

PENAPISAN BAKTERI PENGHASIL ENZIM KITOSANASE YANG BERASOSIASI DENGAN SPONS LAUT

Ekowati Chasanah¹⁾, Yusro Nuri Fawzya²⁾, Asri Pratitis³⁾ dan Tati Nurhayati³⁾

ABSTRAK

Informasi pasar dunia menunjukkan bahwa 50% keperluan dunia akan produk turunan kitin, digunakan untuk produk suplemen kesehatan. Untuk menunjang proses produksi kitosan yang bersifat ramah lingkungan dan aman untuk konsumsi manusia, maka enzim pendegradasi kitin/kitosan sangat berperan. Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan bakteri penghasil enzim pendegradasi kitosan dari spons. Spons dipilih karena biota laut tersebut dikenal kaya akan senyawa bioaktif dan sebagian besar masa tubuhnya didominasi oleh bakteri. Dari 24 spons, telah berhasil diisolasi 86 isolat bakteri dan 22 di antaranya menghasilkan enzim pendegradasi kitin, termasuk di antaranya enzim kitosanase. Berdasarkan pada nilai indeks kitinolitik (IK) dan waktu produksi enzim, isolat KBJ 12 SB telah dipilih sebagai isolat penghasil kitosanase. Isolat tersebut menghasilkan enzim kitosanase maksimal pada hari ke-5, dengan aktivitas enzim sebesar 0,797 U/mg. Enzim kitosanase yang dihasilkan bekerja optimal pada suhu 60°C dan pH 8. Enzim stabil pada suhu 37°C dengan sisa aktivitas > 50% ketika diinkubasi selama 90 menit. Hasil identifikasi menunjukkan bahwa bakteri KBJ 12 SB memiliki sifat mirip dengan jenis *Bacillus* sp.

ABSTRACT: *Screening of chitosanase producing bacteria associated with marine sponges* By: Ekowati Chasanah, Yusro Nuri Fawzya, Asri Pratitis and Tati Nurhayati

Global market of chitin derivatives products showed that 50% are used for food supplement. Chitin degrading enzymes such as chitosanase have an important role in producing environmentally friendly chitosan and other chitin derivatives for human consumption. The objective of this research was to obtain chitin degrading enzyme, i.e. chitosanase, from bacteria isolated from marine sponges. Eighty six bacteria have been isolated from 24 sponges samples, and 22 of them were chitinolytic positive. Based on chitinolytic index value and enzyme production time, KBJ 12 SB isolate was chosen as chitosanase producing bacteria. The isolate was capable of producing enzyme at days 5, with chitosanase activity of 0.797 U/mg. The enzyme worked best at 60°C and pH 8. It was stable at 37°C, giving remaining activity of > 50% when incubated for 90 minutes. This isolate closed to *Bacillus* sp.

KEYWORDS: *screening, chitin degrading enzymes, chitosanase, bacteria, marine sponges, Bacillus* sp.

PENDAHULUAN

Bakteri, selain kapang, selama ini telah digunakan sebagai salah satu sumber potensial penghasil enzim, termasuk enzim pendegradasi kitin (enzim kitinolitik). Kelompok enzim ini akhir-akhir ini mendapat perhatian besar karena aplikasinya yang makin luas dalam bidang bioteknologi, di antaranya sebagai agen biokontrol terhadap kapang patogen dan insekta, berfungsi sebagai biopestisida, untuk memproduksi materi aktif kitooligosakarida serta untuk memproduksi protein sel tunggal, dan *protoplast* kapang (Patil *et al.*, 2000).

Riset tentang enzim kitinolitik dari bakteri lingkungan laut belum banyak dilakukan, padahal laut dinilai memiliki potensi menghasilkan enzim

pendegradasi kitin yang kuat. Bakteri laut *Vibrio alginolyticus* H-8 dilaporkan memiliki 2 jenis enzim kitinase, selain enzim deasetilase (Ohishi *et al.*, 1996). Sejak 2002, Balai Besar Riset Pengolahan Produk dan Bioteknologi Kelautan dan Perikanan, telah memulai kegiatan riset aplikasi enzim kitin deasetilase (CDA) dari *Bacillus* K29-14 koleksi Laboratorium Mikrobiologi dan Biokimia, PAU, IPB dan *Vibrio harveyi* yang ditujukan untuk menghasilkan proses ekstraksi kitosan yang lebih ramah lingkungan (Nasran *et al.*, 2003; Fawzya *et al.*, 2004).

Eksplorasi enzim kitinase/kitosanase kemudian dilakukan pada tahun-tahun berikutnya untuk menjawab tantangan akan ketersediaan enzim yang berperan dalam produksi turunan kitin yang bersifat aktif seperti kitosan oligomer. Berbagai enzim kitinolitik

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

²⁾ Mahasiswa pada Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Institut Pertanian Bogor (IPB)

³⁾ Staf pengajar pada Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Institut Pertanian Bogor (IPB)

yang telah berhasil diisolasi di antaranya adalah kitinase dan kitosanase dari produk tradisional berbahan baku udang yaitu terasi (Noviendri *et al.*, 2006; Zilda *et al.*, 2006). Enzim pendegradasi kitin dari bakteri yang diisolasi dari udang juga telah dilakukan oleh Putro (1982). Kitosanase termotabil dari *Bacillus licheniformis* MB-2 dengan kemampuan spesifik menghasilkan produk oligomer berantai 5 (pentamer) dan 7 (heptamer) telah diproduksi dari sumber air panas Manado (Chasanah *et al.*, 2006). Ketersediaan enzim lokal diharapkan dapat menekan biaya produksi produk turunan kitin, kitosan oligomer, secara kompetitif, mengingat Indonesia memiliki peluang besar sebagai produsen produk turunan kitin tersebut.

