

Seleksi, Karakterisasi, dan Identifikasi Bakteri Penghasil Kitinase yang Diisolasi dari Gunung Bromo Jawa Timur

Yati Sudaryati Soeka*¹⁾ dan Sulistiani

Bidang Mikrobiologi, Puslit Biologi-LIPI, Jalan Raya Bogor Km 46, Cibinong 16911

Diterima 28-05-2009

Disetujui 18-10-2010

ABSTRACT

Selection, characterization and identification of bacteria that can produce chitinase enzyme were isolated from Bromo Mountain, East Java. The 48 isolates were tested for capability to degrade chitine qualitatively, semi quantitatively and quantitatively. The result showed that 2 isolates, B2-4 and NA S4-1 could degrade chitin, with activities of $4.8 \cdot 10^{-3}$ and $3.1 \cdot 10^{-3}$ U/ml, after 1 and 2 days incubation respectively. By using molecular characterization methods, partial sequences of 16S rDNA and the primers 9F & 1510R were identified as *Stenotrophomonas* sp.

Keywords: chitinase, *Stenotrophomonas* sp

PENDAHULUAN

Gunung Bromo merupakan Gunung berapi yang masuk dalam wilayah Taman Nasional Bromo Tengger Semeru. Taman nasional ini merupakan satu-satunya kawasan konservasi di Indonesia yang memiliki keunikan berupa laut pasir seluas 5,250 hektar, yang berada pada ketinggian $\pm 2,100$ meter dari permukaan laut. Terletak dalam kawasan Kabupaten Pasuruan, Kabupaten Probolinggo, Kabupaten Lumajang, dan Kabupaten Malang, Provinsi Jawa Timur (Dephut, 2007).

Keanekaragaman hayati di taman nasional ini diantaranya beberapa jenis tumbuhan antara lain: Jamuju (*Dacrycarpus imbricatus*), Cemara gunung (*Casuarina* sp.), Eidelweis (*Anaphalis javanica*), berbagai jenis anggrek dan jenis rumput langka (*Styphelia pungieus*). Terdapat sekitar 137 jenis burung, 22 jenis mamalia dan 4 jenis reptilia di taman nasional ini. Namun demikian informasi mengenai keanekaragaman hayati mikroba masih sangat kurang. Dalam penelitian ini telah dilakukan isolasi dan identifikasi bakteri air di wilayah Gunung Bromo dari beberapa tempat dengan ketinggian yang berbeda. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui kemampuan isolat bakteri tersebut dalam menghasilkan enzim kitinase. Isolat yang positif kemudian dikarakterisasi secara fenotipik dan molekuler, dengan analisis sekuen 16S rDNA (Don & Brenner *et al.*, 2003).

Kitinase adalah enzim yang mampu menghidrolisis kitin (polimer dari β -1,4 N-asetil-D-glukosamin) yang merupakan suatu polisakarida kedua terbanyak di alam setelah selulosa. Kitin sebagai polimer yang terdapat melimpah di tanah, memiliki struktur dan karakteristik yang unik.

Banyak hewan dan mikroorganisme menjadi penyumbang ketersediaan kitin di dalam tanah (Yurnaliza, 2008). Hasil hidrolisis kitin berupa senyawa kitooligosakarida bermanfaat dalam dunia kesehatan karena memiliki aktivitas anti tumor. Dalam bidang pertanian, kitinase dan mikroorganisme penghasilnya berperan sebagai agen pengendali hayati penyakit tanaman yang disebabkan oleh jamur. Kitinase menyebabkan terjadinya lisis pada dinding sel jamur yang umumnya mengandung kitin (Patil *et al.*, 2000). Kitinase sangat menjanjikan untuk dimanfaatkan sebagai biopestisida yang aman dan ramah lingkungan karena kitinase dapat mendegradasi kitin yang merupakan komponen pada eksoskeleton serangga, nematoda dan dinding sel jamur (Terayama *et al.*, 1993). Kitinase juga berperan sebagai agen biokonversi limbah kitin menjadi protein sel tunggal (Kobayashi *et al.*, 1975) atau senyawa turunannya (Rattanakit *et al.*, 2002). Dengan banyaknya fungsi dari kitinase, penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan isolat unggul penghasil kitinase untuk dikoleksi LIPI-MC.

*Telp: +628129612170

Email: ceuceu_lipi@yahoo.com

BAHAN DAN METODE

Pengambilan Sampel. Pengambilan sampel penelitian ini dilakukan di Gunung Bromo. Lokasi, waktu pengambilan sampel dan parameter lingkungan diuraikan dalam Tabel 1.

