

PENGARUH PENAMBAHAN KITIN PADA MEDIUM PRODUKSI TERHADAP AKTIVITAS KITIN DEASETILASE DARI *Bacillus* K29-14

Yusro Nuri Fawzya, Ninoek Indriati dan Th. Dwi Suryaningrum¹⁾

ABSTRAK

Penelitian untuk mempelajari pengaruh kandungan kitin dalam medium produksi terhadap aktivitas enzim kitin deasetilase telah dilakukan. Sebagai penghasil enzim digunakan bakteri termofilik *Bacillus* K29-14, sedangkan kitin yang digunakan sebagai komponen dalam medium adalah kitin limbah udang buatan lokal, terdiri dari kitin kepala udang dari Cirebon, kitin kulit punggung udang dari Cirebon dan kitin limbah udang (berupa campuran kulit punggung dan kepala udang) dari Sidoarjo. Enzim kitin deasetilase yang dihasilkan dari fermentasi *Bacillus* K29-14 pada medium yang mengandung kitin, merupakan filtrat hasil sentrifugasi larutan fermentasi. Hasil fermentasi *Bacillus* K29-14 pada medium yang mengandung kitin kepala udang dengan konsentrasi 0, 1, 2 dan 3% selama 24, 48 dan 72 jam pada suhu 55°C menunjukkan bahwa aktivitas enzim tertinggi dihasilkan dari perlakuan konsentrasi kitin 2% selama 48 jam, yaitu sebesar 25,49 mU/ml. Sedangkan berdasarkan jenis kitin di dalam medium produksi kitindeasetilase, aktivitas enzim tertinggi dihasilkan oleh perlakuan medium produksi yang mengandung kitin kulit punggung udang sebesar 2% pada fermentasi selama 72 jam. Aktivitas enzim kitin deasetilase yang dihasilkan sebesar 87,39 mU/ml, dengan kadar protein 4,43 mg/ml dan aktivitas spesifik enzim sebesar 19,73 mU/mg.

ABSTRACT : *Activity of chitin deacetylase from Bacillus K29-14 in the chitin containing medium. By: Yusro Nuri Fawzya, Ninoek Indriati and Th. Dwi Suryaningrum*

Research on the effect of chitin added to the medium in the production of chitin deacetylase on the enzyme activity has been carried out. A thermophilic Bacillus K29-14 was used as the source of the chitin deacetylase, whereas three kinds of local chitin added to the medium were head shrimp-chitin as well as shell shrimp-chitin obtained from Cirebon and shrimp waste chitin that was processed using mixed of head and shell shrimp and was purchased from Sidoarjo. Chitin deacetylase produced from fermentation of Bacillus K29-14 in chitin containing medium was filtrate of fermentation solution separated by centrifugation. Fermentation of Bacillus K29-14 in production medium containing of 0, 1, 2 and 3% head shrimp-chitin at 55°C for 24, 48 and 72 hours showed that the highest enzyme activity was produced from the treatment of 2% chitin for 48 hours fermentation, i.e. 25.49 mU/ml. On the other hand, based on the type of chitin contained in the production medium, enzyme with highest activity was produced by medium containing 2% of shell shrimp-chitin for 72 hours fermentation. The enzyme activity was 87.39 mU/ml, while the protein content and the specific activity of enzyme were 4.43 mg/ml and 19.73 mU/mg respectively.

KEYWORDS: *chitin deacetylase, Bacillus K29-14, chitin containing medium.*

PENDAHULUAN

Kitin deasetilase (CDA : EC 3.5.1.41) adalah enzim hidrolase yang mengkatalisis reaksi hidrolisis ikatan N-asetamida dalam kitin yang menghasilkan molekul kitin yang hilang gugus asetilnya (terdeasetilasi). Kitin yang mengalami deasetilasi sekitar 55 sampai dengan 100% disebut sebagai kitosan (Il'ina *et al.*, 2001 dalam Wibowo, 2003). Enzim kitindeasetilase dapat diperoleh dari kapang seperti *Mucor rouxii* (Kafetzopoulos *et al.*, 1993, 1994; Martinou *et al.*, 1995), *Absidia coerulea* (Gao *et al.*, 1995), *Aspergillus nidulans* (Alfonso *et al.*, 1995),

Colletotrichum lindemuthianum (Tsigos *et al.*, 1995) atau bakteri seperti *Vibrio alginolyticus* (Ohishi, *et al.*, 1997), *Bacillus* K29-14 (Rahayu, 2000), *Vibrio harveyi* (Heruwati *et al.*, 2002).

