

@ 2004 Sri Rahayu
Makalah Pengantar Falsafah Sains (PPS 702)
Sekolah Pasca Sarjana / S3
Institut Pertanian Bogor
Dosen :
Prof. Dr. Ir. Rudy C Tarumingkeng
Prof. Dr. Ir. Zahrial Coto
Dr. Ir. Hardjanto, MS

Posted 21 December 2004

KARAKTERISTIK BIOKIMIAWI ENZIM TERMOSTABIL PENGHIDROLISIS KITIN

Oleh:

Sri Rahayu

NRM. 261040031

e-mail: srahajoe_2763@telkom.net

PENDAHULUAN

Enzim adalah biokatalisator yang banyak digunakan pada berbagai bidang industri produk pertanian, kimia, dan medis. Enzim memiliki sifat-sifat spesifik yang menguntungkan yaitu efisien, selektif, *predictable*, proses reaksi tanpa produk samping, dan ramah lingkungan. Sifat-sifat tersebut menyebabkan penggunaan enzim semakin meningkat dari tahun ke tahun, diperkirakan peningkatan mencapai 10–15% per tahun.

Aplikasi enzim pada beberapa industri menghendaki enzim-enzim yang dalam beraktivitas tahan terhadap panas (termostabil). Hal ini berkaitan dengan keuntungan yang akan diperoleh bila proses produksi dilakukan pada suhu tinggi yaitu menurunkan resiko kontaminasi, meningkatkan kecepatan reaksi sehingga menghemat waktu, tenaga dan biaya; serta menurunkan viskositas larutan fermentasi sehingga memudahkan proses produksi.

Kitin adalah polimer dari β -1,4-N-asetilglukosamin, polimer kedua terbesar di alam setelah selulosa. Kitin terdapat terutama pada limbah hasil laut khususnya golongan udang, kepiting, ketam, dan kerang. Secara hayati, polimer sakarida ini disintesis sampai satu miliar ton per tahun di dunia. Diperkirakan limbah hasil laut terutama kulit udang dan batok kepiting dunia sebesar 1,5 juta ton per tahun (Hyeon-Woo *et al.*, 1996; Somashekar dan Joseph, 1996). Kadar kitin dalam kulit udang dan

kepinging diperkirakan mencapai 40-60 persen (Angka dan Suhartono, 2000) dan 22-44 persen pada dinding sel fungi (Patil *et al.*, 1999).

Kitinase, Kitin deasetilase, dan Kitosanase ketiganya merupakan enzim-enzim penghidrolisis kitin, kitooligomer dan kitosan. Kitin dan turunannya menjadi sangat menarik karena berbagai fungsi teknologis yang dimiliki seperti sebagai *immunoadjuvant*, flokulan, dan agrokimia (Sakai *et al.*, 1998). Kitooligosakarida mempunyai efek penghambatan terhadap pertumbuhan jamur dan bakteri, aktivitas antitumor dan antiradang, serta aktivasi respon imun (Hyeon-Woo *et al.*, 1996; Patil *et al.*, 1996).

