

# Pemurnian Parsial dan Karakterisasi Kitinase Asal Jamur Entomopatogen *Beauveria bassiana* Isolat BB200109

Yadi Suryadi<sup>1\*</sup>, Tri P. Priyatno<sup>1</sup>, I Made Samudra<sup>1</sup>, Dwi N. Susilowati<sup>1</sup>, Nuni Lawati<sup>2</sup>, dan Eman Kustaman<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian, Jl. Tentara Pelajar 3A, Bogor 16111

Telp. (0251) 8337975; Faks. (0251) 8338820; \*E-mail: yshid@yahoo.co.uk

<sup>2</sup>Dept. Biokimia, FMIPA IPB-Bogor, Jl. Agatis, Dramaga Bogor

Diajukan: 18 Februari 2013; Diterima: 28 Juni 2013

## ABSTRACT

**Partial Purification and Characterization of Chitinase from Entomopathogenic Fungus *Beauveria bassiana* Isolate BB200109. Yadi Suryadi, Tri P. Priyatno, I Made Samudra, Dwi N. Susilowati, Nuni Lawati, and Eman Kustaman.** *Beauveria bassiana* is one of the entomopathogenic fungus that produces chitinase when infecting its host. This study was aimed to purify, isolate and characterize chitinase of *B. bassiana* isolate BB200109. Pathogen identity was determined both morphologically and molecularly using ITS primer, whilst characterization was done at various conditions i.e. temperature, pH, metal ion and incubation time. Results showed that the BB200109 isolate belonged to *B. bassiana*. The isolate produced extracellular chitinase with chitinolytic index of 1.035. Partial purification of three saturated ammonium sulphate precipitation (10, 30, and 70%) showed maximum purity of 1.2 times, while dialysis could increase the purity of 1.9 times compared to that of crude enzyme extract. Characterization results showed that the chitinase isolated from *B. bassiana* isolate BB200109 had an optimum activity at pH 4, temperature 50°C, and optimum incubation time of 90 minutes. The effect of metal ions (60 mM) Mn<sup>2+</sup> served as activator, while EDTA, K<sup>+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Fe<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, and Na<sup>+</sup> acted as inhibitors. The chitinase demonstrated lower affinity to chitin substrate as indicated by high K<sub>m</sub> value of 0.266 mg/l and a V<sub>max</sub> of 0.067 mg/l sec. Based on SDS-PAGE, chitinase from *B. bassiana* isolate BB200109 had molecular weight of 60.25 kDa. The study implied the potency of *B. bassiana* isolate BB200109 as extracellular chitinase producer with its enzyme characteristics seems to be developed as an insect biocontrol agent.

**Keywords:** Partial purification, chitinase, characterization, *B. bassiana* isolate BB200109.

## ABSTRAK

**Karakterisasi Kitinase Asal Jamur Entomopatogen *Beauveria bassiana* Isolat BB200109. Yadi Suryadi, Tri P. Priyatno, I Made Samudra, Dwi N. Susilowati, Nuni Lawati, dan Eman Kustaman.** *Beauveria bassiana* merupakan salah satu jamur entomopatogen yang memproduksi kitinase saat menginfeksi inangnya. Penelitian ini bertujuan untuk melakukan pemurnian parsial, mengisolasi dan mengkarakterisasi kitinase *B. bassiana* isolat BB200109 se-

cara kualitatif dan kuantitatif. Identitas patogen ditentukan secara morfologis maupun molekuler menggunakan primer ITS; sementara karakterisasi dilakukan pada berbagai kondisi suhu, pH, ion logam, dan waktu inkubasi. Hasil identifikasi menunjukkan isolat BB200109 tergolong ke dalam kelompok *B. bassiana*. Isolat *B. bassiana* BB200109 menghasilkan indeks kitinolitik sebesar 1,035. Hasil pemurnian parsial dengan pengendapan amonium sulfat 10, 30, dan 70% menghasilkan aktivitas enzim sebesar 1,2 kali, sementara hasil dialisis meningkatkan kemurnian sebesar 1,9 kali dibanding ekstrak kasar enzim. Hasil karakterisasi menunjukkan kitinase asal *B. bassiana* isolat BB200109 memiliki pH optimum 4, suhu optimum 50°C, dan waktu inkubasi optimum 90 menit. Pengaruh penambahan ion logam (60 mM) Mn<sup>2+</sup> berfungsi sebagai aktivator, sementara ion EDTA, K<sup>+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Fe<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, dan Na<sup>+</sup> bersifat sebagai inhibitor. Kitinase memiliki afinitas yang rendah terhadap substrat kitin ditunjukkan dengan nilai K<sub>m</sub> sebesar 0,266 mg/l dan V<sub>max</sub> sebesar 0,067 mg/l detik. Hasil SDS-PAGE menunjukkan *B. bassiana* isolat BB200109 memiliki bobot molekul 60,25 kDa. Hasil penelitian ini mengindikasikan potensi *B. bassiana* isolat BB200109 sebagai penghasil kitinase ekstrak seluler dengan karakteristik enzim yang diproduksinya dapat dikembangkan lebih lanjut sebagai agen biokontrol serangga hama.

**Kata kunci:** Purifikasi parsial, kitinase, karakterisasi, *B. bassiana* isolat BB200109.

## PENDAHULUAN

Kitin merupakan polimer yang tersusun atas unit N-asetil-D-glukosamin dengan ikatan β (1,4). Senyawa kitin di alam jumlahnya sangat berlimpah, karena senyawa ini merupakan jenis polimer terbesar kedua setelah selulosa dan berfungsi sebagai komponen penyusun dari berbagai organisme, seperti bakteri, hewan vertebrata, moluska, artropoda, tumbuhan, alga, dan beberapa jenis jamur tertentu (Cohen-Kupiec dan Chet, 1998), sehingga senyawa ini diproduksi secara terus-menerus dan berpotensi besar untuk diuraikan menjadi produk akhir yang lebih bermanfaat. Upaya pencarian isolat mikroorganisme penghasil enzim yang memiliki nilai ekonomi tinggi terus dilakukan hingga saat ini. Salah satu enzim yang memiliki nilai ekonomi tinggi, yaitu enzim kitinase. Kitinase mampu

menghidrolisis ikatan  $\beta$ -1,4-asetamido-2-deoksi-D-glikosida pada kitin dan oligomer kitin (Sahai dan Manocha, 1993; Koga, 2005).