Isolasi dan Pengamatan Bakteri. Pembuatan media agar NA : Nutrient agar 100% (NA): 23 g NA, akuades 1 liter dan Nutrien agar 20% (1/10 NA): 2,3 g NA, agar 12,7g, akuades 1 liter disterilkan menggunakan autoklaf. Isolasi dilakukan dengan metoda cawan sebar. Sample (air embun dan air tanah) diencerkan dengan akuades steril di mikrotube, divortek supaya homogen kemudian ditumbuhkan dengan cara sebar permukaan di 2 macam media, media Nutrient Agar 100% (NA) dan media nutrient agar 20% (1/10 NA). Diinkubasi selama 3 hari dan dilakukan penghitungan jumlah bakteri. Bakteri yang mempunyai morfologi berbeda diambil dan dilakukan pemurnian lebih lanjut (Pelczar & Chan, 2005).

Preparasi Koloidal Kitin. Ditimbang sebanyak 20 g kitin dari kulit udang ditambah 400 ml HCl pekat, distirer selama 2 jam kemudian diinkubasi di dalam lemari pendingin selama 24 jam. Larutan tersebut disaring dengan *glass wool*, filtratnya ditambah akuades steril dingin dan dinetralkan dengan 10 N NaOH sampai pH 7,0. Larutan disentrifugasi dengan kecepatan 7,780 g selama 10 menit dan endapannya diambil. Endapan dibilas dengan akuades steril dan disentrifugasi lagi dengan kecepatan 7,780 g selama 10 menit. Endapan yang berupa koloidal kitin disimpan di dalam lemari pendingin (Widhyastuti, 2007).

Media Seleksi. Media kitin agar (koloidal kitin 1%, pepton 0,1%, KH_2PO_4 0,1%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,05%, agar 2%) digunakan untuk menyeleksi bakteri murni yang dapat merombak kitin dituangkan dalam cawan petri. Inkubasi dilakukan pada suhu kamar selama 3 hari. Hasil pengujian secara kualitatif menunjukkan bahwa isolat yang memiliki aktivitas kitinase ditandai dengan adanya zona bening disekitar koloni.

Media kultur bakteri. Isolat yang menghasilkan aktivitas kitinase tertinggi dengan waktu inkubasi tertentu yang dipakai untuk perlakuan selanjutnya. Dalam perlakuan selanjutnya menginokulasikan mikroba dalam media kultur bakteri Luria Bertani (pepton 1%, ekstrak ragi 0,5%, dan NaCl 0,1%) pada pH 7,2 diinkubasi selama 1 hari pada suhu kamar di atas pengocok *double shaker* NR-150 dengan kecepatan 120 rpm (Mahata et al., 2008). Sebanyak 0,5 ml dipipet masing-masing dimasukkan ke dalam 25 ml media cair kitin 1% dengan variasi pH bufer (pH 3-9). Larutan bufer yang digunakan adalah 0,05 M bufer asetat (pH 3, 4, 5), 0,05 M bufer fosfat (pH 5, 6, 7, 8), pH 7 dalam aquades dan 0,05 M bufer tris- HCl (pH 8, 9).

Produksi Kitinase. Produksi inokulum dilakukan dengan cara bakteri ditumbuhkan pada media agar miring NA, diinkubasi pada suhu kamar sampai berumur 3 hari. Selanjutnya ditambahkan akuades steril. Suspensi mikroba bakteri diukur kerapatan optiknya (OD) dengan spektrofotometer pada λ 600 nm sampai OD mencapai 0,5. Produksi kitinase dilakukan dengan menginokulasikan inokulum ke dalam 25 ml media produksi (koloidal kitin 1%, pepton 0,1%, KH_2PO_4 0,1%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,05%) dengan pH 7 dan diinkubasi pada suhu kamar selama 1-7 hari di atas pengocok dengan kecepatan 120 rpm. Setiap hari dilakukan pengambilan sampel sebanyak 2 ml dan dipisahkan filtrat dan endapannya, disentrifugasi dengan kecepatan 10.160 g selama 5 menit. Filtrat digunakan sebagai larutan enzim dan diuji aktivitas kitinasenya.

Pengujian Aktivitas Kitinase. Aktivitas kitinase diuji dengan mengukur kadar gula amino sebagai produk hidrolisis kitin oleh kitinase. Konsentrasi gula amino diukur menggunakan Metode Reissig (1955). Senyawa *N*-asetil glukosamin (GlcNAc) digunakan sebagai standar untuk penghitungan aktivitas kitinase. Satu unit kitinase adalah banyaknya enzim yang dapat menghasilkan 1 μmol *N*-asetil glukosamin dari substrat