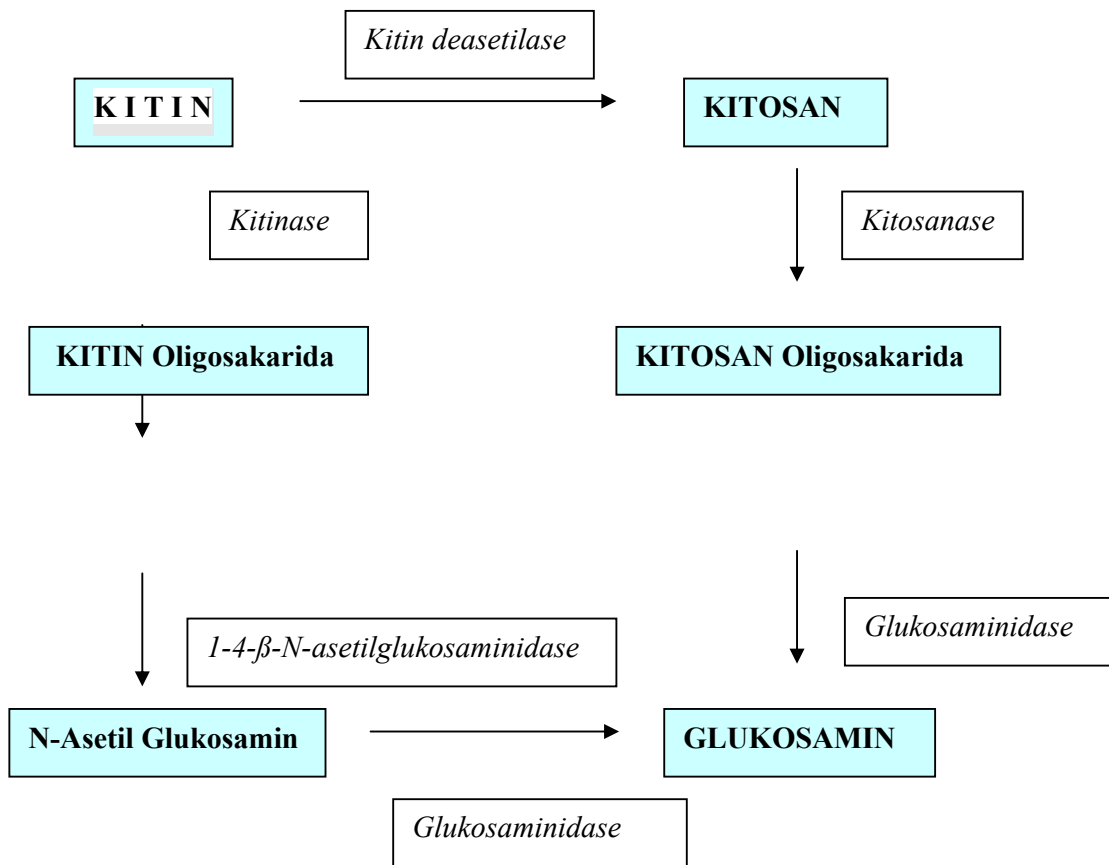
Kitosan merupakan produk dari deasetilase kitin yang memiliki sifat unik, sebab kerangka gula pada kitosan mempunyai gugus amino bermuatan positif. Karena muatan positif itulah, kitosan mempunyai aplikasi yang luas di antaranya sebagai flokulan kationik pada pengolahan limbah dan sebagai bahan penyusun produk perawatan kulit dan rambut (Tokuyasu *et al.*, 1996); digunakan dalam industri perekat; sebagai senyawa pengkelat zat warna pada industri kertas, tekstil, pulp; sebagai pengangkut obat dan komponen alat-alat operasi; deasidifikasi buah, sayur, dan ekstrak kopi; kromatografi; amobilisasi enzim dan sel (Angka dan Suhartono, 2000; Tsigos *et al.*, 2000); sebagai bahan berserat, kitin dan kitosan berpotensi menurunkan kolesterol; untuk perawatan penderita kolik, dan sebagai agen hipourisemia (Muzzarelli, 1996).

Oligomer kitosan adalah produk hidrolisis kitosan oleh enzim kitosanase yang berperan luas dalam dunia medis yaitu sebagai antitumor, stimulan sistem imun, dapat menurunkan gula darah dan mengontrol tekanan darah, mencegah konstipasi, meningkatkan absorpsi kalsium, mengurangi kadar asam urat, dan menurunkan kolesterol (Dalwoo, 2004).

Aplikasi enzim yang menghasilkan oligomer dari kitin dengan ukuran spesifik jauh lebih menguntungkan dibanding dengan hidrolisis kimia yang cenderung menghasilkan monomer, karena ukuran spesifik produk oligomer (trimer hingga heksamer) berkaitan erat dengan sifat fisiologis dan bioaktifnya.

Hidrolisis kitin di alam dikatalisis oleh beberapa enzim yang disintesis oleh mikroorganisme yang bekerja secara sinergis. Jalur hidrolisis kitin menjadi berbagai produk turunannya tampak pada gambar (Gooday, 1990).

Enzim-enzim termostabil mempunyai karakteristik biokimiawi yang menarik. Sifat termostabilitas protein enzim berkaitan dengan bagian asam-asam amino yang bersifat hidrofobik, intensitas interaksi elektrostatik dan jembatan disulfida di antara asam amino penyusun struktur protein (Edwards, 1990; Suhartono, 2000). Menurut Zuber (1981), molekul protein memerlukan fleksibilitas dan rigiditas untuk



Gambar Jalur hidrolisis kitin di alam oleh mikroorganisme

fungsinya, akan tetapi pada suhu di atas optimum struktur yang lebih kaku diperlukan untuk mengimbangi kenaikan energi panas. Kestabilan protein dapat meningkat bila struktur protein lebih kompak sehingga molekul air dapat keluar dari rongga yang dimiliki oleh molekul protein (Nosoh dan Sekiguchi, 1991)..