Kitin deasetilase merupakan salah satu enzim yang bersifat kitinolitik. Sejak sekitar dasawarsa terakhir, eksplorasi enzim-enzim kitinolitik seperti kitinase, kitin deasetilase dan kitosanase, terutama yang berasal dari mikroba, banyak dilakukan untuk menghasilkan kitosan maupun bentuk oligomernya. Teknik produksi kitosan secara enzimatik tersebut merupakan alternatif dari teknik ekstraksi kitosan

¹⁾ Peneliti pada Pusat Riset Pengolahan Produk dan Sosial Ekonomi Kelautan dan Perikanan

secara kimiawi yang selama ini banyak dilakukan dan dinilai kurang ramah lingkungan karena menghasilkan limbah yang mengandung basa kuat (Martinou *et al.*, 1995)

Bacillus K29-14 adalah bakteri termofilik yang diisolasi dari kawah gunung Kamojang, Jawa Barat. Bakteri ini menghasilkan enzim kitinolitik dengan indeks kitinolitik (suatu nilai yang menunjukkan kemampuan enzim untuk menghidrolisis medium padat yang mengandung kitin) mencapai 5,0 dan tumbuh optimum pada pH 7,0 dan suhu 55°C (Tanuwijaya, 1999). Rahayu (2000) melaporkan bahwa enzim kitinase dan kitin deasetilase yang dihasilkan oleh bakteri ini mempunyai pH optimum masing-masing adalah 7,0 dan 8,0, sedangkan suhu optimum kedua jenis enzim adalah sama yaitu 55°C. Untuk mengetahui efektifitas enzim kitin deasetilase dari *Bacillus* K29-14 dalam proses deasetilasi kitin, telah dilakukan ekstraksi dan uji aplikasi enzim untuk menghidrolisis kitin menjadi kitosan (Heruwati *et al.*, 2002; Fawzya *et al.*, 2003). Dilaporkan bahwa enzim kitin deasetilase yang dihasilkan oleh *Bacillus* K29-14 mempunyai aktivitas enzim 0,0052 U/ml dan belum cukup efektif untuk menghidrolisis kitin menjadi kitosan.

Salah satu upaya untuk meningkatkan aktivitas enzim adalah dengan menambahkan *inducer* ke dalam medium sintetik minimal yang digunakan dalam ekstraksi enzim. Penggunaan koloidal kitin dan kompos sebagai komponen medium mampu meningkatkan pertumbuhan dan aktivitas enzim endokitinase dari *Bacillus* MH-1 (Sakai *et al.*, 1998). Aktivitas enzim tertinggi dihasilkan oleh medium yang mengandung koloidal kitin dan kompos masing-masing 0,5%. Sementara itu Oh *et al.* (2000) melaporkan bahwa *Pseudomonas aeruginosa* K-187 menghasilkan enzim protease dengan aktivitas tertinggi apabila diproduksi dengan menggunakan medium yang mengandung tepung limbah udang dan rajungan sebesar 5%.

Riset ini dimaksudkan untuk mempelajari pengaruh penambahan kitin ke dalam medium sintetik minimal yang mengandung koloidal kitin pada proses produksi enzim kitin deasetilase terhadap aktivitas enzim yang dihasilkan. Diduga bahwa jenis dan konsentrasi kitin yang berbeda memberikan pengaruh yang berbeda terhadap aktivitas enzim yang dihasilkan.

BAHAN DAN METODE

Bahan

Bahan yang digunakan dalam riset ini adalah bakteri *Bacillus* K29-14 yang diperoleh dari

Laboratorium Mikrobiologi dan Biokimia PAU, IPB – Bogor. Bakteri penghasil enzim kitinolitik ini adalah bakteri termofilik yang diisolasi dari kawah gunung Kamojang, Jawa Barat, tumbuh optimum pada pH 7,0 dan suhu 55°C (Tanuwijaya, 1999). Enzim kitinase dan kitin deasetilase yang dihasilkan mempunyai pH optimum masing-masing adalah 7,0 dan 8,0 (Rahayu, 2000). Kultur yang digunakan berumur lebih kurang 1 tahun sejak didapatkan dan disimpan dalam medium padat yang mengandung kitin serta dikemas rapat dalam aluminium foil di lemari pendingin suhu sekitar 4°C. Sebagian kultur juga disimpan dalam gliserol 40% untuk stok.

Bahan lain yang digunakan adalah kitin limbah rajungan (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) untuk pembuatan koloidal kitin. Selain itu digunakan tiga jenis kitin limbah udang lokal terdiri dari kitin yang berasal dari Cirebon dan Sidoarjo. Kitin dari Cirebon terdiri atas 2 jenis, yaitu kitin kepala udang dan kitin kulit punggung udang, sedangkan kitin dari Sidoarjo adalah campuran antara kitin kepala dan kulit punggung udang. Media untuk kultivasi dan produksi enzim antara lain adalah *yeast extract* (Oxoid Ltd., Basingstoke, Hampshire, England), *bacto agar* dan *bacto tryptone* (Difco, Detroit, MI, USA). Bahan-bahan kimia untuk analisis aktivitas enzim meliputi glikol kitosan (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) dan berbagai garam anorganik dan pelarut (Merck, Darmstadt, Jerman). Untuk analisis protein digunakan antara lain *bovine serum albumin/BSA* (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) dan bahan kimia lainnya (Merck, Darmstadt, Jerman).

