

KARAKTERISASI KITIN DEASETILASE TERMOSTABIL ISOLAT BAKTERI ASAL PANCURAN TUJUH, BATURADEN, JAWA TENGAH

[Characterization of Thermostable Chitin Deacetylase
from Bacteria Strain Pancuran Tujuh, Baturaden, Center of Java]

Siswa Setyahadi ¹⁾, Tatit K. Bunasor ²⁾, dan Deuxianto Hendarsyah ³⁾

¹⁾ Bidang Teknologi Biokatalis, Pusat Teknologi Bioindustri, Kedepujian TAB, BPPT

²⁾ Departemen Teknologi Industri Pertanian, Fakultas Teknologi Pertanian, IPB

³⁾ Alumni Departemen Teknologi Industri Pertanian, Fak. Teknologi Pertanian, IPB

Diterima 5 Maret 2006 / Disetujui 13 Juli 2006

ABSTRACT

Chitin deacetylase is the enzymes that has important role in converting chitin to chitosan. In nature, chitin is the second most abundant natural biopolymer after cellulose. Generally, chitin easily obtained from outer shell of crustaceans, arthropods, and also detectable on cell wall of some type of fungal (Zygomycetes).

*The chitin deacetylase was isolated from *Bacillus* sp PT2-3. It was found that the highest specific activity was attained at pH 8 60°C. The addition of 5 mM Zn²⁺ and 5 mM Mn²⁺ increased the specific activity of the enzyme, 4.39% and 7.8%, respectively, and the increase was only 2.19% when the addition was 2 mM Mn²⁺. On the contrary the addition of Ca²⁺, Mg²⁺ and Fe²⁺ decrease the specific activity 46.83%, 41.22% and 47.32%, respectively. The enzyme activity was relatively stable at 60°C for 60 minutes, while lengthen the time to 90 minutes, decreased the activity 15.05 %, and the decrease was 26.13% at temperature of 70°C for 180 minutes.*

Key words: *chitin deacetylase, Bacillus, thermostabil*

PENDAHULUAN

Keanekaragaman hayati yang ada di Indonesia menunjukkan bahwa tanah air ini memiliki potensi alam yang sangat besar namun potensi ini masih belum dapat dimanfaatkan secara optimal. Hal ini memberikan peluang untuk menggali lebih banyak lagi manfaat dari sumber alam berbagai ekosistem yang ada. Salah satu potensi ini adalah udang dan kepiting yang saat ini merupakan komoditas ekspor unggulan hasil perikanan

Menurut data Badan Pusat Statistik tercatat bahwa produksi udang Indonesia rata-rata meningkat 7,4% per tahun. Pada tahun 2001, produksi udang nasional mencapai 633.681 ton. Dengan asumsi laju peningkatan produksi tetap, pada tahun 2004 potensi udang diperkirakan sebesar 785.025 ton. Dari jumlah tersebut, 60-70% menjadi limbah yaitu bagian kulit dan kepala. (Anonim, 2004).

Kitin merupakan suatu molekul kompleks yang biasanya ditemukan pada hewan golongan krustasea seperti udang, lobster dan kepiting juga pada fungi dan jamur. Kitin merupakan polimer berantai lurus yang tersusun atas residu N-asetilglukosamina melalui ikatan β (1 - 4) dengan kuantitas/persediaan yang sangat berlimpah, dan merupakan biopolimer terbesar nomor dua di alam setelah selulosa. Dengan pendekatan

teknologi yang tepat maka limbah yang dihasilkan oleh industri perikanan dapat diolah menjadi kitin beserta turunannya.

Kitin deasetilase, merupakan enzim yang dapat mengkonversi kitin menjadi kitosan dalam proses deasetilase N-asetil glukosamin. Enzim ini dapat menghidrolisis kitin melalui pemutusan ikatan N-asetamido pada kitin dan mengubahnya menjadi kitosan. Kitosan, dapat dimanfaatkan antara lain untuk: menurunkan kolesterol dalam darah, antikoagulan dalam darah, agen hipokolesterolemik, antitumor; sebagai pupuk, fungisida, dan pelapis buah-buahan pasca panen (Sandford, 1988). Selain itu dapat dimanfaatkan pula sebagai pengangkut (*carrier*) obat dan komponen alat-alat operasi (sarung tangan, benang operasi). Manfaat lainnya adalah penggunaannya dalam teknologi kromatografi (Angka & Suhartono, 2000)

