

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

A. KITIN

Kitin merupakan senyawa homopolisakarida tidak bercabang yang terdiri dari N-asetilglukosamin. Monomer-monomer N-asetilglukosamin dihubungkan oleh ikatan β -1,4 glikosida (Gambar 1). Kitin terdistribusi luas di alam baik sebagai komponen struktural dinding sel fungi maupun eksoskeleton arthropoda, nematoda dan mollusca. Kitin yang terdapat pada organisme tertentu umumnya berikatan dengan polimer lainnya seperti glukukan dan protein. Kitin mengalami biodegradasi melalui mekanisme dengan melibatkan kompleks enzim (Patil *dkk.* 2000: 473; Gohel *dkk.* 2004: 87). Kitin merupakan zat padat yang tidak larut dalam air (Suryanto *dkk.* 2006: 5).

Berdasarkan susunan N-asetilglukosamin, kitin dapat dibedakan menjadi α -kitin (antiparalel), β -kitin (paralel), dan γ -kitin (antiparalel-paralel). α -kitin memiliki susunan N-asetilglukosamin yang lebih rapat dan lebih banyak dijumpai di alam. α -kitin terdapat pada kutikula arthropoda dan fungi tertentu. β -kitin memiliki susunan N-asetilglukosamin yang tidak rapat dan banyak dijumpai pada diatom. γ -kitin merupakan gabungan dari α -kitin dan β -kitin. γ -kitin tersusun dari N-asetilglukosamin yang rapat dan

N-asetilglukosamin yang tidak rapat. γ -kitin dapat dijumpai pada kumbang *Ptinus tectus* dan *Rhynchaenus fagi* (Muzzarelli 1977: 46; Svitil *dkk.* 1997: 408). (Gambar 3 dan Gambar 4)

Menurut Svitil *dkk.* (1997: 408), salah satu yang mempengaruhi degradasi kitin adalah susunan untai N-asetilglukosamin pada kitin. Degradasi kitin akan berlangsung lebih cepat pada β -kitin daripada α -kitin. Banyak organisme di alam memiliki eksoskeleton yang tersusun dari α -kitin sebagai mekanisme pertahanan diri agar tidak mudah untuk didegradasi.

Kitin dan turunannya telah banyak diaplikasikan pada beberapa industri, antara lain pada industri pangan, farmasi, dan tekstil. Kitin dan turunannya dapat digunakan sebagai bahan tambahan atau pengawet alami pada makanan. Kitin digunakan pula sebagai zat antikoagulasi darah, mempercepat penyembuhan luka, komponen kosmetik, dan pengecatan dalam industri tekstil. Salah satu turunan kitin yaitu oligosakarida kitosan diketahui mampu menunjukkan aktivitas biologi, yaitu dapat menghambat pertumbuhan bakteri dan fungi, sehingga oligomer kitosan banyak dimanfaatkan sebagai antimikroba (Hirano 1997: 31--39; Choi *dkk.* 2004: 4522).

B. ENZIM KITINOLITIK

Sistem enzim kitinolitik akan menghidrolisis substrat kitin secara sempurna menjadi N-asetilglukosamin (GlcNAc) yang terjadi secara sinergis

dan berurutan (Patil *dkk.* 2000: 473). Terdapat dua jalur degradasi kitin di alam. Jalur degradasi kitin yang pertama diawali dengan hidrolisis ikatan β -1,4 glikosida. Ikatan β -1,4 glikosida diputus oleh enzim endokitinase sehingga terbentuk oligomer kitin. Selanjutnya oligomer kitin dipecah menjadi dimer N-asetilglukosamin (kitobiose) oleh kitobiosidase, hingga dihasilkan monomer N-asetilglukosamin (GlcNAc) oleh N-asetilglukosaminidase (kitobiase). Monomer GlcNAc kemudian mengalami deasetilasi menjadi glukosamin oleh enzim N-asetil-glukosamin-deasetilase. Jalur degradasi kitin lainnya adalah deasetilasi kitin menjadi kitosan oleh enzim kitin-deasetilase. Kitosanase akan mendegradasi kitosan menjadi oligomer kitosan. Oligomer kitosan selanjutnya akan didegradasi menjadi glukosamin oleh glukosaminidase (Dinter *dkk.* 2000: 506). (Gambar 2)