Penelitian ini merupakan rangkaian eksplorasi enzim kitosanase dari lingkungan laut, terutama dari bakteri yang berasosiasi dengan spons. Spons merupakan biota laut yang memiliki potensi besar dalam menghasilkan senyawa bioaktif termasuk enzim. Kandungan bioaktif spons berkorelasi dengan jumlah dan jenis bakteri yang terdapat pada spons tersebut (Suryati *et al.*, 2000).

BAHAN DAN METODE

Bahan

Spons dari Perairan Mentawai diperoleh dari tim COREMAP II. Spons dipanen secara manual dengan melakukan penyelaman pada kedalaman 7-12 m di beberapa lokasi, di antaranya Pulau Gosong Silo Oinan, Pulau Potologat dan Teluk Lapi (Kepulauan Mentawai, Sumatera Utara). Setelah sampai di perahu, spons segera dibilas dengan air laut steril, dan dimasukkan ke dalam botol berisi air laut steril yang mengandung gliserol 40%. Selanjutnya spons dibawa ke laboratorium Bioteknologi, Balai Besar Riset Pengolahan Produk dan Bioteknologi Kelautan dan Perikanan, Slipi dalam kondisi dingin.

Substrat koloidal kitin dibuat menurut Arnold & Solomon (1986) dengan bahan baku kitin komersial (*Sigma*), sedangkan 1% kitosan larut asam asetat disiapkan menurut Uchida *et al.* (1988).

Isolasi Bakteri dari Spons

Spons sebanyak 2 g digerus secara aseptik menggunakan mortar steril. Hasil gerusan dimasukkan ke dalam media pertumbuhan steril sea water complete (SWC) yang terdiri dari peptone 0,3%, yeast extract 0,3%, gliserol 0,3%, dan air laut 1 L (Seimahuira *et al.*, 2001). Selanjutnya media berisi gerusan spons diinkubasi pada penangas air goyang selama 24 jam dengan kecepatan 100 rpm dan suhu

30°C, yang ditujukan untuk penyegeran. Sebanyak 100µL campuran spons dan media cair disebarkan ke dalam cawan petri berisi media SWC padat (komposisi sama dengan media SWC cair dengan penambahan *bacto agar* 2%) dengan metode sebar (Lay, 1994). Setiap koloni yang tumbuh selanjutnya dimurnikan dengan cara digores pada media SWC padat. Penggoresan dilakukan berulang kali sampai diperoleh koloni tunggal.

Isolasi Enzim Kitinolitik dari Bakteri Spons

Koloni tunggal yang diperoleh dari tahap sebelumnya, diambil sebanyak 1 ose dan ditusukkan ke dalam *minimal syntetic media* (MSM) yang diperkaya koloidal kitin dengan komposisi KH_2PO_4 0,08%, NaCl 1%, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,4%, *yeast extract* 1%, koloidal kitin 1% dan agar 2%. Inkubasi dilakukan pada suhu 30°C selama 5 hari. Bakteri penghasil enzim kitinolitik adalah bakteri yang menghasilkan zona bening di sekeliling koloninya. Indeks kitinolitik (IK) dihitung berdasarkan perbandingan diameter zona bening dan diameter koloni (Cody, 1989; Wirth & Wolf, 1990). Beberapa bakteri penghasil IK terbesar digunakan untuk percobaan selanjutnya.

Kurva Pertumbuhan

Kurva pertumbuhan isolat bakteri yang memiliki IK terbesar dibuat berdasarkan pengamatan terhadap pertumbuhan isolat bakteri. Pengamatan terhadap pertumbuhan bakteri diawali dengan menginokulasi 1 ose isolat murni ke dalam media pertumbuhan MSM cair. Kemudian pertumbuhan isolat tersebut diamati setiap 4 jam sekali dengan mengukur absorbansi medium pada gelombang 660 nm.

Produksi dan Ekstraksi Enzim Kitosanase

Beberapa bakteri terpilih dikultivasi di media cair MSM yang diperkaya koloidal kitin 0,5%. Sebanyak 1 ose bakteri pada fase logaritmik (diperoleh dari kurva pertumbuhan) diinokulasikan ke dalam 20 mL medium *starter*, dan diinkubasi selama 15 jam pada penangas air dengan suhu 30°C, 100 rpm. Selanjutnya, sebanyak 10% (v/v) *starter* dipindahkan ke dalam media produksi dan diinkubasi. Pengambilan contoh dilakukan setiap hari, dan cairan fermentasi bebas sel bakteri (enzim kasar) didapatkan dengan cara mensentrifugasi cairan kultur pada 7500xg, suhu 4°C selama 15 menit.

Esai enzim kitosanase dilakukan terhadap ekstrak enzim kasar dengan menggunakan metode Yoon *et al.* (2000). Jumlah gula reduksi yang dihasilkan oleh reaksi enzim terhadap substrat ditentukan dengan metoda Schales (Uchida & Ohtakara, 1998) dengan kontrol penambahan enzim inaktif pada substrat yang sama (larutan kitosan 1%), dan blanko disiapkan

dengan menggunakan akuades untuk menggantikan larutan sampel. Satu (1) unit aktivitas kitosanase didefinisikan sebagai jumlah enzim yang dapat memproduksi 1 μmol gula reduksi (*glucosamine*) per menit.