Metode

Penelitian dilakukan dalam 2 tahap : (1) penentuan konsentrasi kitin optimum (ulangan 2 kali), (2) penentuan jenis kitin yang ditambahkan ke dalam medium produksi (ulangan 3 kali). Kitin yang digunakan sebagai komponen medium dalam tahap (1) adalah kitin limbah rajungan (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) dalam bentuk koloidal kitin dan kitin kepala udang dalam bentuk tepung kitin, sedangkan dalam tahap (2) digunakan tiga jenis kitin (kitin kepala udang, kitin kulit punggung udang dan kitin campuran kepala dan kulit punggung udang) selain koloidal kitin. Beberapa tahap preparasi yang diperlukan untuk produksi enzim kitin deasetilase dan analisis aktivitas enzimnya, meliputi:

Pembuatan Koloidal Kitin

Koloidal kitin merupakan turunan kitin yang bersifat amorf dengan kerapatan polimer lebih rendah, sehingga lebih mudah dihidrolisis oleh enzim. Koloidal kitin sebagai salah satu komponen medium untuk

ekstraksi enzim (digunakan sebagai *inducer*) dibuat berdasarkan metode Arnold & Solomon (1986) melalui tahapan sebagai berikut : sebanyak 10 gram kitin dimasukkan ke dalam 200 ml HCl pekat (37%). Campuran didiamkan dalam keadaan tertutup selama 1 malam pada suhu 4°C, kemudian disaring menggunakan *glasswool*. Filtrat yang diperoleh ditambah dengan 100 ml akuades dingin dan dinetralkan dengan NaOH 12N (\pm 200 ml). Selanjutnya disentrifugasi (Beckman J2-21, USA) pada 8000 rpm, 4°C selama 20 menit. Supernatan dibuang, endapan ditambah akuades dingin dan diaduk untuk melarutkan sisa garam, kemudian disentrifugasi pada 8000 rpm, 4°C selama 20 menit. Pelet yang diperoleh adalah koloidal kitin yang siap untuk digunakan lebih lanjut.

Produksi Enzim Kitin Deasetilase

Produksi enzim dilakukan menggunakan medium cair yang mengandung koloidal kitin 0,5% dan kitin (dalam bentuk tepung kitin) sesuai perlakuan; K₂HPO₄ 0,1%; MgSO₄·7H₂O 0,01%; NaCl 0,1%; ammonium sulfat 0,7%, *yeast extract* 0,05% dan *bacto tryptone* 0,1%, dengan pH akhir medium 7,0 (Sakai *et al.*, 1998). Kultur murni *Bacillus* K29-14 pada media padat (komposisi sama dengan medium cair, kecuali koloidal kitin 2,0% ditambah agar 1,5%) sebanyak seperempat bagian cawan petri diinokulasikan ke dalam 50 ml medium cair untuk starter dan diinkubasikan dalam *shaking bath* (Grant SS40D, Barrington, England) selama 24 jam pada suhu 55°C, 180 rpm. Starter sebanyak 7,5% dimasukkan ke dalam medium produksi kemudian diinkubasikan dalam *shaking bath* pada suhu 55°C, 180 rpm selama 24, 48 dan 72 jam. Selanjutnya dilakukan sentrifugasi pada kecepatan 8000 rpm, suhu 4°C selama 20 menit. Enzim kasar berupa filtrat kemudian diuji kadar proteinnya (Lowry *et al.*, 1951 *di dalam* Bollag & Edelstein, 1990) dan aktivitas enzimnya (Tokuyasu *et al.*, 1996).

Pembuatan Glikol Kitin

Glikol kitin digunakan sebagai substrat dalam pengujian aktivitas enzim kitin deasetilase. Pembuatan glikol kitin didasarkan atas metode Trudel & Asselin (1989) sebagai berikut :

Satu gram glikol kitosan dilarutkan dalam 20 ml asam asetat 10% dan dibiarkan dalam suhu ruang selama 24 jam. Ke dalam larutan kemudian ditambahkan 100 ml metanol absolut secara perlahan lalu disaring dengan kertas Whatman no. 41 sambil divakum. Ke dalam filtrat ditambahkan 1,5 ml asetat anhidrat (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) sambil diaduk perlahan menggunakan *magnetic stirrer* dan dibiarkan sekitar 10 menit pada suhu

ruang. Saat terbentuk gel, ditambahkan 150 ml metanol absolut kemudian dihomogenisasi menggunakan blender tangan. Sentrifugasi dilakukan pada 7000 rpm, 4°C selama 15 menit. Ke dalam pelet (endapan) ditambahkan 100-150 ml metanol dan dilakukan homogenisasi lagi, serta dilanjutkan dengan sentrifugasi. Pellet ditambah 100 ml 0,02% sodium azide dan diaduk lagi menggunakan *magnetic stirrer* selama 4 menit. Larutan adalah 1% (b/v) glikol kitin.

