

KARAKTERISTIK KITINASE DARI MIKROBIA

Winda Haliza¹ dan Maggy Thenawidjaya Suhartono²

¹Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Pascapanen Pertanian Bogor

²Departemen Ilmu dan Teknologi Pangan, Institut Pertanian Bogor

Email : haliza_w@yahoo.com

ABSTRAK

Kitinase adalah enzim yang mengkatalisis degradasi hidrolitik kitin, suatu polimer linier tersusun dari monomer β -1,4-N-asetil-D-glukosamin (GlcNAc) yang terdistribusi luas di alam. Berbagai organisme termasuk mikrobia dari tanah dan perairan diketahui mampu mensekresi kitinase dan memiliki peran sangat beragam. Kitinase terlibat dalam menginduksi pertahanan tanaman terhadap serangan jamur patogen. Enzim ini juga dapat digunakan untuk memproduksi kitin-oligosakarida dan diaplikasikan untuk industri makanan dan obat-obatan. Karakteristik kitinase sangat beragam, dapat diketahui dari studi dasar terkait peran biologis mereka terhadap degradasi kitin. Ulasan ini merangkum beberapa karakteristik kitinase dari mikroorganisme.

Kata kunci: Kitinase, kitin, mikrobi

ABSTRACT. Winda Haliza and Maggy Thenawidjaya Suhartono. 2012. Characteristic of Microbial Chitinase. Chitinase is an enzyme that catalyzes the hydrolytic degradation of chitin, a linear polymer of monomeric β -1,4-N-acetyl-D-glucosamine (GlcNAc), which widely occurs in nature. Chitinase occurs widely in soil and sea microorganisms. Chitinases have been implicated in plant resistance against fungal pathogens because of their inducible nature. Chitinases can be used for the production of chitin-oligosaccharides are widely applied in food and pharmaceutical industries. Chitinases having very diverse characteristics are known and may be of value in basic studies related to their biological role and structural elucidation of natural chitin. This review summarizes some of the characteristics of microorganism's chitinase.

Key words: Chitinase, chitin, microbial

PENDAHULUAN

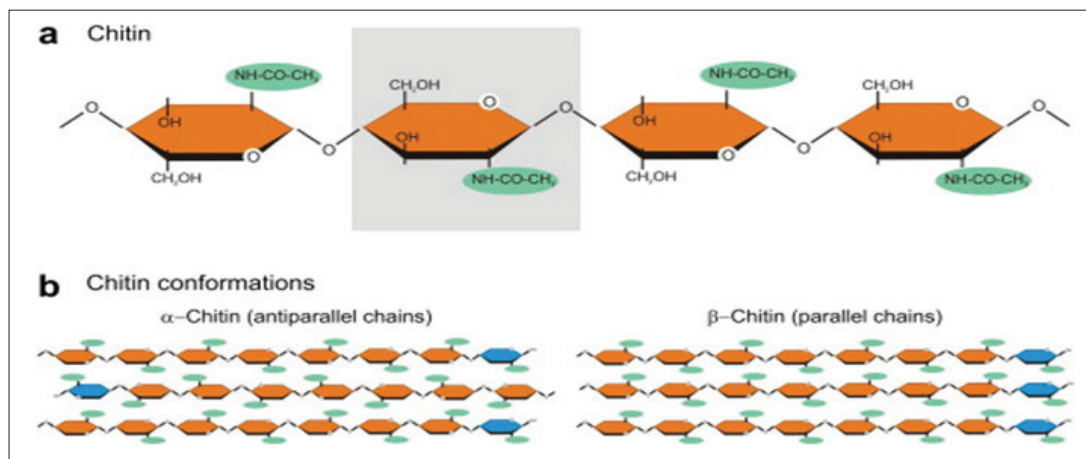
Kitin adalah suatu polisakarida, polimer linier yang tersusun oleh monomer β -1,4-N-asetil-D-glukosamin (GlcNAc) (Gambar 1). Kelimpahan kitin di alam menempati urutan terbesar kedua setelah selulosa dan terdistribusi luas di lingkungan biosfer seperti pada kulit *crustaceae* (kepiting, udang dan lobster), ubur-ubur, komponen struktural *eksoskeleton* insekta, dinding sel fungi (22-40%), alga, nematoda ataupun tumbuhan¹.

Kitin yang terkandung dalam *crustaceae* kadarnya cukup tinggi berkisar 20-60% tergantung spesies. Pada *crustaceae*, kitin merupakan struktur yang *rigid* pada *eksoskeleton*, dikarenakan pada rantai polimer N-asetil-D-glukosamin terdapat ikatan hidrogen antar molekul membentuk mikrofibril menghasilkan struktur yang stabil dan *rigid*, tidak larut dalam air sehingga dapat mengkristal².

Kitin memiliki ukuran molekul yang relatif besar dan kelarutan rendah, sulit diserap tubuh manusia, sehingga aplikasinya sangat

terbatas dan menjadi sumber utama pencemaran senyawa organik. Pada tahun 1993 diperkirakan dunia dapat memperoleh kembali kitin dari invertebrata laut sebanyak 37.000 ton dan meningkat menjadi 80.000 ton pada tahun 2000. Perolehan kembali kitin tersebut berasal dari kulit atau hasil samping produk pengolahan udang beku, kepiting, lobster dan *crustasea* lainnya. Namun, hal ini mengindikasikan bahwa kitin dapat diproduksi secara murah. Pemanfaatnya sekaligus membantu menyelesaikan masalah lingkungan serta mempromosikan nilai ekonomis produksi laut. Sampai saat ini pengolahan limbah untuk mendapatkan kitin ada dua cara, yaitu pengolahan 1) secara kimiawi dengan cara demineralisasi dan deproteinasi melalui penambahan asam atau basa kuat, 2) secara biokimia dengan penambahan enzim proteolitik untuk deproteinasi dan melibatkan kitinase untuk mendegradasi limbah kitin.

Proses enzimatik melibatkan kitinase dalam degradasi kitin dapat menghasilkan produk turunan kitin seperti kitin-oligosakarida.



Gambar 1. Struktur kimia dari kitin. Kotak abu-abu menunjukkan satu subunit N-acetylglucosamine dari rantai kitin. (b) Dua jenis utama dari kitin dicirikan oleh penataan rantai antiparalel (α -kitin) atau paralel (β -kitin) ³.

Figure 1. Chemical structure of chitin. Grey box indicates a sub unit N-acetylglucosamine from chains of chitin. (b) Two main types of of chitin characterized by antiparalel chain management (α -kitin) or paralel (β -kitin) ³.

Teknik ini relatif lebih baik dibanding secara termokimia, karena mudah dikendalikan, terurai secara biologis (*biodegradable*), ramah lingkungan (*biocompatible*), lebih ekonomis, serta dapat membentuk oligomer atau polimer yang diinginkan ^{4,5}. Pasar dunia memprediksikan bahwa produk kitin dan turunannya masih merupakan produk termahal, yaitu senilai \$ 60.000/ton ⁶.

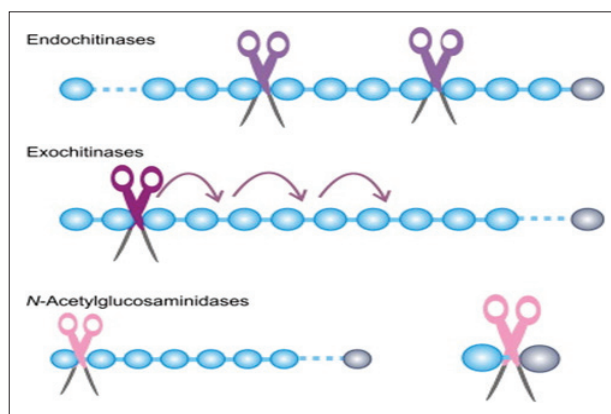
Produk turunan kitin seperti kitin-oligosakarida berat molekul rendah memiliki aktivitas melawan oksidasi, meningkatkan kekebalan yang sangat membantu untuk pengobatan AIDS, kanker, jantung dan penyakit darah, dapat diaplikasikan pada makanan, obat-obatan dan produk kosmetik ⁷. Produk turunan kitin seperti karboksimetil kitin, hidroksietil kitin dan etil kitin dapat dimanfaatkan dalam berbagai bidang. Dalam bidang kedokteran senyawa-senyawa tersebut dapat digunakan sebagai bahan dasar pembuatan benang operasi yang mempunyai keunggulan dapat diserap dalam jaringan tubuh, tidak toksik dan dapat disimpan dalam waktu yang lama. Monomer dari kitin yaitu N-Asetil-D-glukosamin dapat dimanfaatkan dalam bidang farmasi, diantaranya dapat digunakan sebagai obat untuk mengontrol kadar gula dalam darah, sebagai suplemen, antiinflamasi dan sebagainya. Untuk kosmetik, senyawa gula ini dapat membantu mengurangi hilangnya hiperpigmentasi karena N-asetil-D-glukosamin dapat membantu mengurangi aktivitas enzim tirosinase yang berperan dalam produksi melanin.