Tabel 1. Lokasi, waktu pengambilan sampel dan parameter lingkungan

Sumber sampel	Ketinggian (m)	Tekanan (mbar)	Temperatur (°C)	Koordinat	Nama lokasi	Keterangan detail sampel
Air embun	2786	732	11	07°54.239S 112°57.081E	Ds. Penanjakan, Kec. Tosari Kab. Pasuruan	Embun yang menggantung diujung daun cemara
Air tanah	2757	739	13	07°54.187S 112°57.018E	Ds. Penanjakan, Kec. Tosari Kab. Pasuruan	Sumber air pegunungan
Air tanah	2241	781	22	07°55.333S 112°57.829E	Dsn. Cemoro Lawang, Ds. Ngadisari, Kec Sukapura Kab. Probolinggo	Air kran Hotel Cemara Indah yang berasal dari sumber air tanah
Air tanah	1215	879	26	07°54.740S 113°02.189E	Ds Sapi kerep, Kec. Sukapura, Kab. Probolinggo	Air kran rumah penduduk yang berasal dari sumber air tanah

koloidal kitin per menit pada suhu 50°C, pH 7,0. Larutan kitinase yang menghasilkan GlcNAc terlalu tinggi diencerkan terlebih dahulu dan faktor pengenceran digunakan dalam perhitungan aktivitasnya. Sebanyak 0,5 ml larutan enzim direaksikan dengan 0,5 ml substrat koloidal kitin 1% dengan pH 7 dan diinkubasi pada suhu 50°C selama 30 menit. Reaksi enzimatik dihentikan dengan memasukkan campuran ke dalam air mendidih selama 5 menit. Selanjutnya disentrifugasi dengan kecepatan 10.160 g selama 5 menit dan filtrat dipisahkan dari endapan. Sebanyak 250 µl filtrat ditambah 50 µl potasium tetraborat, dididihkan selama 3 menit dan didinginkan dengan segera. Ditambahkan 1,25 ml reagen 4-(dimetilamino)benzaldehida (DMAB), diinkubasi pada suhu 37°C selama 20 menit dan OD dibaca dengan spektrofotometer pada λ 584 nm.

Media produksi dengan variasi pH substrat koloidal kitin 1%. Produksi kitinase dilakukan dengan menginokulasikan isolat dengan nilai kerapatan optik tertinggi ke dalam 10 ml media produksi (koloidal kitin 1%, pepton 0,1%, KH₂PO₄ 0,1%, MgSO₄·7H₂O 0,05%) dengan pH 7 dalam aquades dan diinkubasi pada suhu kamar selama 1 hari di atas pengocok dengan kecepatan 120 rpm. Sampel sebanyak 2 ml setelah diinkubasi 1 hari lalu dipisahkan filtrat dan endapannya, disentrifugasi dengan kecepatan 10.160 g selama 5 menit. Filtrat digunakan sebagai larutan enzim dan diuji aktivitas kitinasenya dengan variasi pH substrat. Sebanyak 0,5 ml larutan enzim direaksikan dengan 0,5 ml substrat koloidal kitin 1% dengan variasi pH substrat bufer (pH 3-9). Larutan bufer yang digunakan adalah 0,05 M bufer asetat (pH 3, 4, 5), 0,05 M bufer fosfat (pH 5, 6, 7, 8), dan 0,05 M bufer tris- HCl (pH 8, 9).

Karakterisasi dan identifikasi isolat penghasil enzim kitinase. Isolat penghasil kitinase dikarakterisasi secara fenotipik dan molekuler. Karakterisasi fenotipik meliputi pengamatan morfologi sel dan koloni, karakter fisiologis karakter fenotipik dilakukan dengan metode *profile matching* yang mengacu pada *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (Don & Brenner *et al.*, 2003). Karakteristik molekuler dilakukan berdasarkan sekuen 16S rDNA dengan primer 9F (5'-GAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') dan 1510R (5'-GGCTACCTTGTTACGACTT-3').

Amplifikasi 16S rDNA. DNA isolat bakteri diisolasi menggunakan *Wizard Genomic DNA Purification Kit* (Promega). Amplifikasi 16S rDNA menggunakan metode

PCR dengan primer universal yaitu 9F dan 1510R. Reaksi PCR menggunakan *Thermalcycler* (Takara, Shuzo, Co. Ltd.) sebagai berikut : denaturasi 95°C selama 3 menit, dilanjutkan 30 siklus yang terdiri dari denaturasi 95°C selama 30 detik, peretakan 50°C selama 30 detik, pemanjangan 72°C selama 90 detik. Pemanjangan akhir 72°C selama 7 menit. Hasil produk PCR dipurifikasi, dilanjutkan dengan cyclesekuensing dengan *template* 9 F dan 1510R. Hasil cyclesekuensing dipurifikasi dan dilanjutkan dengan sekuensing di *Genetic analyzer* ABI 3130. Hasil sekuensing dicek dan diedit/*trimming* menggunakan program *Bioedit*. Fasta yang diperoleh disambungkan menggunakan program *Clustal X*. Hasil penyambungan (*alignment*) di *Blast* di gen Bank NCBI.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Dari sampel air embun dan air tanah yang diisolasi, didapat sebanyak 47 isolat bakteri murni. Hanya dua isolat yang positif dapat merombak kitin yaitu sampel air tanah dari Kabupaten Pasuruan B2-4 dan air tanah NA S4-1 dari Kabupaten Probolinggo (Tabel 2). Setiap isolat murni dipelihara dalam media miring Nutrient Agar.