Tujuan penelitian ini adalah mengetahui karakteristik kitin deasetilase yang dihasilkan dari isolat bakteri termofilik pendegradasi kitin yang berasal dari pancuran tujuh, Baturaden. Karakterisasi enzim ini meliputi suhu dan pH optimal enzim, daya stabilitasnya terhadap panas serta pengaruh penambahan senyawa logam terhadap aktivitas enzim

METODOLOGI

Bahan dan alat

Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi: glikol kitosan (sigma), gliserin, kitin komersial (sigma), *bacto agar*, amonium sulfat $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, K_2HPO_4 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, *yeast extract*, *bacto trypton*, indol dalam etanol, *Coomassie Brilliant Blue* (CBB) G-250, *Bovine Serum Albumin* (BSA), d-glukosamin (sigma). Bahan pelarut dan pereaksi berupa NaOH, HCl amonium sulfamat, CH_3COOH , asam fosfat, metanol, etanol, asetat anhidrida $(\text{CH}_3\text{CO})_2\text{O}$, buffer pH, sodium azide, NaNO_2 , dan berbagai senyawa logam seperti $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; ZnCl_2 ; $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ dan $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, serta akuades.

Alat

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain: sentrifugasi, spektrofotometer, pH meter, neraca analitik, *laminar air flow*, inkubator berpengaduk, otoklaf, pompa vakum, ruang dingin, oven, vortek, mikro pipet, alat ultrafiltrasi dan penangas air, serta berbagai peralatan gelas. Selain itu digunakan pula *glass wool*, kertas saring, kertas saring whatman no. 42, bunsen, sudip, *bulb*, jarum ose, stirer magnet.

Mikroba

Mikroba yang digunakan yaitu *Bacillus* sp. PT2-3 yang termofilik, diisolasi dari sumber air panas pancuran tujuh, Baturaden. Bakteri ini telah diidentifikasi pada penelitian sebelumnya (Azis, 2002).

Metode penelitian

Pembuatan starter

Isolat PT2-3 dalam media agar diinokulasikan dalam media fermentasi kemudian diinkubasi 18 jam pada 55°C , 150 rpm.

Pembuatan koloidal kitin (Arnold dan Solomon, 1986).

Koloidal kitin dibuat dengan melarutkan 5 gram kitin komersial dalam 80 mL HCl pekat dalam gelas beker, kemudian larutan diaduk menggunakan stirer hingga merata. Larutan diinkubasi 24 jam pada 40°C . Kemudian disaring menggunakan *glass wool*. Filtrat ditambah dengan 200 mL aquades dingin dan NaOH 12 N hingga pH mencapai pH 7. Filtrat disentrifugasi 15 menit pada 7.500 rpm. Supernatan dibuang dan endapannya merupakan koloidal kitin yang digunakan untuk penelitian.

Pembuatan glikol kitin (Truddel dan Asselin, 1989)

Glikol kitin sebanyak 1 gram dilarutkan dalam asam asetat 10% dan dibiarkan pada suhu ruang selama 24 jam. Kemudian campuran ditambah 100 ml metanol

secara perlahan di dalam ruang asam, lalu disaring vakum dengan kertas saring Whatman no 42. Filtrat yang dihasilkan ditampung di dalam gelas piala dan ditambah 1.5 ml asetat anhidrida sambil distirer pelan, dibiarkan pada suhu kamar ± 30 menit, saat terbentuk gel ditambah 150 ml metanol dan dihomogenkan. Sentrifugasi pada 7000 rpm, 4°C selama 15 menit. Pelet ditambahkan 100-150ml metanol dan dihomogenkan lagi. Kemudian sentrifugasi diulangi sekali lagi. Pelet ditambah 100 ml 0,02% sodium azide dan dihomogenkan lagi selama 4 menit. Larutan gel yang terbentuk adalah 1% glikol kitin.

Pembuatan larutan bradford (Bradford, 1976)

Coomassie Brilliant Blue G-250 sebanyak 100 mg dilarutkan dalam 50 ml etanol 95% dan ditambah 100 ml asam fosfat 85%. Akuades ditambahkan hingga 1000 ml, kemudian disaring menggunakan kertas saring. Larutan yang diperoleh merupakan larutan stok Bradford dan bila akan digunakan harus diencerkan terlebih dahulu menggunakan akuades dengan perbandingan 1 : 4 v/v.