Salah satu jenis jamur yang berpotensi memiliki aktivitas kitinase yang tinggi adalah jamur entomopatogen *Beauveria bassiana*. *B. bassiana* termasuk ke dalam kingdom fungi, filum Ascomycota, kelas Sordariomycetes, ordo Hypocreales, famili Clavicipitaceae. *B. bassiana* memiliki koloni berwarna putih, hifa pendek, dan bentuk spora bulat (Nuraida dan Hasyim, 2009). Jamur ini sejak lama diketahui memiliki potensi sebagai agen pengendali hayati yang dapat mengendalikan populasi serangga hama, sehingga banyak dikembangkan sebagai agensia hayati dalam bidang pertanian (Prayogo, 2006; Vijayavani *et al.*, 2009; Revathi *et al.*, 2011).

Jamur entomopatogen menginfeksi tubuh serangga secara kontak dengan permukaan inang, masuk ke dalam tubuh inang, mereproduksi inokulum jamur di dalam satu atau lebih jaringan inang hingga menyebabkan kematian, kemudian dilanjutkan proses pertumbuhan miselia jamur di luar tubuh inang hingga menutupi seluruh tubuh serangga. Serangga yang telah terinfeksi *B. bassiana* selanjutnya dapat mengkontaminasi lingkungan dengan mengeluarkan spora melalui tubuh inang maupun feses yang terkontaminasi. Serangga yang sehat pada lingkungan di sekitarnya akan terinfeksi, sehingga berakibat terjadinya penurunan populasi serangga hama tanaman (Wahyudi, 2002). Penelitian virulensi cendawan *B. bassiana* terhadap organisme pengganggu tanaman (OPT) sudah banyak dilakukan. Indriyati (2009) melaporkan jamur ini dapat menimbulkan kematian pada kutu daun dan kepik hijau masing-masing sebesar 78,8 dan 76%. Jamur secara alami terdapat di dalam tanah sebagai jamur saprofit, di mana pertumbuhannya sangat dipengaruhi oleh kondisi tanah, seperti kandungan bahan organik, suhu, dan kelembaban.

Adanya potensi jamur *B. bassiana* sebagai agensia hayati mendorong untuk dilakukannya penelitian lebih lanjut terhadap kitinase yang diproduksi oleh jamur ini. Penelitian ini bertujuan untuk memurnikan dan mengisolasi kitinase dari jamur *B. bassiana* isolat BB200109, dan mengkarakterisasi aktivitas kitinase pada berbagai kondisi pH, suhu, stabilitas waktu inkubasi, ion logam, kinetika enzim, dan menentukan bobot molekul protein. Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberi informasi mengenai potensi *B. bassiana* isolat BB200109 sebagai penghasil kitinase ekstraseluler dan data karakteristik enzim yang produksinya.

## BAHAN DAN METODE

### Peremajaan dan Perbanyakkan *B. bassiana* Isolat BB200109

*B. bassiana* isolat BB200109 berasal dari Suka-ramandi, Subang, yang diisolasi dari serangga walang sangit dan disimpan di dalam koleksi kultur mikroba Biogen CC. Jamur entomopatogen *B. bassiana* isolat BB200109 dari kultur stok diremajakan pada media *potato dextrose agar* (PDA). Satu cawan petri yang berisi media PDA diinokulasikan dengan isolat *B. bassiana* dari stok tabung kultur PDA yang diletakkan pada bagian tengah cawan petri, kemudian diinkubasikan pada suhu ruang selama 7 hari. Identifikasi secara morfologis jamur *B. bassiana* dilakukan dengan pengamatan di bawah mikroskop dilanjutkan dengan identifikasi molekuler (genomik DNA) menggunakan primer *internal transcribe spacer* (ITS) mengikuti prosedur St. Leger dan Joshi (1997).

### Produksi, Isolasi, dan Pemurnian Parsial Kitinase Ekstraselular

Dua potongan agar berisi kultur jamur *B. bassiana* diinokulasikan di dalam media kitin cair yang mengandung 125 ml koloidal kitin 0,3%, 0,65 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 1,5 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,25 g NaCl, 0,5 g  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 0,12 g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , dan 0,005 g  $\text{CaCl}_2$ . Kultur diinkubasi selama 5 hari di dalam inkubator bergoyang (120 rpm) pada suhu ruangan. Sebanyak 10 ml kultur jamur *B. bassiana* ( $\pm 5.000$  spora/ml) dipipet dan diinokulasikan ke dalam 1.000 ml media kitin cair dengan teknik aseptik. Kultur diinkubasi di dalam inkubator bergoyang pada suhu ruang selama 5 hari (Sassa *et al.*, 2009). Kultur disentrifus dengan kecepatan 12.800x g selama 5 menit. Dari supernatan yang dihasilkan, diambil 200 ml sebagai ekstrak enzim kasar, kemudian sisanya dipresipitasi dengan amonium sulfat  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  dengan tingkat kejenuhan masing-masing 10, 30, 50, dan 70%.