Peranan kitinase yang sangat prospektif terhadap kehidupan masyarakat banyak mendorong ilmuwan dan peneliti melakukan eksplorasi mikroorganisme kitinolitik, yaitu mikroorganisme yang dapat mendegradasi kitin dengan menggunakan enzim kitinase. Mikroorganisme ini dapat diperoleh dari berbagai sumber seperti *rizosphere*, *phyllosphere*, tanah atau dari lingkungan air seperti laut, danau, kolam atau limbah udang dan sebagainya. Selain lingkungan mesofil, mikroorganisme kitinolitik juga telah berhasil diisolasi dari lingkungan termofilik seperti sumber air panas, daerah geotermal dan lain-lain. Mikroorganisme penghasil kitinase masih belum banyak diketahui baik tentang jumlah, diversiti maupun fungsi kitinase yang dihasilkan, walaupun kitin merupakan salah satu polimer yang melimpah di alam.

Ulasan ini merangkum beberapa karakteristik kitinase dari mikroorganisme, dimulai dari klasifikasi kitinase, mikrobial penghasil kitinase, penentuan aktivitas kitinase, purifikasi kitinase dan diakhiri dengan karakteristik kitinase dari berbagai mikrobial.

KLASIFIKASI KITINASE

Kitinase (EC 3.2.1.14) dapat diperoleh dari berbagai organisme, termasuk virus, bakteri, jamur, serangga, tumbuhan tingkat tinggi dan hewan, yang mampu menghidrolisis kitin ⁸. Semua enzim yang dapat mendegradasi kitin disebut sebagai kitinase

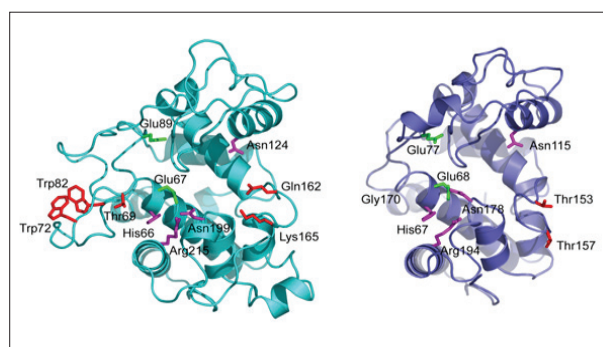


Gambar 2. Skema pola pemutusan domain enzim kitinolitik. Subunit dari rantai kitin diperlihatkan dengan warna biru terang dan ujung gula pereduksi dengan warna abu-abu. Garis putus-putus menunjukkan bahwa substrat polimer lebih panjang dari yang ditampilkan pada gambar ³.

Figure 2. Chematics sensorial termination domain kitinolitik enzymes. Subunit from chains chitin shown in blue light and end sugar reducing agent with gray color. Dotted lines indicating that of the substrate polymer longer than that is displayed on a picture ³.

total atau kitinase non spesifik. Peran kitinase dalam organisme sangat beragam. Berdasarkan mode of action, kitinase dapat diklasifikasikan ke dalam dua kategori utama, endo dan ekso-kitinase. Endokitinase (EC.3.2.1.14) mendegradasi kitin secara acak dari dalam menghasilkan oligomer pendek N - asetil - D - glukosamin. Eksokitinase memotong kitin hanya dari ujung non reduksi. Bila hasil pemotongan berupa dimer (β -1,4-N-asetil-glukosamin) disebut kitobiosidase, namun bila potongan yang dihasilkan berupa monomer maka enzim tersebut dinamakan N-asetilglukosaminidase (EC.3.2.1.30) ⁹.

Berdasarkan komposisi asam amino dan kesamaan sekuen, kitinase dapat diklasifikasikan ke dalam lima kelas, I, II, III, IV dan V. Kitinase pada tanaman sebagian besar berada dalam kelas 1-1V. Kitinase kelas I, memiliki domain N-terminal kaya sistein dan domain kitin berikatan hevein (*chitin-binding hevein-like domain*). Kitinase kelas II tersusun dari domain katalitik yang monomernya homologi dengan domain katalitik kitinase kelas I, tetapi tidak memiliki domain N-terminal kaya sistein dan domain kitin berikatan hevein. Selain pada tanaman, kitinase kelas II juga ditemukan pada jamur dan bakteri. Kitinase kelas III hanya memiliki sekuen yang homologi dengan kitinase *Hevea*



Gambar 3. Struktur GH19 kitinase barley (kiri, ID PDB 1cns) dan ChiG dari *S. coelicolor* (kanan, ID PDB 2cjl). Rantai samping katalitik ditampilkan dalam warna hijau. Dan rantai samping beberapa residu yang terlibat dalam mengikat substrat dan katalisis ditampilkan dalam warna merah dan ungu ¹⁰.

Figure 3. Structure GH19 barley chitinase (left, ID PDB 1cns) and ChiG from *S. coelicolor* (right, ID PDB 2cjl). Side chains catalytic displayed in a green color. And side chains some the residue that involved in tying a substrate and catalysis is shown in red and purple ¹⁰.

brasiliensis, dan tidak memiliki kesamaan sekuen dengan kitinase tanaman lain. Kitinase kelas IV memiliki kesamaan struktur tetapi sekuen berbeda dengan kitinase kelas 1 dan kitinase ini mewakili kelompok kitinase ekstraseluler. Kitinase kelas V, umumnya kitinase yang terdapat pada bakteri.

Semua kitinase dikelompokkan menjadi tiga keluarga hidrolase glycosyl (GH) yaitu keluarga (*family*) 18, 19 dan 20. *Family* 18 meliputi kitinase dari bakteri, jamur, virus, dan beberapa kitinase dari tanaman dan hewan (kelas III dan V). *Family* 19 meliputi keseluruhan kitinase tanaman (kelas I, II, dan IV), salah satu contoh dapat dilihat pada Gambar 3. *Family* 20 meliputi β -N-acetylhexosaminidases dari bakteri *streptomyces* dan manusia ⁹.

MIKROBIA PENGHASIL KITINASE

Beberapa mikroorganisme kitinolitik dari berbagai sumber telah berhasil diisolasi dan dikarakterisasi. Kitin dapat didegradasi dalam dua jalur, yaitu 1) degradasi oleh mekanisme kitinolitik yang menghidrolisis ikatan β -1,4-glikosida, 2) polimer kitin mengalami deasetilasi pertama yang selanjutnya dihidrolisis oleh kitosanase ¹¹. Sebagian besar mikroorganisme tanah dan air adalah pendegradasi kitin yang unggul dan beberapa mikroorganisme

dapat memanfaatkan kitin sebagai sumber karbon dan nitrogen.

Mikrobia pendegradasi kitin dari perairan yang berhasil diisolasi misalnya *Alteromonas* sp. strain O-7, *Vibrio* sp. strain P-6-1, *Vibrio alginolyticus* TK-22, *Vibrio harveyi* ^{12,13,14,15}. Donderski dan Brzezinska ¹⁶ berhasil mengisolasi bakteri kitinolitik dari danau Jeziorak pada permukaan air dan lapisan bawah sedimen diantaranya *Pseudomonas* sp, *Alkaligenes denitrificans*, *Agrobacterium* sp, *Aeromonas hydrophila* yang mendegradasi kitin dan memanfaatkan N-asetilglukosamin sebagai sumber karbon. Sedangkan dari tanah seperti *Streptomyces* sp. J-13-3 ¹, *Arthrobacter* sp. NHB-10 ¹⁷, *Streptomyces thermoviolaceus* OPC ¹⁸, *Enterobacter agglomerans* ¹⁹, *Bacillus* sp. strain MH-1 ²⁰.

Mikrobia dari berbagai daerah di Indonesia telah berhasil diisolasi dan dikarakterisasi. Rahayu *et al.* ²¹ berhasil mengisolasi mikroba dari beberapa daerah geotermal di wilayah Jawa Barat, Indonesia. Hasil seleksi diperoleh tujuh isolat potensial karena memiliki indeks kitinolitik relatif besar serta waktu pembentukan zona bening (halo) tercepat yaitu 24 jam. Hasil identifikasi terhadap tujuh isolat potensial umumnya menunjukkan bakteri gram positif, berspora, berbentuk batang dan bersifat motil, semua isolat termasuk *Bacillus* sp.