Menurut Fischer & Stein pada tahun 1960 dan Cabezas pada tahun 1989 (*lihat Gohel dkk.* 2006: 56), enzim kitinolitik digolongkan ke dalam dua kelompok berdasarkan cara kerja enzim, yaitu endokitinase dan eksokitinase. Endokitinase merupakan enzim yang bekerja dengan menghidrolisis secara acak ikatan β -1,4 glikosida dari N-asetilglukosamin, sedangkan eksokitinase merupakan enzim yang bekerja menghidrolisis gula nonpereduksi di ujung rantai kitin. Menurut Koga *dkk.* (1999: 116), tipe pemotongan endokitinase menghasilkan produk berupa oligomer kitin, sedangkan tipe pemotongan eksokitinase menghasilkan produk berupa monomer kitin (N-asetilglukosamin) dan oligomer kitin.

Enzim kitinolitik banyak dihasilkan oleh organisme. Organisme penghasil enzim kitinolitik antara lain bakteri, fungi, khamir, tumbuhan, insekta, protozoa, manusia dan hewan (Gohel *dkk.* 2006: 56). Enzim kitinolitik oleh bakteri dihasilkan secara ekstraseluler dan digunakan untuk pengambilan nutrisi dan parasitisme (Patil *dkk.* 2000: 473). Enzim kitinolitik pada fungi berperan dalam pengaturan fisiologis saat pembelahan sel, diferensiasi dan aktivitas mikoparasit. Khamir menggunakan enzim kitinolitik untuk proses pembagian sel selama pertunasan dan untuk mekanisme perlawanan terhadap fungi lain. Tumbuhan menggunakan enzim kitinolitik untuk mendegradasi dinding sel fungi patogen. Insekta menggunakan enzim kitinolitik untuk perkembangannya. Enzim kitinolitik pada protozoa digunakan agar protozoa tersebut dapat masuk ke dalam saluran pencernaan insekta yang menjadi inangnya. Manusia memanfaatkan enzim kitinolitik untuk melawan infeksi nematoda (Gohel *dkk.* 2006: 56). Escott dan Adams (1995: 4770), melaporkan bahwa dalam serum dan leukosit manusia diketahui memiliki aktivitas kitinolitik.

Sama seperti enzim pada umumnya, aktivitas enzim kitinolitik juga dipengaruhi oleh faktor lingkungan, seperti pH dan suhu, serta oleh faktor kimiawi tertentu yang secara khusus dapat mempengaruhi enzim tersebut (Campbell *dkk.* 2002: 101). pH optimum enzim kitinolitik berbeda bagi setiap organisme. pH optimum enzim kitinolitik pada tumbuhan tingkat tinggi dan alga adalah 4--9, pada hewan 4,8--7,5 dan pada mikroorganisme 3,5--8. Stabilitas enzim kitinolitik terhadap suhu juga bervariasi untuk setiap

organisme. Enzim kitinolitik pada serangga akan optimum dan tetap stabil pada suhu 25° C. Berbeda dengan enzim kitinolitik dari *Bacillus licheniformis* yang tetap stabil pada suhu 80° C (Koga *dkk.* 1999: 112--113).

Enzim kitinolitik berperan dalam degradasi kitin untuk menghasilkan oligomer kitin dan turunan kitin yang bermanfaat (Hirano 1997: 32), sehingga enzim kitinolitik dapat dimanfaatkan pula untuk mengolah limbah kitin (Thompson *dkk.* 2001: 4001). Enzim kitinolitik juga berperan sebagai agen biokontrol terhadap jamur dan serangga patogen pada tumbuhan, biopestisida, terlibat dalam pembuatan protein sel tunggal (Patil *dkk.* 2000: 478--480), serta berperan sebagai obat terhadap penyakit parasit (Thompson *dkk.* 2001: 4001).