### Uji Aktivitas Kitinase secara Kualitatif

Uji kualitatif dilakukan dengan tiga kali ulangan dan satu kontrol (hanya diisi dengan 5  $\mu\text{l}$  bufer fosfat 0,2 M, pH 7). Indeks kitinolitik ditentukan dengan metode Mubarik *et al.* (2010). Sebanyak 2 ose kultur isolat *B. bassiana* dimasukkan ke dalam tabung mikro steril berisi 100  $\mu\text{l}$  akuades steril. Sebanyak 5  $\mu\text{l}$  larutan dimasukkan pada sumur di dalam media agar yang mengandung koloid kitin. Cawan diinkubasikan selama 7 hari. Zona bening yang terbentuk divisualisasikan dengan penambahan pewarna *congo red* 0,1%, kemudian cawan dicuci dengan akuades dan diameter zona bening yang terbentuk diukur berdasarkan

formula indeks kitinolitik = diameter zona bening/diameter koloni.

#### Uji Aktivitas Kitinase secara Kuantitatif

Uji kuantitatif dilakukan menurut prosedur Toharisman *et al.* (2005). Aktivitas kitinase ditentukan sebagai produk akhir hidrolisis enzim berupa GlcNAc. Satu unit aktivitas kitinase didefinisikan sebagai 1  $\mu$ mol gula reduksi GlcNAc yang dibebaskan selama satu menit dalam kondisi yang telah ditetapkan.

Uji aktivitas enzim terhadap sampel hasil pemurnian parsial dilakukan dengan mencampur 150  $\mu$ l sampel enzim, 150  $\mu$ l bufer fosfat pH 7, dan 300  $\mu$ l koloid kitin 0,3%. Campuran dikocok dengan vortek dan diinkubasi pada *water bath* selama 30 menit pada suhu 37°C. Campuran enzim disentrifus dengan kecepatan 6.400x g selama 5 menit dan 500  $\mu$ l supernatan yang dihasilkan dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambah dengan 500  $\mu$ l akuades dan 1.000  $\mu$ l pereaksi Schales. Campuran dididihkan pada suhu 100°C selama 10 menit, setelah dingin selanjutnya diukur absorbansinya pada panjang gelombang 420 nm.

Total protein ditetapkan menurut metode Bradford (1976) menggunakan *bovine serum albumin* (BSA) sebagai standar. Nilai absorbansi diukur dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 595 nm. Aktivitas spesifik enzim ditentukan berdasarkan pedoman Spindler (1997) sebagai berikut:

Aktivitas spesifik (unit/mg) = Aktivitas kitinase (unit/ml)/kadar protein total (mg/ml)

#### Karakterisasi Aktivitas Kitinase

Enzim direaksikan dengan substrat koloid kitin 0,3% pada suhu 37°C selama 30 menit pada berbagai kondisi pH larutan bufer 3 sampai 10. Bufer sitrat untuk pH 3-6, bufer fosfat pH 7, dan bufer glisin-NaOH pH 8-10. Untuk melihat pengaruh suhu, enzim direaksikan dengan substrat koloid kitin 0,3%, dan bufer fosfat pH 7, pada rentang suhu uji 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, dan 60°C selama 30 menit. Uji pengaruh waktu inkubasi dilakukan dengan mereaksikan kitinase dengan substrat koloid kitin 0,3%, dan bufer pH 4. Inkubasi enzim dilakukan pada suhu 50°C dan rentang waktu inkubasi 15, 30, 60, 120, dan 150 menit. Uji terhadap pengaruh ion logam dilakukan dengan mereaksikan kitinase dengan substrat, bufer fosfat pH 7, dan garam ion logam (EDTA, KCl, MnCl<sub>2</sub>, MgCl<sub>2</sub>, CuSO<sub>4</sub>, FeSO<sub>4</sub>, ZnCl<sub>2</sub>, dan NaCl) pada konsentrasi 60 mM. Inkubasi dilakukan pada suhu 37°C selama 30 menit. Kinetika kitinase dilakukan dengan membuat grafik Lineweaver-Burk:

$$(double\ reciprocal): \frac{1}{v} = \frac{K_m}{V_{maks}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{maks}}$$

Nilai  $K_m$  dan  $V_{maks}$  ditentukan berdasarkan plot grafik antara  $1/[S]$  dan  $1/V$ . Larutan substrat kitin dibuat dengan konsentrasi antara 0,1-1,0% dengan interval 0,2% dalam volume reaksi 600  $\mu$ l dan campuran diinkubasi pada suhu 37°C selama 30 menit.

#### Penentuan Bobot Molekul Protein dengan SDS-PAGE

Pembuatan gel SDS-PAGE dilakukan menurut metode Bollag dan Edelman (1991). Proses elektroforesis dilakukan dengan arus listrik bertegangan 60 V, 30 mA selama  $\pm$ 4 jam. Pewarnaan gel dilakukan dengan pewarna perak nitrat (AgNO<sub>3</sub>) 0,1% selama 20 menit dan dicuci dengan ddH<sub>2</sub>O selama 20 menit. Penentuan bobot molekul didasarkan pada perhitungan dengan menggunakan plot persamaan garis antara nilai  $R_f$  dan log bobot molekul.