Bakteri termofilik *Bacillus papandayan* K29-14 yang berhasil diisolasi dari Kawah Kamojang Gunung Papandayan Garut, Jawa Barat dengan menggunakan koloidal kitin sebagai substrat pertumbuhan ²². *B. papandayan* K29-14 termasuk bakteri gram positif berbentuk batang, berspora, dan motil dengan berat molekul 67 kDa, memiliki pH 8,0 dan suhu optimum 55°C, stabil terhadap panas selama 5 jam pada suhu 55°C, diaktifkan oleh ion Mg dan Na-asetat, namun dihambat ion Mn, Ca, dan Ni ²³.

Soeka dan Sulistiani ²⁴ berhasil mengisolasi dua bakteri penghasil kitinase dari Gunung Bromo, Jawa Timur. Berdasarkan karakteristik molekular urutan parsial 16SrDNA dengan primer 9F dan 1510R, kedua isolat diidentifikasi sebagai *Stenotrophomonas* sp. *Stenotrophomonas* sp B2-4 mempunyai aktivitas kitinase tertinggi pada pH 8 fosfat substrat koloidal kitin 1% sebesar 17,54 x 10-2 U/ml.

Isolasi kitinase pada mikroba dapat dilakukan dari homologus mikrobia atau heterologus mikrobia. Untuk beberapa alasan tertentu kitinase dapat diisolasi bukan dari bakteri atau mikroba aslinya tetapi dari mikroba lain (heterologus

mikroba). *Trichoderma reesei* digunakan sebagai host untuk meningkatkan produksi endokitinase dari *T. harzianum*. Gen ThEn-42 penyandi endokitinase dari *T. harzianum* disisipkan kedalam vektor *cloning* yang dikonstruksi dengan tepat lalu ditransformasikan ke dalam *T. reesei* dibawah kontrol promotor gen *cbh* 1 dapat membuat ekspresi kitinase dari Gen ThEn-42 mencapai overproduksi (produksi berlebih) kitinase. *T.harzianum* memiliki kemampuan sebagai biokontrol dengan memproduksi kitinase tapi tidak dapat memproduksi kitinase dalam jumlah banyak. Sehingga diperlukan inang lain untuk meningkatkan produksi kitinase. *T. reesei* kurang dapat digunakan sebagai biokontrol tetapi fungi ini memiliki kemampuan sekresi sangat bagus karena memiliki promotor yang kuat. Penggunaan rekayasa genetika pada produksi kitinase dari *T. harzianum* dapat menghasilkan kitinase mencapai overproduksi sekaligus meningkatkan fungsinya sebagai agen biokontrol ²⁵.

Deane *et al.* ²⁶ juga melakukan cara sama untuk overproduksi kitinase pada *Aphanocladium album* dengan mengisolasi gen penyandi kitinase fungi tersebut kedalam vektor *cloning* lalu ditransformasikan kedalam *T. reesei* dibawah kontrol promotor konstitutif sehingga mencapai overproduksi kitinase. Menurut Deane *et al.* ²⁶, selain overproduksi kitinase, agen biokontrol, produksi kitinase menggunakan heterologus mikroba dapat bertujuan untuk meningkatkan produksi kitin-oligosakarida sebagai bentuk biokonversi kitin dari limbah. Penggunaan rekayasa genetika untuk produksi kitinase memiliki tujuan yaitu menghasilkan kitinase dalam jumlah banyak. Cara ini lebih efektif karena beberapa mikroba dapat melakukan produksi enzim optimal daripada inangnya sehingga dapat digunakan untuk skala industri.

MEDIA SELEKSI KITINASE

Pada umumnya mikrobia penghasil kitinase melakukan hidrolisis substrat secara ekstraselular, artinya enzim yang dihasilkan di dalam sel, tetapi dikeluarkan (sekresi) ke media pertumbuhan (substrat), sehingga untuk mendapatkan mikrobia penghasil kitinase diperlukan substrat yang mampu menginduksi enzim tersebut. Sebagian besar mikroba menggunakan koloidal kitin sebagai media pertumbuhan ^{15,19,27,8}. Menurut Svitil *et al.* ¹³, berbagai bentuk media kitin akan memperlihatkan aktivitas hidrolisis kitinase yang beragam dan suplai oksigen yang diberikan selama agitasi saat

kultivasi mikroba menghasilkan perbedaan waktu hidrolisis kitinase terhadap substrat. Yamasaki *et al.*²⁸ melaporkan semakin tinggi kecepatan agitasi dapat mempengaruhi suplai oksigen yang berefek terhadap peningkatan kecepatan kitinase mendegradasi substrat.

Mikroorganisme penghasil kitinase dapat diperoleh dari sumbernya dengan cara menumbuhkan dalam media yang mengandung kitin. Suspensi koloidal kitin digunakan dalam media agar nutrisi untuk isolasi bakteri. Koloidal kitin adalah kitin yang dilarutkan dalam asam klorida pekat seperti telah dipelajari oleh Hsu dan Lockwood²⁹ sebagai media selektif untuk mendapatkan *Actinomyces* dari air dan tanah. Mikroorganisme kitinolitik dapat diseleksi keberadaannya dengan mendegradasi media agar kitin yang dapat dideteksi dengan adanya zona bening disekitar koloni bakteri.

Metode konvensional yang menggunakan koloidal kitin sebagai substrat ditemukan sangat efektif untuk menentukan aktivitas kitinase. *Enterobacter* sp NRG4 menunjukkan aktivitas tinggi terhadap kitin *swollen*, kitin koloidal, kitin yang diregenerasi dan glikol kitin dibandingkan dengan serbuk kitin. *Enterobacter* sp G-1 juga dilaporkan mensekresi endokitinase yang ditunjukkan dengan aktivitas tinggi terhadap kitin koloidal dan etilen glikol kitin daripada serbuk kitin atau yang dilarutkan dalam *carboxy methyl cellulose* (CMC). Kitinase yang berasal dari *A. fumigatus* NCPF 2140 diinduksi dalam medium yang mengandung kitin koloidal, tetapi tidak dapat terdeteksi pada serbuk kitin. *Bacillus* sp. MH-1, selain menggunakan kitin sebagai media isolasi ditambahkan ekstrak ikan, kerang, kepiting dan kompos untuk pertumbuhan bakteri tersebut²⁰. *Pseudomonas aeruginosa* K-187 pada media pertumbuhan yang mengandung kitin, tepung udang, kulit kepiting³⁰. *Trichoderma virens* UKM1 yang ditumbuhkan dalam medium yang mengandung koloidal kitin sebagai sumber karbon dapat mendegradasi limbah udang dengan menghasilkan 86% N-asetilglukosamin³¹.

Aphamocladium album dapat memproduksi 9 jenis kitinase saat ditumbuhkan dalam kitin koloidal, tetapi dalam serbuk kitin hanya menghasilkan 3 jenis kitinase. Diduga karena konformasi kitin serta *cross-linking* pada polisakarida berbeda dengan kitin koloidal dalam medium pertumbuhannya. Beberapa peneliti melaporkan bahwa sebagian mikroba dapat menghasilkan beberapa tipe kitinase (*multiple chitinases*) untuk menghidrolisis satu jenis substrat. *Aeromonas* sp No.10S-24 diketahui menghasilkan *multiple chitinase* yaitu Chi I-Chi VIII pada media

pertumbuhan yang mengandung koloidal kitin^{32,33}. *Bacillus circulans* WL-12 menghasilkan Chi A1, Chi A2, Chi B1, Chi B2, Chi C, dan Chi D pada media pertumbuhan koloidal kitin³⁴. *Alteromonas* sp. strain O-7 yang merupakan bakteri laut, gram positif, berbentuk batang, aerobik, berflagela dan menghasilkan empat kitinase berbeda yaitu Chi A, Chi B, Chi C dan Chi D pada media pertumbuhan koloidal kitin¹².

PENENTUAN AKTIVITAS KITINASE

Pengukuran aktifitas kitinase dapat dilakukan dengan berbagai metoda misalnya metoda penghitungan mikroba kitinolitik, metoda kitin azure, metode florogenik 4-MUF (turunan kitin), dan metoda 3H-kitin³⁵. Pengukuran aktivitas kitinase biasanya dilakukan 2 tahap yaitu mengukur aktifitas kitinase selama waktu produksi enzim dan mengukur aktifitas kitinase selama proses purifikasi.