Hasil pengujian secara kualitatif menunjukkan bahwa sebanyak 2 isolat memiliki aktivitas kitinase, yang ditandai dengan adanya zona bening disekitar koloni (Gambar 1). Mikroba yang dapat mensekresikan enzim-enzim kitinolitik ekstraseluler akan membentuk areal bening pada media padat yang mengandung kitin (Priest, 1984). Menurut Faath (1994) perbedaan laju degradasi kitin dapat ditunjukkan dengan penampakan areal bening di sekeliling koloni pada agar yang mengandung kitin. Selanjutnya isolat-isolat yang menunjukkan positif aktivitas kitinase secara kualitatif diukur secara semi-kuantitatif dengan cara membandingkan diameter zona bening disekitar koloni dengan diameter koloni.



Gambar 1. Zona bening dari bakteri B2-4 (kiri) dan NA S4-1 (kanan) perombak kitin

Tabel 2. Jenis-jenis bakteri yang disolasi dari Gunung Bromo Jawa Timur dan kemampuan kitinasenya

No.	Nama sampel	Isolat	Uji Kitinase
1	1. Air embun. Ds.	NA S1/1	-
2	Penanjakan, Kec. Tosari	NA S1/2	-
3	Kab. Pasuruan. 2786 m	NA S1/4	-
4	dpl.	1/10NA S1/1	-
5		1/10NA S1/2	-
6		1/10NA S1/3	-
7	2. Air tanah. Ds.	NA S2/1	-
8	Penanjakan, Kec. Tosari	NA S2/2	-
9	Kab. Pasuruan. 2757	NA S2/3	-
10		NA S2/4	-
11		NA S2/5	-
12		NA S2/6	-
13		NA S2/7	-
14		NA S2/8	-
15		NA S2/10	-
16		B2-4	+++
17		B2-6	-
18		B2-7	-
19		1/10NA S2/4	-
20		1/10NA S2/5	-
21		1/10NA S2/6	-
22		1/10NA S2/9	-
23		1/10NA S2/11	-
24	3. Air tanah. Dsn. Cemoro	NA S3/1	-
25	Lawang, Ds. Ngadisari,	NA S3/2	-
26	Kec Sukapura Kab.	NA S3/4	-
27	Probolinggo. 2241 m dpl.	NA S3/5	-
28		NA S3/6	-
29		NA S3/7	-
30		NA S3/8	-
31		NA S3/9	-
32		NA S3/10	-
33		B3-1	-
34		B3-5	-
35		B3-7	-
36		1/10NA S3/1	-
37		1/10NA S3/2	-
38		1/10NA S3/3	-
39		1/10NA S3/4	-
40		1/10NA S3/5	-
41	4. Air tanah. Ds. Sapi	NA S4-1	+++
42	kerep, Kec. Sukapura,	NA S4-2	-
43	Kab. Probolinggo. 1215 m	1/10 NA S4/1	-
44	dpl.	1/10 NA S4/2	-
45		1/10 NA S4/3	-
46		1/10 NA S4/4	-
47		1/10 NA S4/5	-

Keterangan: - tidak dapat mendegradasi kitin, +++ dapat mendegradasi kitin dengan baik

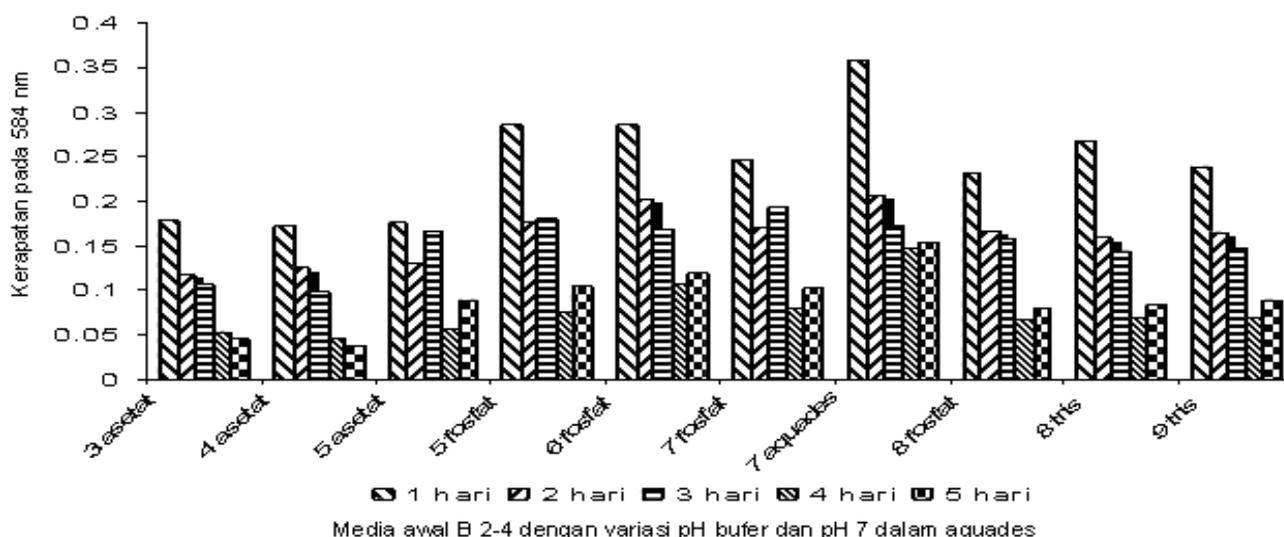
Hasil penghitungan secara semi-kuantitatif menunjukkan terdapat dua isolat memiliki diameter zona bening dengan nilai lebih besar dan sama dengan 2. Hasil bagi antara diameter zona bening dan diameter koloni dinyatakan sebagai aktivitas enzim secara nisbi, sedangkan isolat negatif yaitu isolat yang tidak dapat merombak kitin ada 45 isolat.