Penentuan kadar protein enzim kasar dilakukan berdasarkan metode Lowry (Bollag & Edelstain, 1991) menggunakan *bovine serum albumin* (BSA) sebagai standar. Kecepatan menghasilkan enzim dalam jumlah

besar merupakan saringan kedua pemilihan bakteri penghasil kitosanase.

Karakterisasi Enzim Kitosanase dari Bakteri Terpilih

Ekstrak kasar enzim kitosanase dari enzim terpilih dipekatkan dengan ammonium sulfat 60% berdasarkan metode Bollag & Edelstain (1991). Konsentrat diperoleh dengan mensentrifugasi

Tabel 1. Bakteri penghasil enzim pendegradasi kitin yang diisolasi dari spons
Table 1. Chitin degraded bacteria from marine sponges

No.	Kode Spons/ Sponge Codes	Kode Isolat/ Isolate Codes	IK/ IC	No.	Kode Spons/ Sponge Codes	Kode Isolat/ Isolate Codes	IK/ IC
1	GSO 2	GSO 2 SA	-	44	TPB 2	TPB 2 SC	-
2	GSO 2	GSO 2 SB	1.38	45	TPB 2	TPB 2 SD	-
3	GSO 2	GSO 2 L	-	46	TPB 2	TPB 2 L	-
4	GSO 18	GSO 18 S	-	47	TPB 10	TPB 10 SA	1.10
5	GSO 18	GSO 18 SA	1.07	48	TPB 10	TPB 10 SB	-
6	GSO 18	GSO 18 SB	-	49	TPB 10	TPB 10 SC	-
7	GSO 18	GSO 18 LA	-	50	TPB 14	TPB 14 S	-
8	GSO 18	GSO 18 LB	1.33	51	TPB 14	TPB 14 LA	-
9	GSO 18	GSO 18 LC	-	52	TPB 14	TPB 14 LB	1.27
10	GSO 18	GSO 18 LD	1.05	53	TPB 16	TPB 16 S	1.26
11	GSO 22	GSO 22 SA	-	54	TPB 16	TPB 16 LA	-
12	GSO 22	GSO 22 SB	1.05	55	TPB 16	TPB 16 LB	-
13	GSO 22	GSO 22 SC	-	56	TPB 17	TPB 17 LA	1.07
14	KBJ 2	KBJ 2 SA	-	57	TPB 17	TPB 17 LB	1.14
15	KBJ 2	KBJ 2 SB	1.19	58	TPB 17	TPB 17 LC	-
16	KBJ 2	KBJ 2 SC	-	59	TPB 17	TPB 17 S	-
17	KBJ 2	KBJ 2 L	-	60	TPB 19	TPB 19 S	-
18	KBJ 10	KBJ 10 SA	-	61	TPB 19	TPB 19 LA	-
19	KBJ 10	KBJ 10 SB	1.23	62	TPB 19	TPB 19 LB	-
20	KBJ 12	KBJ 12 LA	-	63	TPB 19	TPB 19 LC	-
21	KBJ 12	KBJ 12LC	-	64	TPB 22	TPB 22 SA	-
22	KBS 12	KBS 12 SA	-	65	TPB 22	TPB 22 SB	-
23	KBJ 12	KBJ 12SB	5.40	66	TPB 22	TPB 22 SC	-
24	KBJ 19	KBJ 19 S	-	67	TPB 22	TPB 22 SD	1.20
25	KBJ 19	KBJ 19 LC	-	68	TPB 22	TPB 22 L	-
26	TLP 1	TLP 1 SA	-	69	TPP 3	TPP 3 SA	-
27	TLP 1	TLP 1 SB	-	70	TPP 3	TPP 3 SB	-
28	TLP 1	TLP 1 SC	-	71	TPP 3	TPP 3 SC	-
29	TLP 1	TLP 1 SD	-	72	TPP 7	TPP 7 S	-
30	TLP 1	TLP 1 SE	-	73	TPP 10	TPP 10 LA	1.38
31	TLP 1	TLP 1 SF	-	74	TPP 10	TPP 10 LB	-
32	TLP 6	TLP 6 SA	-	75	TPP 10	TPP 10 S	-
33	TLP 6	TLP 6 SB	-	76	TPP 11	TPP 11 SA	1.80
34	TLP 11	TLP 11 SA	-	77	TPP 11	TPP 11 SB	-
35	TLP 11	TLP 11 SB	-	78	TPP 11	TPP 11 SC	1.21
36	TLP 11	TLP 11 SC	-	79	TPP 11	TPP 11 SD	1.35
37	TLP 11	TLP 11 SD	-	80	TPP 11	TPP 11 SE	-
38	TLP 14	TLP 14 SA	-	81	TPP 11	TPP 11 LB	-
39	TLP 14	TLP 14 SB	1.15	82	TPP 22	TPP 22 SA	-
40	TLP 14	TLP 14 LA	1.41	83	TPP 22	TPP 22 SB	-
41	TLP 14	TLP 14 LB	-	84	TPP 22	TPP 22 SC	-
42	TPB 2	TPB 2 SA	1.30	85	TPP 26	TPP 26 SA	-
43	TPB 2	TPB 2 SB	-	86	TPP 26	TPP 26 SB	1.36

