

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

A. AKTIVITAS KUALITATIF ENZIM KITINOLITIK (INDEKS KITINOLITIK)

Peremajaan dan purifikasi terhadap kedelapan kultur koleksi isolat bakteri dilakukan terlebih dahulu sebelum pengujian untuk menentukan indeks kitinolitik. Kultur sel bakteri telah lama disimpan dalam medium gliserol dan skim milk pada suhu -85°C sejak Juli 2006, sehingga dengan peremajaan diharapkan metabolisme sel bakteri kembali optimal. Purifikasi yang dilakukan berdasarkan metode Black (1999: 155) adalah untuk memeriksa kembali bahwa tidak ada kontaminan dalam kultur koleksi kedelapan isolat bakteri.

Kedelapan isolat bakteri yang digunakan dengan kode isolat C4, C6, C8, C12, C14, C15, D6, dan D10 memiliki morfologi koloni yang sama, yaitu berwarna putih, tekstur berlendir, penampakan mengkilap, permukaan halus, profil menggunung serta bertepi rata. Penentuan aktivitas kualitatif enzim kitinolitik dilakukan pada medium agar kitin menurut Park *dkk.* (2000: 224). Penentuan aktivitas kualitatif enzim kitinolitik pada medium agar kitin tersebut dipilih, karena mudah dan lebih cepat dilakukan. Metode tersebut juga banyak digunakan karena zona bening yang terbentuk mudah dilihat pada medium agar kitin (Rachman 1992: 120).

Kedelapan isolat bakteri memperlihatkan adanya zona bening di sekitar koloni (Gambar 5). Adanya zona bening tersebut memberikan bukti bahwa kedelapan isolat bakteri mampu memproduksi enzim kitinolitik (Park *dkk.* 2000: 224). Indeks kitinolitik diukur setiap hari selama enam hari inkubasi. Nilai indeks kitinolitik diperoleh dari perbandingan antara diameter zona bening di sekitar koloni dengan diameter koloni bakteri (Nasran *dkk.* 2003: 34). Kedelapan isolat bakteri menunjukkan nilai indeks kitinolitik yang berbeda (Tabel 3; Gambar 8).

Berdasarkan hasil pengukuran indeks kitinolitik pada hari keenam, isolat C15 menunjukkan nilai indeks kitinolitik tertinggi di antara isolat yang lain, yaitu dengan nilai 1,73. Nilai indeks kitinolitik tersebut menunjukkan perbedaan yang relatif lebih besar jika dibandingkan dengan nilai indeks kitinolitik yang dimiliki oleh *Chromobacterium violaceum* sebagai kontrol positif, yaitu dengan nilai 1,05. Hal tersebut menunjukkan bahwa isolat C15 memiliki potensi yang lebih besar dalam mendegradasi kitin dibandingkan dengan *Chromobacterium violaceum* (sebagai kontrol positif) dan tujuh isolat bakteri lainnya.

Berdasarkan pengamatan yang dilakukan setiap hari, zona bening di sekitar koloni bakteri mulai terlihat pada hari ketiga waktu inkubasi (setelah 72 jam). Zona bening yang ada pada hari ketiga tersebut tidak ditunjukkan oleh semua isolat, tetapi hanya isolat C6, C14, C15, dan D6, sedangkan empat isolat lainnya mulai menunjukkan zona bening pada hari keempat (setelah 96 jam). *Chromobacterium violaceum* yang digunakan sebagai

kontrol positif juga mulai menunjukkan zona bening pada hari ketiga (setelah 72 jam), sedangkan *Bacillus licheniformis* F11 yang digunakan sebagai kontrol negatif hingga hari keenam inkubasi tidak menunjukkan zona bening di sekitar koloni. Berdasarkan penelitian yang dilaporkan oleh Chernin *dkk.* (1995: 1722), aktivitas kitinolitik yang ditunjukkan oleh zona bening pada *Enterobacter agglomerans* terlihat setelah 72 hingga 96 jam inkubasi pada medium agar dengan koloidal kitin sebagai sumber karbon. Menurut Donderski dan Trzebiatowska (2000: 82), aktivitas kitinolitik belum ditunjukkan setelah 48 jam waktu inkubasi. Hal tersebut karena kitin merupakan senyawa yang sulit untuk didegradasi, dan bakteri membutuhkan waktu lama untuk beradaptasi terhadap substrat kitin dalam fermentasi hingga bakteri tersebut dapat memproduksi enzim kitinolitik untuk mendegradasinya.