C. BAKTERI PENGHASIL ENZIM KITINOLITIK

Bakteri penghasil enzim kitinolitik banyak berada pada habitat yang memiliki kandungan kitin tinggi, seperti kompos yang mengandung kitin (Sakai *dkk.* 1998: 3397), eksoskeleton crustacea (Vogan *dkk.* 2002: 743), air laut, sedimen laut (Donderski & Brzezinska 2001: 331) dan tanah (Chernin *dkk.* 1995: 1720). Menurut Liaw dan Mah (1992: 260), bakteri kitinolitik umumnya merupakan bakteri halofilik karena banyak dijumpai pada air, sedimen laut dan crustacea yang hidup pada lingkungan berkadar garam tinggi.

Enzim kitinolitik pada bakteri merupakan enzim ekstraseluler untuk pengambilan nutrisi dan parasitisme (Patil *dkk.* 2000:473). Menurut

Brzezinska dan Donderski (2001: 30), bakteri memproduksi enzim kitinolitik untuk mendegradasi kitin sehingga memperoleh N-asetilglukosamin sebagai sumber nutrisi karbon dan nitrogen untuk proses hidup bakteri. Thompson *dkk.* (2001: 4001), melaporkan bahwa degradasi kitin oleh enzim kitinolitik bakteri adalah untuk memperoleh N-asetilglukosamin yang selanjutnya akan dimetabolisme hingga menghasilkan energi, CO₂, H₂O dan NH₃. Menurut Metcalfe *dkk.* (2002: 5042), peranan bakteri kitinolitik penting dalam mempertahankan siklus karbon dan nitrogen dari degradasi kitin dalam ekosistem.

Beberapa genus bakteri yang mampu menghasilkan enzim kitinolitik menurut Thompson *dkk.* (2001: 4001) adalah *Aeromonas*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Pseudomonas*, dan *Serratia*. Bakteri penghasil enzim kitinolitik yang banyak dipelajari adalah *Serratia marcescens* karena mampu memproduksi banyak enzim kitinolitik dan isoenzim. Banyak penelitian yang sudah dilakukan untuk mengetahui karakterisasi enzim kitinolitik dan isoenzim dari *Serratia marcescens* (Thompson *dkk.* 2001: 4001; Green *dkk.* 2005: 28).

Beberapa bakteri lain yang diketahui mampu menghasilkan enzim kitinolitik adalah *Chromobacterium violaceum* (Chernin *dkk.* 1998: 4435), *Streptococcus lydicus*, genus *Vibrio* seperti *Vibrio harveyi* dan *Vibrio alginolyticus* (Nasran *dkk.* 2003: 33), genus *Streptomyces* seperti *Streptomyces olivaceoviridis* (Romaguerra *dkk.* 1992: 3450) dan *Streptomyces thermoviolaceus* (Tsujiibo *dkk.* 1993: 620), dan *Clostridium*

aminovalericum (Simunek *dkk.* 2004: 194). Bakteri kitinolitik juga berperan dalam pengendalian hama dan penyakit tanaman, seperti yang dilaporkan oleh Pleban *dkk.* (1997: 284), bahwa *Bacillus cereus* strain 65 dapat melindungi tanaman kapas dari penyakit busuk akar oleh *Rhizoctonia solani*.

D. PRODUKSI ENZIM KITINOLITIK

Fermentasi merupakan proses untuk menghasilkan berbagai produk dengan melibatkan mikroorganisme. Produk yang dapat diperoleh dari proses fermentasi adalah enzim, sel mikroorganisme, metabolit primer, metabolit sekunder, dan senyawa kimia hasil proses biokonversi oleh mikroorganisme. Fermentasi juga merupakan suatu proses untuk menghasilkan energi dengan bantuan senyawa organik sebagai pemberi dan penerima elektron. Fermentasi mencakup aktivitas metabolisme mikroorganisme baik aerobik maupun anaerobik, sehingga terjadi perubahan kimiawi dari substrat organik (Rachman 1989: 3). Enzim kitinolitik dapat diproduksi dari mikroorganisme melalui proses fermentasi (Mejia-Saules *dkk.* 2006: 95).

Pemanfaatan mikroorganisme dalam produksi enzim dengan fermentasi memberikan keuntungan yaitu produktivitas mikroorganisme dalam menghasilkan enzim dapat ditingkatkan dengan mudah (Rachman 1989: 8). Keunggulan produksi enzim melalui proses fermentasi yaitu jenis substrat yang digunakan dapat disesuaikan dengan mikroorganisme, sehingga biaya produksi lebih murah. Jumlah produksi juga dapat

ditingkatkan dengan optimasi kondisi fermentasi dan perbaikan strain. Produksi enzim dapat dilakukan dalam ruangan yang kondisi lingkungannya dapat diatur (Winarno 1995: 63). Menurut Monreal dan Reese pada tahun 1969 (*lihat* Chen & Lee 1994: 783), salah satu mikroorganisme yang baik dalam memproduksi enzim kitinolitik adalah bakteri.