Keterangan/Note: IK = Indeks Kitinolitik/
IC = Index of Chitinolitik

campuran tersebut dengan kecepatan 7500xg, selama 15 menit pada suhu 4°C. Selanjutnya konsentrat diresuspensi dengan 15 ml *buffer* fosfat 0,05 M pH 6. Penentuan pH optimal dilakukan dengan mereaksikan enzim pada *buffer* dengan variasi nilai pH yang berkisar antara 3 sampai 9. *Buffer* yang digunakan dalam penentuan pH optimum adalah *buffer* sitrat (pH 3 dan 4), *buffer* sitrat-fosfat (pH 4, 5 dan 6), *buffer* fosfat (pH 6,7 dan 8), dan *buffer* asam borat (pH 8 dan 9) dengan konsentrasi 0,05 M. Penentuan suhu optimal dilakukan pada pH optimal dengan berbagai suhu inkubasi, yaitu suhu 30, 37, 50, 60 dan 70°C.

Penentuan Ketahanan Suhu Enzim

Pengujian ketahanan enzim terhadap panas dilakukan dengan memanaskan enzim pada suhu 37, 60 dan 70°C, dan sisa aktivitas diukur setiap 15 menit pemanasan, dengan kondisi esai seperti disebutkan di atas, pada suhu dan pH optimal enzim.

Efek Ion Logam

Efek logam divalen (Mg^{2+} , Mn^{2+} , Li^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} , Zn^{2+} , Ba^{2+} dan Ca^{2+}), monovalen (K^+ , Na^+ , NH_4^+) dan trivalen (Fe^{3+}) terhadap kinerja enzim diukur dengan mereaksikan enzim dengan 1mM logam tersebut di atas. Ion logam ditambahkan dalam bentuk larutan garam klorida. Aktivitas kitosanase diukur pada kondisi optimal enzim, dan dibandingkan dengan kontrol. Pada kondisi yang sama, dibuat kontrol yang tidak ditambah dengan ion logam. Esai enzim dan EDTA juga dilakukan untuk mengetahui ketergantungan enzim terhadap keberadaan ion logam.

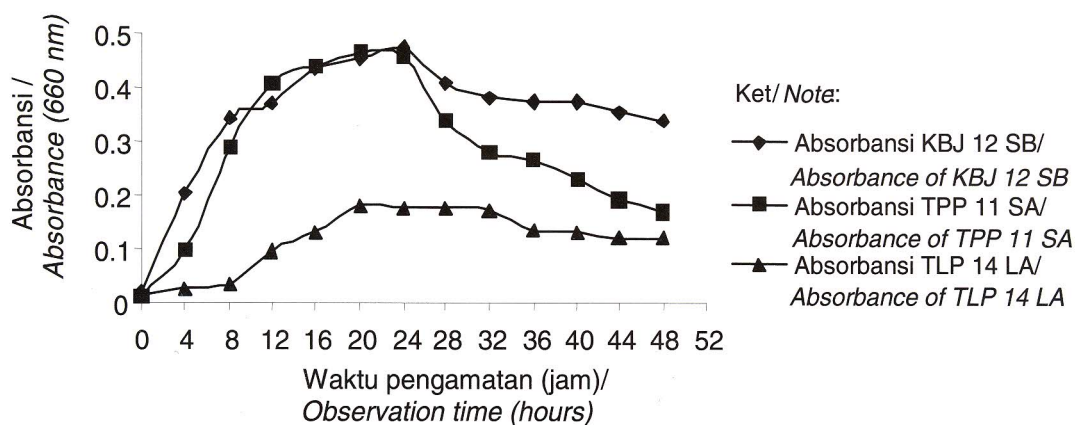
HASIL DAN BAHASAN

Dari 24 jenis spons baik dari jaringan spons maupun cairan perendam spons (air laut dan 40% gliserol), telah diperoleh 86 isolat bakteri. Bakteri yang diperoleh didominasi oleh bakteri Gram negatif berbentuk batang. Sidharta (2000) menyebutkan bahwa 80% bakteri laut berbentuk batang termasuk dalam kelompok Gram negatif. Kelimpahan jumlah bakteri yang berhasil diisolasi dari setiap jenis spons berbeda, yang tergantung dari jenis spons, perairan tempat spons tersebut diperoleh serta metode isolasi (Lee *et al.*, 2001; Ahn *et al.*, 2003).

Ketika ditumbuhkan dalam media padat yang mengandung koloidal kitin 1%, 22 dari 86 isolat yang diperoleh mampu mendegradasi kitin dengan membentuk zona bening di sekitar koloni bakteri. Tabel 1 menunjukkan nilai indeks kitinolitik (IK) dari setiap isolat pada saat inkubasi 5 hari. Dari hasil tersebut diperoleh 3 isolat yang memiliki nilai IK yang tertinggi, yaitu isolat dengan kode KBJ 12 SB (IK=5,40), TPP 11 SA (IK=1,80) dan TLP 14 LA (IK=1,41).