### HASIL DAN PEMBAHASAN

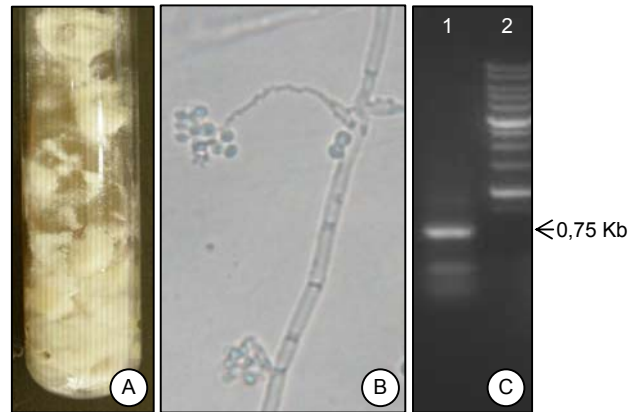
#### Morfologi dan Identifikasi Jamur Entomopatogen *B. bassiana* Isolat BB200109

Hasil pengamatan morfologi *B. bassiana* isolat BB200109 disajikan pada Gambar 1A. Biakan *B. bassiana* pada media PDA mempunyai miselia dan konidia berwarna putih (Samson *et al.*, 1988). Biakan yang telah bersporulasi menghasilkan kumpulan konidia seperti tepung. Konidia diproduksi di atas konidiofor yang berbentuk seperti botol berukuran sekitar 3-6 x 2,5-3,5  $\mu$ m, sedangkan konidia berbentuk bulat berukuran 2-3  $\mu$ m x 2-2,5  $\mu$ m (Gambar 1B). Hasil identifikasi yang dilakukan dengan amplifikasi sekuen ITS dengan primer spesifik isolat *Beauveria* dari Sukamandi yang didisain berdasarkan sekuen ITS *Beauveria* di *GeneBank* (Gambar 1C). Hasil analisis BLASTN sekuen ITS *B. bassiana* isolat BB200109 menunjukkan bahwa isolat tersebut tergolong dalam spesies *B. bassiana*.

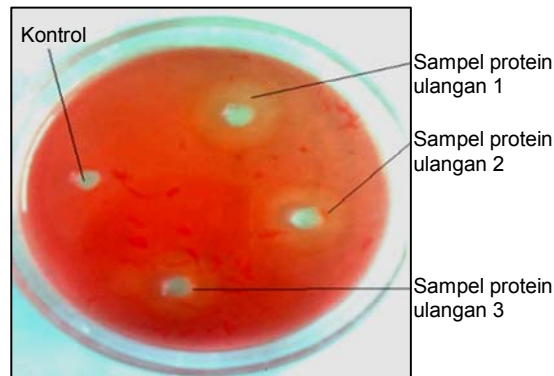
#### Indeks Kitinolitik *B. bassiana* Isolat BB200109

*B. bassiana* isolat BB 200109 ditumbuhkan pada media agar yang mengandung koloid kitin 0,3% setelah diinkubasi selama 7 hari (Gambar 2). Secara kualitatif isolat ini mendifusikan kitinase ekstraseluler ke dalam media yang berakibat terdegradasinya substrat kitin menjadi bentuk monomer sederhana, yaitu GlcNAc.

Substrat kitin (koloid kitin) di dalam media akan terhidrolisis oleh kitinase yang mengakibatkan terbentuknya zona bening di sekeliling koloni isolat *B. bassiana*. Zona bening akan semakin terlihat jelas



**Gambar 1.** Morfologi, variasi konidia, dan uji molekuler *B. bassiana* BB200109. A = isolat jamur entomopatogen *B. bassiana* BB200109 yang dibiakkan pada media PDA miring di dalam tabung reaksi, B = struktur konidia *B. bassiana*, C = gel elektroforesis produk PCR hasil amplifikasi ITS genomik DNA *Beauveria*. Lajur 1 Isolat BB200109; lajur 2 Marker 1 kb.



**Gambar 2.** Indeks kitinolitik isolat *B. bassiana* setelah diberi larutan *congo red*.

setelah penambahan larutan *congo red* ( $C_{32}H_{22}N_6O_6S_2Na_2$ ) yang berikatan dengan substrat polimer kitin ikatan  $\beta$ -1,4 dalam media agar sehingga berwarna merah. Bagian media kitin agar-agar yang terhidrolisis oleh kitinase yang menghasilkan monomer GlcNAc yang tidak memiliki ikatan  $\beta$ -1,4 larutan *congo red* tidak dapat mengikat kuat. Pembilasan dengan akuades dan NaCl akan melunturkan *congo red*, terutama di daerah sekitar koloni yang mengandung gula reduksi sehingga terlihat zona bening (Downie *et al.*, 1994; Sumardi *et al.*, 2005).

Rata-rata indeks kitinolitik *B. bassiana* isolat BB 200109, yaitu sebesar 1,035. Nilai indeks kitinolitik menunjukkan adanya kitinase yang dihasilkan oleh isolat *B. bassiana*. Terbentuknya zona bening di sekitar koloni mikroorganisme menunjukkan adanya produksi enzim ekstraseluler (Dewi, 2008; Nuniek *et al.*, 2009). Kitinase yang disekresikan oleh mikroorganisme ke dalam media koloid kitin menyebabkan polimer kitin pada media terdegradasi menjadi unit monomer GlcNAc (Chen dan Lee, 1994).

### Isolasi dan Pemurnian Parsial Kitinase

Tingkat kemurnian ditentukan dari perbandingan antara aktivitas spesifik tiap tahap pemurnian enzim dengan aktivitas spesifik ekstrak kasar sehingga aktivitas spesifik akan meningkat seiring dengan tahapan pemurnian (Seftiono, 2008). Tingkat kemurnian sampel enzim hasil pengendapan amonium sulfat 10% meningkat dari ekstrak kasar enzim, yaitu sebesar 1,2 kali, sementara pada tahap pengendapan amonium sulfat 50% tingkat kemurnian menurun 0,6 kali (Tabel 1).

Tingkat kemurnian enzim meningkat dari tahap pengendapan amonium sulfat 70% ke tahap pemurnian dialisis, yaitu 1,9 kali. Pada tahap dialisis ini aktivitas kitinase meningkat sebesar 0,0156 unit/ml. Dibandingkan hasil penelitian Sassa *et al.* (2009) terhadap berbagai isolat *B. bassiana* di Brazil, hasil produksi kitinase *B. bassiana* isolat BB200109 masih relatif rendah. Rendahnya kitinase dalam penelitian ini diduga karena jenis strain yang diuji serta substrat spesifisitas

inang juga berbeda serta belum dilakukan optimasi produksi kitinasenya.