Deteksi kitinase terlihat dari pengukuran aktifitas selama mendegradasi substrat. Substrat yang digunakan untuk mengukur aktifitas kitinase mengandung kitin dan turunannya. Aktivitas kitinase merupakan ukuran jumlah produk yang dihasilkan dari suatu pemecahan substrat kitin. Satu unit aktivitas kitinase didefinisikan sebagai pelepasan 1 μ mol gula reduksi (N-asetil-glukosmin) per menit. Beberapa metode penentuan aktivitas kitinase yang sering dipergunakan adalah :

Penentuan secara kolorimetri (metode kolorimetri)

Penentuan secara kolorimetri merupakan metode yang paling umum digunakan untuk mengukur aktivitas kitinase dari berbagai mikroba. Teknik ini didasarkan pada pelepasan produk hasil degradasi substrat kitin berupa N-asetil-D-glukosamin (GlcNAc) per menit setelah direaksikan dengan reagen tertentu dan diukur absorbansi pada panjang gelombang tertentu. Berbagai substrat yang dapat dipergunakan pada teknik ini antara lain:

- 1) koloidal kitin terbuat dari kitin yang dilarutkan dengan asam kuat (HCl). Reissig³⁶ mengembangkan metode pengukuran aktivitas kitinase menggunakan substrat ini. Produk tersebut dikomplekskan dengan reagen tertentu seperti p-dimetilamino-benzaldehid atau reagen asam dinitrosalisilat (DNS) menghasilkan serapan pada panjang gelombang 540-585nm. Untuk menentukan konsentrasi produk digunakan N-asetil-D-glukosamin sebagai standar. Aktifitas kitinase pada *Arthrobacter* sp. NHB-

10, *Streptomyces* sp. J-13-3 dan *Stachybotrys elegans* diukur dengan menggunakan metode Reissig^{17, 1, 37}.

- 2) kitin azure yaitu kitin yang direaksikan dengan pewarna *Remazol Brilliant Violet 5R* dan serapan yang dihasilkan dapat diukur pada panjang gelombang 420 nm³⁸.
- 3) p-nitrophenyl-N-asetil-D-glukosamin (pNP-(GlcNAc)_n), substrat ini digunakan untuk mengukur aktivitas ekso-kitinase. Aktivitas kitinase per unit sama dengan p-nitrophenol yang dilepaskan per menit¹³. Kitinase *Bacillus* sp. strain MH-1 menggunakan (pNP-(GlcNAc)_n) sebagai substrat pada pengukuran aktivitas²⁰.
- 4) senyawa kromogen seperti 4-Nitrofenil-β-D-N-N'-diasetilkitobiosa dan 4-Nitrofenil-β-D-N-N'-N"-triasetilkitotriosida yang disiapkan dalam larutan stok dimetil sulfoksida (DMSO) dan ditentukan serapannya pada panjang gelombang 410 nm³⁴.

Pembentukan Fluoresens (metode florogenik)

Pengukuran aktivitas kitinase berdasarkan jumlah hasil pemotongan substrat menjadi monomer, dimer, trimer dari 4-MUF-kitin. Uji ini digunakan untuk menentukan perbedaan aktivitas degradasi kitin dengan menggunakan substrat 4-metilumbeliferil-N-asetil-β-D-glukosaminida, 4-metil umbeliferil N-asetil-β-D-N-N'-diasetil kitobiosida, 4-metil umbeliferil-N-asetil-β-D-N-N'-N"-triasetil kitotriosida dan 4-metil umbeliferil N-asetil-β-D-N-N'-N"-tetraasetil kitotetraosida dalam larutan DMSO. Pembentukan fluoresens diakibatkan karena pelepasan 4-metil umbeliferil yang tereksitasi pada panjang gelombang 390 nm dan diemisikan pada panjang gelombang 450 nm. Penggunaan metoda florogenik 4-MUF dilakukan pada pengukuran aktivitas kitinase *Pyrococcus kodakaraensis* KOD 1³⁹.

Metode in situ gel activity staining (Zymogram)

Metode ini dikembangkan oleh Trudel dan Asselin⁴⁰, melakukan deteksi aktivitas kitinase dengan cara elektroforesis poliakrilamid gel dalam keadaan native (tidak terdenaturasi) dan terdenaturasi. Cara ini menggunakan glikol kitin sebagai substrat. Prinsip teknik ini mirip dengan penentuan zona bening pada media padat mengandung substrat kitin, dimana degradasi substrat pada media padat mengandung glikol kitin oleh aktivitas kitinase yang ditunjukkan oleh zona bening di sekitar bakteri. Selanjutnya teknik ini dikenal dengan metode *zymogram*, suatu

teknik yang melibatkan 2 tahapan, yaitu pemisahan dengan elektroforesis kemudian diikuti dengan deteksi penentuan aktivitas kitinase. Pada proses ini terjadi kopolimerisasi antara gel poliakrilamid dengan glikol kitin, kitin yang didegradasi oleh kitinase akan membentuk zona bening (*lytic zone*). Gel kemudian diwarnai dengan *Coomassie Brilliant Blue R-250*, dimana muatan positif glikol kitin akan berinteraksi dengan *Coomassie blue* membentuk ikatan elektrostatis. Setelah dilakukan *destaining* dengan air, maka warna glikol kitin akan hilang karena aksi kitinase.

Menurut Transmo dan Harman⁴¹ metode ini lebih mudah untuk mendeteksi aktivitas kitinolitik. Cara ini sederhana dan efektif untuk deteksi aktivitas kitinase dari berbagai sumber baik dari tanaman atau mikroba, tetapi metode ini mempunyai keterbatasan karena tidak dapat digunakan untuk *staining* (pewarnaan) protein lebih lanjut dan mobilitas kitinase dalam gel terganggu karena adanya polisakarida dalam gel.

Metode Staining pada Plate Agar Kitin dan Elektroforesis Gel Poliakrilamid

Pada awalnya dikembangkan screening hiperkitinase yang diproduksi bakteri dengan menggunakan *Calcofluor white M2R* dalam plate yang mengandung kitin *swollen*. *Calcofluor white M2R* berikatan dengan rantai glukosa membentuk lingkaran linier β-(1,4)-glikosidik dengan masing-masing unit N-asetil-glukosamin. Pada pengikatan dengan polisakarida seperti kitin akan mengeluarkan cahaya fluorokrom saat dideteksi di bawah sinar ultra violet. Mikroorganisme yang berpotensi kitinolitik akan memberikan zona bening di bawah sinar UV seperti yang telah dilakukan pada hiperkitinase mutan *Alcaligenes xylosoxydans*⁴². Metode ini kemudian dikembangkan oleh Gohel dengan memisahkan kitinase pada gel poliakrilamid dan ditransfer pada cawan petri yang mengandung agar kitin. Metode ini sederhana, *reproducible*, sensitif, mudah bagi pengguna, dapat dipercaya, dan harganya efektif untuk deteksi kitinase natural dan terdenaturasi pada gel poliakrilamid⁵.

Pemilihan terhadap metode mana yang akan dipakai didasarkan pada kepentingan peneliti. Bila akan menentukan aktivitas kitinase secara kuantitatif, maka dapat digunakan metode kolorimetri dengan menggunakan substrat tertentu. Pembentukan fluoresens juga dapat digunakan secara langsung untuk menentukan jenis kitinase yang dihasilkan dengan menggunakan beberapa

substrat. Sedangkan *zymogram* dan agar kitin dapat digunakan untuk penentuan kualitatif kitinase, yaitu untuk mengidentifikasi mikroorganisme tertentu sebagai penghasil kitinase dan sekaligus dapat melihat berat molekul kitinase yang dihasilkan.

PURIFIKASI KITINASE

Purifikasi atau permurnian merupakan tahap yang penting dalam bioproses. Untuk mendapatkan enzim dengan berkualitas harus melalui proses purifikasi bertahap antara lain ekstraksi, pemisahan enzim seperti presipitasi, sentrifugasi, dialisis dan filtrasi. Pemurnian lebih lanjut dapat dilakukan dengan kromatografi. Pemurnian enzim dengan kolom kromatografi dapat diklasifikasikan berdasarkan ukuran, partikel atau molekul, muatan listrik, afinitas, suhu, densitas dan solubilitas.

Presipitasi (pemekatan protein) pada mikroba dilakukan dengan cara pengendapan amonium sulfat. Cara ini merupakan tahap awal purifikasi. Pengendapan amonium sulfat dilakukan untuk memisahkan senyawa protein dengan non-protein. Persentase kejenuhan amonium sulfat untuk setiap kitinase dari sumber yang berbeda tidak sama. Tingkat kejenuhan pengendapan berkisar antara 30%-85%^{20,33,30,1,17,38,12,34,18,14,8,32,27}.