Gambar 1 memperlihatkan kurva pertumbuhan ketiga bakteri (KBJ12SB, TPP 11SA, TLP14 LA). Dari kurva pertumbuhan ini, produksi *starter* jam ke-8 selanjutnya digunakan untuk produksi *starter* isolat KBJ 12 SB dan TPP 11 SA, sedang jam ke-12 digunakan untuk memproduksi *starter* isolat TLP 14 LA. Pada saat jam tersebut, ketiga isolat berada pada masa pertumbuhan logaritmik.

Gambar 2 menunjukkan pertumbuhan bakteri dan produksi enzim. Produksi enzim kitosanase maksimal diperoleh pada hari ke-5 (Gambar 2a), ke-7 (Gambar 2b) dan ke-6 (Gambar 2c), dengan nilai aktivitas 0,0833 U/ml atau 0,797 U/mg; 0,0803 U/ml atau 0,873 U/mg; dan 0,0567 U/ml atau 0,382 U/mg, masing-



Gambar 1. Kurva pertumbuhan bakteri KBJ 12 SB, TPP 11 SA dan TLP 14 LA.
Figure 1. Bacterial growth curve of KBJ 12 SB, TPP 11 SA and TLP 14 LA.

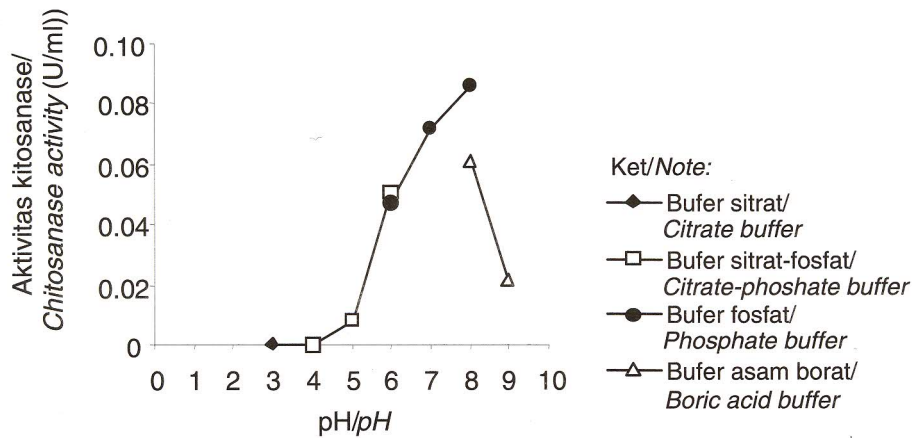
Tabel 2. Perbandingan sifat enzim kitosanase beberapa isolat
 Table 2. Characteristic of chitosanase from some isolates

Asal enzim/ Enzyme sources	Kondisi optimal enzim/ Optimum condition of enzyme		Suhu produksi enzim/ Enzyme production temp (°C)	Waktu produksi/ Production time	Sumber/References
	Suhu/ Temp (°C)	pH/ pH			
KBJ 12SB	60	8	30	5 hari/days	Riset ini/ This research
T5a1	50	7	37	24 jam/hours	Zilda et al. (2006)
<i>Bacillus licheniformis</i>	80	6	80	36-60 jam/hours	Chasanah (2006)
<i>Bacillus</i> sp. KCTC 0377Bp.	40	5	30	3 hari/days	Choi et al. (2004)
<i>Bacillus cereus</i>	40	5,8	30	14 jam/hours	Piza et al. (1999)
<i>Bacillus megaterium</i>	-	5	-	-	Pelletier & Sigush (1990)
<i>Bacillus</i> sp.	-	-	37	3 jam/ hours	Uchida & Ohtakara (1988)
<i>Matsuebacter chitosanobidus</i>	30-40	4	30	4 hari/days	Park et al. (1999)
<i>Trichoderma reseei</i> PC-3-7	50	4	28	72 jam/ hours	Nogawa et al. (1998)

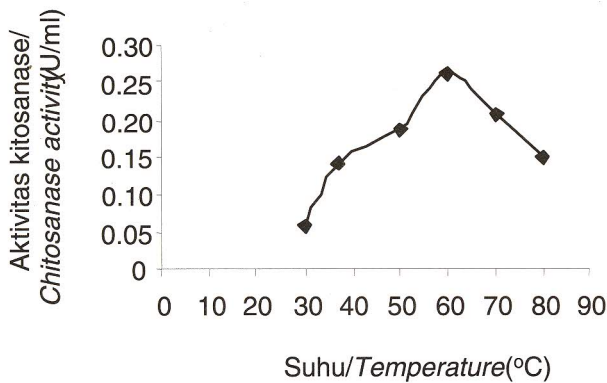
memproduksi enzim pendegradasi kitin, termasuk kitosanase untuk mempertahankan kehidupannya.

Enzim kitosanase dari bakteri KBJ 12 SB memiliki pH optimal 8, dan bekerja optimal pada suhu 60°C (Gambar 3 dan 4). Laporan ini diduga merupakan laporan pertama enzim kitosanase dari bakteri

mesofilik yang memiliki suhu optimal relatif tinggi, yaitu 60°C. Bakteri penghasil kitosanase dari golongan mesofilik seperti *Bacillus* sp. KCTC 0377, *Bacillus cereus* dan *Matsuebacter chitosanobidus* memproduksi enzim kitosanase pada suhu yang sama dengan KBJ 12 SB, yaitu 30°C, tetapi memiliki enzim



Gambar 3. Optimasi pH enzim kitosanase dari isolat KBJ 12 SB.
 Figure 3. pH optimization of KBJ 12 SB chitosanase.