Isolat-isolat C6, C14, C15, dan D6 menunjukkan zona bening lebih cepat (setelah 72 jam) dibandingkan dengan isolat lainnya, yaitu C4, C8, C12, dan D10 yang mulai menunjukkan zona bening setelah 96 jam. Berdasarkan hasil pengamatan tersebut, diduga bahwa isolat-isolat C6, C14, C15, dan D6 memproduksi enzim kitinolitik yang mampu mendegradasi substrat kitin lebih cepat dibandingkan dengan 4 isolat lainnya. Menurut Brzezinska dan Donderski (2001: 30), setiap bakteri memiliki kecepatan degradasi kitin yang berbeda dengan bakteri lainnya, bergantung pada beberapa faktor seperti suhu, konsentrasi substrat, waktu inkubasi, dan pH.

Kecepatan terbentuknya zona bening berkaitan pula dengan kecepatan difusi dan jenis enzim kitinolitik yang disekresikan oleh sel bakteri ke medium agar kitin. Enzim kitinolitik tersebut merupakan enzim ekstraseluler yang digunakan dalam pengambilan nutrisi bagi bakteri (Patil *dkk.* 2000: 473). Enzim kitinolitik yang disekresikan bakteri dalam medium agar kitin kemudian diikat oleh partikel kitin (koloidal kitin), sehingga kitin menjadi terdegradasi dan komposisi kitin dalam medium menjadi berkurang. Degradasi oligomer kitin menjadi senyawa yang lebih sederhana membuat medium tampak jernih, terutama di sekitar koloni bakteri (Chen & Lee 1994: 783).

B. SELEKSI BAKTERI KITINOLITIK

Seleksi terhadap delapan isolat bakteri dilakukan dengan melihat aktivitas spesifik enzim yang dinyatakan sebagai produksi enzim, serta melihat hubungannya dengan jumlah sel dan konsentrasi protein. Berdasarkan hasil yang diperoleh, menunjukkan bahwa produksi enzim, jumlah sel dan kadar protein yang diukur setiap 12 jam memiliki nilai yang berbeda untuk setiap isolat bakteri.

1. Produksi enzim kitinolitik

Berdasarkan hasil pengujian aktivitas enzim yang diperoleh, yang ditunjukkan oleh kurva produksi enzim (Gambar 9--16), terlihat bahwa tujuh dari delapan isolat bakteri menunjukkan pola yang serupa. Tujuh isolat

bakteri tersebut adalah isolat C4, C6, C8, C12, C14, C15, dan D10. Hanya isolat D6 yang menunjukkan pola kurva produksi enzim berbeda.

Pola serupa di antara isolat C4, C6, C8, C12, C14, C15, dan D10 yaitu produksi enzim kitinolitik yang fluktuatif selama 60 jam. Kurva-kurva tersebut umumnya menunjukkan produksi enzim kitinolitik yang tinggi pada jam ke-0, kemudian terjadi fluktuasi hingga jam ke-60. Tingginya produksi enzim kitinolitik pada jam ke-0 di antara isolat-isolat tersebut juga menunjukkan nilai yang bervariasi (Tabel 4). Produksi enzim kitinolitik pada jam ke-0 paling tinggi ditunjukkan oleh isolat C14, yaitu dinyatakan dengan nilai aktivitas enzim sebesar 1,8184 U/mg (0,0009 U/ml).

Tingginya produksi enzim kitinolitik pada jam ke-0 yang ditunjukkan oleh beberapa isolat tersebut, diduga merupakan enzim kitinolitik dari biakan *starter* berumur 24 jam. Setelah 24 jam, biakan dalam medium *starter* diduga telah memproduksi enzim kitinolitik, sehingga ketika starter diinokulasi ke medium produksi, enzim kitinolitik tersebut juga terdapat di medium produksi. Green *dkk.* (2005: 31) melaporkan bahwa enzim kitinolitik pada *Serratia marcescens* QMB1466 diproduksi setelah 24 jam. Produksi enzim tersebut ditunjukkan oleh aktivitas kitinolitik sebesar 50 U/ml.

Produksi enzim kitinolitik dari isolat C4, C6, C8, C12, C14, C15, dan D10 mengalami penurunan pada jam ke-12. Turunnya produksi enzim kitinolitik diduga akibat akumulasi GlcNAc hasil degradasi dalam medium fermentasi. Menurut Donderski dan Trzebiatowska (2000: 81), GlcNAc dalam jumlah yang berlimpah dapat menghambat produksi enzim kitinolitik.