Pengukuran aktivitas enzim kitin deasetilase (modifikasi Tokuyasu et al., 1996)

Larutan digesti yang terdiri dari 300 μl glikol kitin 1%, 200 μl buffer dan 100 μl enzim diinkubasi selama 30 menit pada suhu optimum enzim, kemudian diinaktifasi dengan direbus selama 15 menit. Untuk pengontrolan, penambahan enzim dilakukan sesaat sebelum inaktifasi enzim dilakukan. Setelah digesti, konsentrasi residu glukosamin yang terbentuk dari reaksi deaminasi dihitung berdasarkan oksidasi menggunakan NaNO_2 , mengikuti metode spektrofotometrik menggunakan indol HCl sesuai dengan Dische dan Borenfreund (1950) yang telah dimodifikasi sebagai berikut : larutan digesti dipipet sebanyak 200 μl ditambahkan 200 μl asam asetat 33% dan 200 μl NaNO_2 5% larutan divorteks dan dibiarkan selama 10 menit pada suhu ruang. Ditambahkan 200 μl amonium sulfamat 12,5% dan digoyang selama 30 menit pada suhu ruang. Selanjutnya ditambahkan 800 μl HCl 5% dan 80 μl indol 1% dalam etanol. Campuran reaksi ini dididihkan dalam air mendidih selama 10 menit. Larutan kemudian didinginkan selanjutnya ditambah etanol absolut 800 μl dan divortek. Konsentrasi glukosamin yang terbentuk diketahui melalui reaksi warna kemerahan yang terjadi dan diukur pada 492 nm. Standar yang digunakan adalah konsentrasi glukosamin pada 50 $\mu\text{g/ml}$.

Nilai aktivitas spesifik enzim (U/mg), diperoleh dengan membagi nilai aktivitas enzim dengan nilai konsentrasi protein dari sampel enzim (mg).

Pengukuran konsentrasi protein (Bradford, 1976)

Pengukuran protein sampel dilakukan dengan mereaksikan 40 μl larutan sampel enzim dengan larutan bradford sebanyak 2 ml. Lalu diukur absorbansinya pada

595 nm. Nilai absorbansi dimasukkan ke dalam kurva standar untuk menentukan konsentrasi protein yang terkandung dalam sampel enzim.

Karakterisasi enzim kitin deasetilase

- a. Persiapan preparat enzim
Inokulum sebanyak 10%, dimasukkan ke dalam media produksi, dan fermentasi dilakukan dalam inkubator goyang pada 150 rpm dan suhu 55°C. Enzim dipanen pada jam ke-18 dan disentrifugasi pada 9000 rpm selama 15 menit pada suhu 4°C.
- b. Penentuan pH optimum aktivitas enzim
Enzim diuji aktivitasnya pada pH 5.0 sampai 11.0. Buffer yang digunakan untuk pengujian aktivitas pada pH 5 adalah buffer sitrat-phospat 0.05 M. Buffer phospat 0.05 M digunakan untuk pengujian pada pH 6, 7, 8, sedangkan untuk pH 9, 10 dan 11 digunakan buffer glycine-NaOH 0.05 M.
- c. Penentuan suhu optimum.
Enzim, substrat (glikol kitin) dan buffer pH pada pH optimum (yang didapatkan dari hasil pengujian pH optimum), di inkubasi pada kisaran suhu 40°C hingga 70°C sehingga diperoleh suhu optimum dengan aktivitas spesifik tertinggi.
- d. Ketahanan enzim terhadap pengaruh panas.
Enzim dipanaskan pada suhu 60°C dan 70°C masing-masing selama 180 menit. Pengambilan sampel dilakukan setiap 30 menit untuk dilakukan pengujian aktivitasnya. Ketahanan enzim terhadap pengaruh panas dinyatakan dalam persentase aktifitas relatif.
- e. Pengaruh penambahan ion logam
Uji pengaruh penambahan senyawa logam terhadap aktivitas enzim dilakukan dengan menambahkan 2mM dan 5mM masing-masing dari $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; ZnCl_2 ; $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ pada larutan enzim-substrat-buffer, kemudian di inkubasi pada suhu dan pH optimumnya. Dalam hal ini, pengaruh penambahan ion logam dinyatakan dalam persentase aktivitas relatif enzim.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Bakteri penghasil enzim kitin deasetilase