Bakteri yang terlibat dalam produksi enzim kitinolitik berkaitan dengan kemampuannya dalam menggunakan sumber karbon dan nitrogen. Penggunaan sumber karbon dan nitrogen dapat mendukung kecepatan perubahan metabolik bakteri dalam menghasilkan enzim kitinolitik (El-Mansi 1999: 49). Kitin merupakan sumber karbon dan nitrogen yang digunakan dalam produksi enzim kitinolitik dari bakteri dengan fermentasi. Kitin merupakan substrat atau penginduksi kuat dalam produksi enzim kitinolitik (Chen & Lee 1994: 783; Dinter *dkk.* 2000: 507).

Kitin merupakan senyawa yang sulit untuk didegradasi, sehingga bakteri membutuhkan waktu lebih lama untuk mendegradasinya (Donderski & Trzebiatowska 2000: 82). Kitin yang digunakan dalam fermentasi untuk produksi enzim kitinolitik dapat berupa koloidal kitin, kulit udang utuh yang tidak diberi perlakuan apapun (*crude*), kitin hasil proses kimiawi, dan kitin hasil proses biologi (Green *dkk.* 2005: 31). Koloidal kitin merupakan penginduksi aktivitas kitinolitik yang paling efektif, karena koloidal kitin merupakan turunan kitin yang bersifat amorf dengan kerapatan polimer lebih rendah sehingga lebih mudah dihidrolisis oleh enzim (Fawzya *dkk.* 2004: 12) dan lebih mudah tersebar merata dalam medium cair (Muzzarelli 1977: 57).

Kecepatan terbentuknya produk pada fermentasi dipengaruhi oleh beberapa faktor lingkungan seperti pH, suhu, oksigen terlarut, dan akumulasi senyawa penghambat (inhibitor) (El-Mansi 1999: 49). Enzim kitinolitik yang diproduksi oleh bakteri dalam fermentasi juga bergantung pada banyak faktor, seperti pH, suhu, konsentrasi substrat dan waktu inkubasi (Brzezinska & Donderski 2001: 30). Produksi enzim kitinolitik juga berkaitan dengan kemampuan bakteri dalam mendegradasi kitin. Degradasi kitin oleh bakteri bergantung pula pada faktor lingkungan seperti pH, suhu, konsentrasi kitin, dan waktu inkubasi (Donderski & Trzebiatowska 2000: 81). Seki, pada tahun 1965 (*lihat* Donderski & Trzebiatowska 2000: 81) melaporkan bahwa 10^{10} kultur sel bakteri dalam 1 cm^3 tanah mampu mendegradasi 30 mg kitin dalam satu hari pada suhu 25°C . Kitin di laut pada suhu 15°C akan terdegradasi oleh bakteri selama 140 hari, pada suhu 5°C akan terdegradasi oleh bakteri selama 370 hari, dan pada suhu di bawah 5°C akan terdegradasi oleh bakteri selama 500 hari.

Kondisi lingkungan seperti pH, suhu, konsentrasi substrat, dan waktu inkubasi yang optimum untuk memperoleh aktivitas enzim kitinolitik yang tinggi berbeda untuk setiap jenis bakteri (Brzezinska & Donderski 2001: 30). Frandberg dan Schniirer (1993), melaporkan bahwa *Bacillus pabuli K 1* menghasilkan aktivitas kitinolitik terbesar pada pH 8, suhu 30°C , dan waktu inkubasi 120 jam. Monreal dan Reese (1969), melaporkan bahwa *Serrratia marcescens* menghasilkan aktivitas kitinolitik terbesar pada pH 6,4, suhu

50° C, dan waktu inkubasi 144 jam (*lihat* Donderski & Trzebiatowska 2000: 81).