Makalah ini ditulis dengan tujuan mengetahui dan mempelajari karakteristik biokimiawi enzim-enzim termostabil yang berperan dalam hidrolisis kitin, khususnya enzim kitinase, kitin deasetilase, dan kitosanase. Karakteristik biokimiawi enzim yang diamati antara lain adalah suhu dan pH optimum, stabilitas terhadap panas, sifat terhadap kation divalen, dan berat molekul enzim. Ketiga enzim dihasilkan oleh bakteri penghasil enzim penghidrolisis kitin yang bersifat termofilik (suhu optimal pertumbuhan 55°C).

MATERI DAN METODE

Produksi enzim

Bakteri kitinolitik ditumbuhkan dalam media cair mengandung substrat 0.5% koloidal kitin pada suhu 55°C. Pada selang waktu tertentu selama inkubasi, sampel diambil dan diuji aktivitasnya. Produksi enzim dilakukan pada waktu fermentasi optimal. Di akhir inkubasi, filtrat dipisahkan dari sel menggunakan sentrifus pada 3.000 x g selama 15 menit. Protein diendapkan menggunakan amonium sulfat 40-50% dan dilarutkan dalam 0.02M bufer Tris pH 7.0. Untuk mendenaturasi enzim yang tidak tahan panas, protein diinkubasi 55°C selama 24 jam kemudian disentrifus. Enzim selanjutnya didialisis menggunakan membran (Sigma, 12.500 molekul), kemudian diaplikasikan ke kolom DEAE sephadex A-50. Protein dianalisis menggunakan metode Bradford (1976).

Uji Aktivitas Enzim

Aktivitas kitinase diuji menggunakan metode Ueda dan Arai (1992). Campuran reaksi mengandung 0.3% koloidal kitin, 0.1M bufer fosfat (pH 7.0) dan larutan enzim diinkubasi pada 55°C selama 60 menit. Sisa kitin dalam campuran reaksi diukur turbiditasnya pada 660 nm. Satu unit aktivitas didefinisikan sebagai jumlah enzim yang menyebabkan penurunan absorbansi sebesar 0.001 pada 660 nm per menit.

Aktivitas kitin deasetilase diuji menggunakan metode Tokuyasu *et al* (1996). Substrat glikol kitin (Sigma) 0.15% diinkubasi dalam 20 mM bufer sodium tetraborat/HCl. Reaksi dimulai dengan menambah 40 µl larutan enzim ke dalam 160 µl campuran reaksi. Inkubasi selama 20 menit, reaksi dihentikan dengan menambah 200 µl asam asetat 33% (b/v).

Aktivitas kitosanase diuji menggunakan metode Yoon *et al* (2001). Substrat 1.0% kitosan terlarut dalam bufer fosfat potasium direaksikan dengan enzim pada suhu 60°C selama 30 menit. Reaksi dihentikan dengan pemanasan 100°C selama 10 menit, kemudian disentrifugasi.

Karakterisasi Enzim

Karakteristik biokimia enzim yang diamati adalah suhu dan pH optimal, stabilitas terhadap panas, sifat terhadap kation divalen, dan berat molekul enzim. Sifat terhadap suhu dan pH diketahui dengan menguji larutan enzim pada berbagai variasi suhu dan pH menggunakan beberapa jenis bufer (pH : 3.0 – 11.0).

Sifat stabilitas panas diukur dengan menguji enzim pada suhu dan pH optimal selama beberapa jam/hari, dan tiap selang waktu tertentu diambil sampel larutan enzim kemudian diukur aktivitasnya.

Sifat terhadap kation divalen (sebagai inhibitor/aktivator) diukur dengan menguji enzim pada beberapa larutan kation divalen (Ca, Mn, Mg, Ni, Co, Cu). Berat molekul enzim diukur menggunakan metode *Sodium Dodecyl Sulfate – PolyAcrylamide Gel Electrophoresis* (Laemmli, 1970).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pengaruh suhu pada reaksi enzimatik merupakan fenomena yang kompleks. Pada awalnya kenaikan suhu akan menyebabkan bertambahnya reaksi kecepatan enzim hingga tercapai suhu optimal, selanjutnya kecepatan reaksi akan menurun karena perubahan konformasi pada substrat dan enzim. Pada suhu yang lebih tinggi akan terjadi denaturasi enzim sehingga enzim akan kehilangan aktivitas.

Kisaran suhu optimal untuk aktivitas enzim pendegradasi kitin termostabil cukup luas yaitu berkisar dari 45–85°C. Enzim-enzim termostabil dihasilkan oleh mikroorganisme termofilik yang dikulturkan pada suhu optimal di atas 45°C. Pada umumnya aktivitas enzim-enzim penghidrolisis kitin dari mikroorganisme termofilik memiliki suhu optimal di atas suhu pertumbuhannya.