Pengamatan

Pengamatan yang dilakukan terhadap enzim kasar meliputi aktivitas enzim kitin deasetilase (Touyasu *et al.*, 1996), kadar protein (Lowry *et al.*, 1951 *di dalam* Bollag & Edelstein, 1990) dan perhitungan aktivitas enzim spesifiknya. Sebagai data dukung, juga dilakukan pengamatan pertumbuhan sel selama produksi enzim melalui pengukuran OD_{660nm} medium sebelum dilakukan pemisahan larutan enzim dengan biomassa, menggunakan spektrofotometer UV 1201 (Shimadzu, Kyoto, Japan) (Ohishi *et al.*, 1997; Wang & Chang, 1997) serta pengamatan terhadap kitin yang digunakan, meliputi kadar air, kadar abu, N total (AOAC, 1980) dan derajat deasetilasi dengan metode spektroskopi infra merah (Sabnis & Block, 1997) menggunakan Fourier Transform Infra Red spectrophotometer (FTIR) 8400 S (Shimadzu, Kyoto, Japan) dengan jumlah scan 5 kali dan menggunakan rasio sampel/KBr 1:100 pada preparasi contohnya.

HASIL DAN BAHASAN

Pada penentuan konsentrasi kitin yang optimum dalam medium produksi enzim kitin deasetilase, kitin yang digunakan adalah kitin kepala udang yang diperoleh dari Cirebon dengan spesifikasi sebagai berikut : kadar air 11,19%; kadar abu 0,65%; N total 7,53% dan derajat deasetilasi 53,52%. Setelah proses produksi, enzim kasar kitin deasetilase yang diperoleh diuji aktivitasnya. Hasil aktivitas enzim disajikan pada Tabel 1.

Hasil uji aktivitas enzim sangat bervariasi yang ditunjukkan oleh deviasi yang cukup besar. Kondisi semacam ini layaknya memang sering terjadi pada penelitian biologis karena sifat bahan biologis itu sendiri. Memperbanyak ulangan percobaan mungkin dapat mengurangi keragaman bahan.

Aktivitas enzim cenderung meningkat pada produksi jam ke 48 dan menurun lagi pada 24 jam berikutnya, kecuali pada medium yang mengandung kitin sebanyak 3%. Berdasarkan konsentrasi kitin dalam medium, pada produksi selama 48 dan 72 jam terlihat kecenderungan peningkatan aktivitas enzim dengan meningkatnya konsentrasi kitin sampai dengan 2%, kemudian menurun lagi pada konsentrasi kitin 3%,

Tabel 1. Aktivitas enzim kitin deasetilase (mU/ml) dari *Bacillus* K29-14 dalam medium produksi yang mengandung kitin kepala udang
 Table 1. Chitin deacetylase activity (mU/ml) from *Bacillus* K29-14 in a head shrimp chitin containing medium

Konsentrasi kitin (%)/ Chitin concentration (%)	Lama produksi (jam)/Production time (hours)		
	24	48	72
0	7.29 ± 7.29	14.86 ± 5.59	3.41 ± 2.99
1	4.23 ± 1.64	16.49 ± 13.36	5.20 ± 1.43
2	0	25.49 ± 10.22	8.72 ± 5.59
3	5.25 ± 5.25	2.18 ± 2.18	7.70 ± 4.56

Catatan/Note : Ulangan/replication : 2; Jumlah sel yang dimasukkan/Cell count inoculated into production medium : 23.2×10^{10}

sedangkan pada produksi selama 24 jam pola yang dihasilkan tidak jelas, kecuali bahwa aktivitas enzim tertinggi dihasilkan oleh perlakuan medium tanpa penambahan kitin. Diduga bahwa pada 24 jam pertama persediaan substrat koloidal kitin, yang lebih mudah dikonsumsi oleh sel dibandingkan kitin, masih cukup, sehingga ketersediaan kitin (kelebihan substrat) akan bersifat menghambat produksi enzim. Pada produksi selama 48 dan 72 jam diduga ketersediaan koloidal kitin sudah menipis atau habis, sehingga penambahan kitin sampai dengan 2% merangsang mikroba (*Bacillus* K29-14) untuk mengeluarkan enzimnya agar dapat mengkonsumsi substrat dalam rangka mempertahankan hidupnya. Aktivitas enzim tertinggi dihasilkan oleh medium yang mengandung kitin kepala udang sebanyak 2% pada produksi selama 48 jam, yaitu sebesar 25,49 mU/ml. Penggunaan kitin dalam medium produksi enzim deasetilase dari *Vibrio alginolyticus* juga dilakukan

oleh Ohishi *et al.* (1997) yang berupa kitin cumi sebesar 0,5%. Enzim kasar yang dihasilkan mempunyai aktivitas spesifik enzim sebesar 0,9 U/mg, sedangkan Oh *et al.* (2000) menambahkan laktosa (1%) dan tepung campuran limbah udang dan limbah rajungan sebanyak 5% ke dalam medium produksi untuk meningkatkan aktivitas enzim protease dari *Pseudomonas aeruginosa* K-187. Aktivitas enzim yang dihasilkan mencapai 21,2 U/ml.