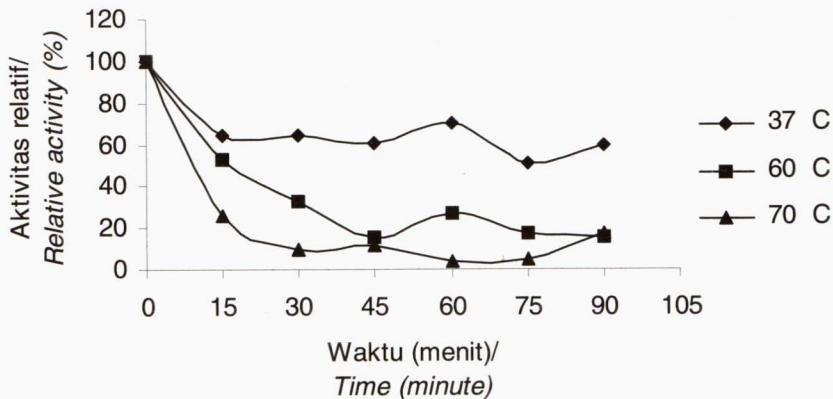


Gambar 4. Optimasi suhu enzim kitosanase dari isolat KBJ 12 SB.
 Figure 4. Optimum temperature of KBJ 12 SB chitosanase.

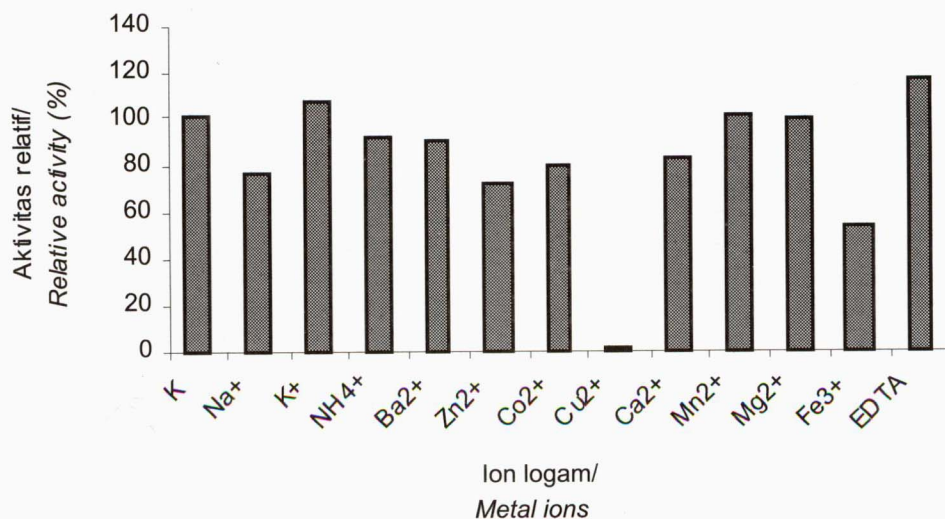
kitosanase yang bekerja optimal pada suhu 40°C (Park *et al.*, 1999; Piza *et al.*, 1999; Choi *et al.*, 2004). Enzim kitosanase dari 2 *strain* bakteri mesofilik yang diisolasi dari air dan tanah asal Jepang dilaporkan memiliki suhu optimal 40-50°C (Mahata *et al.*, 2005). Enzim kitosanase yang diisolasi dari terasi, yaitu dari isolat T5a1, juga bekerja optimal pada suhu 50°C dan pH 7, tetapi stabil pada suhu 40°C selama 200 menit (Zilda *et al.*, 2006). Enzim-enzim tersebut di atas, yang diisolasi dari bakteri mesofilik dan diproduksi dengan suhu sesuai pertumbuhan bakterinya, rata-rata memiliki suhu optimal yang lebih tinggi dari suhu produksinya, tetapi tidak stabil pada suhu optimal tersebut. Hal itu berarti, bahwa aplikasi penggunaan enzim tersebut nantinya hanya pada suhu operasi proses di bawah suhu optimum enzim (enzim tsb memiliki kestabilan yang relatif tinggi) sehingga enzim tersebut tidak dapat dioptimalkan.

Enzim KBJ 12 SB bersifat stabil pada suhu 37°C (Gambar 5). Hal ini berarti bahwa enzim tersebut meskipun mampu bekerja maksimal pada suhu 60°C, diperkirakan tidak mampu mempertahankan struktur tiga dimensinya pada suhu 60°C lebih dari 15 menit. Pada suhu optimum, enzim bekerja maksimal dan struktur tiga dimensi protein enzim pada posisi sedemikian rupa sehingga sisi aktif enzim tersebut dalam konformasi yang sempurna untuk bereaksi dengan substrat. Pada kondisi terdenaturasi akibat suhu tinggi, enzim tersebut tidak dapat lagi mempertahankan struktur tiga dimensinya. Dalam aplikasinya, enzim tersebut tidak dapat dipakai pada reaksi dengan suhu tinggi di atas suhu optimalnya atau pada suhu optimal (60°C) lebih dari 15 menit.

