

KARAKTERISASI ENZIM KITOSANASE DARI ISOLAT BAKTERI KPU 2123 DAN APLIKASINYA UNTUK PRODUKSI OLIGOMER KITOSAN

Yusro Nuri Fawzya¹⁾, Asri Pratitis¹⁾, dan Ekowati Chasanah¹⁾

ABSTRAK

Penelitian ini merupakan sebagian dari rangkaian penelitian mengenai eksplorasi enzim kitinolitik dari mikroba lingkungan laut, khususnya dari limbah udang. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengidentifikasi isolat bakteri KPU 2123 dari limbah udang, mengkarakterisasi dan mengaplikasikan enzim kitosanase yang dihasilkan oleh bakteri tersebut untuk produksi oligomer kitosan dan menguji bioaktivitas oligomer kitosan tersebut sebagai antitumor dan antibakteri. Karakterisasi enzim dilakukan dengan menguji aktivitas enzim pada berbagai suhu dan pH. Selain itu juga ditentukan besarnya aktivitas yang tersisa setelah enzim diinkubasi pada suhu dan lama waktu tertentu. Pengaruh ion logam terhadap aktivitas enzim juga dilihat dengan mereaksikan enzim dengan 1 mM ion logam dalam bentuk larutan khlorida. Hasil penelitian menunjukkan bahwa berdasarkan analisis gen 16S-rRNA, isolat bakteri KPU 2123 memiliki kemiripan 95% dengan *Stenotrophomonas maltophilia*. Enzim kitosanase dari isolat ini bekerja optimal pada suhu 50°C dan pH 6. Enzim ini cukup stabil pada suhu 37°C selama 120 menit. Penambahan ion logam berpengaruh terhadap aktivitas enzim. Ion logam Zn²⁺ (sebagai garam klorida, 1 mM) menghambat 100% aktivitas enzim tersebut. Penggunaan enzim kitosanase dalam menghidrolisis substrat kitosan, menghasilkan oligomer kitosan yang mengandung tetramer, pentamer dan heksamer. Oligomer kitosan tersebut mampu menghambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* sebesar 10,06% dan dapat menyebabkan kematian sel HeLa dengan LC₅₀ pada dosis 120 ppm.

ABSTRACT: *Characterization of chitosanase produced by KPU 2123 isolate and its application to produce chitosan oligomers. By: Yusro Nuri Fawzya, Asri Pratitis and Ekowati Chasanah*

*This research was part of research on the exploration of microbial chitinolytic enzymes isolated from marine environment, especially from shrimp waste. The aim of the research was to identify the KPU 2123 bacteria isolate from shrimp waste, characterize and apply the chitosanase produced by this bacteria isolate for producing chitooligosaccharides, and to evaluate the product's bioactivity as an antibacterial as well as antitumor. Enzyme characterization was carried out by assaying the enzyme's activity on various temperatures and pHs, and the residual activity after incubating the enzyme at certain temperature and time. In addition, effect of metal ions on the enzyme's activity was observed by reacting the enzyme with 1mM metal ions as chloride salt. The result showed that based on the 16S-rRNA gene analyses, the isolate had 95% similarity toward *Stenotrophomonas maltophilia*. The chitosanase produced by this isolate worked optimally at 50°C, pH 6. The enzyme was stable at 37°C for 120 minutes. Addition of metal ion affected the enzyme activity. Ion Zn²⁺ (as chloride salt; 1 mM) inhibited 100% of the chitosanase activity. Application of this enzyme in hidrolizing soluble chitosan produced chitosan oligomer which contained tetramer, pentamer, and hexamer. The chitosan oligomer could inhibit the growth of *Staphylococcus aureus* up to 10.06% and HeLa proliferation with LC₅₀ of 120 ppm.*

KEYWORDS: *chitosanase, characterization, chitosan oligomer, bioactivity*

PENDAHULUAN

Oligomer kitosan atau kitooligosakarida merupakan produk turunan yang diperoleh dari hasil hidrolisis ikatan glikosidik kitosan. Produk ini memiliki manfaat yang lebih besar dari polimer kitin atau kitosan, karena bersifat larut dalam air dan memiliki beberapa aktivitas biologis yang lebih besar. Karena itu, penggunaan oligomer kitosan dalam aplikasi industri makanan

maupun medis lebih menguntungkan daripada penggunaan langsung kitin dan kitosan. Kitin dan kitosan juga bersifat tidak dapat dipecah di dalam usus manusia tanpa adanya enzim pemecah seperti kitinase dan kitosanase (Alasalvar *et al.*, 2000).

Aplikasi oligomer kitosan pada bidang pangan dan kesehatan telah banyak dilaporkan, antara lain sebagai bahan dasar produk perawatan tubuh, karena

¹⁾ Peneliti pada Balai Besar Riset Pengolahan Produk dan Bioteknologi Kelautan dan Perikanan, DKP

kemampuannya dalam menghambat pertumbuhan bakteri yang tidak menguntungkan pada kulit manusia (Gooday, 1994). Aktivitas oligomer kitosan sebagai antibakteri juga dilaporkan oleh You-Jin & Se-Kwon (2000), Tsai *et al.* (2000), No *et al.* (2002), Kumar *et al.* (2005), Kittur *et al.* (2005), dan Meidina *et al.* (2005). Selain sebagai antibakteri, oligomer kitosan juga dilaporkan memiliki kemampuan sebagai antitumor (Suzuki, 1986; Dhanikula & Panchagnula, 2004; Wahyuni *et al.*, 2006).

Oligomer kitosan dapat diproduksi secara enzimatik dengan menggunakan enzim kitosanase yang bekerja spesifik pada substrat kitosan. Namun, beberapa jenis enzim hidrolase non spesifik dilaporkan mampu menghidrolisis kitosan menghasilkan kitooligosakarida, seperti campuran enzim amilase, selulase dan proteinase (Zhang *et al.*, 1999), pektinase (Cabrera & Cutsem, 2005; Kittur *et al.*, 2005), papain dan pronase (Kumar *et al.*, 2005), selulase (Chasanah *et al.*, 2007b). Berbagai enzim kitosanase dari mikroba telah berhasil dikarakterisasi (Nogawa *et al.*, 1998; Piza *et al.*, 1999; Chasanah, 2004; Choi *et al.*, 2004; Zilda *et al.*, 2006; Chasanah *et al.*, 2007a) dan beberapa di antaranya telah diaplikasikan untuk pembuatan oligomer kitosan (kitooligosakarida) (You-Jin & Se-Kwon, 2000; Chasanah, 2004; Choi *et al.*, 2004; Fawzya *et al.*, 2009).