Pada tahap ke-2, penambahan jenis kitin yang berbeda ke dalam medium produksi dengan konsentrasi 2% dilihat pengaruhnya terhadap aktivitas enzim kitin deasetilase yang dihasilkan. Tiga jenis kitin digunakan yaitu kitin campuran kepala dan kulit punggung udang dari Sidoarjo, kitin kepala udang dari Cirebon dan kitin kulit punggung udang dari Cirebon dengan spesifikasi sebagaimana terlihat pada Tabel 2, sedangkan hasil uji aktivitas enzim kitin deasetilase yang diperoleh ditunjukkan pada Tabel 3.

Tabel 2. Spesifikasi kitin lokal
 Table 2. Specification of local chitin

Jenis kitin Chitin type	Air (%) Moisture (%)	Abu (%) Ash (%)	N Total (%) Total N (%)	Derajat Deasetilasi (%) Degree of deacetylation (%)
Kitin campuran kepala dan kulit punggung udang/Mixed head and shell shrimp chitin	8.43 ± 0.28	2.03	7.62 ± 0.02	24.36
Kitin kulit punggung udang/Shrimp shell chitin	11.22	0.44	6.34	31.31
Kitin kepala udang/Shrimp head chitin	11.21 ± 0.02	0.65	7.53 ± 0.05	53.52

Tabel 3. Aktivitas enzim (mU/ml) dari *Bacillus* K29-14 dalam medium produksi yang mengandung kitin
 Table 3. Enzyme activity (mU/ml) from *Bacillus* K29-14 in a chitin containing medium

Jenis kitin dalam medium/ Type of Chitin contained in medium	Lama produksi (jam)/Production time (hours)		
	24	48	72
Kitin campuran kepala dan kulit punggung udang/Mixed head and shell shrimp chitin	0.793 ± 1.12	0.06 ± 0.08	58.18 ± 78.1
Kitin kulit punggung udang/Shrimp shell chitin	3.19 ± 4.11	6.54 ± 5.73	87.39 ± 67.5
Kitin kepala udang/Shrimp head chitin	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	18.22 ± 25.8

Catatan/Note :Ulangan/replication = 3; Jumlah sel starter yang dimasukkan/Cell count inoculated into production medium : 55.3×10^6

Tabel 4. Kepadatan sel dalam medium, aktivitas enzim, kadar protein dan aktivitas spesifik enzim kasar selama produksi
 Table 4. Cell density in medium, enzyme activity, protein content and specific activity of crude enzyme during production

Perlakuan/ Treatment	Kepadatan Sel/ Cell density (OD ₆₈₀ nm)	Akt Enzim/ Enzyme activity (mU/ml)	Kadar Protein/ Protein content (mg/ml)	Akt Spesifik/ Specific activity (mU/mg)*
Kitin campuran kepala dan kulit punggung udang/Mixed head and shell shrimp chitin:				
24 jam/hours	0.848 ± 0.071	0.793 ± 1.12	9.71 ± 0.19	8.20×10^{-2}
48 jam/hours	0.492 ± 0.077	0.06 ± 0.08	11.13 ± 0.44	5.12×10^{-3}
72 jam/hours	0.365 ± 0.045	58.18 ± 78.1	11.22 ± 1.51	5.19
Kitin kulit punggung udang/Shrimp shell chitin:				
24 jam/hours	0.430 ± 0.044	3.19 ± 4.11	4.88 ± 0.35	6.54×10^{-1}
48 jam/hours	0.269 ± 0.015	6.54 ± 5.73	4.57 ± 0.18	1.43
72 jam/hours	0.257 ± 0.044	87.39 ± 67.5	4.43 ± 0.46	19.73
Kitin kepala udang/Shrimp head chitin :				
24 jam/hours	0.739 ± 0.092	0.00 ± 0.00	4.24 ± 0.50	0
48 jam/hours	0.536 ± 0.108	0.00 ± 0.00	4.84 ± 0.64	0
72 jam/hours	0.324 ± 0.069	1.22 ± 25.8	4.36 ± 0.11	4.18

Catatan/Note :Ulangan/replication = 3; Jumlah sel starter yang dimasukkan/Cell count inoculated into production medium: 55.3×10^6 ; * aktivitas enzim/kadar protein (enzyme activity/protein content)

