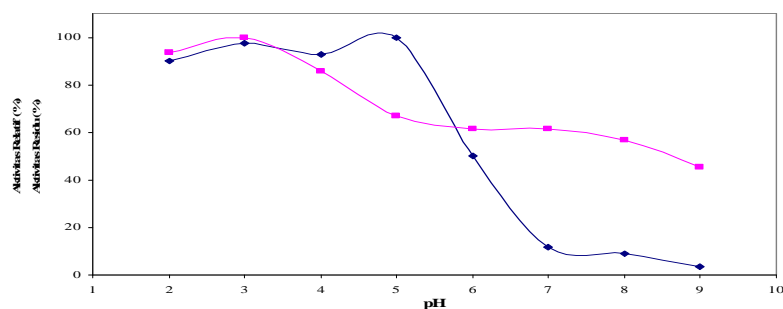
Tahap	Total Protein (mg)	Total Aktivitas (U)	Aktivitas Spesifik (U/mg)	Pemurnian (kali)	Hasil (% total aktivitas)
Ekstrak kasar	9,184	53,46	5,74	1	100
(NH ₄) ₂ SO ₄	2,185	16,46	7,53	1,31	30,79

Pengaruh suhu terhadap aktivitas kitinase dari *B.pseudomallei* ditunjukkan pada gambar 2. Aktivitas kitinase mengalami kenaikan pada suhu 25°C dan diperoleh suhu optimum pada 35°C. Aktivitas enzim mulai mengalami penurunan setelah melewati suhu 40°C dan terlihat kehilangan aktivitas pada suhu 55°C. Saat enzim disimpan pada beberapa variasi suhu selama 30 menit dalam bufer sitrat fosfat pH 5 menunjukkan hasil yang signifikan bahwa enzim kehilangan aktivitas pada suhu 55°C.



Gambar 2. Suhu optimum (◆) dan stabilitas termal (■) enzim kitinase yang diisolasi dari *B.pseudomallei*

Penentuan pH optimum dan stabilitas pH telah dilakukan seperti tampak pada gambar 3. Pengaruh pH terhadap aktivitas enzim kitinase ditentukan pada berbagai variasi pH (2 sampai 9) dengan menggunakan larutan bufer yang berbeda. Pengaruh denaturasi pH terhadap protein kitinase diamati dengan menginkubasi enzim selama 120 menit pada berbagai nilai pH pada suhu 35°C. Enzim mengalami kenaikan pada sekitar pH asam yaitu antara 2 sampai 5 dan menunjukkan pH optimum pada pH 5. Enzim menunjukkan aktivitas yang relatif stabil pada pH 2 sampai 8 saat disimpan pada suhu 4°C selama 1 jam dimana aktivitas enzim bisa dijaga sampai 50%. Beberapa penelitian tentang kitinase yang memberikan pH optimum pada sekitar pH asam adalah *Streptomyces sp.* M-20 [Kim, 2003], *Trichoderma viride* [Omumashaba, 2001], *Bacillus sp.* [Woo, 2003].



Gambar 3. pH optimum (◆) dan stabilitas pH (■) enzim kitinase yang diisolasi dari *B.pseudomallei*

DAFTAR PUSTAKA

- Bradford M.M., 1976, *A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of microgram quantities of Protein utilizing the principle of protein-dye binding*, Anal. Biochem., 72 : 248-254
- Chernin, L.S, Winson, M.K, Thompson, J.M, 1998, *Chitinolytic Activity in Chromobacterium violaceum : Substrat analysis and regulation by quorum sensing*, Journal of Bacteriology, Vol. 180 (17).
- Han B.K., Moon J.K., Ryu Y.W., Park Y.H. and Jo D.H., *Purification and Characterization of Acidic Chitinase from Gizzard of Broiler (Gallus gallus L.)*, 2000, J.of Biochemistry and Molecular Biology, 33(4) : 326-331
- Herdyastuti,N., Raharjo T.J., Cahyaningrum S.E., 2008, *Eksplorasi Bakteri Penghasil Kitinase Dari Lumpur Pertanian dan Keragaman Gen Penyandi Bakteri Kitinolitik Sebagai Agen Biokontrol*, Hibah Bersaing PT XVI
- Huang,J.H and Chen J.J., 2005, *Production of Chitinolytic Enzymes from a Novel Species of Aeromonas*, Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology
- Omumashaba,C.A., Yoshida,N. and Ogawa,K., 2001, *Purification and Characterization of a Chitinase from Trichoderma viride*, J.Gen.Appl.Microbiol., 47 : 53-61.
- Rinaudo M., 2006, *Chitin and Chitosan : Properties and Application*, Prog.Polym. Sci. 31 : 603-632
- Wang,Y., A.P. Kausch, J.M. Chandlee, H. Luo and B.A. Ruemmele 2003, *Co-transfer and expression of chitinase, glucanase and bar genes in creeping bentgrass for conferring fungal disease resistance*, Plant Sci., 165 : 497-506
- Woo C.D. and Park H.D., 2003, *An Extrasellular Bacillus sp. Chitinase for the production of chitotriose as a major chitinolytic product*, Biotechnology Letters, 25 : 409-412.
- Yong Tao, Hong Jin, Zhangfu, Li Zhang, Xiuqiong, Ke Tao, Shaorong, Shigui, 2005, *Purification and Characterization of an Extraselluler Chitinase Produced by Bacterium C4*, Anall of Microbiology, 55 (3) : 213-218