Pada beberapa kasus pengendapan protein dengan menggunakan amonium sulfat dilakukan dua kali, misalnya kitinase *Enterobacter* sp. G-1, setelah enzim kasar dipekatkan dengan amonium sulfat pada kejenuhan 30%, supernatan yang diperoleh dari hasil pemekatan itu diendapkan lagi dengan amonium sulfat pada kejenuhan 75%⁸. Kitinase dari *Bacillus circulans* WL-12 diendapkan dengan amonium sulfat pada kejenuhan 40% dan 60%³⁴. Pengendapan amonium sulfat untuk Chi III sampai Chi VIII dari *Aeromonas* sp. No. 10S-24 dilakukan pada kejenuhan 85%³³ sedangkan untuk Chi I dan II dilakukan pada kejenuhan 80%³².

Kitinase dari *Vibrio* sp. tidak dapat dipekatkan dengan menggunakan pengendapan amonium sulfat. Enzim dipekatkan dengan menggunakan evaporator berputar. Dengan cara ini, enzim tidak perlu untuk didialisis karena tidak mengandung garam. Penggunaan kolom kromatografi O-acetylated chitin pada purifikasi kitinase *Vibrio* sp. bertujuan untuk memisahkan kitobiose yang terdapat pada kultur supernatan. Bila tidak dipisahkan menyebabkan kitinase tidak terdeteksi sebagai *single band* protein pada elektroforesis¹⁵.

Kitinase dari berbagai mikroba menggunakan 3 tipe kromatografi yaitu kromatografi penukar ion, kromatografi afinitas, dan gel filtrasi. Kromatografi penukar ion, enzim diberi muatan didalam larutan, tergantung dari pH, struktur dan titik isoelektrik enzim. Kromatografi afinitas merupakan kromatografi yang memanfaatkan aktifitas *binding* protein dengan makromolekul lain sehingga memungkinkan enzim terpisah secara spesifik. Makromolekul yang dapat digunakan adalah hormon, peptida atau inhibitor enzim. Filtrasi gel adalah teknik pemurnian protein dengan makromolekul lain berdasarkan ukuran molekul⁴³. Matriks untuk setiap tipe kromatografi berbeda-beda dan tertentu. Matriks-matriks penukar ion yang digunakan pada pemurnian kitinase mikroba adalah DEAE-Sephadex A-50, Butyl-Toyopearl, SP-Sephadex C-50, DEAE-Sepharose CL-6B, DEAE-Toyopearl 650 M, DEAE-Cellulose. Pada Tabel 1 disajikan purifikasi kitinase dari berbagai sumber. Tingkat keberhasilan purifikasi enzim terlihat dari tingkat kemurnian, rendemen dan aktivitas spesifik (U/mg protein). Tingkat kemurnian yang tinggi diikuti rendemen dan aktivitas spesifik yang tinggi dapat diartikan enzim yang dihasilkan semakin murni (pure).

KARAKTERISTIK KITINASE

Karakteristik kitinase dari mikroba yang beragam berdasarkan sifat-sifat biokimianya telah dirangkumkan dalam Tabel 2. Berbagai macam sifat kitinase dari berbagai mikroba yang dilaporkan antara lain :

Berat Molekul

Sebagian besar kitinase mikrobial yang telah dikarakterisasi memiliki berat molekul antara 30-120 kDa dan dilakukan dengan dua cara yaitu SDS-PAGE dan Gel Filtrasi (Tabel 2). SDS-PAGE adalah pemisahan molekul protein dalam medan listrik pada poliakrilamid gel dalam kondisi terdenaturasi karena penambahan SDS (sodium dodecyl sulfat). Perbedaan berat molekul enzim akan terjadi dengan menggunakan kedua cara ini disebabkan kondisi terdenaturasi atau tidak terdenaturasi. Pada kitinase FI dari *Pseudomonas aeruginosa* K-187 perbedaan mencolok berat molekul yaitu 30 kDa dengan SDS-PAGE (terdenaturasi) sedangkan dengan Gel Filtrasi (tidak terdenaturasi) sebesar 60 kDa mengandung pengertian lain. Berat molekul 30 kDa merupakan berat molekul monomer enzim artinya kitinase FI merupakan dimer³⁰. Pada kondisi terdenaturasi, enzim dapat

Tabel 1. Tahapan Pemurnian Kitinase Mikroba

Table 1. Chitinase microbial purification stages

Sumber / Source	Tahapan Pemurnian	Aktifitas Spesifik (U/mg protein)	Rendemen (%)	Tingkat Kemurnian	PUSTAKA
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> K-187	- Pengendapan $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ - DEAE-Sephadex CL-6B - Econo-Paq Q	1.52 (FI) 0.88 (FII)	27 (FI) 7 (FII)	10 (FI), 6 (FII)	Wang & Chang ³⁰
<i>Aeromonas</i> sp. No.10S-24	- Pengendapan $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ - SP-Sephadex C-50 - Sephacryl S-200	1.92 (Chi I) 3.00 (Chi II)	0.58 (Chi I) 0.70 (Chi II)	64 (Chi I), 100 (Chi II)	Ueda & Arai ³²
<i>Aeromonas</i> sp. No.10S-24	- Pengendapan $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ - DEAE-Sephadex A-50 - Butyl-Toyopearl 650 M - Kromatofocusing	2.32 (Chi III), 1.60 (Chi IV), 1.42 (Chi V), 2.87 (Chi VI), 3.72 (Chi VII), 3.90 (Chi VIII)	0.22 (Chi III), 0.43 (Chi IV), 0.37 (Chi V), 0.57 (Chi VI), 0.62 (Chi VII), 3.68 (Chi VIII)	N.A	Ueda <i>et al.</i> ³³
<i>Bacillus</i> sp. MH-1	- Pengendapan $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ - Kromatografi Afinitas - Kromatofocusing	20.0 (Chi L) 18.0 (Chi M) 24.0 (Chi S)	2.20 (Chi L) 0.67 (Chi M) 1.10 (Chi S)	N.A	Sakai <i>et al.</i> ²⁰
<i>Streptomyces</i> sp. J-13-3	- Pengendapan $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ - DEAE-Sephadex A-50 - DEAE-Cellulose - Mono Q	5.14 (Chi A) 4.78 (Chi B)	1.20 (Chi A) 0.80 (Chi B)	12 (Chi A) 12 (Chi B)	Okazaki <i>et al.</i> ¹
<i>Bacillus circulans</i> WL-12 (Chi B1)	- Pengendapan $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ - Isoelektrik focusing	N.A	8.60	10	Watanabe <i>et al.</i> ³⁴
<i>Vibrio</i> sp.	- Evaporator berputar - BioGel P-30 - O-acetylated Chitin - BioGel P-150	7.93	9.90	14	Takahashi <i>et al.</i> ¹⁵
<i>Arthrobacter</i> sp. NHB-10	- Pengendapan $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ - DEAE-Sephadex A-50 - Superose 12	9.13	8	21	Okazaki <i>et al.</i> ¹⁷
<i>Enterobacter</i> sp. G-1 (Chi A)	- Pengendapan $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ - DEAE-Sephadex A-50 - DEAE-Sephadex G-100	3.94	6.50	43	Park <i>et al.</i> ⁸
<i>Vibrio alginolyticus</i> TK-22	- Pengendapan $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ - DEAE-Toyopearl 650 M - Butyl Toyopearl 650 M - TSK-Gel DEAE-5PW	N.A	2.10	23	Murao <i>et al.</i> ¹⁴

Keterangan : N.A : Data not available

Tabel 2. Karakteristik kitinase mikrobia
Table 2. Characteristic of microbes kitinase