Menurut Mousdale *dkk.* (1999: 170), enzim sebagai produk fermentasi yang dihasilkan oleh sel bakteri, dapat berperan dalam proses pertumbuhan bakteri itu sendiri. Sejumlah GlcNAc hasil degradasi enzim kitinolitik di awal fermentasi digunakan oleh bakteri untuk proses hidupnya. GlcNAc yang diperoleh dari degradasi kitin digunakan sebagai sumber nutrisi karbon dan nitrogen untuk pertumbuhan bakteri (Brzezinska & Donderski 2001: 30). GlcNAc yang diperoleh akan dimetabolisme lebih lanjut oleh bakteri hingga menghasilkan energi, CO₂, H₂O, dan NH₃ (Thompson *dkk.* 2001: 4001). GlcNAc yang dihasilkan diduga digunakan pula untuk membentuk peptidoglikan pada dinding sel bakteri. Peptidoglikan bakteri merupakan polimer linear yang terdiri dari unit N-asetilglukosamin dan asam N-asetilmuramat yang saling terkait satu sama lain dengan rantai peptida (Moat & Foster 1995: 2--3).

Penggunaan GlcNAc untuk kebutuhan nutrisi bakteri membuat bakteri kembali mampu melakukan metabolisme optimal, sehingga produksi enzim kitinolitik pada isolat C4, C6, C8, C12, C14, C15, dan D10 kembali meningkat pada jam ke-24. Kurva produksi enzim kitinolitik dari isolat C4, C6, C12, C14, dan D10 menunjukkan nilai yang tinggi pada jam ke-24 selama 60 jam inkubasi. Hal tersebut dapat diartikan bahwa enzim kitinolitik banyak diproduksi pada jam ke-24. Produksi enzim kitinolitik tertinggi pada jam ke-24 di antara isolat-isolat tersebut ditunjukkan oleh isolat C14, yaitu sebesar 2,2344 U/mg (0,0022 U/ml).

Isolat C4, C6, C12, C14, dan D10 menunjukkan penurunan produksi enzim kitinolitik pada jam ke-36, namun isolat C8 dan C15 mengalami peningkatan produksi enzim. Peningkatan produksi enzim kitinolitik pada isolat C8 yaitu dari 0,0038 U/mg (0,0002 U/ml) pada jam ke-24 menjadi 0,0069 U/mg (0,0007 U/ml) pada jam ke-36. Peningkatan yang terjadi pada isolat C15 yaitu dari 0,0034 U/mg (0,0010 U/ml) pada jam ke-24 menjadi 0,0058 U/mg (0,0016 U/ml) pada jam ke-36. Penurunan produksi enzim kitinolitik pada jam ke-36 dari isolat C4, C6, C12, C14, dan D10 sama halnya dengan penurunan yang terjadi pada jam ke-12, yaitu akibat akumulasi senyawa GlcNAc, sedangkan peningkatan produksi enzim dari isolat C8 dan C15, kemungkinan kedua isolat tersebut masih memproduksi enzim hingga jam ke-36. Selanjutnya isolat C4, C6, C8, C12, C14, C15, dan D10 menunjukkan perbedaan produksi enzim kitinolitik pada jam ke-48 dan jam ke-60.

Isolat C4 dan D10 mengalami peningkatan produksi enzim kitinolitik pada jam ke-48 kemudian produksi enzim kitinolitik menurun pada jam ke-60 (Gambar 9 dan 16). Berbeda dengan kedua isolat tersebut, isolat C6, C12, dan C14 menunjukkan penurunan produksi enzim kitinolitik pada jam ke-48. Penurunan produksi enzim pada isolat-isolat C6, C12, dan C14 mulai terjadi dari jam ke-24 hingga jam ke-48. Produksi enzim dari isolat C6, C12, dan C14 kembali meningkat pada jam ke-60 (Gambar 10; 12; dan 13). Isolat C8 juga mengalami penurunan produksi enzim kitinolitik pada jam ke-48, bahkan terus menurun hingga jam ke-60 (Gambar 11). Penurunan produksi enzim

pada jam ke-48 terjadi pula pada isolat C15, namun pada jam ke-60 produksi enzim kembali meningkat (Gambar 14).