Ion logam Cu^{2+} secara signifikan mampu menghambat enzim kitosanase KBJ 12 SB, sedangkan Na^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} dan Fe^{3+} sedikit



Gambar 5. Ketahanan panas enzim kitosanase dari isolat KBJ 12 SB
Figure 5. Heat stability of KBJ 12 SB chitosanase



Gambar 6. Pengaruh ion logam (sebagai garam Cl) pada aktivitas enzim kitosanase dari isolat KBJ 12 SB
Figure 6. Effect of metal ions on KBJ 12 SB chitosanase activity

Tabel 3. Ciri-ciri morfologi dan sifat biokimia KBJ 12 SB
 Table 3. Morphological and biochemical characteristics of KBJ 12 SB isolate

Ciri-ciri morfologi/ Morphological characteristics	Bacillus sp.*	KBJ 12 SB
Gram/ Gram	Positif/Positive	Positif/Positive
Bentuk sel/ cell shape	Batang/Rod	Batang/Rod
Bentuk koloni/ colony shape		Bervariasi/Varied
Warna koloni/ colony colour		Bervariasi/Varied
Sifat Biokimia/ Biochemical characteristics		
O/F test	O, F, O/F	-
SIM	+ / -	+
Katalase test	+	+
Gelatinase	+ / -	+
Oksidase test	+ / -	-

* Sumber : MacFaddin (1980)

menghambat enzim tersebut (Gambar 6). Tampaknya penambahan ion logam tidak berpengaruh nyata pada peningkatan aktivitas enzim, karena itu penambahan EDTA juga tidak memberikan kontribusi terhadap aktivitas enzim. Hal yang hampir sama juga ditunjukkan oleh kitosanase yang berasal dari isolat *Matsuebacter chitosanobidus* 3001. Enzim kitosanase tidak terpengaruh oleh beberapa ion logam seperti Ba²⁺, Co²⁺, Hg²⁺, Ca²⁺, Cu²⁺, Mg²⁺, Fe²⁺, Mn²⁺ dan Zn²⁺. Kitosanase tersebut dapat dihambat oleh ion Ag²⁺ (Park *et al.*, 1999). Sementara enzim kitosanase yang dihasilkan oleh isolat T5a1 dapat dipengaruhi oleh ion Ca²⁺ yang meningkatkan aktivitas sampai 37% (Zilda *et al.*, 2006).

Identifikasi terhadap isolat KBJ 12 SB menunjukkan bahwa isolat tersebut kemungkinan besar adalah *Bacillus* sp. dengan ciri-ciri dan sifat biokimia seperti pada Tabel 2. *Bacillus* sp. merupakan spesies yang mudah ditemukan pada berbagai ekosistem, baik daratan maupun pada ekosistem perairan. Oguntoyinbo (2007) melaporkan mengenai keragaman *Bacillus* yang hidup di perairan laut, dan dari beberapa isolat yang telah diisolasi dengan media yang mengandung mangan, dua di antaranya teridentifikasi sebagai *Bacillus* sp. Penelitian yang hampir serupa juga dilakukan oleh Bradley Tebo yang berhasil mengisolasi *Bacillus* sp. SG-1 dari perairan Guaymas Basin di Teluk California, Amerika Serikat (J. Craig Venter Institute, 2005).

KESIMPULAN

- Dari 24 sampel spons, 86 isolat tunggal berhasil diisolasi dan 22 di antaranya menghasilkan enzim pendegradasi kitin (kitinolitik).
- Isolat KBJ 12 SB menunjukkan potensi kitinolitik yang terbesar dengan nilai IK sebesar 5,40.

- Kitosanase yang dihasilkan oleh isolat KBJ 12 SB memiliki waktu produksi selama 5 hari.
- Aktivitas kitosanase mencapai kondisi optimal pada pH 8 dan suhu 60°C. Enzim ini cukup stabil pada suhu reaksi 37°C selama 90 menit.
- Pemberian ion logam Cu²⁺ menghambat enzim tersebut kitosanase asal bakteri KBJ 12 SB.
- Isolat KBJ 12 SB diduga merupakan bakteri *Bacillus* sp.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terimakasih disampaikan kepada COREMAP II yang telah menyediakan sampel spons.

