

1	0	0	g	0	r	1	1	0	1	0	4	0	0	0	7	0
Prodi	Publikasi	Pemula	Tahun	Candi	Daerah	Modul										

KARAKTERISASI PARSIAL KITOSANASE DARI ISOLAT BAKTERI LUMPUR RAWA INDRALAYA SUMATERA SELATAN

Ace Baehaki, Herpandi
 Program Studi Teknologi Hasil Perikanan, Fakultas Pertanian
 Universitas Sriwijaya

Abstrak

Tujuan penelitian ini adalah untuk melakukan karakterisasi secara parsial kitosanase dari bakteri lumpur rawa di Indralaya. Tiga isolat (L1S1, L1S2 dan L2S1) memiliki indeks kitinolitik yang tinggi. L2S1 selanjutnya dipilih untuk dikarakterisasi karena memiliki indeks kitinolitik yang paling tinggi. Produksi optimum kitosanase isolat L2S1 adalah 3 hari. pH dan suhu optimum kitosanase isolat L2S1 adalah pada pH 8 dan suhu 50 °C. Pengaruh ion logam (NaCl, KCl, CaCl₂ dan FeCl₂) menunjukkan semua ion logam dapat menghambat kitosanase isolat L2S1. Hasil analisis SDS-PAGE menunjukkan kitosanase isolat bakteri L2S1 memiliki 10 pita protein dengan berat molekul 21-78 kD.

Kata kunci: kitosanase, bakteri, karakterisasi, lumpur rawa

PENDAHULUAN

Kitosanase (EC 3.2.1.132) merupakan enzim yang menghidrolisis ikatan glikosidik kitosan. Reaksi ini akan menghasilkan turunan kitosan (oligomer kitosan). Kitosan [β -(1-4)-N-glukosamin] merupakan turunan dari kitin yang diperoleh melalui deasetilasi sempurna atau sebagian. Menurut Fukumizo dan Brzezinski (1997), kitosanase adalah enzim yang menghidrolisis kitosan yang memotong ikatan β -1,4-glikosidik kecuali ikatan GlcNAc-GlcNAc.

Kitosanase dapat diperoleh dari tanaman, bakteri dan fungi. Penelitian bakteri penghasil kitosanase sudah banyak dilakukan yaitu bakteri *Bacillus* sp.PI-7S (Seino *et al.* 1991), *Pseudomonas* sp. H-14 (Yoshihara *et al.* 1992), *Enterobacter* G-1 (Yamasaki *et al.* 1993), *Amycolatopsis* sp. CsO-2 (Okajima *et al.* 1994), *Acinetobacter* sp. strain CHB101 (Shimosaka *et al.* 1995), *Streptomyces* N174 (Somashhekar dan Joseph 1996), *Myxobacter* sp.AL-1 (Reyes dan Corona 1997), *Matsuebacter chitosanotabidus* 3001 (Park *et al.* 1999), *Burkholderia gladioli* strain CHB101 (Shimosaka *et al.* 2000), *Bacillus cereus* S1 (Kurakake *et al.* 2000) dan *Bacillus* sp. CK4 (Yoon *et al.* 2001). Kitosanase dari fungi adalah *Fusarium solani* f. sp. phaseoli (Shimosaka *et al.* 1993) dan *Aspergillus* Y2K (Cheng dan Li 2000). Kitosanase dari tanaman dapat diperoleh dari *Cucumis sativus*, *Citrus sinensis* dan Barley (Somashaker dan Joseph 1996).