### Karakterisasi Kitinase

Kitinase *B. bassiana* isolat BB200109 dikarakterisasi berdasarkan beberapa parameter, yaitu pH, suhu, waktu inkubasi, dan pengaruh penambahan ion logam. Penentuan pH optimum dilakukan dengan menggunakan bufer yang sesuai untuk meningkatkan aktivitas enzim. Aktivitas kitinase tertinggi terdapat pada bufer sitrat fosfat pH 4 dengan aktivitas kitinase 0,0053 unit/ml selanjutnya aktivitas menurun seiring dengan meningkatnya pH (Gambar 3). Aktivitas kitinase kembali mengalami peningkatan pada pH 9 sebesar 0,0049 unit/ml. Pada pH 7 dalam larutan bufer fosfat, kitinase mempunyai aktivitas enzim sebesar 0,0044 unit/ml.

Penurunan atau peningkatan aktivitas enzim setelah pH optimal kemungkinan disebabkan adanya perubahan keadaan ion enzim dan keadaan ion substrat. Perubahan kondisi ion enzim dapat terjadi pada residu asam amino yang berfungsi katalitik mengikat substrat atau residu asam amino yang berfungsi mempertahankan struktur tersier dan kuarterner enzim aktif (Spindler, 1997). Aktivitas enzim yang mengalami penurunan dapat dipulihkan dengan merubah kondisi reaksi enzimatik pada pH optimalnya.

Pada pH tertentu, perubahan muatan ion pada rantai samping dapat terionisasi dari residu asam amino enzim meningkat lebih besar sehingga mengakibatkan terjadinya denaturasi enzim yang disertai hilangnya aktivitas katalitik enzim, di samping itu adanya perubahan struktur tersier menyebabkan kelompok hidrofobik kontak dengan air sehingga solubilitas enzim menjadi berkurang yang mengakibatkan turunnya aktivitas enzim secara bertahap (Chen dan Lee, 1994).

Suhu inkubasi sangat berpengaruh terhadap aktivitas enzim, di mana enzim mudah terdenaturasi apabila terkena suhu tinggi yang berakibat kinerja enzim menjadi menurun. Waktu inkubasi berpengaruh terhadap jumlah produk hidrolisis enzim yang dihasilkan. Aktivator yang dapat mempengaruhi aktivitas enzim dapat berupa jenis ion logam dan non logam. Aktivitas kitinase optimal terjadi pada suhu 50°C sebesar 0,0081 unit/ml (Gambar 4).

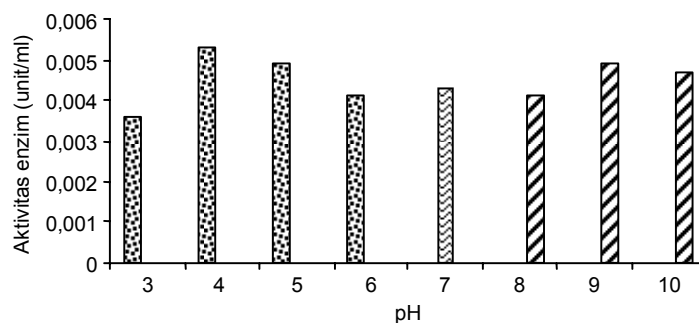
Aktivitas kitinase meningkat seiring peningkatan suhu dan suhu optimal terlihat pada suhu 50°C. Selanjutnya terjadi penurunan aktivitas, diduga karena meningkatnya energi kinetik akibat meningkatnya suhu reaksi yang mempercepat gerakan vibrasi, translasi, dan rotasi antara molekul enzim dan substrat (Kolodziesjka *et al.*, 2000).

Aktivitas enzim optimal terjadi pada 90 menit inkubasi sebesar 0,0040 unit/ml. Aktivitas kitinase me-

**Tabel 1.** Tingkat kemurnian pada setiap tahap pemurnian kitinase *B. bassiana* isolat BB200109.

Sampel enzim	Volume kitinase (ml)	Aktivitas kitinase (unit/ml) <sup>1</sup>	Kadar protein kitinase (mg/ml) <sup>2</sup>	Total aktivitas kitinase (unit/ml) <sup>3</sup>	Protein total (mg/ml)	Aktivitas spesifik (unit/mg) <sup>4</sup>	Hasil (%) <sup>5</sup>	Tingkat kemurnian (kali) <sup>6</sup>
Ekstrak kasar	200	0,0042	0,0428	0,8400	8,5600	0,0981	100	1
Amonium sulfat 10%	8	0,0048	0,0419	0,0384	0,3352	0,1146	114,2857	1,2
Amonium sulfat 30%	8	0,0046	0,0392	0,0368	0,3136	0,1173	109,5238	1,2
Amonium sulfat 50%	8	0,0048	0,0833	0,0384	0,6664	0,0576	114,2857	0,6
Amonium sulfat 70%	8	0,0133	0,1168	0,1064	0,9344	0,1139	316,6667	1,2
Dialisis	0,5	0,0156	0,0813	0,0078	0,0407	0,1916	371,4285	1,9

<sup>1</sup> aktivitas kitinase = aktivitas (U/ml) x volume (ml), <sup>2</sup> protein dihitung dengan metode Bradford dengan standard BSA (mg/ml), <sup>3</sup> total aktivitas kitinase = volume kitinase x kadar protein, <sup>4</sup> aktivitas spesifik (U/mg)/adar protein (mg/ml), <sup>5</sup> hasil = jumlah enzim setelah purifikasi/total enzim sebelum purifikasi, <sup>6</sup> tingkat kemurnian = aktivitas spesifik enzim setelah purifikasi/aktivitas spesifik sebelum purifikasi.