Berbeda dengan tujuh isolat lainnya, isolat D6 menunjukkan peningkatan produksi enzim kitinolitik dari jam ke-0 hingga jam ke-12. Peningkatan produksi enzim pada isolat D6 bahkan terjadi hingga jam ke-24 sebesar 0,0638 U/mg (0,0034 U/ml). Isolat D6 mengalami penurunan produksi enzim pada jam ke-36, sedikit peningkatan produksi enzim pada jam ke-48 dan kembali mengalami penurunan produksi enzim pada jam ke-60 (Gambar 15).

2. Jumlah sel bakteri

Jumlah sel bakteri kedelapan isolat ditentukan selama fermentasi berlangsung. Penentuan jumlah sel dilakukan dengan metode *Total Plate Count* (TPC). Masing-masing isolat menunjukkan jumlah sel yang berbeda setiap 12 jam (Tabel 4) dan setiap isolat juga menunjukkan pola pertumbuhan yang bervariasi (Gambar 9--16). Berdasarkan penentuan jumlah sel yang dilakukan, beberapa isolat menunjukkan pola pertumbuhan yang serupa. Beberapa isolat yang menunjukkan pola pertumbuhan serupa adalah isolat C4, C6, C14, dan D6. Isolat-isolat tersebut menunjukkan peningkatan jumlah sel hingga waktu tertentu, kemudian mengalami penurunan jumlah sel hingga jam ke-60. Demikian pula dengan 4 isolat lainnya, yaitu isolat C8, C12, C15, dan D10 menunjukkan pola pertumbuhan yang serupa. Isolat-isolat tersebut menunjukkan peningkatan jumlah sel

hingga waktu tertentu, kemudian menurun hingga waktu tertentu dan mengalami peningkatan jumlah sel kembali pada jam ke-60.

Jumlah sel tertinggi dari isolat C6 dan C14 ditunjukkan pada waktu yang sama, yaitu pada jam ke-24 (Gambar 10 dan 13), sedangkan jumlah sel tertinggi dari isolat C4 dan D6 dicapai pada jam ke-36 (Gambar 9 dan 15). Perbedaan waktu hingga diperoleh jumlah sel paling tinggi diduga akibat perbedaan kecepatan membelah di antara isolat-isolat tersebut. Semua sel bakteri membelah tidak pada waktu yang sama atau kecepatan membelah setiap bakteri berbeda. Waktu yang diperlukan oleh sel tunggal bakteri untuk membelah menjadi dua sel bakteri (*generation time*) berbeda untuk setiap bakteri, dan bergantung pada kondisi pertumbuhan bakteri. Umumnya bakteri memiliki *generation time* yang pendek jika berada pada kondisi pertumbuhan optimum (Ray 2004: 59).

Peningkatan sel bakteri hingga mencapai jumlah sel paling tinggi pada waktu tertentu dari isolat C4, C6, C14, dan D6 menunjukkan bahwa sel bakteri aktif membelah atau bakteri berada pada fase logaritma. Menurut Tortora *dkk.* (2001: 173), fase logaritma merupakan periode reproduksi sel bakteri dan metabolisme sel bakteri paling aktif. Jumlah sel dari isolat C4, C6, C14, dan D6 kemudian menurun hingga jam ke-60. Menurunnya jumlah sel tersebut diduga akibat semakin berkurangnya kandungan nutrisi dalam medium, sehingga banyak sel bakteri yang mati. Penurunan jumlah sel hingga jam ke-60 tersebut menunjukkan bahwa sel berada pada fase kematian. Menurut Tortora *dkk.* (2001: 174), pada fase kematian, kecepatan

kematian sel terus meningkat, sedangkan kecepatan sel membelah menjadi menurun, sehingga logaritma kecepatan kematian mencapai maksimal dan jumlah sel menjadi menurun. Menurut Hidayat *dkk.* (2006: 51), sel bakteri mati akibat habisnya beberapa nutrisi atau akibat terjadinya penimbunan senyawa tertentu hasil metabolisme yang bersifat racun bagi sel bakteri.