Menurut Azis (2002), mikroba penghasil kitin deasetilase yang diidentifikasi dan diisolasi berasal dari daerah sumber air panas pancuran tujuh, Baturaden, termasuk bakteri genus *Bacillus*. Aktivitas kitinolitik diamati selama 48 jam fermentasi, isolat-isolat tersebut memiliki kecenderungan yang sama yaitu aktivitas enzim kasarnya meningkat pada fermentasi jam ke-18. Waktu ini merupakan waktu yang digunakan untuk pemanenan enzim terbaik. Dari isolat-isolat yang diamati maka

didapatkan aktivitas enzim kasar tertinggi yang dicapai oleh isolat *Bacillus* sp. PT2-3 yang selanjutnya isolat tersebut dipergunakan untuk dikarakterisasi sifat-sifat spesifik enzim.

Produksi enzim

Kitin deasetilase diperoleh dengan cara fermentasi cair substrat koloidal kitin pada medium fermentasi dengan *Bacillus* sp. PT2-3 sebagai mikroorganisme termofilik penghasil enzim termostabil tersebut. Umumnya, enzim pendegradasi kitin diproduksi secara ekstraselular. Fermentasi dilakukan selama 18 jam dalam pengocok 150 rpm suhu 55°C. Setelah jam ke-18 didapatkan ekstrak kasar enzim

Karakterisasi enzim kitin deasetilase PT2-3

Pengujian karakterisasi enzim dilakukan untuk mengetahui kondisi optimal enzim yang akan mempengaruhi kinerja dalam mentransformasikan substrat, sehingga akan diperoleh aktivitas enzim yang maksimum. Karakterisasi enzim yang dilakukan dalam penelitian ini meliputi, analisa pH optimum dengan selang pH antara 5, 6, 7, 8, 9, 10, dan 11, suhu optimum dengan selang suhu antara 40°C, 50°C, 60°C, dan 70°C, pengaruh penambahan logam terhadap aktivitasnya, dan stabilitas atau ketahanan enzim terhadap panas.

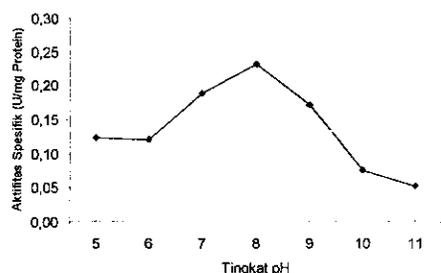
pH optimum enzim

Hampir semua enzim sangat sensitif terhadap perubahan pH, dan biasanya aktivitas enzim akan berkurang bila pH medium berubah dari pH optimumnya. Menurut Webb dan Dixon (1979), peningkatan aktivitas enzim pada pH optimum yang dicapainya dapat dihubungkan dengan suatu perubahan ionisasi dalam gugus-gugus ionik dan tapak aktif enzim sehingga enzim berada pada konformasi tapak aktif yang lebih efektif dalam membentuk produk.

Dari Gambar 1, terlihat bahwa aktivitas spesifik akan meningkat hingga pH 8.0 yang merupakan pH optimumnya enzim. Setelah pH tersebut tercapai, akan terjadi penurunan aktivitas enzim.

Enzim menyediakan banyak tempat pengikatan proton, mengingat pada hakekatnya enzim adalah protein yang tersusun atas asam-asam amino yang dapat mengadakan ionisasi (mengikat dan melepaskan proton atau ion hidrogen) pada gugus amino, karboksil, atau beberapa gugus fungsional lainnya. (Suhartono, 1988).

pH optimum dari kitin deasetilase yang berasal dari isolat Ck-d dan L-17, masing-masing 7 dan 5, lebih rendah dibandingkan dengan pH optimum isolat *Bacillus* sp. PT2-3, yang memiliki nilai sama dengan isolat K29-14 yang diisolasi dari bakteri asal Kawah Kamojang (Rahayu, 2000) yakni pH 8. Sedangkan pH optimum kitin deasetilase dari *Colletotricum lindemutianum* (ATCC 56676) (Tokuyasu, 1996), berada lebih tinggi yakni pH



Gambar 1. Grafik aktivitas spesifik kitin deasetilase PT2-3, pada berbagai pH.