METODE PENELITIAN

Eksplorasi dan Isolasi Bakteri Rawa Penghasil Kitosanase

Isolasi bakteri rawa adalah dengan mengambil sampel lumpur dari daerah Indralaya, sampel yang diperoleh akan dilakukan pengenceran dari 10⁻¹ sampai 10⁻⁷.

sampel diambil sebanyak 1 ml dimasukkan ke media pengayaan (*lauria broth*) 5 ml, lalu diinkubasi selama 24 jam pada inkubator dengan suhu 37°C. Sampel yang telah diinkubasi tersebut diambil sebanyak 0,5 ml untuk kemudian di spread ke media *lauria* agar yang telah ditambahkan koloidal kitin 0,5% yang selanjutnya dinamakan *lauria* agar modifikasi, setelah itu diinkubasi kembali dalam inkubator pada suhu 37 °C. Koloni yang memiliki halo yang tumbuh pada media *lauria* agar modifikasi untuk selanjutnya diberi nomor dan diisolasi zig-zag ke media *lauria* agar modifikasi dan diinkubasi pada suhu yang sama, hal ini bertujuan untuk memisahkan koloni-koloni bakteri. Isolat-isolat yang diperoleh ditumbuhkan secara serentak dengan cara ditotolkan pada media *lauria* agar modifikasi. Setelah diinkubasi selama satu minggu pada suhu 37 °C ditentukan indeks kitinolitik yang merupakan nilai perbandingan diameter daerah bening (halo) dengan diameter koloni.

Penentuan Waktu Optimum Produksi Kitosanase

Produksi enzim kitosanase diawali dengan pembuatan starter dalam medium yang mengandung: 0,5% koloidal kitosan, 0,1% K_2HPO_4 , 0,01% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,05% yeast extract, 0,1% NaCl, 0,7% $(NH_4)_2SO_4$. Kultur biakan sebanyak satu sampai dua loop diinokulasikan dalam 200 ml medium starter. Setelah diinkubasi selama 24 jam dalam *shaking water bath* (37 °C, 100 rpm), OD_{600} mencapai 0,303 dengan jumlah sel sekitar 10^6 sel/ml, starter dipindahkan ke dalam 1 liter medium produksi sebanyak 5% (v/v) dan diinkubasi selama 48 jam dalam fermentor dengan suhu 37 °C dan kecepatan 126 rpm yang setiap 6 jam dianalisa aktivitasnya untuk menentukan waktu produksi optimal. Setelah mendapatkan waktu optimal yang ditandai dengan aktivitas kitosanase yang tertinggi selanjutnya digunakan untuk memproduksi kitosanase lebih lanjut. Setelah diinkubasi, kultur yang dihasilkan disentrifugasi pada 8.000 rpm (4 °C, 10 menit). Supernatan yang dihasilkan selanjutnya dianalisa aktivitas, kadar protein dan optical density (OD).

Pengukuran Aktivitas dan Kadar Protein Kitosanase

Analisis aktivitas kitosanase dengan metode Schales didasarkan pada perhitungan gula reduksi yang diproduksi selama hidrolisis kitosan dapat larut, dengan glukosamin sebagai standar (Uchida dan Ohtakara 1998). Campuran yang mengandung 100 µl kitosan dapat larut 1%, 100 µl larutan enzim dan 100 µl buffer fosfat, diinkubasi selama 30 menit pada 40 °C dan reaksi dihentikan dengan memanaskan campuran pada air mendidih selama 3 menit. Sejumlah 200 µl campuran ditambahkan 1 ml reagen schales dan 800 µl akuades. Tabung reaksi ditutup dengan aluminium foil dan dipanaskan pada air mendidih selama 15 menit. Setelah dingin, larutan disentrifuse dengan kecepatan 8.000 rpm selama 10 menit pada suhu 4 °C dan supernatan diukur absorbansinya pada panjang gelombang 420 nm. Blanko disiapkan dengan mengganti campuran enzim dengan 1 ml akuades. Satu unit

aktivitas kitosanase didefinisikan sebagai jumlah enzim yang memproduksi 1 μmol gula reduksi sebagai glukosamin per menit. Untuk kurva standar disiapkan 400 μl larutan standar glukosamin dengan berbagai konsentrasi dan diperlukan sama dengan campuran enzim.