Penelitian terhadap bakteri yang sama menunjukkan kondisi optimum yang berbeda dalam produksi enzim kitinolitik, seperti yang dilaporkan oleh Donderski dan Trzebiatowska (2000: 81), bahwa *Arthrobacter* sp. menunjukkan aktivitas kitinolitik tertinggi pada suhu 40° C, sedangkan Morissey *dkk.* pada tahun 1976 (*lihat* Donderski & Trzebiatowska 2000: 81) melaporkan bahwa aktivitas kitinolitik tertinggi *Arthrobacter* sp. pada suhu 50° C. Konsentrasi substrat optimum dalam produksi enzim kitinolitik juga berbeda untuk setiap jenis bakteri, seperti *Aeromonas hydrophila* menunjukkan aktivitas kitinolitik tertinggi pada konsentrasi koloidal kitin 2% setelah 192 jam inkubasi, sedangkan untuk *Aeromonas salmonicida* pada konsentrasi koloidal kitin 1,5% setelah 192 jam inkubasi (Brzezinska & Donderski 2001: 30).

E. PENENTUAN AKTIVITAS ENZIM KITINOLITIK

Aktivitas enzim kitinolitik yang ditunjukkan oleh bakteri merupakan parameter yang digunakan dalam seleksi bakteri kitinolitik (Park *dkk.* 2000: 224). Seleksi sebenarnya membantu untuk mengetahui apakah suatu mikroorganisme menghasilkan senyawa kimia tertentu, seperti enzim, antibiotik atau metabolit sekunder lainnya (Huang *dkk.* 1999: 21). Seleksi umumnya merupakan strategi dalam penelitian yang dilakukan dengan tujuan mendapatkan strain mikroorganisme penghasil produk tertentu (Hunter 1999:

128). Aktivitas enzim yang dihasilkan oleh mikroorganisme dapat diketahui dengan seleksi pada medium selektif. Medium selektif merupakan medium dengan komposisi tertentu, sehingga hanya jenis-jenis mikroorganisme tertentu saja yang dapat hidup (Gandjar *dkk.* 1992: 20).

Enzim kitinolitik yang diproduksi dapat diketahui dengan melihat aktivitas enzim kitinolitik. Aktivitas enzim merupakan ukuran perubahan molekul substrat menjadi produk dalam satuan waktu pada kondisi tertentu. Aktivitas enzim kitinolitik yang ditunjukkan oleh bakteri dapat ditentukan secara kualitatif maupun kuantitatif (Green *dkk.* 2005: 30).

1. Aktivitas Kualitatif Enzim Kitinolitik

Menurut Cody (1989) dan Wirth & Wolf (1990) (*lihat Gohel dkk.* 2006: 57), aktivitas kitinolitik secara kualitatif dapat ditentukan oleh adanya zona bening di sekitar koloni bakteri yang tumbuh pada medium agar kitin. Potensi bakteri dalam memproduksi enzim kitinolitik ditentukan dengan menghitung nisbah antara diameter zona bening dengan diameter koloni bakteri. Nisbah diameter zona bening di sekitar koloni (halo) dengan diameter koloni, merupakan indeks kitinolitik (Nasran *dkk.* 2003: 34). Adanya zona bening di sekitar koloni bakteri setelah waktu inkubasi tertentu, membuktikan bahwa bakteri tersebut mampu memproduksi enzim kitinolitik (Park *dkk.* 2000: 224).

Zona bening terbentuk akibat enzim kitinolitik yang dibebaskan ke luar sel bakteri untuk memecah makromolekul kitin menjadi molekul kitin yang lebih kecil, sehingga bakteri dapat mengambil nutrisi dalam bentuk molekul-

molekul kecil (Joklik & Smith 1968: 66). 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 dan penggunaan molekul hasil degradasi tersebut oleh bakteri membuat medium tampak jernih, terutama di sekitar koloni bakteri (Chen & Lee 1994: 783).