Kitosanase (EC 3.2.1.132) termasuk dalam golongan enzim kitinolitik yang mengkatalisis degradasi kitosan. Enzim ini memotong rantai polimer kitosan dari dalam (*endo-acting enzymes*), menghasilkan dimer, trimer, tetramer atau oligomer sebagai produk hidrolisisnya (Somasekar & Joseph, 1996). Dinyatakan pula bahwa kitosanase yang dihasilkan oleh masing-masing organisme berbeda satu sama lain dalam pola aksi hidrolisisnya, tergantung pada derajat polimerisasi dan asetilasi substrat. Kitosanase yang berasal dari beberapa sumber juga menunjukkan spesifisitas substrat yang berbeda, yaitu mampu menghidrolisis kitosan dan substrat lain yang memiliki kemiripan dengan kitosan seperti turunan kitosan (karboksimetil kitosan, glikol kitosan, koloidal kitosan), kitin dan karboksimetilselulosa. Karakteristik kitosanase berbeda-beda satu sama lain. Suhu optimum kitosanase bervariasi antara 30–70°C, dan pH berkisar antara 4–7. Berbagai ion logam berpengaruh terhadap aktivitas kitosanase, bisa sebagai inhibitor atau aktivator. Pengaruh ion logam ini berbeda-beda antara kitosanase satu dengan lainnya. Balai Besar Riset Pengolahan Produk dan Bioteknologi Kelautan dan Perikanan memiliki koleksi isolat bakteri dari lingkungan laut penghasil enzim kitinolitik. Di antara isolat-isolat tersebut, isolat bakteri KPU 2123 yang berasal dari limbah udang memiliki indeks kitinolitik

(IK) relatif tinggi, yaitu 2,27 (Chasanah *et al.*, 2007b), namun belum diketahui informasi lainnya baik identitas isolatnya, karakteristik maupun produk aplikasi enzimnya. Makalah ini menguraikan hasil eksplorasi enzim kitosanase dari isolat bakteri KPU 2123 berupa karakterisasi dan aplikasinya untuk produksi oligomer kitosan serta bioaktivitas oligomer yang dihasilkan. Identifikasi isolat ini dilakukan secara molekuler berdasarkan analisis gen 16S rRNA.

BAHAN DAN METODE

Bahan

Isolat bakteri yang digunakan pada penelitian ini merupakan koleksi Balai Besar Riset Pengolahan Produk dan Bioteknologi Kelautan dan Perikanan yang diisolasi dari limbah udang, dengan kode KPU 2123 dan memiliki indeks kitinolitik (IK) 2,27 (Chasanah *et al.*, 2007b). Bahan lain yang digunakan meliputi bahan-bahan kimia dan mikrobiologi untuk identifikasi isolat bakteri, produksi dan karakterisasi enzim, pembuatan oligomer kitosan, identifikasi oligomer kitosan dan uji bioaktivitas oligomer kitosan.

Identifikasi isolat bakteri

Sebelum dilakukan identifikasi secara molekuler, terlebih dahulu dilakukan pengamatan morfologi sel bakteri dan pewarnaan Gram (Lay, 1994). Identifikasi isolat bakteri KPU 2123 dilakukan berdasarkan analisis 16S-rRNA (Madigan *et al.*, 2000), melalui tahapan ekstraksi dan purifikasi DNA, amplifikasi gen penyandi 16S-rRNA, sekuensing hasil PCR untuk menentukan sekuen klon yang mengandung gen 16S-rRNA dan analisis perbandingan sekuen dengan sekuen yang telah diketahui dari database yang diakses dari *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) (www.ncbi.nlm.gov). Ekstraksi DNA dilakukan dengan menggunakan *Genomic DNA Purification Kit* (Fermentas). Reaksi PCR untuk amplifikasi DNA dilakukan dengan *Pure Taq Ready To Go PCR beads* (GE Healthcare) dengan menggunakan primer hasil disain Marchesi *et al.* (1998), sedangkan sekuensing dilakukan di Fakultas Teknobiologi, Universitas Atmajaya. Hasil sekuensing dianalisis menggunakan program *Clustal W* dan pembuatan pohon filogenetik menggunakan program *Treecon 1.3b* (Van de Peer & De Wachter, 1993).

Produksi dan Karakterisasi Enzim Kitosanase

Produksi enzim dilakukan berdasarkan metode Chasanah (2004) yang dimodifikasi dengan menggunakan Medium Sintetik Minimal (MSM) cair yang mengandung 0,1% K_2HPO_4 ; 0,01%

MgSO₄·7H₂O; 0,05% yeast extract; 0,1% NaCl; 0,7% (NH₄)₂SO₄; dan substrat koloidal kitin 0,5%. Preparasi koloidal kitin dilakukan menurut metode Arnold & Solomon (1986). Isolat bakteri yang berusia 16 jam diinokulasi ke dalam medium produksi, selanjutnya medium berisi isolat bakteri tersebut diinkubasi pada *shakerbath* pada suhu 30°C dengan kecepatan agitasi 125 rpm. Fermentasi dilakukan selama 48 jam, kemudian hasil fermentasi disentrifugasi pada suhu 4°C dengan kecepatan 10.000 g (Beckman Coulter, rotor JA-14). Enzim kasar yang berupa filtrat dipekatkan 10 kali volume awal dengan menggunakan ultrafiltrasi (kolom UFP-10-C-3MA, dengan 10.000 NMWC cut off).

Karakterisasi enzim kasar dilakukan dengan menentukan pH dan suhu optimal enzim. Penentuan pH optimal dilakukan dengan mereaksikan enzim pada *buffer* dengan variasi nilai pH yang berkisar antara 3 sampai 8. *Buffer* yang digunakan dalam penentuan pH optimum adalah *buffer* sitrat (pH 3 dan 4), *buffer* sitrat-fosfat (pH 4, 5, dan 6), dan *buffer* fosfat (pH 6, 7, dan 8) dengan konsentrasi 0,05 M. Penentuan suhu optimal dilakukan pada pH optimal dengan variasi suhu inkubasi 25, 30, 37, 50, dan 60°C.

Pengujian ketahanan enzim terhadap panas dilakukan dengan memanaskan enzim pada suhu 37, 50, dan 60°C. Sisa aktivitas diukur setiap 15 menit pemanasan. Pengaruh EDTA, logam divalen (Mg²⁺, Mn²⁺, Li²⁺, Co²⁺, Zn²⁺, Ba²⁺, dan Ca²⁺) dan monovalen (K⁺ dan Na⁺), terhadap aktivitas enzim diukur dengan mereaksikan enzim dengan 1mM EDTA dan 1 mM ion logam dalam bentuk garam klorida. Pada kondisi yang sama, dibuat kontrol yang tidak ditambah dengan ion logam.

Pengujian aktivitas kitosanase dilakukan dengan menggunakan metode *Schales* (Yoon *et al.*, 2000). Kitosan larut air 1% yang digunakan sebagai substrat disiapkan menurut Choi *et al.* (2004).