Kitinase dan kitin deasetilase termostabil yang dihasilkan oleh *Bacillus* K29-14, diketahui memiliki aktivitas optimal pada suhu 55°C dan pada suhu 65°C terjadi penurunan aktivitas kitin deasetilase sebesar 4 persen sedang kitinase 32 persen. Pada suhu 85°C aktivitas sisa kedua enzim tinggal sekitar 15 persen, denaturasi enzim terjadi pada suhu 95°C (Rahayu *et al.*, 2004). Tiga endokitinase termostabil dari *Bacillus* strain MH-1 yang dikulturkan pada suhu 58°C juga mempunyai aktivitas optimal di atas suhu pertumbuhannya yaitu pada suhu 65°C dan 75°C (Sakai *et al.*, 1998). Kitosanase dari *Bacillus* sp. strain CK4 yang diproduksi pada suhu 60°C mempunyai aktivitas optimal pada suhu 60°C dan pH 6.5 (Yoon *et al.*, 2001).

Enzim memerlukan pH lingkungan yang sesuai untuk aktivitas optimalnya. Perubahan pH lingkungan diperkirakan akan menyebabkan perubahan ionisasi enzim, substrat, atau kompleks enzim dengan substrat, sehingga aktivitas enzim akan menurun. Beberapa hasil penelitian menunjukkan bahwa enzim-enzim penghidrolisis kitin pada umumnya bekerja optimal pada kisaran pH asam hingga netral.

Kitinase *Bacillus* K29-14 bekerja optimal pada pH 7.0, *Bacillus* strain MH-1 pada pH 5.5 dan 6.5, *Aeromonas* sp. pada pH 3.5 – 4.5 (Ueda *et al.*, 1995). Meskipun demikian beberapa mikroba menghasilkan enzim kitinase dan kitin deasetilase yang beraktivitas optimal pada pH alkalis, misalnya dua kitinase dari *P. aeruginosa* K-187 pada pH 7.0 dan 8.0 (Wang dan Chang, 1997), kitin deasetilase *Bacillus* K29-14 pada pH 8.0 (Rahayu *et al.*, 2004) dan kitin deasetilase *C. lindemuthiamum* pada pH 11.5 – 12.0 (Tokuyasu *et al.*, 1996).

Enzim-enzim penghidrolisis kitin yang dihasilkan oleh mikroorganisme termofilik umumnya memiliki sifat stabilitas terhadap panas yang sangat baik. Kitinase dan kitin deasetilase *Bacillus* K29-14 masih mempunyai aktivitas sisa 80–90 persen setelah diinkubasi selama 5 jam pada suhu 70°C (Rahayu *et al.*, 2004). Kitosanase *Bacillus* sp. strain CK4 stabil pada suhu 80°C selama 30 menit dan 70°C selama 60 menit (Yoon *et al.*, 2001).

Beberapa enzim memerlukan ion-ion tertentu untuk menjamin aktivitasnya. Ion-ion tersebut dapat bertindak sebagai *inhibitor* pada konsentrasi tertentu, tetapi dapat juga menjadi *aktivator* pada konsentrasi yang berbeda.

Kation divalen CoCl_2 dan NiCl_2 meningkatkan aktivitas kitinase *Bacillus* K29-14, sementara ZnCl_2 menghambat aktivitas kitinase. Kitin deasetilase *Bacillus* K29-14 diaktifkan oleh adanya MgCl_2 tetapi dihambat oleh MnCl_2 , CaCl_2 dan NiCl_2 (Rahayu *et al.*, 2004). Aktivitas kitosanase *Bacillus* sp. strain CK4 meningkat 2.5 kali dengan penambahan 10 mM ion Cu dan 1.4 kali ion Mn, sementara pada konsentrasi yang sama ion Cu menghambat aktivitas kitosanase (Yoon *et al.*, 2001).

Pada umumnya mikroorganisme menghasilkan beberapa jenis enzim untuk menghidrolisis kitin yang terdapat di alam. *Bacillus* strain MH-1 menghasilkan tiga jenis kitinase dengan berat molekul 71, 62 dan 53 kDa (Sakai *et al.*, 1998). Jamur *Colletotrichum lindemuthianum* menghasilkan kitin deasetilase setelah delapan hari inkubasi, enzim merupakan polipeptida tunggal dengan berat molekul sekitar 31,5 dan 33 kDa (Tokuyasu *et al.*, 1996). *Aeromonas* sp. menghasilkan enam jenis kitinase dengan berat molekul 89, 117, 120, 104, 112, dan 115 kDa (Ueda *et al.*, 1995), sementara *P. aeruginosa* K-187 dua jenis kitinase dengan berat molekul 60 dan 30 kDa (Wang dan Chang, 1997).