Isolat C8, C12, C15, dan D10 juga menunjukkan jumlah sel tertinggi pada waktu tertentu. Jumlah sel tertinggi dari isolat C12, C15, dan D10 dicapai pada jam ke-24 (Gambar 12; 14; dan 16), sedangkan jumlah sel tertinggi dari isolat C8 dicapai pada jam ke-36 (Gambar 11). Perbedaan waktu untuk mencapai jumlah sel paling tinggi tersebut sama halnya dengan keempat isolat yang telah dijelaskan sebelumnya (C4, C6, C14, dan D6), yaitu akibat perbedaan *generation time* di antara isolat-isolat tersebut (Ray 2004: 59).

Peningkatan jumlah sel hingga dicapai jumlah sel maksimum pada waktu tertentu, menunjukkan bahwa sel-sel dari isolat C8, C12, C15, dan D10 diduga sedang aktif membelah atau sedang berada pada fase logaritma. Isolat-isolat C8, C12, dan C15 selanjutnya mengalami penurunan jumlah sel hingga jam ke-48, sedangkan isolat D10 mengalami penurunan jumlah sel hingga jam ke-36. Penurunan jumlah sel tersebut diduga akibat banyaknya sel-sel bakteri yang mati atau berada pada fase kematian. Isolat-isolat C8, C12, C15, dan D10 menunjukkan peningkatan kembali jumlah sel. Peningkatan kembali jumlah sel tersebut terjadi hingga jam ke-60. Terjadinya

peningkatan kembali jumlah sel dari isolat C8, C12, C15, dan D10 diduga akibat hasil metabolit tertentu yang dapat meningkatkan jumlah sel.

Peningkatan jumlah sel isolat C12 dan C15 yang terjadi dari jam ke-48 hingga jam ke-60 diikuti oleh peningkatan produksi enzim kitinolitik.

Peningkatan produksi enzim yang dinyatakan dengan aktivitas enzim untuk isolat C12 yaitu dari 0 U/mg (0 U/ml) hingga 0,0030 U/mg (0,0004 U/ml), dan untuk isolat C15 yaitu dari 0,0007 U/mg (0,0003 U/ml) hingga 0,0034 U/mg (0,0011 U/ml). Peningkatan jumlah sel pada isolat C12 dan C15 diduga akibat peningkatan GlcNAc hasil degradasi enzim kitinolitik yang diproduksi oleh kedua isolat tersebut. GlcNAc yang dihasilkan digunakan untuk proses pertumbuhan kedua isolat tersebut. Menurut Patil *dkk.* (2000: 473), bakteri menghasilkan enzim kitinolitik secara ekstraseluler untuk pengambilan nutrisi. Thompson *dkk.* (2001: 4001), juga menyatakan bahwa hasil degradasi kitin oleh enzim kitinolitik berupa GlcNAc akan digunakan bakteri untuk metabolisme lebih lanjut dan hasil metabolisme tersebut dapat memicu pertumbuhan bakteri.

Peningkatan jumlah sel yang terjadi pada isolat C8 dan D10 tidak diikuti oleh peningkatan produksi enzim kitinolitik, sehingga peningkatan jumlah sel yang terjadi pada kedua isolat tersebut diduga akibat senyawa-senyawa lain (selain GlcNAc) yang mampu memicu pertumbuhan sel.

Menurut Rachman (1989: 36), selama pertumbuhan bakteri, akan terbentuk berbagai metabolit hasil proses biosintesis oleh bakteri. Berbagai metabolit tersebut saling berhubungan satu sama lain dan berperan dalam

pertumbuhan sel. Wang *dkk.* pada tahun 1979 (*lihat* Rachman 1989: 36), juga menyatakan bahwa terdapat sejumlah senyawa antara (katabolit) yang dihasilkan selama metabolisme sel berlangsung, dan senyawa antara tersebut berperan penting dalam pertumbuhan sel.

3. Konsentrasi protein

Hampir semua isolat menunjukkan fluktuasi nilai konsentrasi protein, kecuali isolat D6, dari jam ke-0 hingga jam ke-60 nilai konsentrasi protein terus meningkat hingga mencapai nilai 0,1478 mg/ml (Gambar 15). Peningkatan nilai konsentrasi protein pada isolat D6 hingga jam ke-60 diduga akibat semakin bertambahnya protein lain selain enzim yang ikut terdeteksi pada saat dilakukan pengukuran konsentrasi protein. Protein lain, selain enzim tersebut dapat berasal dari protein penyusun medium dan protein dari sejumlah sel lisis yang masih tertinggal pada enzim kasar (supernatan bebas sel). Menurut Mousdale *dkk.* (1999: 170), sejumlah sel dapat lisis dalam proses fermentasi, sehingga protein seluler dari sel lisis tersebut larut dan terakumulasi dalam medium fermentasi.