Pembuatan kitooligosakarida atau kitooligomer (Chasanah, 2004)

Enzim kitosanase direaksikan dengan kitosan larut air pada kondisi optimal enzim selama 1 sampai 4 jam. Reaksi enzimatik dihentikan dengan pemanasan pada suhu 100°C selama 5 menit. Hasil reaksi disentrifugasi selama 15 menit pada kecepatan 9.000 g (Beckman Coulter Microsentrifuge 22R, rotor F241.5) sehingga diperoleh supernatan yang mengandung kitooligosakarida.

Identifikasi oligomer kitosan

Kitooligosakarida diidentifikasi dengan menggunakan kromatografi lapis tipis (KLT) berdasarkan metode Choi *et al.* (2004). Larutan

pengembang yang digunakan adalah campuran n-propanol dan 30% amonia dengan perbandingan 2 : 1. Plat yang digunakan adalah Silicagel 60 F254 (Merck). Spot sampel yang terbentuk dapat dibaca setelah disemprot dengan 0,1% ninhidrin dalam n-butanol, dan dikeringkan. Sebagai standar digunakan kitooligosakarida yang mengandung monomer sampai heksamer (Seikagaku, Jepang).

Pengujian bioaktivitas oligomer kitosan secara *in vitro*

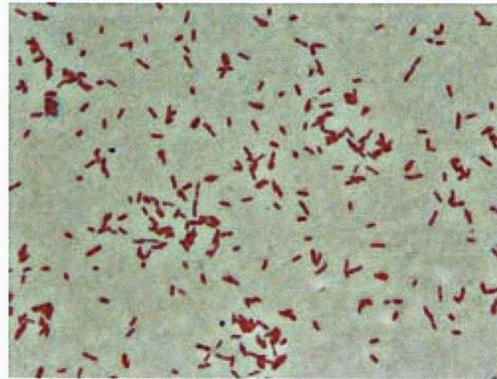
Uji bioaktivitas yang dilakukan terhadap oligomer kitosan meliputi uji antibakteri dan uji antitumor. Pengujian aktivitas antibakteri oligomer kitosan dilakukan terhadap bakteri Gram positif (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, dan *Streptococcus mutans*) serta bakteri Gram negatif (*Pseudomonas aeruginosa*) dengan menggunakan metode turbidimetri (You-Jin & Se-Kwon, 2000) yang dimodifikasi. Biakan bakteri uji dengan konsentrasi 10⁵–10⁶ cfu/ml diinokulasi ke dalam *nutrient broth* (NB) yang berisi sampel oligomer kitosan, lalu diinkubasi pada suhu 37°C selama 24–48 jam dan dilanjutkan dengan pengukuran *optical density* (OD) pada 640 nm.

Pengujian antitumor berdasarkan metode Zachary (2003) dengan menggunakan pereaksi garam MTT (3-[4,5-dimetilthiazol-2yl]-2,5-difenil tetrazolium bromida). Larutan MTT direaksikan ke dalam *plate* yang berisi oligomer kitosan dan sel lestari tumor HeLa, kemudian diinkubasi selama 4 jam. Reaksi dihentikan dengan menambahkan 10% *sodium dodecyl sulphate* (SDS) ke dalam *plate*, selanjutnya kultur disimpan semalam dalam ruang gelap. Hasil reaksi dibaca dengan ELISA *reader* pada panjang gelombang 570 nm. Kontrol reaksi dibuat sebagai pembanding, yang terdiri atas kontrol sel, sampel dan media. Tingkat kematian sel dihitung dengan membandingkan reaksi kitooligomer terhadap kontrol. Persentase kematian sel dihitung dengan rumus [(A-D)-(B-C)]/(A-D) x 100 % dimana A adalah absorbansi kontrol sel, B adalah absorbansi sel yang diberi perlakuan kitooligosakarida, C adalah absorbansi kontrol sampel, serta D adalah absorbansi kontrol media. Penghitungan LC₅₀ dilakukan dengan menggunakan analisis probit. Persentase kematian sel dikonversi menjadi nilai probit. Nilai probit versus log konsentrasi diplotkan pada sumbu X dan Y untuk memperoleh nilai LC₅₀.

HASIL DAN BAHASAN

Identifikasi Isolat Bakteri KPU 2123

Hasil pengamatan morfologi dan pewarnaan Gram terhadap sel bakteri KPU 2123 menunjukkan bahwa isolat ini termasuk kelompok bakteri Gram negatif,



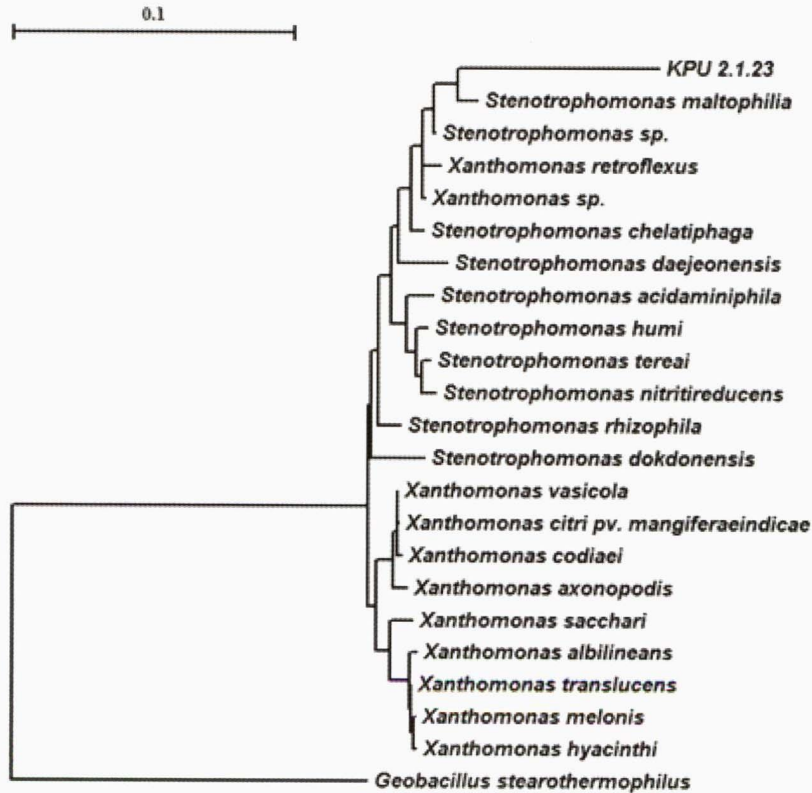
Gambar 1. Morfologi sel bakteri KPU 2123.
Figure 1. Morphology of KPU 2123 isolate.

berbentuk batang (Gambar 1). Sedangkan identifikasi berdasarkan analisis sekuen gen 16S-rRNA menunjukkan bahwa isolat ini memiliki kemiripan sebesar 95% dengan *Stenotrophomonas maltophilia*, seperti terlihat pada Gambar 2.