KESIMPULAN

1. Enzim termostabil penghidrolisis kitin memiliki aktivitas optimal pada suhu di atas 50°C dengan pH optimal umumnya pH asam.
2. Pada umumnya. enzim pendegradasi kitin yang dihasilkan mikroorganisme termofilik stabil pada suhu $70\text{--}80^\circ\text{C}$.
3. Mikroorganisme termofilik menghasilkan beberapa jenis enzim untuk mendegradasi kitin dengan berat molekul sangat beragam.

DAFTAR PUSTAKA

Angka, S.I. dan M.T. Soehartono. 2000. *Bioteknologi Hasil Laut*. PKSL-IPB. Bogor.

- Bradford, M.M. 1976. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilising the Principle of Protein Dye Binding. *Anal. Biochem.*, 72: 248–254.
- Dalwoo. 2004. *Chitosan Oligomer*. <http://dalwoo.co/chitosan/product.html/> (03 Maret 2004).
- Gooday, G.W. 1990. The Ecology of Chitin Degradation. *Advances in Microbial Ecology*, 11: 387–430.
- Hyeon-Woo, L., J. Choi, D. Han, N. Lee, S. Park dan D. Yi. 1996. Identification and Production of Constitutive Chitosanase from *Bacillus* sp. HW-002. *Journal of Microbiol. and Biotech.* 6 (1): 12–18.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage on Structural Proteins During the Assembly of the Head of Bacteriophage T₄. *Nature* 227: 680–685.
- Muzzarelli, R.A.A. 1996. Chitosan Based Dietary Food. *J. of Carbohydrate polymers* 29: 309–316.
- Nosoh, Y. and T. Sekiguchi. 1991. *Protein Stability and Stabilization Through Protein Engineering*. Ellis Horwood Ltd, England.
- Patil, R.S., V. Ghormade dan M.V. Deshpande. 1999. Chitinolytic Enzymes: An Exploration. *J. Enzyme and Microbial. Technol.* 26: 473–483.
- Rahayu, S., F. Tanuwidjaya, Y.Rukayadi, A.Suwanto, M.T.Suhartono, J.K. Hwang dan Y.R. Pyun. 2004. Study of Thermostable Chitinase Enzymes from Indonesian *Bacillus* K29-14. *J. Microbiol. Biotechnol.* 14 (4): 647–652.
- Sakai, A., A. Yokota, H. Kurokawa, M. Wakayama, M. Moriguchi. 1998. Purification and Characterization of Three Thermostable Endochitinases of a *Bacillus* Novel Strain MH-1 Isolated from Chitin Containing Compost". *Appl. and Environ. Microbiol.* 64 (9): 397–340.
- Somashekar, D. and R. Joseph. 1996. Chitosanases Properties and Applications a Review. *Bioresources Tech.* 55: 35–45.
- Soehartono, M.T. 2000. *Pemahaman Karakteristik Biokimiawi Enzim Protease dalam Mendukung Industri Berbasis Bioteknologi*. Orasi Ilmiah. Fakultas Teknologi Pertanian – IPB Bogor.
- Tokuyasu, K., M.O. Kameyama dan K. Hayashi. 1996. Purification and Characterization of Extracellular Chitin Deacetylase from *Colletotrichum lindemuthianum*. *Biosci. Biotech. Biochem.* 60: 1598–1603

- Ueda, M., A.Fujiwara, T.Kawaguchi dan M. Arai. 1995. Purification and Some Properties of Chitinases from *Aeromonas* sp. No. 10S – 24. *Biosci. Biotech. Biochem.* 59 (11): 2162–2164.
- Ueda, M., M. Shiro, T.Kawaguchi dan M. Arai. 1996. Expression of the Chitinases III Gene of *Aeromonas* sp. No. 10S–24 in *Escheria coli*. *Biosci. Biotech. Biochem.* 60: 1195–1197.
- Wang, S.L. dan W.T. Chang. 1997. Purification and Characterization of Two Bifunctional Chitinases/Lisozymes Extracellularly Produced by *P. aeruginosa* K-187 in Shrimp and Scrab Shell Powder Medium. *Appl. and Environ. Microbiol.* 63: 380–386.
- Yoon, H.C, HY. Kim, HK. Kim, BS. Hong, DH. Shin and H.Y. Cho. 2001. Termostable Chitosanase from *Bacillus* sp. Strain CK4 : Its Purification, Characterization and Reaction Patterns. *Biosci. Biotech. Biochem.* 63 (4): 802-809