Sumber	Jenis Kitinase	Berat Molekul (kDa)	pH Opt	Suhu Opt (°C)	pI	Stabilitas pH	Stabilitas Suhu	Substrat spesifik	PUSTAKA
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> K-187	FI	30 (SDS), 60 (GF)	8	50	5,2	6 - 9	50	CC & EGC	Wang & Chang ³⁰
	FII	32 (SDS), 30 (GF)	7	40	4,8	5 - 10	60	CC & EGC	
<i>Aeromonas</i> sp. No. 10S-24	Chi I	112 (SDS), 114 (GF)	4	50	7,9	4 - 9	50	CC & EGC	Ueda & Arai ; Ueda <i>et al.</i> ^{32,33}
	Chi II	115 (SDS), 114 (GF)	4	60	8,1	5 - 9	45	CC & EGC	
	Chi III	89 (SDS)	3,5 - 4	50	7,6	4 - 9	50	CC	
	Chi IV	117 (SDS)	3,5 - 4	50	7,8	4 - 9	50	CC	
	Chi V	117 (SDS)	4	50	7,9	4 - 9	50	CC	
	Chi VI	120 (SDS)	4 - 4,5	50	8,0	4 - 9	50	CC	
	Chi VII	104 (SDS)	4	50	8,3	4 - 9	50	CC	
	Chi VIII	117 (SDS)	4	50	8,4	4 - 9	50	CC	
<i>Bacillus</i> sp. MH-1	Chi L	71 (SDS)	6,5	75	5,3	6	60	(GlcNAc)n & pNP-GlcNAc	Sakai <i>et al.</i> ²⁰
	Chi M	62 (SDS)	5,5	65	4,8	6	60	(GlcNAc)n & pNP-GlcNAc	
	Chi S	53 (SDS)	5,5	75	4,7	5,5	60	(GlcNAc)n & pNP-GlcNAc	
<i>Streptomyces</i> sp. J-13-3	Chi A	31 (SDS), 32,5 (GF)	6	45	3,9	4 - 6	45	Coloidal chitin	Okazaki <i>et al.</i> ¹
	Chi B	31 (SDS), 32,5 (GF)	6	45	3,5	3 - 7	45	CC	
<i>Bacillus circulans</i> WL-12	Chi A1	74 (SDS)	5	N.D	4,7	N.D	N.D	N.D	Watanabe <i>et al.</i> ³⁴
	Chi A2	69 (SDS)	N.D	N.D	4,5	N.D	N.D	N.D	
	Chi B1	38 (SDS)	4,5	65	6,6	N.D	N.D	GC	
	Chi B1	38 (SDS)	N.D	N.D	5,9	N.D	N.D	N.D	
	Chi C	39 (SDS)	N.D	N.D	8,5	N.D	N.D	N.D	
	Chi D	52 (SDS)	N.D	N.D	5,2	N.D	N.D	N.D	
<i>Vibrio</i> sp.		100 (SDS)	5	40	N.D	4,5 - 9	40	CC	Takahashi <i>et al.</i> ¹⁵
<i>Arthrobacter</i> sp. NHB-10		30 (SDS)	5	45	6,8	3 - 7	55	CC	Okazaki <i>et al.</i> ¹⁷
<i>Enterobacter</i> sp. G-1		60 (SDS)	7	40	6,6	5 - 10	50	CC	Park <i>et al.</i> ⁸
<i>Vibrio alginolyticus</i> TK-22		66 (SDS), 57 (GF)	4 - 9	45	4,3	5 - 9	30 - 40	CC	Murao <i>et al.</i> ¹⁴

Keterangan : SDS : Sodium Dodecyl Sulphate ; GF : Gel Filtration ; N.D : Data not determined ; N.A : Data not available

terpisah pada keadaan monomer sedangkan pada kondisi tidak terdenaturasi, enzim dalam keadaan utuh atau sebenarnya. Perbedaan berat molekul dari kedua cara ini tidak mengurangi keakuratan dalam penentuan berat molekul enzim artinya berat molekul dari salah satu cara dapat digunakan.

Aeromonas sp. 10S-24 menghasilkan delapan jenis kitinase. Kedelapan kitinase tersebut memiliki berat molekul yang berbeda dan sebagian besar kitinase memiliki berat molekul yang besar (> 100 kDa)^{32,33}. Chi A dan Chi B dari *Streptomyces* sp. J-13-3 memiliki berat molekul yang sama yaitu 31 kDa dengan menggunakan SDS-PAGE¹. Kitinase dari *B. circulans* WL-12 (Chi A1, Chi A2, Chi B1, Chi B2, Chi C, Chi D) memiliki berat molekul antara 38 kDa-74 kDa³⁴.

Suhu dan pH

Sebagian besar kitinase dari mikroba memiliki aktifitas pada range pH yang cukup luas. Sebagian besar kitinase dari berbagai mikrobia memiliki kondisi optimum pada kisaran pH 3.5-9 dan suhu 40-75°C (Tabel 2). Kitinase dari *Vibrio alginolyticus* TK-22 memiliki pH optimum pada pH 4-9 dan stabil

pada pH 5-9 dengan koloidal kitin sebagai substrat¹⁴. Kitinase dari *Bacillus* sp. strain MH-1²⁰ memiliki pH optimum 6.5 (Chi L), 5.5 (Chi M), 5.5 (Chi S). Chi III dan Chi IV dari *Aeromonas* sp. No.10S-24 memiliki pH optimum yang sama yaitu 3.5-4³³. Kitinase FI dan FII dari *P. aeruginosa* K-187 memiliki stabil pada kisaran pH 6-9 dan 5-10³⁰. Kitinase dari *Enterobacter* sp. G-1 stabil pada kisaran pH 5-10⁸. Kitinase dari *Aeromonas* sp. No.10S-24 (Chi III-VIII) stabil pada kisaran pH 4-9³³. Stabilitas pH dari kitinase *Streptomyces* sp. J-13-3 (Chi B) dan *Arthrobacter* sp. NHB-10 yaitu 3-7^{1,17}.

Suhu optimum dari kitinase *Aeromonas* sp. No.10S-24 (Chi I-Chi VIII) antara 50-60°C dan stabil pada kisaran suhu 45-50°C^{32,33}. Kitinase dari *Streptomyces* sp. J-13-3 memiliki suhu optimum 45°C dan stabil pada suhu yang sama¹. Kitinase *Bacillus* sp. strain MH-1 termasuk kitinase thermostabil karena memiliki suhu optimum 65-75°C dan stabil pada suhu 60°C²⁰. Stabilitas suhu kitinase dari *Arthrobacter* sp. NHB-10, *Enterobacter* sp. G-1, *V. alginolyticus* TK-22, dan *Vibrio* sp. adalah 55°C, 50°C, 30-40°C dan 40°C dan memiliki kisaran suhu optimum 40-45°C^{17,8,14,15}.

Tabel 3 . Inhibitor, Aktivator dan Komposisi Asam Amino Kitinase Mikroba

Table 3. Activator and Inhibitor, the Amino Acid Composition of microbial Kitinase

SUMBER	INHIBITOR	AKTIVATOR	KOMPOSISI ASAM AMINO	PUSTAKA
<i>Arthrobacter</i> sp. NHB-10	Hg ²⁺ , p-cloromercuribenzoic acid	N.D	N.D	Okazaki <i>et al.</i> ¹⁷
<i>Aeromonas</i> sp. No.10S-24	Ag ²⁺ , iodoacetic acid	p-CMB, Ni ²⁺	AsxThrSerGlx ProGlyAlaCys ValMetIleLeu TyrPheLysHis TrpArg	Ueda dan Arai ³²
<i>Enterobacter</i> sp. G-1	EDTA, p-CMB	Ca ²⁺ , NaCl	N.D	Park <i>et al.</i> ⁸
<i>Streptomyces</i> sp. J-13-3	Ag ²⁺ , N-chloro- atau N-bromo-succinimide	N.D	NH ₂ -A-D-X-A-A-W-N-A-S- S-V-Y-T-G-G-G-S-A-S-Y-N- G-H-N	Okazaki <i>et al.</i> ¹
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> K-187	Mn ²⁺ , Mg ²⁺ , Zn ²⁺ , glutathione, dithiothreitol, 2-mercaptoethanol	Cu ²⁺	AsxThrSerGlx ProGlyAlaCys ValMetIleLeu TyrPheLysHis TrpArg	Wang & Chang ³⁰
<i>Vibrio</i> sp.	Hg ²⁺ , Al ³⁺ , Cu ³⁺ , mono iodoacetic acid, EDTA	N.D	N.D	Takahashi <i>et al.</i> ¹⁵
<i>Bacillus</i> sp. strain MH-1	pNP-GlcNAc, Ag ²⁺ , Hg ²⁺ , (GlcNAc) ₂	Mn ²⁺ , Ca ²⁺	ATPATATYSTDS WETGFQKQWTI KEDLVTPGFES GLSGWTVQWY PAWWPTWYRV IHRVIHD	Sakai <i>et al.</i> ²⁰

Substrat Spesifik

Substrat spesifik dari kitinase mikroba dapat dilihat dalam Tabel 2. Sebagian besar kitinase menghidrolisis koloidal kitin sebagai substrat utama (100%). Selain koloidal kitin, substrat spesifik dari kitinase *Aeromonas* sp. No.10S-24, *Bacillus circulans* WL-12, dan *P. aeuroginosa* K-187 adalah etilen glikol kitin yang dihidrolisis sama baiknya dengan koloidal kitin^{32,34,30}. Pada *P. aeuroginosa* K-187, penggunaan etilen glikol kitin sebagai substrat bertujuan untuk menguji aktifitas kitinase dan lysozim. Kitinase dari *Vibrio* sp. memiliki substrat spesifik terhadap koloidal kitin namun tidak dapat mendegradasi glikol kitin. Aktifitas kitinase dari *Vibrio* sp. terhadap kitin oligosakarida juga diuji dan diperoleh bahwa enzim lebih banyak menghidrolisis kitin oligosakarida dalam bentuk kitotriose¹⁵.