Identifikasi bakteri berdasarkan analisis gen 16S-rRNA, didasarkan atas gen penyandi 16S-rRNA yang menyandikan sub unit 16S dari ribosom, yang dimiliki oleh semua bakteri. Gen ini terdiri atas sekuen gen yang sangat konservatif dan sekuen gen yang sangat cepat berubah (variabel). Sekuen variabel berevolusi

pada laju yang berbeda sehingga memberikan cukup informasi untuk menentukan kedekatan atau jauhnya hubungan filogenetik suatu organisme (Woese, 1987).

Stenotrophomonas maltophilia adalah bakteri Gram negatif berbentuk batang, bersifat aerob, motil, dan banyak ditemukan pada lingkungan perairan, tanah dan tanaman. Sebelum diketahui bahwa bakteri *Stenotrophomonas maltophilia* termasuk dalam genus *Stenotrophomonas* pada tahun 1993 oleh Palleroni dan Bradbury, bakteri ini dikelompokkan ke dalam genus *Pseudomonas* sejak tahun 1961 oleh



Gambar 2. Pohon filogenetik isolat KPU 2123.
Figure 2. Phylogenetic tree of KPU 2123 isolate.

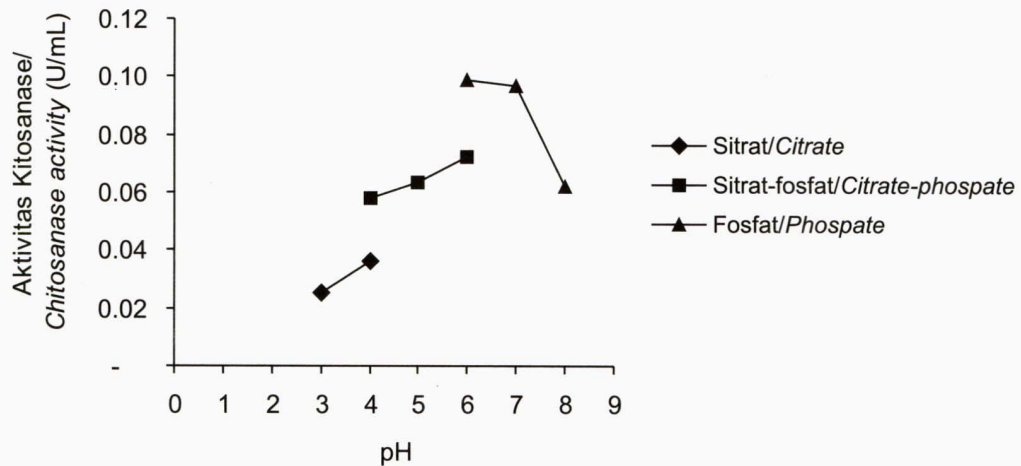
Hugh dan Ryschenkow kemudian dikelompokkan oleh Swings *et al.* pada tahun 1983 menjadi genus *Xanthomonas* (Anon., 2008).

Sebagaimana dinyatakan oleh Zobell (1946) dalam Sidharta (2000), 80% bakteri laut adalah kelompok bakteri Gram negatif berbentuk batang. Jenis-jenis bakteri yang hidup di laut umumnya berasal dari genus *Pseudomonas*, *Vibrio*, *Flavobacterium*, dan *Achromobacter* (Sidharta, 2000). Khusus pada habitat limbah udang, Brzezinska (2008) menemukan bahwa di antara total bakteri heterotropik, hanya beberapa persen yang merupakan bakteri kitinolitik, yaitu sekitar 4% ditemukan pada bagian eksoskeleton, dan 2% pada bagian kepala, sedangkan Putro (1982) menemukan bahwa jenis-jenis bakteri kitinolitik yang teridentifikasi dari limbah udang adalah *Vibrio*, *Pseudomonas*, *Streptomyces*, dan *Cytophaga*.

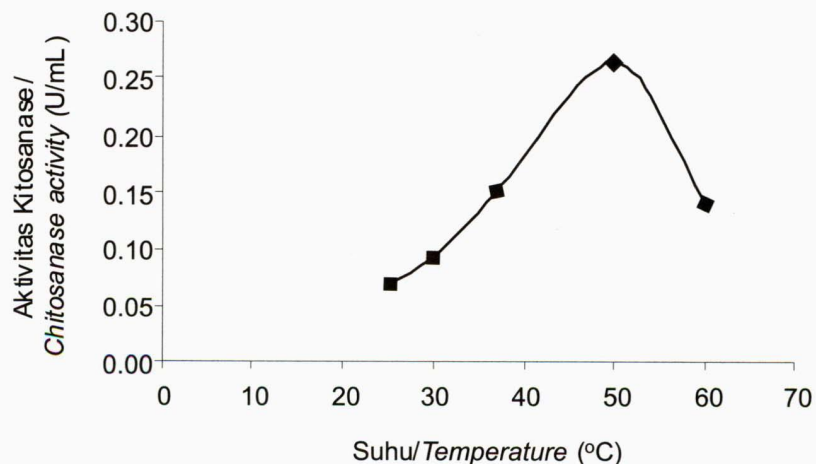
Zhang *et al.* (2001) melaporkan bahwa *Stenotrophomonas maltophilia* C3 merupakan bakteri penghasil enzim kitinolitik. Enzim kitinase yang dihasilkan dari bakteri tersebut bekerja optimum pada suhu 45–50°C dan pH 4,5–5,0. Aktivitas enzim ini dihambat oleh adanya ion Hg^{2+} and Fe^{3+} . Enzim ini memiliki kemampuan menghambat germinasi kapang pada tanaman *Bipolaris sorokiniana* (Sacc.), sehingga dalam aplikasinya dapat dimanfaatkan sebagai biokontrol (anti kapang).