Kemampuan dari masing-masing isolat bervariasi sesuai dengan isolatnya. Selanjutnya isolat dengan aktivitas nisbi sama dan lebih besar dengan 2 diuji kemampuan kitinasenya secara kuantitatif. Konsentrasi koloidal kitin yang digunakan untuk penapisan isolat dengan memperlihatkan zona bening yang jelas di sekitar koloni biasanya mengandung sekitar koloidal

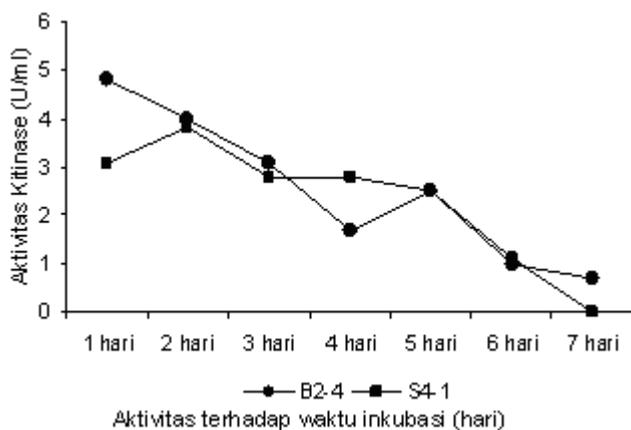
kitin 1%. Menurut Hsu, (1975) zona bening paling jelas terlihat pada media agar kitin yang mengandung koloidal kitin 0,4%, pada konsentrasi koloidal kitin yang lebih rendah (0,1-0,2%) tidak ada penampakan zona bening dan pada konsentrasi yang lebih tinggi atau 1-2% zona bening yang dihasilkan terlihat agak kabur. Monreal, (1968) menggunakan agar kitin dengan "double layer" untuk penapisan bakteri penghasil kitinase, dan pada lapisan bawah digunakan media mengandung ekstrak ragi 0,5% dan agar 2%, dan yang bagian atas media mengandung koloidal kitin 1%. Secara keseluruhan seleksi secara kualitatif isolat penghasil kitinase yang dilakukan dalam penelitian ini menunjukkan hasil yang baik dan jelas.

Isolat yang dapat mendegradasi kitin ditumbuhkan pada media kultur bakteri Luria Bertani (pepton 1%, ekstrak ragi 0,5%, dan NaCl 0,1%) pada pH 7,2 diinkubasi selama 1 hari pada suhu kamar di atas pengocok dengan kecepatan 120 rpm (Mahata *et al.*, 2008). Pada bakteri B2-4 lebih cepat dan lebih tinggi kerapatan optiknya diukur pada spektrofotometer dengan λ 584 nm dibandingkan dengan NA S4-1 (Gambar 2 dan Gambar 3). Pada Gambar 2 dapat dilihat kerapatan optik tertinggi B2-4 didapat dari perlakuan media awal pH 7 dalam aquades dengan waktu inkubasi 1 hari yaitu sebesar 0,358. Sedangkan isolat NA S4-1 kerapatan optik tertinggi didapat dari perlakuan media awal pH 7 dalam aquades dengan waktu inkubasi 2 hari yaitu sebesar 0,286, lebih kecil dari isolat B2-4. Derajat keasaman (pH) media berpengaruh terhadap pertumbuhan dan produksi enzim dan enzim memiliki pH optimum yang khas, yaitu pH yang menyebabkan aktivitas maksimal. Tetapi pH optimum enzim tidak perlu sama dengan pH lingkungan normalnya, dengan pH yang mungkin sedikit berada di atas atau di bawah pH optimum (Lehninger, 1988). Menurut Fresht, 1985 bahwa setiap enzim memiliki kisaran pH optimum yaitu kisaran pH dimana enzim menunjukkan aktivitas maksimum dengan stabilitas yang tinggi.