Titik Isoelektrik (pI)

Titik isoelektrik (pI) dari suatu enzim dapat ditentukan dengan menggunakan kromatofocusing atau isoelektrik *focusing*. Pada Tabel 2, diketahui pI kitinase B dari *Streptomyces* sp. J-13-3¹ adalah yang terendah (3.5) dan pI kitinase C dari *B. circulans* WL-12³⁴ adalah yang tertinggi (8.5).

Pada Tabel 2 terlihat beberapa kitinase dari mikroba memiliki pI yang sama seperti pI kitinase D dari *B. circulans* WL-12 sama dengan pI kitinase FI dari *P. aeuroginosa* K-187 yaitu 5.2, pI kitinase M dari *Bacillus* sp. strain MH-1 sama dengan pI kitinase *P. aeuroginosa* K-187 yaitu 4.8, pI kitinase S dari *Bacillus* sp. strain MH-1 sama dengan pI kitinase A1 dari *B. circulans* WL-12 yaitu 4.7 dan pI kitinase B1 *B. circulans* WL-12 sama dengan pI kitinase dari *Enterobacter* G-1 yaitu 6.6.

Penentuan pI suatu enzim sangat penting dalam tahap pemurnian karena pI akan turut menentukan muatan enzim. Muatan enzim akan berpengaruh pada matriks yang digunakan di dalam kromatografi tersebut. Salah satu penyebab perbedaan pI dari suatu enzim adalah komposisi asam amino enzim.

Aktivator dan Inhibitor

Karakteristik kitinase berdasarkan aktivator dan inhibitor enzim dari berbagai mikroba dapat dilihat pada Tabel 3. Efek metal ion terhadap kitinase dari *Aeromonas* sp. No.10S-24 menunjukkan bahwa aktifitas enzim ini dapat dihambat oleh Ag^+ dan iodoacetic acid dimana penghambatan yang terjadi sekitar 50% dari aktifitas kitinase dan diketahui pula bahwa aktifitas kitinase dari bakteri dapat

ditingkatkan oleh p-CMB, Ni^{2+} , peningkatan yang terjadi sekitar 10% dari aktifitas kitinase³².

Kitinase dari *Arthrobacter* sp. NHB-10 dapat dihambat aktifitasnya oleh p-chloromercuribenzoic acid (p-CMB). Penghambatan oleh senyawa ini disebabkan karena rusaknya grup sulfidryl enzim dimana grup sulfidryl yang dibutuhkan untuk ekspresi aktifitas enzim¹⁷. Hal yang sama terjadi pada kitinase dari *Enterobacter* sp. G-1 bersama dengan EDTA, sedangkan Ca^{2+} , NaCl diketahui sebagai aktivator bagi aktifitas kitinase bakteri tersebut. Aktifitas kitinase dari *Enterobacter* sp. G-1 akan menurun sekitar 24% bila ditambahkan p-CMB kedalam larutan enzim dan apabila ditambahkan EDTA maka aktifitas kitinase akan menurun sekitar 58%. Dari hasil ini dapat disimpulkan bahwa kitinase *Enterobacter* sp. G-1 tidak tahan terhadap *chelating agent*⁸. Kitinase dapat dihambat oleh metal ion apabila gugus aktif enzim diubah atau dirusak.

Pada kitinase *Streptomyces* sp. J-13-3 aktifitas enzim akan terhambat oleh N-chloro- atau N-bromo-succinimide karena asam amino tryptophan enzim ini terikat ion sehingga aktifitas enzim terganggu¹. Kitinase dari *P. aeuroginosa* K-187 tidak terganggu dengan adanya penambahan glutathione, dithiothreitol, 2-mercaptoethanol pada larutan enzim. Namun aktifitas kitinase menurun sekitar 50% dengan penambahan Mn^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} kedalam larutan enzim dan aktifitas enzim meningkat 50% dengan penambahan Cu^{2+} dalam larutan enzim³⁰.

Ion Hg^{2+} memberi efek penghambatan pada kitinase dari *Bacillus* sp. strain MH-1 dan *Vibrio* sp.^{20,15}. Kitinase dari *Bacillus* sp. strain MH-1 menunjukkan penurunan aktifitas sangat drastis (99%) bila ditambahkan Hg^{2+} kedalam larutan enzim sedangkan kitinase *Vibrio* sp. akan kehilangan aktifitas bila ditambahkan EDTA kedalam larutan enzim.

Komposisi Asam Amino

Komposisi asam amino pada beberapa mikroba dapat dilihat pada Tabel 3. Dari komposisi asam amino bakteri menunjukkan bahwa enzim kitinase dari *Aeromonas* sp. No.10S-24 memiliki komposisi yang hampir sama dengan *Pseudomonas aeuroginosa* K-187 yang berbeda hanya pada konsentrasi saja. Asam amino kitinase dari *Aeromonas* sp. No.10S-24 kaya akan Asx, Thr, Gly, Ala sedangkan kitinase *Pseudomonas aeuroginosa* K-187 kaya akan asam amino Glx, Ser, Gly, Ala, Met, Leu^{32,30}. Komposisi asam amino kitinase dari

Streptomyces sp. J-13-3 dan *Bacillus* sp. strain MH-1 menunjukkan komposisi asam amino pada N-terminal, huruf yang tertera didalam kolom tersebut menyandikan asam amino tertentu. Huruf X pada susunan asam amino *Streptomyces* sp. J-13-3 menyatakan bahwa asam amino tersebut tidak terdeteksi^{1,20}. Susunan komposisi N-terminal asam amino dari suatu enzim dapat bermacam-macam jumlahnya seperti pada kitinase III, IV, V, VI, VII, VIII dari *Aeromonas* sp. No.10S-24 yang memiliki susunan N-terminal asam amino sebanyak 5 sekuen³³.

PENUTUP

Kitinase dari berbagai mikroba telah dapat diisolasi dan dikarakterisasi. Kitinase terdapat di dalam tanaman, mikroba dan enzim ini memiliki aplikasi yang cukup luas, salah satunya untuk memproduksi kitin/kito-oligomer yang sangat berguna dalam medis dan industri. Pemanfaatan kitinase adalah cara terbaik dalam penanggulangan limbah terutama limbah yang mengandung kitin seperti pabrik pembekuan udang yang bila dibiarkan dapat menyebabkan pencemaran lingkungan.

Aplikasi kitinase mikroba mengacu pada karakteristik kitinase yang diperoleh. Dengan mengetahui assay, purifikasi dan karakteristik kitinase diharapkan dapat memberikan gambaran yang jelas tentang sifat kimia dan biokimia dari kitinase yang akan digunakan untuk proses selanjutnya sehingga memberikan hasil yang optimal. Review ini diharapkan dapat berguna untuk studi biodegradasi kitin, penggunaan kitinase secara optimal dan pengembangan penelitian kitinase mikroba.

DAFTAR PUSTAKA

- Okazaki K, Kato F, Watanabe N, Yasuda S, Masui Y, Hayakawa S. Purification and Properties of Two Chitinase from *Streptomyces* sp. J-13-3. *Biosci. Biotech. Biochem.* 1995; 59(8):1586-1587.
- Skaugrud O, Sargent G. Chitin and Chitosan: Crustacean Biopolymers with Potensial. International By-products Conference Anchorage: Alaska. 1990; pp. 61-72.
- Verena Seidl. Chitinases of filamentous fungi: a large group of diverse proteins with multiple physiological functions. *Fungal Biology Reviews.* 2008; 22(1) : 36–42.
- Tsigos I, Martinou A, Kafetzopoulos D, Bouriotis V. "Chitin Deacetylase: New, Versatile Tools in Biotechnology". *TIBTECH.* 2000; 18: 305-311.
- Gohel V, Singh A, Vimal M, Ashwini P, Chhatpar HS. Bioprospecting and antifugal potensial of chitinolytic microorganisms. *African Journal of Biotechnology.* 2008; 5(2): 54-72.
- Sandford PT. "World market of chitin and its derivatives". Dalam : Varum KM, Domard A, Smidsrod O. *Advances in chitin science*, vol 4. Trondheim, Norway; 2003.
- Shahidi F, Arachchi JKV, Jeon YJ. Food applications of chitin and chitosan. *Trends in Food Science and Technology.* 1999; 10: 37-51.
- Park JK, Morita K, Fukumoto I, Yukikazu Y, Nakagawa T, Kawamukai M, Matsuda H. Purification and Characterization of The Chitinase (Chi A) from *Enterobacter* sp. G-1. *Biosci. Biotech. Biochem.* 1997; 61(4): 684-689.
- Shakhbazov AV, Kartel NA. Chitinases in bioengineering research. *Russian Journal of Genetics.* 2008; 44(8): 881-889.
- Hoell IA, Dalhus B, Heggset EB, Aspmo SI, and Eijsink VG. Crystal structure and enzymatic properties of a bacterial family 19 chitinase reveal differences from plant enzymes. *FEBS J.* 2006; 273(21):4889-900.
- Gooday GW. Physiology of Microbial Degradation of Chitin and Chitosan, *Biodegradation.* 1990; 1:177-190.
- Tsujibo H, Okazaki H, Shiotani K, Hayashi M, Umeda J, Miyamata K, Imada C, Okami Y, Inamori Y. Characterization of Chitinase C from a Marine Bacterium, *Alteromonas* sp. strain O-7 and Its Corresponding Gene and Domain Structure. *Appl. Environ. Microbiol.* 1998; 472-478.
- Svitil AL, Chadhain SMN, Moore JA, Kirchman DL. Chitin Degradation Protein Produced by The Marine Bacterium *Vibrio harveyi* Growing on Different Form of Chitin. *Appl. Environ. Microbiol.* 1997; 408-413.
- Murao S, Kawada T, Itoh H, Oyama H, Shin T. Purification and Characterization of a Novel Type of Chitinase from *Vibrio alginolyticus* TK-22. *Biosci. Biotech. Biochem.* 1992; 56(2) : 368-369.
- Takahashi M, Tsukiyama T, Suzuki T. Purification and Some Properties of Chitinase Produced by *Vibrio* sp. *J. Ferment. Bioeng.* 1993; 75(6) :457-459.
- Donderski W, Brzezinska MS. The Utilization of N-acetylglucosamine and Chitin as Sources of Carbon and Nitrogen by Planktonic and Benthic