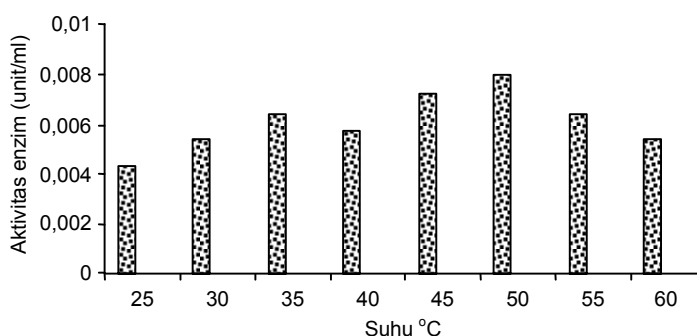
**Gambar 3.** Profil hasil pengujian pengaruh pH terhadap aktivitas kitinase. Bufer sitrat fosfat (pH 3-6), bufer fosfat (pH 7), dan bufer NaOH-glisin (pH 8-10).

ningkat sejak 15 menit inkubasi hingga mencapai aktivitas optimal pada 90 menit inkubasi. Aktivitas kitinase menurun setelah waktu inkubasi optimal dan menunjukkan aktivitas yang sama, yaitu sebesar 0,0039 unit/ml pada menit 120 dan 150 (Gambar 5).

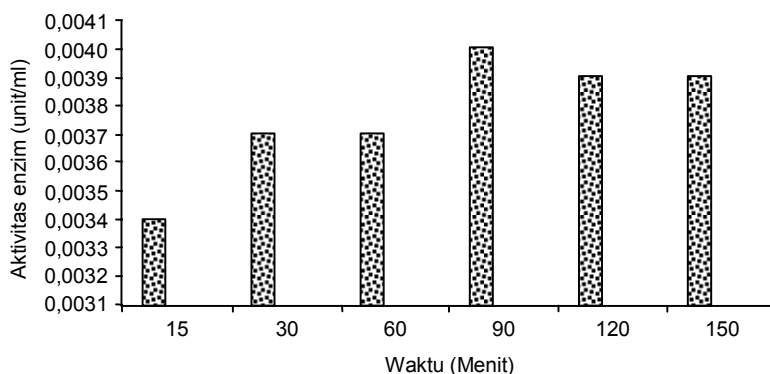
Ion logam dengan konsentrasi 60 mM dapat berperan sebagai aktivator atau inhibitor enzim. Aktivator merupakan senyawa kimia berfungsi mengaktivasi kompleks enzim substrat. Ion  $Mn^{2+}$  tidak mampu menghambat aktivitas kitinase dan menunjukkan aktivitas kitinase tertinggi, yaitu 0,0164 unit/ml, sementara ion  $Mg^{2+}$  memberikan efek penghambatan terhadap aktivitas kitinase yang lebih besar dari ion logam lain

dengan aktivitas kitinase yang dihasilkan sebesar 0,0048 unit/ml (Gambar 6).

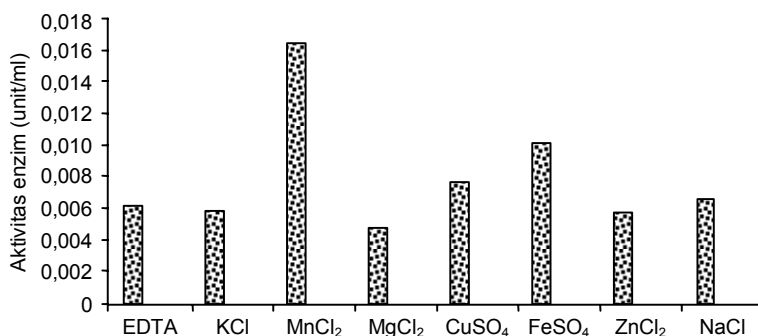
Kinetika enzim yang ditunjukkan dengan nilai  $K_m$  dan  $V_{maks}$  merupakan suatu kondisi di mana kecepatan tidak dapat bertambah lagi dengan bertambahnya konsentrasi substrat. Konstanta *Michaelis-Menten* ( $K_m$ ) merupakan suatu keadaan di mana kecepatan reaksi enzim telah mencapai  $\frac{1}{2}V_{maks}$ . Nilai  $K_m$  spesifik dan berbeda antara satu enzim dengan yang lain. Persamaan *Lineweaver-Burk* digunakan untuk menentukan nilai  $K_m$  dan  $V_{maks}$ . Nilai  $K_m$  merupakan ukuran afinitas suatu enzim dalam menghidrolisis substrat yang menunjukkan indikator kekuatan kom-



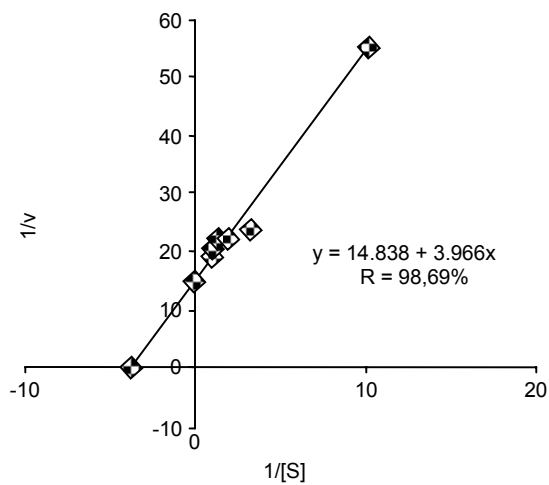
**Gambar 4.** Profil hasil pengujian pengaruh suhu terhadap aktivitas kitinase.