Kondisi media awal pH 7 dalam aquades yang dipakai pada penelitian selanjutnya dengan perlakuan berbagai variasi waktu inkubasi dari 1-7 hari (Gambar 3). Metode Reissig (1955) digunakan untuk mendeteksi gula asetilamino. Reaksi antara gula amino dengan potasium tetraborat dalam konsidi alkali dan pemanasan menghasilkan senyawa intermediat asetil heksosamine. Dapat dilihat aktivitas tertinggi didapat



Gambar 2. Kerapatan optik B2-4 pada media awal dengan variasi pH dalam bufer dan pH 7 dalam aquades



Gambar 3. Aktivitas kitinase B2-4 dan NA S4-1 terhadap waktu inkubasi

dari isolat bakteri B2-4 dengan waktu inkubasi 1 hari sebesar $4,8 \times 10^{-3}$ U/ml dan NA S4-1 dengan waktu inkubasi 2 hari sebesar $3,1 \times 10^{-3}$ U/ml. Hasil ini masih lebih kecil kalau dibandingkan dengan aktivitas hasil dari bakteri isolat 99 dan *Enterobacter* sp. G-1 (Mahata *et al.*, 2008) dan dari *Aspergillus rugulosus* 501 (Widhyastuti, 2007). Kalau melihat dari hasil foto dan penghitungan secara semikuantitatif aktinomisetes BB 3.2 (Soeka, 2009) hampir sama, tetapi aktivitas kitinase B2-4 dan NA S4-1 hasilnya sangat kecil. Ada kemungkinan media kultur bakteri Luria Bertani (Mahata *et al.*, 2008) kurang/tidak cocok, untuk penelitian selanjutnya harus dicoba dengan media lain. Dapat dilihat setelah hari pertama untuk B2-4 dan setelah hari kedua untuk NA S4-1 aktivitas kitinasenya terus menurun hal ini dimungkinkan terjadinya kenaikan aktivitas enzim dengan inkubasi dalam waktu jam tidak hari lagi. Jika keadaan baik, hampir semua bakteri mampu berkembang biak dengan amat cepat. Lamanya

dapat satu jam hingga beberapa hari. Lama waktu ini tergantung pada macam bakteri, umur biakan, dan nutrisi yang terdapat dalam media yang disediakan Mikroorganisme mempunyai masa pertumbuhan yang bervariasi dimana dalam aktivitas metabolisme tersebut mikroorganisme memiliki beberapa fase dalam pertumbuhannya. Pada awal pertumbuhan fase yang dilalui adalah fase pertumbuhan kemudian aktivitas metabolisme akan menurun setelah mikroorganisme melewati fase puncak pertumbuhannya. Fase-fase pertumbuhan tersebut sangat berpengaruh terhadap enzim yang dihasilkan oleh mikroorganisme untuk membantu pencernaan makanannya (Volk & Wheeler, 1988).

Laju reaksi bergantung pada kondisi larutan dan konsentrasi substrat. Kondisi-kondisi yang menyebabkan denaturasi protein seperti temperatur tinggi, konsentrasi garam yang tinggi, dan nilai pH yang terlalu tinggi atau terlalu rendah akan menghilangkan aktivitas enzim. Sedangkan peningkatan konsentrasi substrat cenderung meningkatkan aktivitasnya. Untuk menentukan kelajuan maksimum suatu reaksi enzimatik, konsentrasi substrat ditingkatkan sampai laju pembentukan produk yang terpantau menjadi konstan. Konsentrasi ion hidrogen (yaitu keasaman atau kebasaaan) larutan sangat mempengaruhi aktivitas suatu enzim. Hal ini disebabkan karena asam amino yang merupakan pusat aktif enzim harus berada dalam keadaan ionisasi yang tepat agar menjadi aktif. Kebanyakan enzim menunjukkan aktivitas maksimum pada kisaran netral, pH 6 sampai 8. Pengaruh pH terhadap suatu enzim bervariasi tergantung jenisnya.

Ada enzim yang bekerja secara optimal pada kondisi asam. Ada juga yang bekerja secara optimal pada kondisi basa. Untuk setiap enzim kita dapat memastikan pH minimum, maksimum, dan optimum (Volk & Wheeler, 1988). Hasil penelitian ini sesuai dengan hasil penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Yurnaliza *et al.*, (2008) mengatakan beberapa penelitian enzim menunjukkan bahwa pH berada pada kisaran netral dapat meningkatkan pertumbuhan mikroba dan kemampuannya mensintesis kitinase. Menurut Webb dan Dixon (1979), peningkatan aktivitas enzim pada pH optimum dapat dihubungkan dengan adanya perubahan ionisasi dalam gugus ionik enzim pada sisi aktif sehingga konformasi sisi aktif menjadi lebih efektif dalam mengikat dan mengubah substrat menjadi produk.