Karakterisasi Enzim

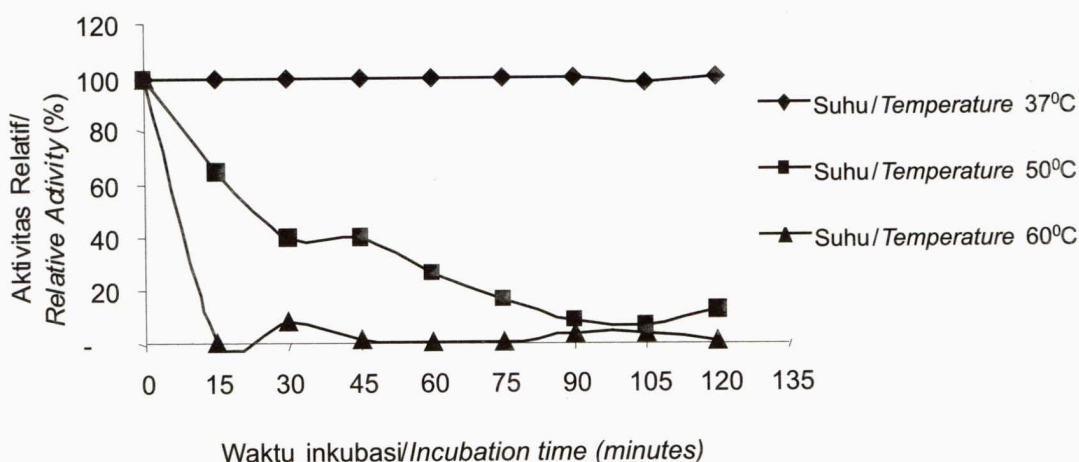
Enzim kitosanase yang diproduksi oleh isolat bakteri KPU 2123 memiliki nilai aktivitas spesifik sebesar 0,1063 U/mg. Enzim tersebut memiliki pH optimal 6 buffer fosfat dan suhu optimal 50°C (Gambar 3 dan 4). Beberapa kitosanase dari bakteri dilaporkan memiliki pH optimum antara 4,0–8,0 dan suhu



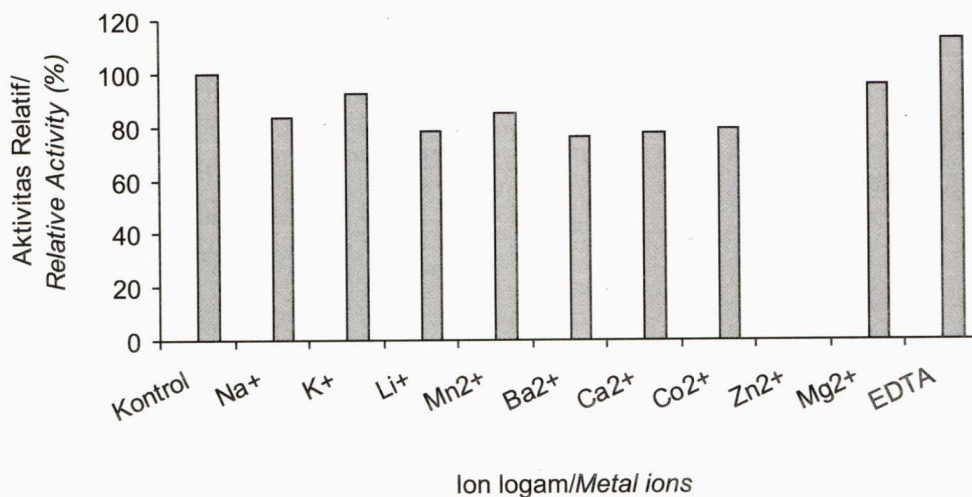
Gambar 3. pH optimum enzim kitosanase dari isolat KPU 2123.
 Figure 3. Optimum pH of KPU 2123 chitosanase.



Gambar 4. Suhu optimum enzim kitosanase dari isolat KPU 2123.
 Figure 4. Optimum temperature of KPU 2123 chitosanase.



Gambar 5. Kurva ketahanan panas enzim kitosanase dari isolat KPU 2123.
 Figure 5. Heat stability of KPU 2123 chitosanase.



Gambar 6. Pengaruh ion logam terhadap aktivitas enzim kitosanase isolat KPU 2123.
 Figure 6. Effect of metal ion on KPU 2123 chitosanase activity.

optimum antara 50–60°C, seperti kitosanase dari *Bacillus* sp strain KCTC 0377BP (pH 4.0-6.0; suhu 60°C) (Choi *et al.*, 2004), dari *Sterptomyces griceus* HUT 6037 (pH 6; suhu 60°C) (Tanabe *et al.*, 2003) dan kitosanase dari isolat T5a1 asal terasi (pH 7; suhu 50°C) (Zilda *et al.*, 2006)

Hasil pengujian ketahanan enzim terhadap panas menunjukkan bahwa enzim kitosanase KPU 2123 ini cukup stabil pada suhu 37°C; inkubasi sampai dengan 120 menit tidak menunjukkan penurunan nilai aktivitas enzim. Sebaliknya, enzim ini tidak stabil pada suhu optimalnya (50°C); pemanasan selama 15 menit telah menurunkan aktivitas enzim sekitar 40%. Sedangkan pengujian pada suhu 60°C menunjukkan bahwa enzim kehilangan hampir 100% aktivitasnya setelah pemanasan selama 15 menit. Hal ini menunjukkan bahwa kitosanase yang diproduksi oleh KPU 2123

dapat bekerja secara optimum pada suhu yang cukup tinggi (50°C) namun tidak cukup stabil, artinya enzim akan kehilangan aktivitasnya lebih dari 50% setelah 30 menit (Gambar 5). Ketahanan panas enzim kitosanase KPU 2123 ini hampir sama dengan kestabilan enzim kitosanase T5a1 yang stabil pada suhu 40°C sebagaimana dilaporkan oleh Zilda *et al.* (2006). Ketahanan enzim terhadap panas dipengaruhi oleh beberapa faktor, di antaranya adalah komposisi asam amino penyusunnya serta sifat dan struktur protein enzimnya.

Pengaruh ion logam terhadap aktivitas enzim ditunjukkan pada Gambar 6. Penambahan ion logam Zn²⁺ dalam bentuk garam khlorida (1 mM) menurunkan aktivitas enzim secara drastis. Sedangkan penambahan EDTA ke dalam reaksi sedikit meningkatkan aktivitasnya. Pengaruh ion logam

terhadap setiap enzim tidak selalu sama. Enzim kitosanase yang dihasilkan oleh *Bacillus* sp. strain KCTC 0377BP menunjukkan sensitivitas terhadap penambahan ion Mn^{2+} sebagaimana dilaporkan oleh Choi *et al.* (2004). Sedangkan kitosanase dari isolat T5a1 asal terasi tidak terlalu peka terhadap penambahan ion logam divalen. Penambahan ion Mg^{2+} dan Zn^{2+} hanya menghambat aktivitas kitosanase T5a1 sekitar 15% (Zilda *et al.*, 2006).

Produksi dan Identifikasi Oligomer Kitosan

Produksi kitooligosakarida dilakukan dengan menggunakan enzim kitosanase hasil pemekatan dengan ultrafiltrasi. Reaksi dilakukan dengan menggunakan enzim kitosanase sebesar 23 U/g kitosan selama 1–4 jam. Reaksi tersebut menghasilkan produk dengan viskositas yang lebih rendah (secara visual tampak jauh lebih encer). Hasil identifikasi oligomer dengan menggunakan KLT menunjukkan bahwa oligomer yang terbentuk sebagian besar adalah tetramer, pentamer dan heksamer (Gambar 7). Oligomer yang terbentuk diduga masih beragam, karena enzim yang digunakan masih berupa enzim kasar sehingga bersifat kurang spesifik, dan akibatnya hasil pemotongannya terdiri atas beberapa ukuran oligomer.