Aktivitas kitosanase (unit/ml): - — — — —

Keterangan:

- X_s = kadar GLcN pada sampel
- X_k = kadar GLcN pada kontrol
- 100 = volume enzim (μl)
- 300 = volume reaksi enzimatik (μl)
- 200 = volume campuran (hasil reaksi enzimatik) yang digunakan untuk penentuan GLcN (μl)
- 30 = lama inkubasi (menit)
- 215,6 = berat molekul GLcN-HCl

Metode penentuan kadar protein didasarkan kemampuan protein mengikat pewarna khusus (pereaksi folin). Sejumlah 0,1 ml sampai 0,9 ml pereaksi lowry ditempatkan dalam tabung reaksi lalu divorteks. Tabung diinkubasi selama 15 menit dalam suhu ruang. Sejumlah 3 ml pereaksi folin yang telah diencerkan 10 kali ditambahkan ke dalam tabung, divorteks lalu diinkubasi selama 45 menit pada suhu ruang. Absorbansi sampel diukur pada panjang gelombang 540 nm. Nilai absorbansi sampel dibandingkan dengan kurva standar yang telah dibuat sebelumnya dengan *bovine serum albumine* (BSA) sebagai standar. Sebagai blanko digunakan akuades untuk pengganti larutan protein.

Karakterisasi Kitosanase

Untuk mengetahui karakteristik enzim kitosanase, maka dilakukan beberapa pengamatan meliputi penentuan pH optimum dengan kisaran pH 3-9, suhu optimum dengan kisaran 30- 70 $^{\circ}\text{C}$ dan pengaruh ion logam (NaCl, KCl, CaCl_2 dan FeCl_2) dengan konsentrasi 1 mM.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Eksplorasi dan Isolasi Bakteri Rawa Penghasil Kitosanase

Pada proses *screening* didapatkan 3 isolat yang memiliki indeks kitinolitik yang mempunyai nilai > 1 (Tabel 1).

Tabel 1 Hasil uji kitinolitik bakteri lumpur rawa

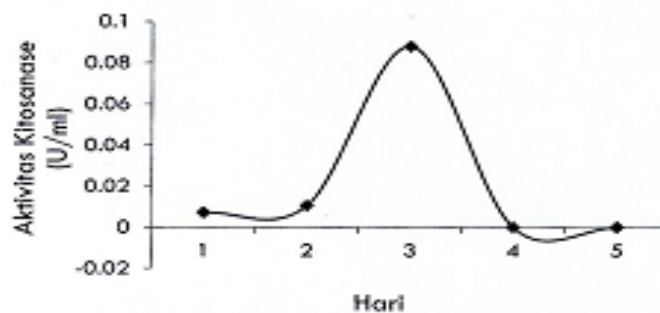
Isolat	Indeks kitinolitik
L1S1	1,1
L1S2	1,2
L2S1	1,4

Pada Tabel 1, isolat L251 memiliki indeks kitinolitik yang paling tinggi yang selanjutnya dipilih untuk dilakukan karakterisasi kitosanase.

Penentuan Waktu Optimum Produksi Kitosanase Isolat L251

Kitosanase diproduksi menggunakan media cair yang mengandung 0,5% koloidal kitosan. Produksi kitosan optimal dari isolat L251 diperoleh setelah 3 hari (Gambar 1). Penentuan aktivitas kitosanase dilakukan pada suhu 40 °C dengan metode Uchida dan Ohtakara (1998).

Waktu yang dibutuhkan untuk memproduksi kitosanase dari isolat L251 tergolong cepat dibandingkan dengan bakteri lain seperti *Matsuebacter chitosanotabidus* 3001 (Park et al. 1999) dan *Pseudomonas* sp. H-14 (Yoshihara et al. 1992) yang membutuhkan waktu kultivasi sekitar 4 hari pada suhu 28–30 °C.