Nilai konsentrasi protein pada isolat C15 menunjukkan nilai yang paling besar diantara nilai konsentrasi protein pada isolat yang lain. Kisaran nilai konsentrasi protein isolat C15 yaitu 0,2570--0,4710 mg/ml (Tabel 4). Tingginya nilai konsentrasi protein pada isolat C15 diduga karena adanya protein dari enzim lain, selain keluarga enzim kitinolitik yang terakumulasi dalam supernatan bebas sel dan ikut terdeteksi saat dilakukan pengukuran

konsentrasi protein. Menurut Svitil *dkk.* (1997: 412), umumnya bakteri kitinolitik tidak hanya menghasilkan enzim kitinolitik saja, tetapi bakteri kitinolitik juga dapat menghasilkan enzim proteolitik.

Peningkatan konsentrasi protein yang berfluktuasi ditunjukkan oleh hampir semua isolat adalah akibat protein lain, selain protein enzim kitinolitik. Protein yang terukur merupakan semua protein yang terdapat dalam larutan, sehingga yang terukur tidak hanya protein enzim kitinolitik (Mousdale *dkk.* 1999: 170). Penurunan konsentrasi protein dalam fluktuasi diduga akibat protein bebas dari sel-sel lisis maupun penyusun medium yang terlarut turut digunakan sebagai sumber nutrisi oleh sel bakteri. Menurut Hidayat *dkk.* (2006: 64), asam amino bebas dalam medium fermentasi dapat dimetabolisme oleh sel bakteri.

4. Isolat terpilih

Pemilihan satu isolat dilakukan dengan melihat nilai aktivitas spesifik enzim kitinolitik yang dinyatakan sebagai produksi enzim, serta melihat hubungannya dengan jumlah sel dan konsentrasi protein. Produksi enzim kitinolitik, jumlah sel, dan konsentrasi protein merupakan parameter yang digunakan dalam pemilihan isolat. Satu isolat terpilih tersebut kemudian digunakan untuk penentuan suhu dan pH yang sesuai dalam produksi enzim kitinolitik. Secara keseluruhan, selama fermentasi dari kedelapan isolat, terdapat kesesuaian antara ketiga parameter yang digunakan, namun ada pula yang menunjukkan ketidaksesuaian antara ketiga parameter tersebut.

Kesesuaian dan ketidaksesuaian antara ketiga parameter yang digunakan, ditunjukkan oleh beberapa isolat bakteri dan hanya terjadi pada jam-jam tertentu saat fermentasi, karena nilai ketiga parameter tersebut umumnya berfluktuasi. Kesesuaian yang ditunjukkan dari kedelapan isolat selama fermentasi sangat jarang terjadi, sedangkan ketidaksesuaian antara ketiga parameter banyak ditunjukkan. Kesesuaian antara ketiga parameter yang ditunjukkan yaitu meningkatnya produksi enzim seiring dengan meningkatnya jumlah sel dan nilai konsentrasi protein atau sebaliknya, yaitu menurunnya produksi enzim seiring dengan menurunnya jumlah sel dan nilai konsentrasi protein. Ketidaksesuaian antara ketiga parameter terjadi bila salah satu dari ketiga parameter yang diukur tidak seiring, yaitu tidak ikut meningkat atau ikut menurun.

Kesesuaian antara ketiga parameter tersebut antara lain ditunjukkan oleh isolat C8, yaitu peningkatan yang terjadi dari jam ke-12 hingga jam ke-24. Peningkatan produksi enzim diiringi oleh meningkatnya jumlah sel dan nilai konsentrasi protein, bahkan peningkatan terjadi hingga jam ke-36. Isolat C8 juga menunjukkan penurunan produksi enzim diiringi oleh menurunnya jumlah sel dan nilai konsentrasi protein. Hal tersebut ditunjukkan oleh isolat C8 dari jam ke-36 hingga jam ke-48. Beberapa isolat bakteri yang menunjukkan kesesuaian pada jam-jam tertentu adalah isolat C6, C8, C12, D6 dan D10.

Menurut Mousdale *dkk.* (1999: 171), terdapat interaksi yang kuat antara kecepatan terbentuknya sel (pertumbuhan sel) dan terbentuknya

produk dalam fermentasi. Fermentasi dibedakan menjadi dua, yaitu produk yang berkaitan dengan pertumbuhan sel (*growth-associated*) dan produk yang tidak berkaitan dengan pertumbuhan sel (*growth-independent*).