Selanjutnya isolat B2-4 dianalisa aktivitas kitinasenya dengan variasi pH (3-9) substrat kitin 1%, dapat dilihat dalam Gambar 3, didapat aktivitas tertinggi pada pH 8 fosfat sebesar $17,54 \times 10^{-2}$ U/ml. Hasil ini masih lebih besar dari hasil penelitiannya Nasran, *et al.*, (2003) aktivitas kitinase dari *Vibrio harveyi* pada pH 8 dengan masa inkubasi 5 hari mencapai $6,0 \times 10^{-5}$ U/ml. Dan sesuai dengan penelitian dari Rochima (2006) *Bacillus papandayan* asal Kawah Kamojang mempunyai pH optimum pada pH 8. Dengan pH 8 berarti bersifat alkali. Kebanyakan bakteri hidup paling baik pada keadaan sekitar netral (pH 7) karena itu sebelum digunakan, kebanyakan medium disesuaikan pada pH sekitar 7. Hanya sedikit bakteri

hidup dalam lingkungan ekstrim kisaran pH (misalnya 8-9), oleh karena itu pH harus disesuaikan dengan jenis yang ditumbuhkan. Konsentrasi ion hidrogen (yaitu keasaman atau kebasaan) larutan sangat mempengaruhi aktivitas suatu enzim. Hal ini disebabkan karena asam amino yang merupakan pusat aktif enzim harus berada dalam keadaan ionisasi yang tepat agar menjadi aktif. Kebanyakan enzim menunjukkan aktivitas maksimum pada kisaran netral, pH 6 sampai 8 (Volk & Wheeler, 1988).

Berdasarkan hasil identifikasi isolat tingkat spesies dengan metode molekuler 16S rDNA diketahui bahwa isolat B2-4 dan NA S4-1 adalah *Stenotrophomonas* sp. (Tabel 3). *Stenotrophomonas* adalah spesies termasuk genus *Stenotrophomonas*, keluarga *Xanthomonadaceae*, Order *Xanthomonadales*, kelas *Gammaproteobacteria* dan *phylum Proteobacteria*. Hasil ini didukung analisis karakter morfologi dan fisiologi dan ternyata sesuai dengan yang disebutkan dalam *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Second ed.* Springer.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa dari 48 isolat yang mempunyai kapasitas dapat merombak kitin menjadi kitinase adalah 2 isolat B2-4 dan NA S4-1. Isolat B2-4 mempunyai aktivitas kitinase tertinggi sebesar $4,8 \cdot 10^{-3}$ U/ml dengan waktu inkubasi 1 hari dan NA S4-1 mempunyai aktivitas kitinase tertinggi sebesar $3,1 \times 10^{-3}$ U/ml dengan waktu inkubasi

Tabel 3. Kecocokan profil analisa karakter morfologi dan fisiologi isolat B2-4 dan NA S4-1 penghasil kitinase dengan genus acuan berdasarkan *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (Don J. Brenner *et al.* 2003)

Unit Karakter	Species <i>stenotrophomonas</i> dalam <i>bergey's manual of systematic bacteriology</i>		
	<i>manual of systematic bacteriology</i>	NA B2-4	NA S4-1
Gram	negatif	negatif	negatif
Motilitas	tidak motil	tidak motil	tidak motil
Bentuk sel	batang	batang	batang
Ukuran sel (μm)	1	1	1
Bentuk koloni	bulat	bulat	bulat
Ukuran koloni (mm)	1-1,5	1-1,5	1-1,25
Tepi sel	rata	rata	rata
Elevasi	agak cembung	agak cembung	agak cembung
Permukaan	berkilap	berkilap	berkilap
Opasitas	tidak tembus cahaya	tidak tembus cahaya	tidak tembus cahaya
Warna	kekuning-kuningan	kekuning-kuningan	kekuning-kuningan
Motilitas	tidak motil	tidak motil	tidak motil
Kebutuhan O ₂	aerob	aerob	aerob
Tes oksidase	+	+	+
Tes peroksidase	+	+	+

2 hari masing-masing diproduksi pada media tumbuh cair dengan pH 7 dalam aquades. Isolat B2-4 mempunyai aktivitas kitinase tertinggi pada pH 8 fosfat substrat koloidal kitin 1% sebesar $17,54 \times 10^{-2}$ U/ml. Berdasarkan karakteristik molekular urutan parsial 16S rDNA dengan primer 9F dan 1510R kedua isolat diidentifikasi sebagai anggota *Stenotrophomonas* sp.

UCAPAN TERIMA KASIH

Diucapkan terima kasih kepada Dra. Elidar Naiola atas bantuannya sehingga penelitian ini dapat terlaksana, serta kritik dan saran dalam penulisan makalah.