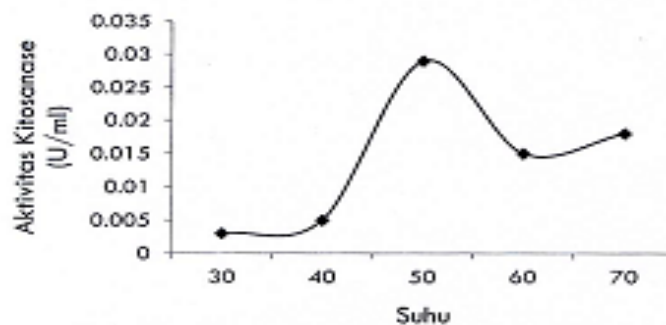


Gambar 1 Waktu produksi kitosanase isolat bakteri L251.

Karakterisasi Kitosanase Ekstrak Kasar Isolat L251

Suhu optimum

Penentuan suhu optimum pada enzim ekstrak kasar dilakukan pada berbagai suhu 30–70 °C. Setelah dianalisa aktivitas kitosanase tertinggi pada suhu 50 °C dengan aktivitas sebesar 0,029 U/ml (Gambar 2).

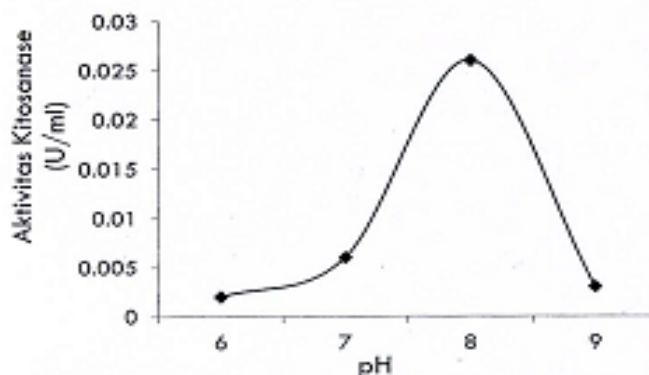


Gambar 2 Suhu optimum kitosanase isolat bakteri L251.

Kitosanase isolat bakteri L2S1 yang memiliki suhu optimum pada suhu 50 °C termasuk termostabil yang moderat. Hasil ini sama dengan kitosanase *Enterobacter* sp.G-1 (Yamasaki et al. 1993). Suhu optimum kitosanase isolat bakteri L2S1 lebih tinggi dibandingkan dengan *Pseudomonas* sp. H-14 (Yoshihara et al. 1992), *Bacillus* sp. PI-75 dan *Fusarium solani* f. sp. phaseoli (Shimosaka et al. 1993) yang memiliki suhu optimum masing-masing 30, 35 dan 40 °C, kitosanase isolat L2S1 dibandingkan dengan kitosanase bakteri *Bacillus* sp. strain CK4 (Yoon et al. 2001), *Streptomyces* sp. N174 (Somashakar dan Joseph 1996) dan *Mycobacter* sp AL-1 (Reyes dan Corona 1997) memiliki suhu optimum yang lebih rendah, ketiga kitosanase bakteri ini memiliki suhu optimum masing-masing 60, 65 dan 70 °C.

pH optimum

Kitosanase isolat L2S1 aktif pada kisaran pH yang sempit dengan pH optimum pada pH 8 (Gambar 3), aktivitas kitosanase dibawah dan diatas pH optimum memiliki aktivitas yang sangat rendah.

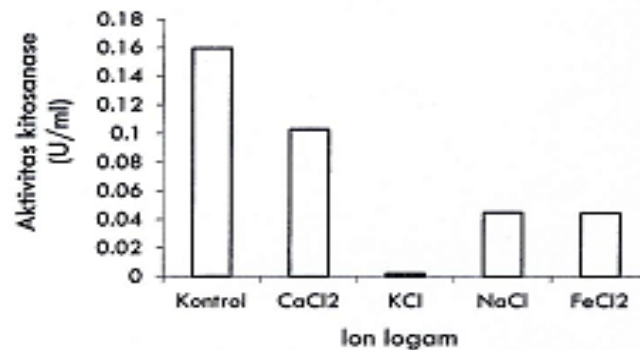


Gambar 3 pH optimum kitosanase isolat bakteri L2S1.