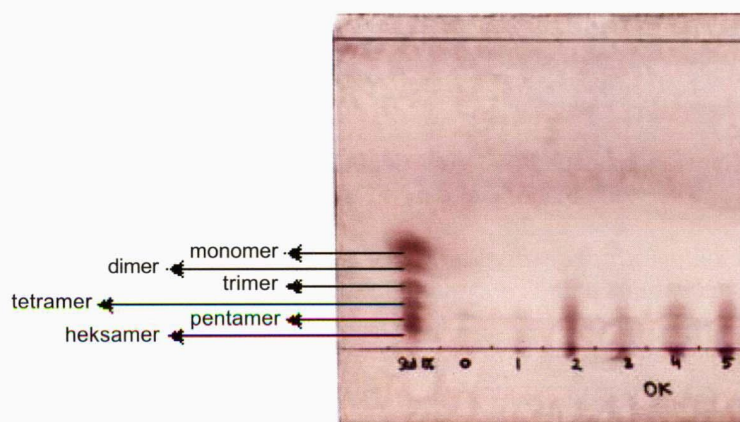
Uji Bioaktivitas Oligomer Kitosan

Uji bioaktivitas yang dilakukan pada oligomer kitosan ini adalah uji antibakteri dan sitotoksitas sebagai antitumor. Hasil pengujian antibakteri dengan menggunakan metode turbidimetri menunjukkan bahwa oligomer kitosan dapat menghambat pertumbuhan bakteri uji. Penghambatan terbesar ditunjukkan oleh oligomer kitosan dengan waktu inkubasi 1 jam terhadap bakteri *Staphylococcus*

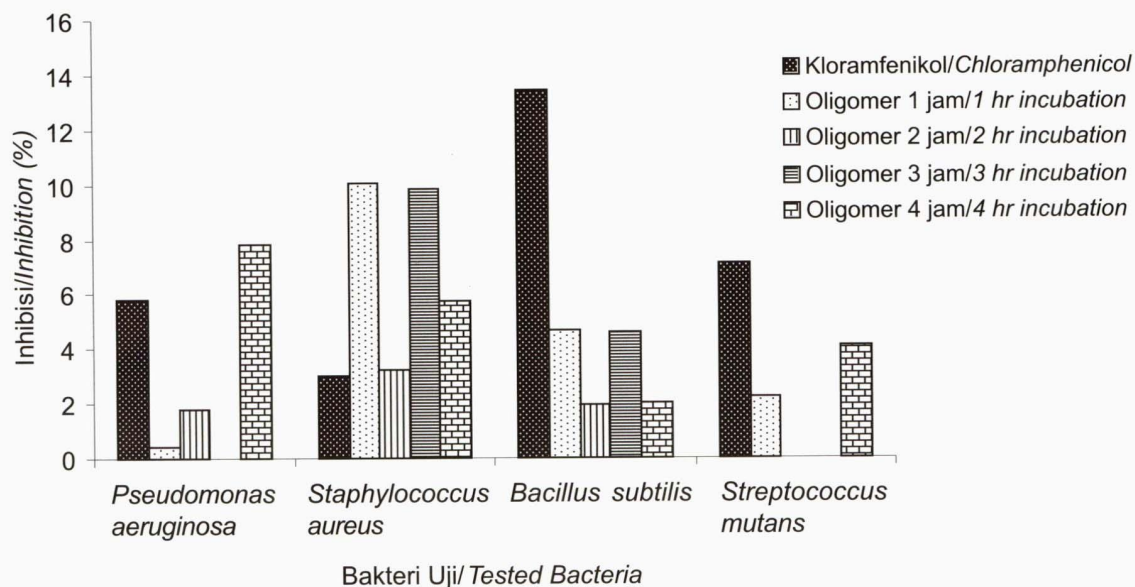
aureus, dengan penghambatan sekitar 10% (Gambar 8).

Kumar *et al.* (2005) melaporkan bahwa oligomer kitosan yang dihasilkan dari proses hidrolisis kitosan menggunakan enzim papain dan pronase mampu menghambat bakteri *Bacillus cereus* dan *Escherichia coli* lebih baik dibandingkan dengan polimer kitosan. Demikian juga Wang *et al.* (2007) melaporkan bahwa kitooligosakarida yang dihasilkan oleh chitosanase dari *Pseudomonas* CUY8 mampu menghambat bakteri *E. coli*, *S. aureus*, *S. lactis* dan *B. subtilis* dengan konsentrasi penghambatan minimum masing-masing adalah 0,08; 0,12; 0,12; dan 0,12%. Selain itu Wang juga menemukan bahwa berdasarkan derajat polimerisasinya (DP), kitooligosakarida dengan DP 4-6 memberikan aksi penghambatan yang lebih efektif dibandingkan kitooligosakarida dengan DP 7-9.

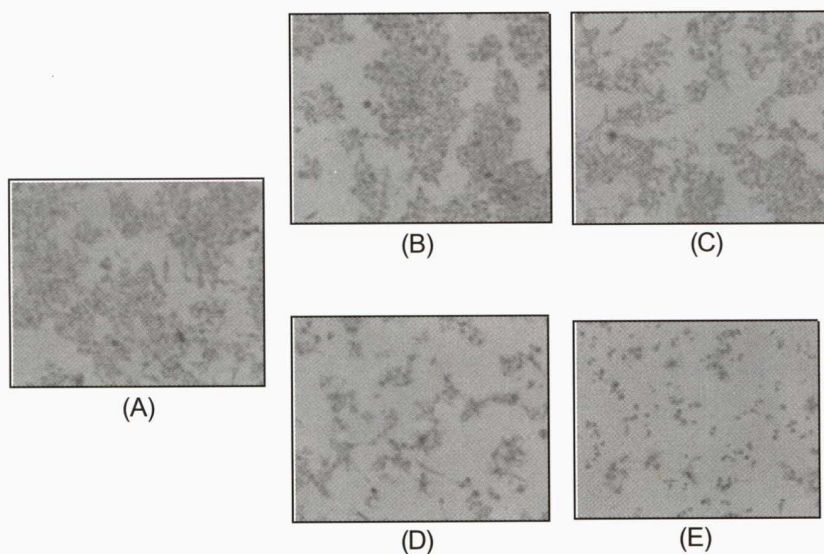
Hasil pengujian sitotoksitas kitooligosakarida terhadap sel tumor HeLa disajikan pada Gambar 9. Perlakuan penambahan kitooligosakarida pada sel HeLa menyebabkan kematian sel dengan tingkat kematian yang sebanding dengan dosis kitooligosakarida yang ditambahkan. Makin tinggi dosis kitooligosakarida yang ditambahkan, jumlah sel yang hidup makin berkurang. Hasil pengujian menunjukkan bahwa sel yang mendapatkan perlakuan kitooligosakarida sebesar 100 ppm menyebabkan kematian 44% sel kultur. Dengan menggunakan nilai probit diperoleh hasil bahwa LC_{50} kitooligosakarida adalah 120 ppm. Menurut Andersen (1991) dalam Sismindari *et al.* (2002) ekstrak dianggap aktif apabila mampu menyebabkan kematian populasi sel tumor 50% pada konsentrasi di bawah 30 ppm ($LC_{50} < 30$ ppm). Dengan demikian kitooligosakarida ini tidak cukup aktif dalam menghambat sel HeLa. Wahyuni *et al.* (2006) melaporkan bahwa kitooligomer dalam



Gambar 7. Hasil khromatografi lapis tipis oligomer KPU 2123.
Figure 7. Oligomer profile of KPU 2123 on thin layer chromatography.