**Gambar 5.** Profil hasil stabilitas aktivitas kitinase terhadap waktu inkubasi pada suhu 50°C dan pH 4.



**Gambar 6.** Profil hasil pengujian pengaruh ion logam (60 mM) terhadap aktivitas kitinase.



Gambar 7. Kurva *double reciprocal* Lineaweaver-Burk.

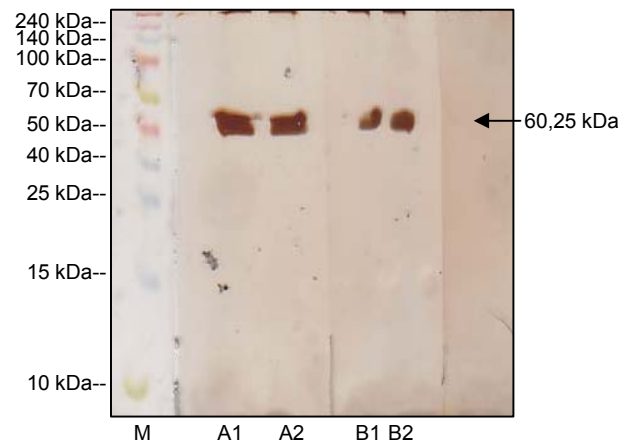
plek enzim-substrat. Nilai  $K_m$  lebih kecil daripada  $V_{maks}$ , maka kompleks enzim substrat mantap dan afinitas enzim terhadap substrat lebih tinggi, sedangkan jika nilai  $K_m$  lebih besar daripada  $V_{maks}$  berlaku kebalikannya (Bintang, 2010). Kinetika enzim dihitung berdasarkan pengukuran konsentrasi GlcNAc sebagai produk hidrolisis substrat koloid kitin pada berbagai konsentrasi selama waktu inkubasi 30 menit, sehingga diperoleh persamaan linier  $y = 14,838 + 3,966x$  (Gambar 7).

Dari persamaan tersebut diperoleh nilai  $V_{maks} = 0,067$  mg/l detik dan nilai  $K_m = 0,266$  mg/l. Hal ini mengindikasikan bahwa nilai  $K_m$  lebih besar, yang berarti kompleks enzim substrat kurang mantap dan afinitas enzim terhadap substrat rendah. Hasil penelitian di Cina (Zhang *et al.*, 2004) melaporkan produksi kitinase *B. bassiana* isolat BB 174 pada kondisi formulasi padat mempunyai nilai  $K_m$  0,52 mg/ml dan  $V_{maks}$  sebesar 0,70 mg/l detik.

#### Bobot Molekul

Sampel kitinase dari ekstrak kasar enzim hasil pengendapan 70% amonium sulfat dan sampel enzim hasil dialisis dianalisis jumlah pita dan bobot molekulnya dengan teknik SDS-PAGE. Hasil elektroforegram SDS-PAGE memperlihatkan bahwa kitinase memiliki bobot molekul berkisar antara 20-120 kDa (Gambar 8).

Bobot molekul kitinase pada bakteri berkisar antara 60-110 kDa, sementara bobot molekul kitinase pada golongan Aktinomisetes berkisar 30 kDa atau lebih rendah (Sahai dan Manocha, 1993). Bobot molekul pita protein yang dihasilkan mendekati bobot molekul jenis enzim N-asetil-D-glukosamidase yang telah dilakukan oleh Michael *et al.* (1993) dengan



Gambar 8. Bobot molekul kitinase hasil elektroforegram SDS-PAGE. M = marker (*spectra multicolor broad range protein ladder*, Fermentas Life Science), A1 dan A2 = pengendapan amonium sulfat 70%, dan B1 dan B2 = dialisis.

bobot molekul antara 64-66 kDa, namun berbeda dengan bobot molekul yang dilaporkan oleh Hayukkala *et al.* (1993) di mana metode SDS-PAGE terhadap kitinase isolat *B. bassiana* menghasilkan bobot molekul 45 kDa. Adanya perbedaan bobot molekul yang dihasilkan dapat diduga karena protein yang dihasilkan berasal dari jenis *B. bassiana* yang berbeda. Pada penelitian ini, sampel protein hasil pengendapan amonium sulfat 70% dan dialisis (kolom A dan B pada Gambar 8), memperlihatkan satu pita dengan jarak Rf yang sama (1,7 cm), yang berarti protein kitinase yang diisolasi pada penelitian ini memiliki bobot molekul 60,25 kDa.

#### KESIMPULAN

Telah berhasil dimurnikan secara parsial kitinase dari *B. bassiana* isolat BB200109. Produksi kitinase ekstraseluler ditunjukkan dengan indeks kitinolitik sebesar 1,035. Amonium sulfat jenuh 70% dan hasil dialisis menghasilkan kemurnian enzim tertinggi.

Karakterisasi yang dilakukan terhadap kitinase hasil penelitian ini menunjukkan karakteristik pH optimum 4, suhu optimum 50°C, dan waktu inkubasi optimum 90 menit. Pengaruh penambahan ion logam (60mM)  $Mn^{2+}$  menjadi aktivator, sementara ion EDTA,  $K^+$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ , dan  $Na^+$  bersifat sebagai inhibitor. Enzim kitinase memiliki nilai  $K_m$  sebesar 0,266 mg/l dan  $V_{maks}$  sebesar 0,067 mg/l.detik. Protein enzim kitinase memiliki bobot molekul 60,255 kDa.

#### UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada BB Biogen yang telah membiayai penelitian ini dengan kode DIPA BB Biogen TA 2012 No. 1798.009.001.011.