Kitosanase isolat L2S1 memiliki karakteristik unik terhadap pengaruh pH yang memiliki pH optimum pada pH basa. Sebagian besar kitosanase bakteri lain bekerja pada pH asam seperti kitosanase *Matsuebacter chitosanofabidus* 3001 (Park et al. 1999) dan *Pseudomonas* sp. H-14 (Yoshihara et al. 1992) yang memiliki pH optimum pada pH 4, kitosanase *Myxobacter* sp AL-1 (Reyes dan Corona 1997) yang memiliki pH optimum pada pH 5.

Pengaruh ion logam

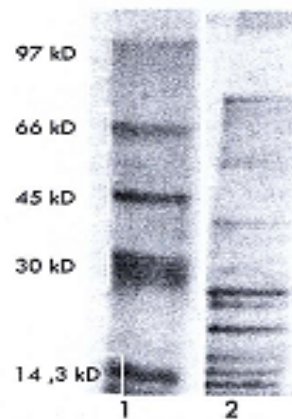
Pengaruh ion logam terhadap aktivitas kitosanase dapat dilihat pada Gambar 4. Gambar 4 menunjukkan semua ion logam yang diuji dapat menurunkan aktivitas kitosanase isolat bakteri L2S1 atau sebagai inhibitor. Penelitian lain pengaruh ion logam terhadap kitosanase umumnya ion logam sebagai inhibitor adalah Hg^{2+} dan Ag^{2+} yang diuji pada kitosanase *Bacillus* sp. PI-75 (Seino et al. 1991) dan *Mycobacter* sp. AL-1 (Reyes dan Corona 1997).



Gambar 4 Pengaruh Ion logam terhadap aktivitas kitosanase isolat L2S1.

Penentuan Berat Molekul Kitosanase

Penentuan berat molekul kitosanase isolat L2S1 dilakukan dengan cara analisis SDS-PAGE. Hasil SDS-PAGE kitosanase dapat dilihat pada Gambar 5.



Gambar 5 SDS-PAGE kitosanase isolat L2S1 (lajur 1 = marker; phosphorylase b (97 kDa), bovine serum albumin (66 kDa), ovalbumin (45 kDa), carbonic anhydrase (30 kDa), and lysozyme (14.3 kDa); lajur 2 = kitosanase L2S1).

Hasil analisis SDS-PAGE menunjukkan kitosanase isolat bakteri L2S1 memiliki 10 pita protein dengan berat molekul 21-78 kD. Banyaknya pita protein yang didapatkan dikarenakan kitosanase yang dianalisis SDS-PAGE adalah kitosanase ekstrak kasar. Kitosanase ekstrak kasar *Bacillus coagulans* LH 28.38 memiliki 5 pita protein dengan berat molekul 74 -93 kD (Haliza 2003)

KESIMPULAN

Tiga isolat (L1S1, L1S2 dan L2S1) yang diisolasi dan discreening dari lumpur rawa Indaralaya memiliki indeks kitinolitik yang tinggi. L2S1 selanjutnya dipilih untuk dikarakterisasi karena memiliki indeks kitinolitik yang paling tinggi. Produksi optimum kitosanase isolat L2S1 adalah 3 hari. pH dan suhu optimum kitosanase isolat L2S1 adalah pada pH 8 dan suhu 50 °C. Pengaruh ion logam (NaCl, KCl, CaCl₂ dan FeCl₂) menunjukkan semua ion logam dapat menghambat kitosanase isolat L2S1. Hasil analisis SDS-PAGE menunjukkan kitosanase isolat bakteri L2S1 memiliki 10 pita protein dengan berat molekul 21-78 kD.

UCAPAN TERIMA KASIH

Peneliti berterima kasih kepada Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi Depdiknas yang telah membiayai penelitian ini melalui program Hibah Bersaing tahun 2009.