Growth-associated merupakan fermentasi di mana produk yang terbentuk akibat aktifnya pertumbuhan sel atau sebaliknya, sedangkan *growth-independent* merupakan fermentasi di mana produk yang terbentuk bukan akibat aktifnya pertumbuhan sel (Mousdale *dkk.* 1999: 171; Hidayat *dkk.* 2006: 49). Isolat bakteri yang diuji umumnya menunjukkan *growth-independent*.

Aktivitas kuantitatif enzim kitinolitik tidak selalu menunjukkan kesesuaian dengan aktivitas kualitatif enzim kitinolitik (besar indeks kitinolitik) pada semua isolat. Isolat C15 menunjukkan nilai indeks kitinolitik terbesar, namun tidak menunjukkan aktivitas enzim yang besar. Isolat C4 menunjukkan nilai indeks kitinolitik terkecil, namun memiliki aktivitas enzim yang lebih besar, yaitu 0,2121 U/mg (0,0021 U/ml) dibandingkan dengan isolat C15 yaitu sebesar 0,0058 U/mg (0,0016 U/ml). Hal tersebut menunjukkan bahwa besar aktivitas kuantitatif enzim kitinolitik tidak selamanya diiringi oleh besar aktivitas kualitatif enzim kitinolitik.

Ketidaksesuaian tersebut dapat terjadi karena saat pengujian aktivitas enzim kitinolitik, pemecahan kitin oleh enzim kitinolitik tidak sempurna hingga menjadi GlcNAc, tetapi hanya sampai bentuk oligomer kitin, sehingga pada saat pengujian aktivitas enzim, GlcNAc lebih sedikit terukur.

Berdasarkan ketiga parameter yang diukur, isolat yang dipilih untuk pengujian selanjutnya dalam penentuan suhu dan pH yang sesuai dalam produksi enzim kitinolitik adalah D6. Isolat D6 dipilih karena isolat D6 menunjukkan produksi enzim kitinolitik yang tidak terlalu fluktuatif dibandingkan dengan isolat lain. Nilai konsentrasi protein yang ditunjukkan isolat D6 semakin meningkat hingga jam ke-60. Isolat D6 juga menunjukkan pola pertumbuhan sel bakteri yang tidak fluktuatif. Alasan lain dipilihnya isolat D6, yaitu zona bening disekitar koloni bakteri yang ditunjukkan merupakan zona bening yang paling jernih dibandingkan zona bening isolat lain, walaupun indeks kitinolitik yang ditunjukkan bukanlah yang terbesar. Paling jernihnya zona bening yang ditunjukkan oleh isolat D6 diduga enzim kitinolitik yang diproduksi juga banyak dan cepat mendegradasi kitin. Semakin banyak enzim kitinolitik yang diproduksi bakteri, maka semakin banyak pula partikel kitin yang terdegradasi, sehingga medium menjadi lebih jernih (Chen & Lee 1994: 783).

Hasil pengamatan mikroskopis menunjukkan bahwa isolat D6 merupakan bakteri berbentuk batang (*bacillus*) (Gambar 17), sehingga genus isolat D6 kemungkinan adalah *Bacillus*, namun butuh pengujian lebih lanjut untuk membuktikannya. Menurut Thompson *dkk.* (2001: 4001), *Bacillus* merupakan salah satu genus bakteri yang mampu menghasilkan enzim kitinolitik. Berdasarkan pengecatan Gram yang dilakukan, isolat D6 merupakan bakteri Gram positif.

C. VARIASI SUHU DAN pH UNTUK PRODUKSI ENZIM KITINOLITIK

Penentuan suhu dan pH yang sesuai untuk produksi enzim kitinolitik dari isolat D6 dilakukan pada produksi enzim kitinolitik tertinggi saat seleksi, yaitu pada jam ke-24.

1. Variasi suhu

Produksi enzim kitinolitik diuji pada pH 7, dengan variasi suhu 30°, 37°, 45°, dan 55° C. Isolat D6 menunjukkan produksi enzim kitinolitik tertinggi pada suhu inkubasi 30° C, yaitu sebesar 0,0643 U/mg (0,0032 U/ml). Isolat D6 masih menunjukkan produksi enzim kitinolitik pada suhu inkubasi 37° C, namun produksi enzim tersebut lebih rendah dibandingkan pada suhu inkubasi 30° C. Isolat D6 pada suhu inkubasi 45° dan 55° C tidak menunjukkan adanya produksi enzim kitinolitik (Gambar 18).