Pola yang terlihat pada Tabel 3 adalah bahwa aktivitas enzim yang dihasilkan pada produksi selama 72 jam relatif lebih tinggi dibandingkan dengan aktivitas enzim pada produksi selama 24 dan 48 jam. Dibandingkan dengan Tabel 1, aktivitas enzim pada produksi selama 48 jam relatif lebih tinggi dari produksi selama 24 dan 72 jam. Hal ini kemungkinan berkaitan

dengan jumlah sel starter yang dimasukkan ke dalam medium produksi lebih rendah dari jumlah sel pada tahap 1 ($55,3 \times 10^6$ vs $23,2 \times 10^{10}$), sehingga produksi enzim berlangsung lebih lambat. Aktivitas enzim kitin deasetilase yang tertinggi dihasilkan dari fermentasi menggunakan medium yang mengandung tepung kitin dari kulit punggung udang yang diperoleh dari Cirebon.

Adapun Tabel 4 menunjukkan data tentang pertumbuhan sel bakteri (kepadatan sel), kadar protein dan aktivitas enzim kasar serta aktivitas spesifiknya selama produksi. Selama produksi, diperoleh nilai OD_{660nm} yang semakin kecil. Hal ini kurang mencerminkan pola pertumbuhan sel mikroba yang umumnya mengikuti fase lag, log dan stasioner. Terjadinya hal tersebut disebabkan tidak dilakukannya pengukuran OD_{660nm} terhadap medium yang mengandung kitin yang tidak ditambah (diinokulasi) dengan sel *Bacillus* K29-14 sebagai kontrol, sehingga data yang ada hanya menggambarkan kondisi/penampakan medium selama produksi enzim. Berdasarkan penurunan nilai ini terlihat bahwa selama produksi enzim, substrat koloidal kitin yang bersifat lebih mudah larut dikonsumsi lebih awal dibandingkan kitin dan terhidrolisis lebih dulu oleh enzim kitin deasetilase sehingga menjadi lebih jernih.

Enzim kasar merupakan filtrat setelah medium produksi dipisahkan dari sel mikroba dan komponen padat lainnya. Selama produksi terjadi pertumbuhan sel mikroba dan konsumsi substrat oleh mikroba. Makin lama produksi, substrat makin berkurang dan untuk dapat bertahan hidup mikroba akan mengekskresikan enzim untuk dapat memecah substrat sebagai makanannya. Fenomena perubahan medium, produksi enzim dan kadar protein ekstrak kasar enzim pada Tabel 4 kemungkinan dapat diuraikan sebagai berikut:

- Pada produksi enzim selama 24 jam, pertumbuhan sel belum maksimum dan belum seluruh substrat dikonsumsi oleh sel mikroba. Oleh karena itu yang terdeteksi sebagai protein pada ekstrak enzim sebagian besar adalah berasal dari medium yang mengandung tripton dan *yeast extract*. Hal ini didukung oleh data aktivitas enzim yang relatif masih rendah (0 – 3,19 mU/ml) (Tabel 4).
- Setelah produksi enzim berlangsung selama 72 jam, medium yang mengandung kitin dari kulit punggung udang mempunyai nilai OD_{660nm} paling rendah yaitu 0,257 dan ternyata nilai aktivitas enzimnya paling tinggi yaitu 87,39 mU/ml. Perbedaan substrat sangat berpengaruh terhadap kemampuan sel mikroba dalam menggunakan substrat tersebut untuk menghasilkan enzim. Salah satu faktor yang berpengaruh terhadap degradasi kitin oleh mikroba adalah sifat alami atau struktur fisik kitin. Struktur fisik dan kimia kitin sangat bervariasi antara lain tergantung pada pengaturan rantai N-asetilglukosamin, derajat deasetilasi dan ikatan silang komponen strukturalnya dengan komponen lain seperti protein dan glukosa (Svith *et al.*, 1997). Berdasarkan pengaturan rantai N-

asetilglukosaminnya, terdapat 3 jenis struktur kitin, yaitu struktur a, b dan g-kitin. Setiap sel mikroba mempunyai kemampuan berbeda dalam mengenali substratnya. *Streptomyces olivaceoviridis* dapat secara langsung mengenali struktur a-kitin karena mikroba ini menghasilkan lektin, sejenis protein, yang berikatan secara spesifik dengan a-kitin, sedangkan sel mikroba yang lain dapat segera mengenali derajat deasetilasi melalui jumlah proporsi glukosamin dan N-asetilglukosamin atau mengenali adanya protein yang terikat secara kovalen dengan kitin (Svith *et al.*, 1997).