DAFTAR PUSTAKA

- Anonimous. 2005. *Statistik Perikanan Tangkap Indonesia 2003*. Departemen Kelautan dan Perikanan, Ditjen Perikanan Tangkap. Jakarta.
- Ahn, Y.B., Rhee, S.K., Fennel, D.E., Kerkhof, J.L., Hentschel, U. and Haggblom, M.M. 2003. Reductive dehalogenation of brominated phenolic compounds by microorganisms associated with the marine sponge *Aplysina aerophoba*. *Appl. and Env. Microbiol.* 69(7): 4159-4166.
- Arnold, L.D. and Solomon, N.A. 1986. *Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology*. American Society for Microbiology. Washington DC.
- Bollag, D.M. and Edelstein, J.S. 1991. *Protein Methods*. Wiley-Liss. New York.
- Chasanah, E., Hariyadi, P., Witarto, A.B., Hwang, J.K. and Suhartono, M.T. 2006. Biochemical characteristic of chitosanase from the Indonesian *B. licheniformis* MB-2. *Journal of Molecular Biotechnol-ogy* 33 (2) : 93-102.
- Choi, Y.J., Kim, E.J., Piao, Z., Yun, Y.J. 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. and Env. Microbiol.* 70(8): 4522-4531.
- Cody, R.M. 1989. Distribution of chitinase and chitinase in *Bacillus*. *Curr. Microbiol.* 19:201-205.
- Einarsson, J. M. M. 2006. Chitin Chitosan: A bioactive material from shrimp shell. PRIMEX. Iceland. <http://www.silase/foodmanufacturing/activities/documentation%20%20nov%202003%20island>. Assessed August 14, 2007.
- Fawzya, Y.N., Indriati, N. dan Suryaningrum, T.D. 2004. Pengaruh penambahan kitin pada medium produksi terhadap aktivitas kitin deasetilase dari *Bacillus K29-14*. *J. Penel. Perik. Indonesia* 10(3):11-18.
- J. Craig Venter Institute. 2007. Gordon and Betty Moore foundation marine microbial genome sequencing project. <https://research.venterininstitute.org/moore/SingleOrganism.do?speciesTag=BSG1&pageAttr=pageMain>. Assessed September 4, 2007.
- Lay, B.W. 1994. *Analisis Mikroba di Laboratorium*. PT Raja Grafindo Persada. Jakarta.
- Lee, Y.K., Lee, J.H. and Lee, H.K. 2001. Microbial symbiosis in marine sponges. *J. Microbiol.* 39(4): 254-264.
- MacFaddin, J.F. 1980. *Biochemical Tests for Identification of Medical Bacteria*. Williams and Wilkins. London.
- Mahata, M.E, Soo, Y.C., Dharma, A., Ryanto, I., Rizal, Y. dan Kawamukai, M. 2005. Karakterisasi kitosanase ekstraseluler dari bakteri asal air dan tanah di Kota Matsue, Jepang dan dibandingkan dengan kitosanase dari *Matsuebacter chitosanotabidus* 3001. *J. Mikrobiol. Ind.* 10 (1): 21-24.
- Nasran, S., F. Ariyani dan N. Indriati. 2003. Produksi kitinase dan kitin deasetilase dari *Vibrio harveyi*. *J. Penel. Perik. Indonesia* 9(5):33-38.
- Nogawa, M., Hiroya, T., Aya, K., Kenji, O., Hirofumi, O. and Yasushi, M. 1998. Purification and characterization of exo- β -D-glucosaminidase from a cellulytic fungus, *Trichoderma reesei* PC-3-7. *Appl. and Env. Microbiol.* 64(3): 890-895.
- Noviendri, D., Chasanah, E. dan Fawzya, Y.N. 2006. Karakterisasi enzim kitinase yang diproduksi oleh isolat bakteri JB4 dari terasi. *JPB. Perikanan.* 1(2): 85-92.
- Oguntoyinbo, F.A. 2007. Monitoring of marine *Bacillus* sp. diversity among the bacteria community of sea water. *African J. Biotech.* 6 (2): 163-166.
- Ohishi K., Yamagishi M., Ohta T., Suzuki M., Izumida H., Sano H., Nishijima M. and Miwa T. 1996. Purification and properties of two chitinases from *Vibrio alginolyticus* H-8. *J. of Fermentation and Bioengineering.* 82 (6) : 598-600
- Park, J.K., Shimono, K., Ochiai, N., Shigeru, K., Kurita, M., Ohta, Y., Tanaka, K., Matsuda, H. and Kawamukai, M. 1999. Purification, characterization and gene analysis of a chitosanase (ChoA) from *Matsuebacter chitosanobidus* 3001. *J. Bacteriology.* 181(21): 6642-6649.
- Patil R.S., Ghormade V., Deshpande M.V. 2000. Chytinolytic enzymes : an exploration. *Enzyme and Microbial Technology.* 26: 473-483
- Pelletier, A., and Sigush, J. 1990. Purification and characterization of three chitosanase activities from *Bacillus megaterium*. *Appl. and Env. Microbiol.* 70(8): 4522-4531.
- Piza, F.A.T., Siloto, A.P., Carvalho, C.V. and Franco, T.T. 1999. Production, characterization and purification of chitosanase from *Bacillus cereus*. *Braz. J. Chem. Eng.* 16(2): 185-192.
- Seimahura, J.G., Suwanto, A., Rumengan, I.F.M., Kawung, N.J. and Uria, A.R. 2001. *Genetic diversity of bacteria associated with the marine sponges, Hymanicidon sp. and Placortis nigra from Bunaken National Marine Park in North Sulawesi, Indonesia*. Unpublished.
- Sidharta, B.R. 2000. *Pengantar Mikrobiologi Kelautan*. Univ. Atma Jaya Press. Yogyakarta.
- Suryati, E., Rosmiati, Parenrengi, A. dan Nurbaya. 2000. Identifikasi bakteri dan kapang yang bersimbiosis dengan spons di Perairan Spermonde, Sulawesi Selatan. *J. Penel. Perik. Indonesia.* 6 (1): 59- 63.
- Uchida, Y. and Ohtakara, A. 1988. Chitosanase from *Bacillus* species. In *Methods in Enzymology*. Vol 5. Academic Press. London.
- Wirth, S.J. and Wolf, G.A. 1990. Dye-labelled substrates for the assay and detection of chitinase and lysozyme activity. *J Microbiol Meth.* 12:197-205.
- 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: Clonning and expression of the gene and characterization of the enzyme. *Appl. and Env. Microbiol.* 66(9): 3727-3734.
- Zilda, D.S., Fawzya, Y.N. dan Chasanah, E. 2006. Karakterisasi enzim kitosanase dari bakteri kitinolitik T5a1 yang diisolasi dari terasi. *J. P. B. Perikanan.* 1(1): 43-49.