Gambar 8. Penghambatan oligomer kitosan terhadap bakteri.
 Figure 8. Bacterial inhibition by chito-oligomer.



Gambar 9. Foto kristal biru formazan pada sel HeLa sebelum penambahan kitooligosakarida (A) dan setelah penambahan kitooligosakarida sebesar 12,5 ppm (B), 25 ppm (C), 50 ppm (D), dan 100 ppm (E).

Figure 9. Picture of blue formazan crystal on HeLa cell lines before (A) and after addition of chito-oligosaccharides at the concentration of 12.5 ppm (B), 25 ppm (C), 50 ppm (D), and 100 ppm (E).

hidrolisat kitosan dari hidrolisis kitosan menggunakan enzim kitosanase *Bacillus licheniformis* MB2 memiliki kemampuan menghambat proliferasi sel kanker K562 (*chronic myelogenous leukemia*). Aktivitas penghambatan tertinggi dihasilkan oleh hidrolisat hasil

reaksi enzimatik dari preparat enzim yang dipekatkan dengan ammonium sulfat 80% dengan aktivitas 0,1 U/mg kitosan selama 3 jam, yaitu sebesar 20,58%. Beberapa hal yang diduga berpengaruh terhadap penghambatan kitooligomer terhadap sel tumor adalah

jenis sel tumor, jenis kitooligomer dan dosis kitooligomer yang ditambahkan.

KESIMPULAN

- Berdasarkan analisis sekuen gen 16S-rRNA isolat bakteri KPU 2123 memiliki kemiripan sebesar 95% dengan *Stenotrophomonas maltophilia*.
- Enzim kitosanase yang diproduksi dari isolat KPU 2123 ini bekerja optimal pada pH 6 buffer fosfat dan suhu 50°C. Enzim ini cukup stabil pada suhu 37°C tetapi tidak stabil pada suhu optimalnya (50°C). Penambahan ion logam mempengaruhi aktivitas enzim kitosanase ini. Ion-ion logam divalen dan monovalen, kecuali Zn^{2+} sedikit menghambat aktivitas enzim, sedangkan penambahan ion Zn^{2+} pada konsentrasi 1 mM tidak menyisakan aktivitas enzim sama sekali.
- Aplikasi enzim kitosanase sebesar 23 U/g kitosan pada proses hidrolisis kitosan menghasilkan oligomer kitosan yang sebagian besar adalah tetramer, pentamer dan heksamer.
- Oligomer kitosan yang dihasilkan dapat menghambat pertumbuhan bakteri uji, terutama *Staphylococcus aureus*. Selain itu, oligomer kitosan ini juga dapat menyebabkan kematian sel HeLa dengan nilai LC_{50} sebesar 120 ppm.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terimakasih diucapkan kepada Sdr. Miftahul Ilmi, mahasiswa FMIPA Universitas Indonesia, yang telah membantu melakukan isolasi bakteri ini dari limbah udang. Ucapan terima kasih juga disampaikan kepada Ginting Pantatis, SSi yang telah membantu dalam identifikasi KPU 2123 secara molekuler.

DAFTAR PUSTAKA

- Alasalvar, C., Shahidi, F., and Quantick, P. 2000. Food and health applications of marine nutraceuticals: a review. In Alasalvar, C., and Taylor, T. (eds.). *Seafoods-Quality, Technology and Nutraceutical Applications*. Springer, London. p. 175–187.
- Anonymous. 2008. *Stenotrophomonas maltophilia*. http://en.wikipedia.org/wiki/Stenotrophomonas_maltophilia. Diakses tanggal 18 Februari 09
- Arnold, L.S. and Solomon, N.A. 1986. *Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology*. American Society for Microbiology. Washington DC.
- Brzezinska, M.S. 2008. Occurrence and activity of microorganisms in shrimp waste. *J. Curr. Microbiol.* 57(6): 580–587.
- Cabrera, J.C. and Cutsem, P.V. 2005. Preparation of chitooligosaccharides with degree of polymerization

higher than 6 by acid or enzymatic degradation of chitosan. *Biochem. Engin. J.* 25:165–172.