Selama produksi enzim kitin deasetilase, tidak tertutup kemungkinan bahwa enzim yang dihasilkan secara ekstraseluler tidak hanya kitin deasetilase, tetapi juga enzim kitinolitik lainnya seperti kitinase dan kitosanase. Selain itu protease pun dapat dihasilkan karena adanya enzim-enzim kitinolitik yang terbentuk, yang juga merupakan suatu protein, dapat menstimulasi ekskresi protease. Rahayu (2000) melaporkan bahwa *Bacillus* K29-14 selain menghasilkan kitin deasetilase juga kitinase. Pada perlakuan medium yang mengandung kitin campuran kepala dan kulit punggung udang dari Sidoarjo dihasilkan aktivitas enzim kitin deasetilase yang lebih kecil dari aktivitas enzim dari medium yang mengandung kitin kulit punggung udang dari Cirebon. Akan tetapi kandungan protein enzimnya adalah sebaliknya, yaitu protein enzim dari perlakuan medium kitin campuran dari Sidoarjo lebih tinggi dari protein enzim dari perlakuan medium kitin kulit punggung dari Cirebon. Tingginya protein enzim pada medium yang mengandung kitin campuran dari Sidoarjo mungkin disebabkan oleh terbentuknya enzim kitinolitik yang lain, tetapi aktivitas enzimnya tidak terukur. Beberapa mikroba penghasil enzim-enzim kitinolitik dilaporkan juga menghasilkan protease, antara lain *Vibrio harveyi* (Svith *et al.*, 1997), dan *Pseudomonas aeruginosa* K-187 (Wang *et al.*, 1997; Oh *et al.*, 2000).

KESIMPULAN

Penambahan kitin dalam bentuk tepung ke dalam medium produksi enzim kitindeasetilase dari *Bacillus* K29-14 dapat meningkatkan aktivitas enzim kitin deasetilase yang dihasilkan. Aktivitas enzim tertinggi dihasilkan pada produksi selama 48 jam pada suhu 55°C menggunakan medium yang ditambahkan berupa tepung kitin kepala udang sebesar 2% dengan jumlah sel awal yang ditambahkan sebesar $23,2 \times 10^{10}$. Aktivitas enzim yang dihasilkan mencapai 25,49

mU/ml. Penambahan tepung kitin dari jenis yang berbeda, menghasilkan enzim dengan aktivitas yang berbeda. Di antara tepung kitin limbah udang (mengandung campuran kepala dan punggung udang), tepung kitin kepala udang dan tepung kitin kulit punggung udang sebesar 2%, aktivitas enzim tertinggi dihasilkan oleh penambahan tepung kitin kulit punggung udang ke dalam medium selama 72 jam produksi. Dengan jumlah sel dalam starter yang ditambahkan sebesar $55,3 \times 10^6$, aktivitas enzim kasar (*crude extract*) yang dihasilkan adalah sebesar 87,39 mU/ml, dengan kadar protein 4,43 mg/ml dan aktivitas spesifik enzim sebesar 19,73 mU/mg.

SARAN

Berdasarkan hasil penelitian di atas, beberapa perbaikan perlu dilakukan untuk menyempurnakan penelitian ini atau penelitian lain yang sejenis, yaitu :

- Untuk setiap produksi enzim sebaiknya digunakan jumlah sel yang sama dari starter yang digunakan. Hal ini bisa dilakukan dengan mencari terlebih dahulu hubungan antara OD_{660nm} dengan jumlah sel starter, sehingga dengan hanya mengukur OD_{660nm} starter sebelum produksi enzim, jumlah sel dapat diketahui.
- Pengukuran densitas sel melalui OD_{660nm} perlu dibarengi dengan kontrol yaitu medium sebelum diinokulasi dengan sel dan diperlakukan seperti contoh lainnya, agar dapat dihitung nilai OD_{660nm} sel.
- Perlu dilakukan penelitian/perhitungan kinetika proses produksi enzim untuk mendapatkan kondisi yang optimum baik substrat maupun sel mikroanya.
- Perlu kajian lebih lanjut mengenai metode pengujian aktivitas enzim agar diperoleh hasil yang lebih akurat. Selain metode Tokuyasu (1996) yang didasarkan atas glukosamin yang dihasilkan, pengujian aktivitas enzim kitin deasetilase dapat dilakukan dengan menggunakan metode Bergmeyer (1974) di dalam Martinou *et al.* (1995) melalui reaksi ezimatis bertingkat yang didasarkan atas jumlah asam asetat yang terbentuk. Hanya saja metode ini lebih mahal karena menggunakan bahan substrat dan enzim yang relatif mahal.

DAFTAR PUSTAKA

Alfonso, C., Neuro, O.M., Santamaria, F. and Reves, F. 1995. Purification of heat stable chitin deacetylase from *Aspergillus nidulans* and its role in cell wall degradation. *J. Curr. Microbiol.* 30(1):49-54.

AOAC, 1980. *Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists.* 13th ed. AOAC, Inc. Arlington. Virginia 1018 pp.