Suhu optimum

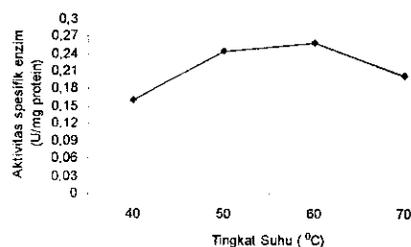
Aktivitas kitin deasetilase PT2-3, meningkat seiring dengan naiknya suhu, akan tetapi jika telah melampaui suhu optimumnya maka aktivitasnya pun menurun. Menurut Pelczar (1972), beberapa variasi dari pH ekstrim akan dapat merusak enzim, sama halnya dengan suhu yang ekstrim bagi enzim. Dimulai dengan suhu yang rendah, akan terjadi peningkatan aktivitas seiring dengan meningkatnya suhu hingga kondisi optimum dicapai. Jika suhu terus ditingkatkan, akan menyebabkan aktivitas enzim menurun yang disebabkan oleh terjadinya kerusakan pada struktur molekul enzim. Karena enzim juga merupakan protein, maka faktor-faktor yang dapat mengubah konformasi protein juga dengan sendirinya potensial untuk mengubah konformasi enzim.

Kitin deasetilase PT2-3, aktivitasnya optimal pada suhu 60°C. Hal ini dapat ditunjukkan oleh naiknya konsentrasi glukosamin sebagai hasil hidrolisis glikol kitin substrat enzim tersebut. Pada suhu 60°C, kitin deasetilase mampu menghidrolisis substrat dengan aktivitas spesifik tertinggi sebesar 0.26 unit/mg protein.

Kecepatan reaksi akan meningkat setara dengan meningkatnya suhu karena akan mempercepat gerak termal molekul. Pada suhu yang lebih besar dari t_0 , protein enzim akan mengalami perubahan konformasi yang bersifat detrimental. Pada suhu yang melebihi suhu optimal enzim, substrat juga dapat mengalami perubahan konformasi sehingga sisi reaktifnya tidak dapat lagi, atau mengalami hambatan dalam memasuki lokasi tapak aktif enzim.

Dari Gambar 2 terlihat bahwa pada suhu 40°C kitin deasetilase PT2-3, tercatat memiliki aktivitas spesifik sebesar 0.16 U/mg protein. Hal ini dapat dijelaskan bahwa pada suhu tersebut enzim belum dapat menghidrolisis substrat secara optimal disebabkan suhu optimumnya belum tercapai. Demikian juga pada suhu 50°C.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa kitin deasetilase dari isolat PT2-3, memiliki suhu optimum yang setara dengan suhu optimum *Colletotricum lindemutianum* ATCC 56676 (Tokuyasu, 1996); isolat Ck-d dan isolat L-17 yang diisolasi oleh Subianto (2001) dan isolat 13.26 yang diisolasi oleh Jayanti (2002).



Gambar 2. Aktivitas spesifik Kitin deasetilase PT2-3, pH optimal (pH 8) pada berbagai tingkat suhu.

Suhu 70°C, yang merupakan suhu diatas suhu optimum enzim, menyebabkan aktivitas spesifiknya menurun. Hal ini mungkin disebabkan oleh karena terjadinya kerusakan struktur molekul enzim akibat panas. Kenaikan suhu akan menyebabkan protein terdenaturasi yang ditandai dengan kinerja enzim yang menurun dalam menghidrolisis substratnya. Pada suhu tersebut, aktivitas spesifik enzim tercatat sebesar 0.20 U/mg protein sebagai fungsi dari aktivitas enzim yang dihitung dengan laju protein yang terbentuk.

Stabilitas enzim terhadap panas

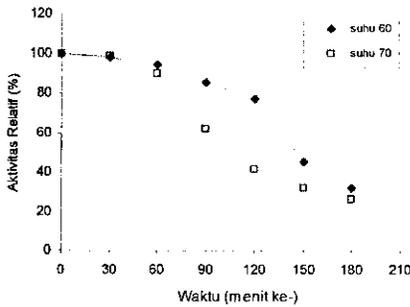
Karakterisasi ketahanan panas terhadap enzim dilakukan untuk mengetahui efektifitas dan kestabilan penggunaan enzim pada proses yang memerlukan panas (Gambar 3). Hal ini dilakukan, karena enzim sebagai protein mudah mengalami denaturasi jika diberi perlakuan pemanasan yang akan menyebabkan proses membukanya struktur protein dan hilangnya aktivitas hayati enzim. Dalam pengujiannya, enzim kitin deasetilase dari *Bacillus* sp. PT2-3, diberi perlakuan panas pada suhu optimalnya yaitu 60°C dan dalam jangka waktu 180 menit.