2. Aktivitas Kuantitatif Enzim Kitinolitik

Salah satu penentuan aktivitas kuantitatif enzim kitinolitik adalah dengan menentukan terbentuknya produk akhir, yaitu gula pereduksi N-asetilglukosamin (GlcNAc) yang dibebaskan dari kitin selama reaksi hidrolisis. Definisi satu unit aktivitas enzim kitinolitik adalah sejumlah enzim yang menghasilkan 1 μmol N-asetilglukosamin per menit (Green *dkk.* 2005: 30). Gula pereduksi yang dibebaskan ditentukan secara kolorimetri dengan pereaksi Schales (Tsujiro *dkk.* 1993: 620; Wang & Chang 1997: 381). Metode ini merupakan metode yang sederhana dan cepat, namun tidak efektif jika enzim yang dihasilkan sedikit (Spindler 1997: 233).

3. Metode Lain dalam Penentuan Aktivitas Enzim Kitinolitik

Aktivitas enzim kitinolitik dapat ditentukan dengan beberapa cara lain, salah satunya berdasarkan pengurangan substrat, yaitu metode viskometri. Aktivitas enzim kitinolitik ditentukan dengan melihat waktu yang diperlukan dari pengurangan viskositas substrat dalam larutan. Metode ini

tidak efektif karena menghabiskan waktu banyak. Selain metode viskometri, metode turbidimetri (nephelometri) juga dapat digunakan untuk menentukan aktivitas enzim kitinolitik. Metode tersebut mengukur variasi turbiditas (kerapatan) koloidal kitin selama reaksi hidrolisis. Pengukuran ini bersifat cepat dan akurat, namun tidak cocok untuk aktivitas enzim kitinolitik rendah (Spindler 1997: 233--235).

Penentuan aktivitas enzim kitinolitik juga dapat dilakukan dengan spektrofotometri atau fluorometri, yaitu menggunakan substrat kromogenik *4-methylumbelliferyl* (4-MU) GlcNAc. Aktivitas enzim yang ditunjukkan dapat dilihat melalui perpendaran warna yang dihasilkan. Metode tersebut dapat digunakan untuk menentukan jenis enzim kitinolitik yang dihasilkan. Radiometri juga merupakan metode untuk menentukan aktivitas kitinolitik, yaitu substrat diberi label radioaktif seperti ^{14}C atau ^3H . Kadar produk kemudian diuji dengan menentukan radioaktivitasnya (Spindler 1997: 230; Guthrie *dkk.* 2005: 491).

F. PENENTUAN KONSENTRASI PROTEIN

Enzim merupakan protein yang konsentrasinya dapat diukur dengan metode Bradford (1976). Metode Bradford digunakan untuk mendeteksi konsentrasi protein hingga 20 $\mu\text{g/ml}$. Prinsip dasar metode Bradford adalah pengikatan warna *Coomassie Brilliant Blue* oleh protein. Keuntungan metode Bradford adalah menggunakan pereaksi yang sederhana dan mudah disiapkan, serta pembentukan kompleks warna biru yang cepat dan bersifat

stabil. Kekurangan dari metode tersebut adalah sensitivitas yang kurang terhadap sampel yang mengandung sedikit protein (Wilson & Walker 2000: 321). Konsentrasi protein ditentukan dengan mengukur absorbansi pada panjang gelombang 595 nm. Nilai absorbansi sampel kemudian dibandingkan dengan kurva standar *Bovine Serum Albumin* (BSA) (Bradford 1976: 249--250).

Metode lain yang umum digunakan dalam pengukuran konsentrasi protein adalah metode Lowry. Metode tersebut dapat mendeteksi konsentrasi protein hingga 10 µg/ml. Prinsip dasar metode tersebut adalah reaksi Cu^{2+} terhadap ikatan peptida pada protein dan reduksi kompleks reagen folin oleh asam amino pada protein. Keuntungan dari metode Lowry adalah memiliki sensitivitas yang tinggi. Kekurangan dari metode Lowry adalah reagen yang digunakan tidak sederhana dan reagen mudah bereaksi dengan senyawa selain protein (Stenesh 1984: 69; Wilson & Walker 2000: 320).

Konsentrasi protein yang ditentukan dapat digunakan dalam penentuan aktivitas spesifik enzim. Aktivitas spesifik enzim adalah jumlah unit enzim per miligram protein. Aktivitas spesifik merupakan suatu ukuran kemurnian enzim. Nilai aktivitas spesifik enzim meningkat selama pemurnian suatu enzim dan nilai akan tetap jika enzim sudah dalam keadaan murni (Lehninger 1982: 249).