## DAFTAR PUSTAKA

- Bintang, M. 2010. Teknik Penelitian Biokimia. Erlangga, Jakarta. hlm. 256.
- Bollag, D.M. and S.J. Edelman. 1991. Protein Methods. Wiley Liss, New York. p. 415.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 12:248-254.
- Chen, J.P. and M.S. Lee. 1994. Simultaneous production and partition of chitinase during growth of *Serratia marcescens* in an aqueous two-phase system. *Biotechnol. Tech.* 8(11):783-788.
- Cohen-Kupiec, R. and I. Chet. 1998. The molecular biology of chitin digestion. *Curr. Opin. Biotechnol.* 9:331-334.
- Dewi, M.I. 2008. Isolasi bakteri dan uji aktivitas kitinase termofilik kasar dari sumber air panas tinggi raja, Simalungun Sumatera Utara. Skripsi S1, Program Studi Biologi, Universitas Sumatera Utara. hlm. 65.
- Downie, B., H.W.M. Hilhorst, and J.D. Bewley. 1994. A new assay for quantifying endo- $\beta$ -D-mannanase activity using congo red dye. *Phytochem.* 36:829-835.
- Hayukkala, I., C. Mitamura, S. Hara, Hirayae, Nishizawa, and Hibi. 1993. Induction and purification of *Beauveria bassiana* chitinolytic enzymes. *J. Invertebr. Pathol.* 61(1):97-102.
- Indriyati. 2009. Virulensi jamur entomopatogen *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin (Deuteromycotina: Hyphomycetes) terhadap kutu daun (*Aphis* spp.) dan kepik hijau (*Nezara viridula*). *JHPT* 2:92-98.
- Koga, D. 2005. Application of chitinase in agriculture. *J. Met. Mater. Miner.* 15:33-36.
- Kolodziejska, I., A.W. Pajak, G. Ogonowska, and Z.E. Sikorski. 2000. Deacetylation of chitin in a two-stage chemical and enzymatic process. *Bulletin of the Sea Fisheries Institute* 2(150):15-24.
- Michael, J., I. Bidochka, K. Tong, G. George, and Khachatourians. 1993. Partial purification and characterization of two extracellular N-acetyl-D-glucosaminidases produced by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Can. J. Microbiol.* 39(1):40-45.
- Mubarik, N.R., M. Irni, A. Amaryllis, S. Sugeng, and R. Iman. 2010. Chitinolytic bacteria isolated from chili rhizosphere: Chitinase characterization and its application as biocontrol for whitefly (*Bemisia tabaci* Genn.). *Am. J. Agric. Biol. Sci.* 5(4):430-435.
- Nuniek, H., T.R. Joko, Mudasir, dan Sabirin. 2009. Kitinase dan mikroorganisme kitinolitik: Isolasi, karakterisasi, dan manfaatnya. *Indo. J. Chem.* 9(1):37-47.
- Nuraida dan A. Hasyim. 2009. Isolasi, identifikasi, dan karakterisasi jamur entomopatogen dari rizosfir pertanian kubis. *J. Hort.* 19(4):419-432.
- Prayogo, Y. 2006. Upaya mempertahankan keefektifan cendawan entomopatogen untuk mengendalikan hama tanaman pangan. *J. Litbang Pertanian* 25(2):47-54.
- Revathi, N., G. Ravikumar, M. Kalaiselvi, D. Gomathi, and C. Uma. 2011. Pathogenicity of three entomopathogenic fungi against *Helicoverpa armigera*. *J. Plant Pathol. Microbiol.* 2(4):1-4.
- Sahai, A.S. and M.S. Manocha. 1993. Chitinases of fungi and plants: Their involvement in morphogenesis and host-parasite interaction. *FEMS Microbiol. Rev.* 11:317-338.
- Samson, R.A., H.C. Evans, and J.P. Latge. 1988. Atlas of Entomopathogenic Fungi. Springer-Verlag, New York. p. 187.
- Sassa, D.C., G.V. Pereira, P.M.O.J. Neves, and J.E. Garcia. 2009. Genetic variation in a chitinase gene from *B. bassiana*: Lack of association between enzyme activity and virulence against *Hypothenemus hampei*. *J. Entomol.* 6(1):35-41.
- Seftiono, H. 2008. Pemurnian dan karakterisasi mananase dari *Streptacidiphilus luteoalbus*. Skripsi S1, Program Studi Biokimia, Institut Pertanian Bogor. 24 hlm.
- Spindler, K.D. 1997. Chitinase and chitosanase assays. p. 229-235. *In* R.A.A. Muzarelli and M.G. Peter (eds.) Chitin Handbook. Alda Tecnografica.
- St. Leger, R.J. and L. Joshi. 1997. The application of molecular techniques to insect pathology with emphasis on entomopathogenic fungi. p. 367-394. *In* L. Lacey (ed.) Manual of Techniques in Insect Pathology. Academic Press, New York.
- Sumardi, A. Suwanto, T.M. Suhartono, and P. Tresnawati. 2005. Isolation and characterization of mannanolytic bacteria from palm oil shell and their mannanase enzyme production properties. *Biotropia* 25:1-10.
- Toharisman, A., M.T. Suhartono, Spindler-Barth, Hwang, and Y.R. Pyun. 2005. Purification and characterization of thermostable chitinase from *Bacillus licheniformis* Mb-2. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 21:733-738.
- Vijayavani, S., K.R.K. Reddy, and G.B.V.N. Murthy. 2009. Pathogenicity of *B. bassiana* (Deuteromycotina; Hypomycetes) strains on *Spodoptera litura* (Fab). *J. Biopesticides* 2(2):205-207.
- Wahyudi, P. 2002. Uji patogenitas kapang entomopatogen *Beauveria bassiana* Vuill. terhadap ulat grayak (*Spodoptera litura*). *Biosfera* 19:1-5.
- Zhang, J., J. Cai, K. Wu, S. Jin, R. Pan, and M. Fan. 2004. Production and properties of chitinase from *Beauveria bassiana* Bb174 in solid state fermentation. *Chin. J. Appl. Ecol.* 5:863-866.