Hasil percobaan menunjukkan bahwa semakin lama waktu dan semakin tinggi suhu pemanasan, aktivitas enzim pun cenderung semakin menurun. Pada permulaan inkubasi dengan suhu 60°C aktivitas enzim berada pada kondisi optimal yang ditunjukkan dengan maksimumnya enzim dalam menghidrolisa substrat, tetapi setelah pemanasan berlangsung selama 90 menit, enzim kehilangan aktivitasnya sebesar 15,05 % dan terus menurun drastis pada menit ke-120 menuju menit ke-150, sehingga aktivitas relatifnya tersisa sebesar 45%. Jika waktu pemanasan diperpanjang, aktivitasnya pun terlihat semakin menurun sehingga hanya 31.89 % yang tersisa.

Kestabilan molekul protein enzim dipengaruhi oleh kestabilan ikatan-ikatan yang ada pada molekul enzim, yakni ikatan hidrogen antara atom-atom H, O, N dan S pada molekul asam amino penyusunnya, ikatan Van Der Waals, interaksi hidrofobik, maupun gaya tarik menarik listrik antara muatan yang berbeda. (Suhartono, 1988). Gaya non kovalen yang dicerminkan oleh ikatan hidrogen, gaya elektrostatik dan interaksi hidrofobik

dikenal sebagai faktor penentu stabilitas enzim terhadap lingkungan panas yang akan mempertahankan struktur sekunder dan tertier. Tingkat berbagai interaksi non kovalen ini dipengaruhi oleh struktur primer enzim (deret asam-asam amino) (Ferdinand et al., dalam Suhartono, 1994).

Pada suhu 70°C, penurunan aktivitas enzim yang signifikan terjadi pada inkubasi mulai menit ke-60 dengan aktivitas sebesar 0.18 U/mg protein, menuju menit ke-120 dengan aktivitas sebesar 0.08 U/mg protein, sehingga aktivitas yang tersisa tinggal 41.09 %. Selanjutnya inkubasi pada menit ke-180 aktivitas enzim terus menurun hingga tersisa sebesar 26.24 %. Sebagai ilustrasi, pengaruh waktu inkubasi terhadap aktivitas enzim dapat dilihat dalam gambar berikut :



Gambar 3. Aktivitas relatif Kitin deasetilase PT2-3, pada suhu 60°C dan 70°C waktu inkubasi selama 180 menit

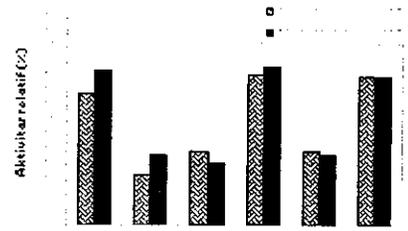
Pengaruh penambahan ion logam terhadap aktivitas enzim

Penambahan senyawa logam dengan konsentrasi tertentu pada suatu enzim akan bertindak sebagai zat aktivator yang dapat meningkatkan aktivitasnya ataupun sebaliknya yaitu sebagai zat yang dapat menurunkan aktivitas enzim tersebut atau inhibitor. Hal ini bervariasi tergantung dari karakteristik enzim yang bersangkutan.

Penambahan ion logam dari beberapa senyawa memiliki pengaruh terhadap kinerja aktivitas enzim kitin deasetilase PT2-3. Berdasarkan hasil percobaan, penambahan berbagai senyawa logam dengan konsentrasi 2 mM pada kitin deasetilase *Bacillus* sp. PT2-3, menunjukkan bahwa hampir semua senyawa menurunkan aktivitas kitin deasetilase PT2-3, kecuali ion logam Mn²⁺ dari senyawa MnCl₂.4H₂O.