Berdasarkan hasil yang diperoleh, terlihat bahwa variasi suhu yang diuji memberikan pengaruh terhadap isolat D6 dalam memproduksi enzim kitinolitik. Tidak adanya produksi enzim pada variasi suhu inkubasi 45° dan 55° C diduga akibat suhu tersebut memengaruhi metabolisme bakteri, sehingga enzim kitinolitik tidak dihasilkan. Bakteri memiliki kisaran suhu untuk proses metabolisme hidupnya. Suhu tertentu di luar kisaran suhu pertumbuhan bakteri, dapat memengaruhi enzim dalam metabolisme dan struktur selnya (Moat & Foster 1995: 543; Tortora *dkk.* 2001: 157). Setiap

bakteri memiliki suhu optimum yang berbeda dalam produksi enzim kitinolitik (Donderski & Trzebiatowska 2000: 81).

Selain menentukan produksi enzim, isolat D6 juga diuji pertumbuhannya pada medium agar LB dengan variasi suhu inkubasi tersebut. Isolat D6 yang ditumbuhkan pada medium agar LB, dengan suhu inkubasi yang berbeda menunjukkan pertumbuhan yang berbeda pula. Isolat D6 pada suhu inkubasi 30° dan 37° C, setelah 24 jam menunjukkan pertumbuhan, yang ditandai dengan semakin menebalnya warna putih bekas goresan pada medium saat inokulasi. Isolat D6 yang ditumbuhkan pada suhu inkubasi 45° dan 55° C, setelah 24 jam tidak menunjukkan adanya pertumbuhan.

Berdasarkan hasil yang diperoleh, dapat diketahui bahwa isolat D6 masih dapat hidup pada suhu 30° dan 37° C, sedangkan pada suhu 45° dan 55° C, isolat D6 tidak mampu hidup. Isolat D6 diduga merupakan bakteri mesofil, yaitu bakteri yang mampu tumbuh pada kisaran suhu 25°--40° C (Tortora *dkk.* 2001: 158). Tidak adanya produksi enzim kitinolitik pada variasi suhu inkubasi 45° dan 55° C diduga akibat bakteri pada suhu tersebut mati, sehingga enzim kitinolitik tidak dihasilkan. Suhu 30° C diduga merupakan suhu yang sesuai untuk produksi enzim kitinolitik dari isolat D6, karena menunjukkan produksi enzim kitinolitik tertinggi di antara variasi suhu yang diuji.

2. Variasi pH

Produksi enzim kitinolitik diuji pada suhu 30° C, dengan variasi pH 6, 7, 8, dan 9. Isolat D6 menunjukkan produksi enzim kitinolitik tertinggi pada pH 6, yaitu sebesar 0,0238 U/mg (0,0030 U/ml). Isolat D6 pada pH 7 dan 8 masih menunjukkan produksi enzim, namun pada pH 9 enzim kitinolitik tidak diproduksi (Gambar 19). Isolat D6 juga diuji pertumbuhannya dalam medium agar LB pada variasi pH tersebut (6, 7, 8, dan 9). Semua isolat D6 yang ditumbuhkan dalam medium agar LB pada variasi pH tersebut, menunjukkan pertumbuhan setelah 24 jam inkubasi.

Berdasarkan hasil yang diperoleh, terlihat bahwa variasi pH yang diuji memberikan pengaruh terhadap isolat D6 dalam memproduksi enzim kitinolitik. pH 6 diduga merupakan pH yang sesuai di antara variasi pH yang lain bagi isolat D6 untuk memproduksi enzim kitinolitik, karena menunjukkan produksi enzim kitinolitik tertinggi. Tidak adanya produksi enzim pada pH 9 diduga karena pada pH tersebut memengaruhi metabolisme atau aktivitas fisiologis sel isolat D6, sehingga enzim kitinolitik tidak dihasilkan. Menurut Moat dan Foster (1995: 26), pH medium dapat memengaruhi permeabilitas sel dan aktivitas fisiologis sel. pH optimum untuk memperoleh aktivitas enzim kitinolitik yang tinggi berbeda untuk setiap jenis bakteri (Brzezinska & Donderski 2001: 30).