Arnold, L.D. and Solomon, N.A. 1986. *Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology.* Washington. American Society for Microbiology.

Bollag, D.M. and Edelman, S.J. 1990. *Protein Concentration Determination.* Wiley-Liss Protein Methods. Inc., New York. p 45-68.

Fawzya, Y.N., Zilda, D.S. dan Heruwati, E.S. 2003. Preliminary study on chitin degradation by chitinolytic enzyme from *Bacillus* K29-14. Papers IMFS 2003. *International Seminar on Marine and Fisheries.* Agency for Marine and Fisheries Research. Ministry of Marine Affairs and Fishery. p:234-239.

Gao, X.D., Katsumoto, T. and Onodera, K. 1995. Purification and characterization of chitin deacetylase from *Absidia coerulea.* *J. Biochem.* 117(2):257-263.

Heruwati, E.S, Ariyani, F., Indriati, N. dan Zilda, D.S. 2002. Riset Ekstraksi Enzim dan Kitosan dari Biota Laut dan Aplikasinya. *Laporan Tahunan Pusat Riset Pengolahan Produk dan Sosial Ekonomi Kelautan dan Perikanan.* Jakarta.

Kafetzopoulos, D., Martinou, A. and Bouriotis, V. 1993. Bioconversion of chitin to chitosan: Purification and characterization of chitin deacetylase from *Mucor rouxii.* *J. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90(7):2564-2568.

Kafetzopoulos, D., Martinou, A., Tsigos, I., Christodoulidou, A., Kavelaki, P. and Bouriotis, V. 1994. Chitin deacetylation by enzymatic means. *J. Prog. Biotechnol.* 9(1):291-294.

Martinou, A., Kafetzopoulos, D. and Bouriotis, V. 1995. Chitin deacetylation by enzymatic means: monitoring of deacetylation process. *J. Carbohydr. Res.* 273(2):235-242.

Oh, Yi-Su; Shih, Ing-Lung; Tzeng, Yew-Min and Wang, San-Lang. 2000. Protease produced by *Pseudomonas aeruginosa* K-187 and its application in the deproteinization of shrimp and crab shell wastes. *Enzyme Microb. Technol.* 27:3-10.

Ohishi, K., Yamagishi, M., Ohta, T., Motosugi, M., Izumida, H., Sano, H., Adachi, K. and Tan Miwa. 1997. Purification and properties of two deacetylases produced by *Vibrio alginolyticus* H-8. *J. Biosci. Biotech. Biochem.* 61(7):1113-1117.

Rahayu, S. 2000. *Pemurnian dan Karakterisasi Kitinase dan Kitin Deasetilase Termotabil dari Isolat Bacillus K29-14 Asal Kawah Kamojang, Jawa Barat.* Thesis Program Pascasarjana, IPB.

Sabnis, S. and Block, L.H. 1997. Improved infrared spectroscopic method for analysis of degree of N-deacetylation of chitosan. *Polym Bull.*, 39:67-71.

Sakai, K., Yokota, A., Kurokawa, H., Wakayama, M. and Moriguchi, M. 1998. Purification and characterization of three thermostable endochitinases of a noble *Bacillus* strain MH-1, isolated from chitin containing compost. *Appl. Environ. Microbiol.* 64(9):3397-3402

Svith, A.L., Chadain, S.M., Moore, J.A. and Kirchman, D.L. 1997. Chitin degradation proteins produced by the marine bacterium *Vibrio harveyi* growing on different forms of chitin. *J. Appl. Environ. Microbiol.* 63(2):408-413.

- Tanuwijaya, F. 1999. *Isolasi dan Pemilahan Bakteri Termofilik Penghasil Enzim Kitinase*. Skripsi. Jurusan Teknologi Pangan dan Gizi, Fakultas Teknologi Pertanian, IPB, Bogor.
- Tokuyasu, K., Ohnishi Kameyama, M. and Hayashi, K. 1996. Purification and characterization of extracellular chitinase from *Colleotrichum lindemuthianum*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 60:1598-1603.
- Trudel, J. and Asselin, A. 1989. Detection of chitinase after polyacrilamide gel electrophoresis. *Anal. Biochem.* 178: 302-306.
- Tsigos, I. and Bouriotis, V. 1995. Purification and characterization of chitin deacetylase from *Colleotrichum lindemuthianum*. *J. Biol. Chem.* 270:26286-26291.
- Wang, San-Lang and Chang, Wen-Tsu, 1997. Purification and characterization of two bifunctional chitinases/lysozymes extracellularly produced by *Pseudomonas aerogenosa* k-187 in a shrimp and crab shell powder medium. *J. Appl. Environ. Microbiol.* 63(2): 380-386.
- Wibowo, S. 2003. *Surimi Wash Water Treatment by Chitosan-Alginate Complexes*. PhD. Dissertation. Oregon State University, Corvallis, Oregon, USA. 123 pp