DAFTAR PUSTAKA

- Cheng YC, Li KY. 2000. An *Aspergillus* chitosanase with potential for large-scale preparation of chitosan oligosaccharides. *Biotechnol.Appl.Biochem* 32: 197-203.
- Fukamizo T, Brzezinski R. 1997. Chitosanase from *Streptomyces* sp. strain N174: a comparative review of its structure and function. *Biochem. Cell Biol* 75: 687-696.
- Kurakake M, Shou Y, Nakagawa K, Sugihara M, Komaki T. 2000. Properties of chitosanase from *Bacillus cereus* S1. *Curr.Microbiol* 63: 833-839.
- Okajima S, Ando A, Shinoyama H, Fujii T. 1994. Purification and characterization of an extracellular chitosanase produced by *Amycolatopsis* CsO-2. *J Ferment Bioeng* 77: 617-620.
- Park JK, Shimono K, Ochiai N, Shigeru K, Kurita M, Ohta Y, Tanaka K, Matsuda H, Kawamukai M. 1999. Purification, characterization and gene analysis of a chitosanase (ChoA) from *Matsuebacter chitosanotabidus* 3001. *J Bacteriol* 181: 6642-6649.
- Reyes MP, Corona FG. 1997. The bifunctional enzyme chitosanase-cellulase produced by the Gram-negative microorganism *Mycobacter* sp. AL-1 is highly similar to *Bacillus subtilis* endoglucanases. *Arch. Microbiol* 168:321-327.
- Selno H, Tsukuda K, Shimasue Y. 1991. Properties and pattern of a chitosanase from *Bacillus* sp. PI-7S. *Agric.Biol.Chem* 55: 2421-2423.
- Shimosaka M, Nogawa M, Ohno Y, Okazaki M. 1993. Chitosanase from plant pathogenic fungus, *Fusarium solani* f. sp. phaseoli: purification and some properties. *Biosci. Biotech. Biochem* 57:231-235.
- Shimosaka M, Nogawa M, Wang YX, Kumehara M, Okazaki M. 1995. Production of two chitosanase from chitosan-assimilating bacterium, *Acinetobacter* sp. strain CHB101. *Appl. Environ. Microbiol.* p. 438-442.
- Shimosaka M, Kumehara M, Zhang YX, Nogawa M, Okazaki M. 1996. Cloning and characterization of a chitosanase gene from plant pathogenic fungus *Fusarium solani*. *J Ferment. Bioeng* 82:426-431

- Shimosaka M, Fukumori Y, Zhang YX, He NJ, Kodaira R, Okazaki M. 2000. Molecular cloning and characterization of a chitosanase from the chitosanolytic bacterium *Burkholderia gladioli* strain CHB101. *Appl. Microbiol. Biotechnol* 54:354-360.
- Shomashekar D, Joseph R. 1996. Chitosanase-properties and applications: a review. *Bioresource Technol* 55:35-45.
- Uchida Y, Ohtakara A. 1998. Chitosanase from *Bacillus* species. *Methods in enzymology*. 161:501-506.
- Yamasaki Y, Hayashi I, Ohta Y, Nakagawa T, Kawamukai M, Matsuda H. 1993. Purification and mode of action of chitosanase enzyme from *Enterobacter* sp. G-1. *Biosci. Biotech. Biochem* 57:444-449.
- Yoon HG, Lee KH, Kim HY, Hong BS, Shin DH, Cho HY. 2001. Thermostable chitosanase from *Bacillus* sp. strain CK4: Its purification, characterization and reaction pattern. *Biosci. Biotechnol. Biochem* 66:986-995.
- Yoshihara K, Hosokawa J, Kubo T, Nishiyama M, Koba Y. 1992. Purification and properties of a chitosanase from *Pseudomonas* sp. H-14. *Biosci. Biotechnol. Biochem* 56: 972-973.