- Chasanah, E. 2004. *Characterization of Thermophilic Bacillus licheniformis MB2 Chitosanase Isolated from Manado Hot Spring Water*. Disertasi. Sekolah Pascasarjana, Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Chasanah, E., Fawzya, Y.N., Pratitis, A., dan Nurhayati, T. 2007a. Penapisan bakteri penghasil enzim kitosanase yang berasosiasi dengan spons laut. *Jurnal Pascapanen dan Bioteknologi Kelautan dan Perikanan.* 2(2): 161–169.
- Chasanah, E., Fawzya, Y.N., Putro, S., Oktavia, D.O., Krisnawang, H., dan Dewi, A.S. 2007b. Riset depolimerisasi kitosan secara enzimatis untuk produksi kitooligosakarida. *Laporan Teknis*. Balai Besar Riset Pengolahan Produk dan Bioteknologi Kelautan dan Perikanan, Jakarta.
- Choi, Y.J., Kim, E.J., Piao, Z., Yun, Y.C., and Shin, Y.C. 2004. Purification and characterization of chitosanase from *Bacillus* sp. strain KCTC 0377BP and its application for the production of chitosan oligosaccharides. *Appl. Environ. Microbiol.* 70(8): 4522–4531.
- Dhanikula, A.B. and Panchagnula, R. 2004. Development and characterization of biodegradable chitosan films for local delivery of paclitaxel. *AAPS J.* 6(3): 1–12.
- Fawzya, Y.N., Setyani, H.E., dan Wijaya, A. 2009. *Produksi dan Aplikasi Enzim Kitosanase dari Bakteri Asal Terasi untuk Pembuatan Oligomer Kitosan*. Makalah disampaikan pada Seminar Nasional Kelautan V Universitas Hang Tuah, Surabaya tanggal 23 April 2009.
- Gooday, J.W. 1994. Physiology of microbial degradation of chitin and chitosan. In Ratledge, C. (ed.). *Biochemistry of Microbial Degradation*. Kluwer Academic Publishers, Netherlands.
- Kittur, F.S., Kumar, A.B.V., Varadaraj, M.C., and Tharanathan, R.N. 2005. Chitooligosaccharides-preparation with the aid of pectinase isozyme from *Aspergillus niger* and their antibacterial activity. *Carbohydrate Research.* 340: 1239–1245.
- Kumar, A.B.V., Varadaraj, M.C., Gowda, L.R., and Tharanathan, R.N. 2005. Characterization of chito-oligosaccharides prepared by chitosan analysis with the aid of papain and pronase, and their bactericidal action against *Bacillus cereus* and *Escherichia coli*. *Biochem. J.* 391: 167–175.
- Lay, B.W. 1994. *Analisis Mikrobiologi di Laboratorium*. PT. Raja Grafindo Persada, Jakarta. 161 pp.
- Madigan, M.T., Martinko, J.M., and Parker, J. 2000. *Brock Biology of Microorganisms* (9th ed). Chapter 12: Microbial evolution and systematics. NJ : Prentice Hall, Inc.
- Marchesi, J.R., Sato, T., Weightman, A.J., Martin, T.A., Fry, J.C., Hiom, S.J., and Wade, W.G. 1998. Design and evaluation of useful bacterium-specific PCR primers that amplify genes coding for bacterial 16S rRNA. *Appl. Environm. Microbiol.* 64: 795–799.
- Meidina, Sugiyono, Jenie, B.S.L., dan Suhartono, M.T. 2005. Aktivitas antibakteri oligomer kitosan yang diproduksi menggunakan kitosanase dari isolat

- B. licheniformis* MB-2. www.iptek.net.id. Diakses tanggal 14 Mei 2006.
- No, H.K., Park, N.Y., Lee, S.H., Hwang, H.J., and Meyers, S.P. 2002. Antimicrobial activities of chitosans and chitosan oligomers with different molecular mass on spoilage bacteria isolated from tofu. *J. Food Sci.* 67: 1511–1514.
- Nogawa, M., Hiroya, T., Aya, K., Kenji, O., Hirofumi, O., and Yasushi, M. 1998. Purification and characterization of exo- β -D-glucosaminidase from a cellulolytic fungus, *Trichoderma reesei* PC-3-7. *Appl. and Env. Microbiol.* 64(3): 890–895.
- Piza, F.A.T., Siloto, A.P., Carvalho, C.V., and Franco, T.T. 1999. Production, characterization and purification of chitosanase from *Bacillus cereus*. *Brazilian Journal of Engineering*. Vol. 16.
- Putro, S. 1982. *Studies of the Suitability of Chitinoclastic Microorganisms for Shrimp Waste Fermentation* [Dissertation]. University of Washington. 339 pp.
- Sidharta, B.R. 2000. *Pengantar Mikrobiologi Kelautan*. Univ. Atma Jaya Press, Yogyakarta.
- Sismindari, A.S., Handayani, Yulia, S., and Candra, E. 2002. Potent effect of protein extract containing ribosome-inactivating proteins (RIPs) isolated from *Erythrina fusciculour* on cancer cells. *Indon. J. Biotechnol. Dec 2002*. p. 559–564
- Somashekar, D. and Joseph, R. 1996. Chitosanases – Properties and applications : A review. *Biosource Technol.* 55: 35–45
- Suzuki, K., Mikami, T., Okawa, Y., Tokoro, A., Suzuki, S., and Suzuki, M. 1986. Antitumor effect of hexa-N-acetylchitohexose and chitohexose against meth-A solid tumor. *Carbohydr. Res.* 151: 403–408
- Tanabe, T., Morinaga, K., Fukamizo, T., and Mitsutomi, M. 2003. Novel chitosanase from *Streptomyces griseus* HUT 6037 with transglycosylation activity. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 67(2): 354–364.
- Tsai, G.J., Wu, Z.Y., and Su, W.H. 2000. Antibacterial activity of a chitooligosaccharides mixture prepared by cellulase digestion of shrimp chitosan and its application to milk preparation. *J. Food Prot.* 63(6): 747–752.
- Van de Peer and De Watcher, 1993. TREECON : A software package for the construction and drawing of evolutionary trees. *Comput. Applic. Biosci.* 9: 177–182
- Wahyuni, S., Witarto, A.B., Syah, D., Zakaria, F.R., and Suhartono, M.T. 2006. Aktivitas senyawa-senyawa kitooligomer hasil reaksi enzimatis terhadap proliferasi sel kanker. *Prosiding Seminar Nasional Kitin Kitosan*. Departemen Teknologi Hasil Perairan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Institut Pertanian Bogor.
- Wang, Y., Zhou, P., Yu, J., Pan, X., Wang, P., Lan, W., and Thao, S. 2007. Antimicrobial effect of chitooligosaccharides produced by chitosanase from *Pseudomonas* CUY 8. *Asia Pac. J. Clin. Nutr.* 16 (1): 174–177.
- Woese, C.R. 1987. Bacterial evolution. *Microbiol. Rev.* 51: 221–271
- Yoon, H.G., Kim, H.Y., Lim, Y.H., Kim, H.K., Shin, D.H., Hong, B.S., and Cho, H.Y. 2000. Thermostable chitosanase from *Bacillus* sp. strain CK4: Cloning and expression of the gene and characterization of the enzyme. *Applied and Environmental Microbiology.* 66(9): 3727–3734.
- You-Jin, J. and Se-Kwon, K. 2000. Production of chitooligosaccharides using an ultrafiltration membrane reactor and their antibacterial activity. *Carbohydr. Polymers.* 41: 133–141.
- Zachary, I. 2003. Determination of cell number. In Hughes, D. and Mehmet, H. (eds.). *Cell Proliferation and Apoptosis*. Bios Scientific Publishers, Oxford, UK. 373 pp.
- Zhang, H., Du, Y., Yu, X., Mitsutomi, M., and Sei-ichi, A. 1999. Preparation of chitooligosaccharides from chitosan by a complex enzyme. *Carbohydrate Res.* 320: 257–260.
- Zhang, Z., Yuen, G.Y., Sarath, G., and Penheiter, A.R. 2001. Chitinases from the plant disease biocontrol agent, *Stenotrophomonas maltophilia* C3. *Phytopathology* 91: 204–211.
- Zilda, D.S., Fawzya, Y.N., dan Chasanah, E. 2006. Karakterisasi enzim kitosanase dari bakteri kitinolitik T5a1 yang diisolasi dari terasi. *Jurnal Pascapanen dan Bioteknologi Kelautan dan Perikanan.* 1(1): 43–49.