Penambahan ion Mn²⁺ menaikkan aktivitas relatif enzim menjadi 102,19 %. Penurunan aktivitas relatif terbesar terjadi pada penambahan senyawa CaCl₂.2H₂O yaitu sebesar 65,85 % dari keadaan semula. Begitu pula dengan penambahan ion Mg²⁺ dan ion Fe²⁺, dengan penurunan yang relatif tidak jauh berbeda antara keduanya yaitu masing-masing dapat menurunkan aktivitas relatif menjadi 49,76 % dan 49,02 %. Hal serupa juga diperlihatkan oleh ion Zn²⁺, yang juga dapat menurunkan aktivitas relatif enzim sebesar 11,22 %.

Secara grafis, pengaruh penambahan senyawa logam pada aktivitas enzim dapat dilihat dalam gambar 4. Ion logam Mn²⁺ bertindak sebagai aktivator dari enzim kitin deasetilase PT2-3 pada konsentrasi logam 2 mM, sedangkan ion logam lainnya seperti Ca²⁺, Mg²⁺, Fe²⁺ dan ion Zn²⁺ bertindak sebagai inhibitor yakni karena pengikatannya dengan enzim dapat menurunkan aktivitasnya.



Gambar 4. Pengaruh penambahan ion logam terhadap aktivitas relatif enzim (%).

Menurut Dixon dan Webb (1964), penambahan ion logam dengan konsentrasi optimum dapat meningkatkan konsentrasi kompleks logam-substrat, kemudian mengubah potensial elektrokinetik protein enzim sehingga proses aktivasi dapat optimal. Jika konsentrasi logam di atas atau di bawah konsentrasi optimum maka kesetimbangan dan potensial elektrokinetik tidak mencapai atau melebihi batas (*range*) yang diinginkan dan menyebabkan proses aktivasi tidak optimal bahkan dapat menghambat enzim yang berakibat pada penurunan aktivitas.

Pada konsentrasi 5 mM, terlihat bahwa senyawa logam yang berikatan dengan enzim adalah ZnCl₂ dan MnCl₂.4H₂O, yang menyebabkan aktivitas enzim meningkat. Ion logam Mn²⁺ dan Zn²⁺ pada konsentrasi ini berfungsi sebagai kofaktor bagi enzim karena dapat berperan dalam penghubungan ikatan enzim dengan substrat (ES) untuk mengaktifkan konformasi aktif enzim atau tapak aktif pada struktur tiga dimensi enzim tersebut. Kestabilan pada molekul enzim, dengan sendirinya akan mempengaruhi pengikatan enzim dengan substrat baik secara langsung (pada sisi aktif) maupun tidak secara langsung yaitu melalui perubahan konformasi (Dixon and Webb, 1964).

Aktivitas enzim meningkat sebesar 4,39 % oleh penambahan ZnCl₂ sedangkan penambahan ion logam Mn²⁺ aktivitas enzim naik menjadi 107,80 %. Dari hasil percobaan, menunjukkan bahwa baik pada konsentrasi 2 mM maupun 5 mM, ion logam Mn²⁺ dapat bertindak sebagai aktivator sehingga akan berfungsi meningkatkan aktivitas enzim.

Seperti halnya pada konsentrasi 2 mM, pada konsentrasi 5 mM ini pun, ion Ca²⁺, Mg²⁺ dan Fe²⁺ bertindak sebagai inhibitor karena proses inhibisinya pada kestabilan konformasi enzim kitin deasetilase PT2-3, dengan glikol kitin sebagai substratnya (ES).

KESIMPULAN

Enzim kitin deasetilase yang dihasilkan dari isolat *Bacillus* sp. PT2-3 memiliki aktivitas spesifik optimum pada suhu 60°C dan pH 8.0 (buffer fosfat) sebesar 0,26 U/mg protein. Ion logam yang berperan sebagai penghambat (inhibitor) adalah Ca²⁺, Mg²⁺, Fe²⁺ dan Zn²⁺. Kenaikan aktivitas relatif enzim pada Mn²⁺ terjadi pada penambahan 2mM dan 5 mM masing-masing 2,19% dan 7,80%. Penambahan ion Zn²⁺ 5 mM, aktivitas relatif enzim naik menjadi 104,39%.

Pengujian stabilitas enzim terhadap panas, menunjukkan bahwa enzim kitin deasetilase PT2-3, secara relatif tidak mengalami penurunan aktivitas pada suhu 60°C dan 70°C selama 60 menit, dan cenderung terus menurun jika inkubasi dilanjutkan hingga menit ke-180.