DAFTAR PUSTAKA

- Dephut. 2007. Taman Nasional Bromo Tengger Semeru. *Malang. www.dephut.go.id/INFORMASI/TN%20INDOENGLISH/tn_bromo.htm* (April 2007).
- Don, J., Brenner, Krieg, N.R. & Staley, J.T. 2003. The Proteobacteria, Part B The Gammaproteobacteria. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Second ed.* Springer.
- Faath, I. 1994. Isolation of Chitin Degrading Bacteria from Various Habitats. *Microbial Diversity*, Bonn.
- Fersht, A. 1985. *Enzyme Structure and Metabolism*, 2nd ed. Freeman, San Fransisco.
- Hsu, S.C. & Lockwood, J.L. 1975. Powdered chitin agar as a selective medium for enumeration of actinomycetes in water and soil. *Applied Microbiology* **29**: 422-426.
- Kobayashi, S., Kiyosada, T. & Shoda, S. 1997. A novel method for sintesis of chitobiose via enzymatic glycosylation using sugar oxazoline as glycosyl donor. *Tetrahedron Lett* **38**: 2111-2112.
- Lehninger, A.L. 1988. *Dasar-dasar Biokimia*. Jilid 1. Thenawijaya M. penerjemah Penerbit Erlangga, Jakarta. Terjemahan dari: *Principles of Biochemistry*.
- Mahata, M.E., Dharma, A., Ryanto, I. & Yose, R. 2008. Characterization of Extracellular Chitinase from Bacterial Isolate 99 and *Enterobacter* sp. G-1 from Matsue City, Japan. *Journal Mikrobiologi Indonesia* **2**: 34-38.
- Monreal, J. & Reese, E.T. 1968. The Chitinase of *Serea marcescens*. *Can. Journal Microbiol* **15**: 689-696.
- Nasran, S., Farida, A. & Ninoek, I. 2003. Produksi Kitinase dan Mitin Deasetilase dari *Vibrio harveyi*. *Journal Penelitian Perikanan Indonesia* **9(5)**: 33-38.
- Patil, R.S., Ghormade, V. & Despande, M.V. 2000. Chitinolytic Enzymes: an Exploration. *Enzyme and Microbial Technology* **26**: 473-483.
- Pelczar, M.J. & Chan, E.C.S. 2005. *Dasar-Dasar Mikrobiologi*. Ratna Siri Hadioetomo et al. Penerjemah. Penerbit UI Press 87.
- Priest, F.G. 1984. *Extracellular Enzymes* Van Nostrand Reinhold, England.
- Radzicka, A. & Wolfenden, R. 1995. "A proficient enzyme". *id.wikipedia.org/wiki/Enzim-Tembolok*. *Science* **6(267)**: 90-931.
- Rattanakit, N., Plikomol, A., Yano, S., Wakayama, M. & Tachiki, T. 2002. Utilization of Shrim Shellfish Waste a Substrate for Solid-State Cultivation of a Culture Based on Chitinase Formation Which is necessary for Chitin Assimilation. *Journal of Bioscience and Bioengineering* **93(6)**: 550-556.
- Rochima, E. 2006. Pemurnian dan Karakterisasi Kitin Deasetilase Termotabil dari *Bacillus papandayan* asal Kawah Kamojang Jawa Barat. *Journal Bionatura* **8(2)**: 193-209.
- Soeka, Y.S. 2009. Kondisi Optimum Produksi Kitinase dari Aktinomisetes dengan Karakterisasi pH dan Suhu Enzim. *Jurnal Berkala Penelitian Hayati*. Edisi Khusus **3C**: 57-61.
- Terayama, H., Takahashi, S. & Kuzuhara, H. 1993. Large-scale preparation of N, N-diacetylchitobiose by enzymic degradation of chitin and its chemical modification. *Journal Carbohydr. Chem* **12**: 81-93.
- Volk, W.A. & Wheeler, M.F. 1988. *Mikrobiologi Dasar*. Jilid 1. Soenartono Adisoemarto Editor. Penerbit Erlangga Jakarta. Terjemahan dari: *Basic Microbiology, fifth edition*.
- Webb, E.C. & Dixon, M. 1979. *Enzymes*. Academia Press, New York.
- Widhyastuti, N., Handayani R., Hastuti, A., Kasirah, Setianingrum, N., Manalu, J., Gita. & Saskiawan, I. 2006. Studi Potensi Aktinomisetes untuk Produksi Enzim Kitinase Guna Menunjang Industri Farmasi. *Laporan Teknik Pusat Penelitian Biologi-LIPI*.
- Widhyastuti, N. 2007. Produksi Kitinase Ekstraseluler *Aspergillus rugulosus* 501 secara Optimal pada Media Cair. *Jurnal Berita Biologi* **8(6)**: 547-553.
- Yurnaliza. 2008. Senyawa Khitin dan Kajian Aktivitas Enzim Mikrobial Pendegradasinya. *Digitized by USU digital library*. (24 November 2008).
- Yurnaliza, Margino, S. & Sembiring, L. 2008. Kondisi Optimum untuk Produksi Kitinase dari *Streptomyces* Rkt5 dan Karakterisasi pH dan Suhu Enzim. *Biota XIII* **3**: 169-174.