- Bacteria in Lake Jeziorak Polish Journal of Environmental Studies. 2003; 12(6): 685-692.
17. Okazaki K, Kawabata T, Nakano M, Hayakawa S. Purification and Properties of Chitinase from *Arthrobacter* sp. NHB-10. *Biosci. Biotech. Biochem.* 1999; 63(9):1644-1646.
 18. Tsujibo H, Endo H, Miyamoto K, Inamori Y. Expression in *Escherichia coli* of a Gene Encoding a Thermostable Chitinase from *Streptomyces thermoviolaceus* OPC-250. *Biosci. Biotech. Biochem.* 1995; 59(1): 145-146.
 19. Chernin L, Ismailov Z, Harun S, Chet I. Chitinolytic *Enterobacter* agglomerans Antagonistic to Fungal Plant Pathogens. *Appl. Environ. Microbiol.* 1995; 1720-1726.
 20. Sakai K, Yokota A, Kurokawa H, Wakayama M, Moriguchi M. Purification and Characterization of Three Thermostable Endochitinase of a Noble *Bacillus* sp. Strain, MH-1, Isolated from Chitin-Containing Compost. *Appl. Environ. Microbiol.* p. 3397-3402; 1998.
 21. Rahayu S, Fredy T, Maggy TS, Hwang JK, Pyun YR. Eksplorasi Bakteri Termofilik Penghasil Enzim Kitinase Asal Indonesia. Prosiding Seminar Hasil-Hasil Penelitian Bidang Ilmu Hayat. Pusat Antar Universitas Ilmu Hayat IPB, Bogor, 16 September 1999.
 22. Subianto Y. Isolasi dan Pemilahan Bakteri Termofilik Penghasil Enzim Kitinase dan Kitin Deasetilase Dari Isolat Beberapa Daerah di Indonesia [Skripsi]. FATETA, IPB; Bogor: 2001.
 23. Rahayu S, Tanuwijaya F, Suhartono MT, Hwang JK, Pyun YR. Study of thermostable chitinase enzymes from Indonesian *Bacillus* K29-14. *J. Microbiol. Biotechnol.* 2004; 14 (4): 647-652.
 24. Soeka YS, Sulistiani. Seleksi, Karakterisasi, dan Identifikasi Bakteri Penghasil Kitinase yang Diisolasi dari Gunung Bromo Jawa Timur. *Jurnal Natur Indonesia.* 2011; 13(2):155-161.
 25. Clark EM, Hayes CK, Harman GE, Penttila M. Improved Production of *Trichoderma harzianum* Endochitinase by Expression in *Trichoderma reesei*. *Appl. Environ. Microbiol.* p. 2145-2151. 1996.
 26. Deane EE, Whipps JM, Lynch JM, Peberdy JF. Transformation of *Trichoderma reesei* with a Constitutively Expressed Heterologous Fungal Chitinase Gene. *Enzyme and Microbiol. Technol.* 1999; 24:419-424.
 27. Ueda M, Shiro M, Kawaguchi T, Arai M. Expression of Chitinase III Gene of *Aeromonas* sp. No.10S-24 in *Escherichia coli*. *Biosci. Biotech. Biochem.* 1996; 60(7):1195-1197.
 28. Yamasaki Y, Ohta Y, Marita K, Nakagawa T, Kawamukai M, Matsuda H. Isolation, Identification and Effect of Oxygen Supply on Cultivation of Chitin and Chitosan Degrading Bacterium. *Biosci. Biotech. Biochem.* 1992; 56(8): 1325-1326.
 29. Hsu SC, Lockwood JL. Powdered chitin agar as a selective medium for enumeration of actinomycetes in water and soil. *Applied Microbiology.* 1975; 29 (3):422-426.
 30. Wang SL, Chang WT. Purification and characterization of two bifunctional chitinase/lysozyme extracellularly produced by *Pseudomonas aeruginosa* K-187 in shrimp and crab shell powder medium. *Appl. Environ. Microbiol.* p. 380-386; 1997.
 31. Suraini AA, Sin TL, Alitheen N, Shahab, N, and Kamaruddin K. Microbial degradation of chitin materials by *Trichoderma virens* UKM1. *Journal of Biological Science.* 2008; 8(1): 52-59.
 32. Ueda M, Arai M. Purification and Some Properties of Chitinase from *Aeromonas* sp. No.10S-24. *Biosci. Biotech. Biochem.* 1992; 56 (3): 460-464.
 33. Ueda M, Fujiwara A, Kawaguchi T, Arai M.. Purification and Some Properties of Six Chitinase from *Aeromonas* sp. No.10S-24. *Biosci. Biotech. Biochem.* 1995; 59 (11) : 2162-2164.
 34. Watanabe T, Yamada T, Oyanagi W, Suzuki K, Tanaka H. Purification and Some Properties of Chitinase B1 from *Bacillus circulans* WL-12. *Biosci. Biotech. Biochem.* 1992; 56(4) : 682-683.
 35. Hood MA. Comparison of Four Method for Measuring Chitinase Activity and The Application of The 4-MUF Assay in Aquatic Environments. *J. Microbiol. Methods.* 1991; 13 : 151-160.
 36. Reissig JL, Strominger JL, Leloir FA. A modified colorimetric method for the estimation of N-acetylamino sugars. *J. Biol. Chem.* 1955; 217: 959-966.
 37. Tweddell RJ, Hare SHJ, Charest PM. Production of Chitinases and β -1,3-Glucanases by *Stachybotrys elegans*, a Mycoparasite of *Rhizoctonia solani*. *Appl. Environ. Microbiol.* p. 489-495. 1994.
 38. Harighi MJ, Zamani MR, Motallebi M. Evaluation of Antifungal Activity of Purified Chitinase 42 from *Trichoderma atroviride* PTCC5220. *Biotechnology.* 2007; 6(1):28-33.
 39. Tanaka T, Fujiwara S, Nishikori S, Fukui T, Takagi M, Imanaka T. A Unique Chitinase with Dual Active Sites and Triple Substrate Binding Sites from The Hyperthermophilic Archaeon

- Pyrococcus kodakaraensis* KOD-1. Appl. Environ. Microbiol. p. 5338-5344. 1999.
40. Trudel J, Asselin A. Detection of Chitinase Activity after Polyacrilamide Gel Electrophoresis. Anal. Biochem. 1989; 178 : 362-366.
 41. Transmo A, Harman GE. Detection and Quantification of N-Acetyl- β -D-glucosaminidase, Chitinobiosidase, and Endochitinase in Solution and on Gels. Anal. Biochem. 1993; 208:74-79.
 42. Vaidya RJ, Macmil SLA, Vyas PR, Chhatpar HS. The novel method for isolating chitinolytic bacteria and its application in screening for hyperchitinase producing mutant of *Alcaligenes xylosoxydans*. Journal of Applied Microbiology. 2003; 36 (3):129-134.
 43. Harris ELV, Angal S. Protein Purification Methods a Practical Approach. UK: Oxford Univ. Pr. 1989.