DAFTAR PUSTAKA

- Angka, S. L. Dan M. T. Suhartono. 2000.** Pemanfaatan Limbah Hasil Laut. Bioteknologi Hasil Laut. Pusat Kajian Sumberdaya Pesisir Dan Lautan. Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Anonim, 2004.** Badan Pusat Statistik, Jakarta.
- Arnold. L. D. dan N. A. Solomon. 1986.** Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology. American Society for Microbiol., Washington D. C.
- Azis, S. 2002.** Isolasi dan Seleksi Bakteri Termofilik Penghasil Kitin Deasetilase Potensial dari Sumber Air Panas Pancuran Tujuh, Baturaden. Skripsi. Fakultas Biologi. Universitas Jendral Sudirman. Purwokerto.
- Bradford, M. 1976.** A Rapid and Sensitive Method for Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing The Principle of Protein Dye Binding. Anal Biochem 72 : 248 – 254.
- Direktorat Jendral Perikanan. 1997.** Statistik Perikanan Tahun 1995. Deptan RI. Jakarta.
- Dixon, M. dan E. C. Webb. 1958.** Enzymes. Longmans, Green and Co. London.
- Dische Z. dan E. Borenfreund. 1949.** A Spectrofotometric Method for The Micro Determination of Hexosamines. New York.
- Ferdinand, W. 1976.** The Enzyme Molecule. Dalam: Suhartono M. T. Bioteknologi Enzim Termostabil. Bul. Teknol dan Industri Pangan. Vol V : 93 – 98.
- Jayanti, J. F. L. 2002.** Studi Kitinase dan Kitin Deasetilase Termostabil Dari Isolat Asal Manado. Skripsi. Jurusan Teknologi Pangan Dan Gizi. Fakultas Teknologi Pertanian. Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Manitto, P. 1981.** Biosintesis Produk Alami. Terjemahan Koensoemardiyah. Ellis Horwood Limited Publishers, Chichester.
- Pelczar, M. J. dan R. D. Reid. 1972.** Microbiology. Mcgraw-Hill Book Company. New York.
- Rahayu, S. 2000.** Karakterisasi dan Pemurnian Enzim Kitinase dan Kitin Deasetilase Termostabil Dari *Bacillus* Sp. K29.14 Asal Kawah Kamojang, Jawa Barat. Tesis. Program Pasca Sarjana. Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Sandford, P. A. 1988.** Chitosan : Uses and Potential Application. Dalam: Skjåk-Bræk G., T. Anthonsen dan P. Sandford, (eds). Chitin and Chitosan. Sources, Chemistry, Biochemistry, Physical Properties and Applications. Elsevier Appl. Sci. London.
- Subianto, Y. 2001.** Isolasi dan Pemilahan Bakteri Termofilik Penghasil Enzim Kitinase dan Kitin Dasetilase dari Beberapa Daerah di Indonesia. Skripsi. Jurusan Teknologi Pangan Dan Gizi. Fakultas Teknologi Pertanian. Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Suhartono, M. T. 1988.** Pengantar Biokimia. Pusat Antar Universitas, Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- _____. **1989.** Enzim Dan Bioteknologi. Pusat Antar Universitas, Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- _____. **1994.** Bioteknologi Enzim Termostabil. Bul. Teknol dan Industri Pangan. Vol V : 93 – 98.
- Tokuyasu, K., M.O. Kameyama dan K. Hayasi, 1996.** Purification and Characterization of Extracelullar Chitin Deacetylase from *Colletotrichum Lindemuthianum*. J. Biosci. Biotechnol. Biochem., 60 (10): 1598 - 1603.
- Trudel, J. Dan A. Asselin. 1989.** Detection of Chitinase Activity after Polyacrylamide Gel Elektrophoresis. Anual Biochemistry. Tibtech (18) : 305 – 313.
- Tsigos, I., M. Aggeliki, K. Dimitri dan B. Vasillis. 2000.** Chitin Deacetylases : New, Versatile Tools In Biotechnology. Tibtech (18) : 305 - 312.
- _____, dan V. Bouriotis. **1995.** Purification and Characterization of Chitin Deacetylase from *Colletotrichum lindemuthianum*. J Biol. Chem. 270(44) : 26286 – 26291. American society for Biochemistry and Molecular Biology, Inc. USA.