

Pemanfaatan Limbah Kulit Udang untuk Menghasilkan Enzim Kitinase dari *Streptomyces macrosporeus* InaCC A454

Utilization of Shrimp Shell Wastes to Produce Chitinase from Streptomyces macrosporeus InaCC A454

Yati Sudaryati Soeka¹ dan Evi Triana¹

¹Bidang Mikrobiologi, Puslit Biologi- LIPI, Cibinong

Jl. Raya Jakarta Bogor, Km 46 Cibinong 16911

Tel. 021-8765066, Fax. 8765062

Corresponding author: ceuceu.lipi@gmail.com

ARTICLE INFO

Article history

Received date : 31 August 2015

Revised date : 10 May 2016

Accepted date : 10 June 2016

Available online at:

<http://kimia.lipi.go.id/inajac/index.php>

Kata kunci:

Enzim kitinase, aktinomisetes,
Streptomyces macrosporeus

Keywords:

chitinase enzyme, actinomycetes,
Streptomyces macrosporeus

Abstrak

Kitinase (EC 3.2.1.14) adalah enzim yang dapat menghidrolisis ikatan panjang polimer asetil-D-glukosamina (kitin) menjadi ikatan polimer kitin yang lebih pendek. Kitin banyak ditemukan pada cangkang hewan invertebrata laut, terutama krustasea, serangga, moluska, dinding sel jamur. Limbah udang sangat penting sebagai sumber kitin. Penelitian ini bertujuan untuk menentukan karakteristik enzim kitinase yang dihasilkan oleh aktinomisetes asal P. Belitung dengan substrat kitin dari limbah udang, meliputi waktu inkubasi, pengaruh pH, suhu optimum serta stabilitas. Pengaruh beberapa ion-ion logam sebagai aktivator atau inhibitor terhadap aktivitas enzim kitinase diukur dengan spektrofotometer pada λ 584 nm. Strain aktinomisetes diidentifikasi secara molekuler berdasarkan 16S rDNA sekuen. Aktivitas kitinase secara kualitatif diperlihatkan dengan adanya zona bening di sekitar koloni pada media yang mengandung 1% koloidal kitin. Hasil menunjukkan bahwa aktivitas tertinggi pada waktu inkubasi lima hari, suhu 50°C dan pH 8 berturut-turut sebesar 0,0304 U/mL, 0,0312 U/mL dan 0,0421 U/mL. Pengaruh ion logam dalam bentuk kationdivalen dan monovalen masing-masing pada konsentrasi 1 mM diaktifkan oleh kationdivalen CaCl₂, MnCl₂, CuCl₂ dan kation monovalen KCl, NaCl. Identifikasi molekuler berdasarkan sekuen 16S rDNA menunjukkan bahwa isolat aktinomisetes ini adalah *Streptomyces macrosporeus*. Strain ini telah didaftarkan di kultur koleksi InaCC dengan nomor koleksi A 454.

Abstract

Chitinases (EC 3.2.1.14) hydrolyze chitin polymers into shorter oligomers and N-acetyl glucosamine monomers. Chitin is found in marine invertebrates shell, particularly crustaceans, insects, mollusks, and fungal cell walls. Shrimp waste is very important source of chitin. This study aimed to determine actinomycetes ability from P. Belitung to produce chitinase with substrate contained chitin from shrimp waste. The chitinase enzyme was characterized including incubation time, the optimum pH, temperature and stability. The effect of metal ions as activators or inhibitors of the enzyme were measured using spectrophotometer at λ 584 nm. Actinomycetes strain was identified using 16S rDNA sequences. Chitinase activity was qualitatively demonstrated by clear zone around the colonies in the medium containing 1% colloidal chitin. The result showed that the highest activity were incubation time of five days, temperature of 50°C and pH 8 by 0.0304 U/mL, 0.0312 U/mL and 0.0421 U/mL, respectively. At concentration of 1mM the enzyme were activated by divalent cations CaCl₂, MnCl₂, CuCl₂ and monovalent cations KCl, NaCl. Molecular identification based on 16S rDNA sequences showed that actinomycetes isolate was *Streptomyces macrosporeus*. The strain was registered in the InaCC collection (no. A 454).

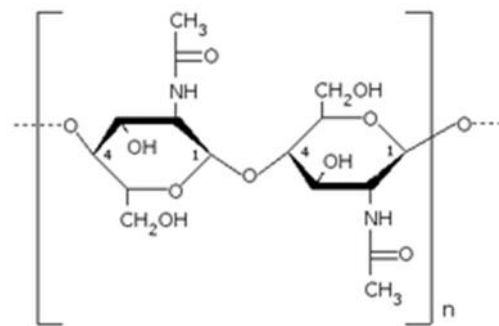
1. PENDAHULUAN

Indonesia tercatat sebagai negara penghasil udang terbesar ketiga dunia.^[1] Udang merupakan salah satu komoditas ekspor unggulan^[2] dan utama untuk produk-produk perikanan, yang mencapai 69%.^[3] Tahun 2014 terjadi peningkatan produksi terutama perikanan tangkap dan perikanan budidaya udang sebesar 1,62% (255 ribu ton).^[4] Udang yang diekspor pada umumnya dalam bentuk beku.^[5] Untuk ekspor, udang diproses menghasilkan udang kupas, sehingga menyisakan limbah berupa kulit, kaki, ekor dan kepala udang yang cukup tinggi, yaitu 60-70% berat udang. Limbah tersebut mudah sekali busuk sehingga dapat menimbulkan pencemaran lingkungan.^[6] Padahal limbah tersebut masih banyak mengandung protein, lemak, kalsium karbonat, kitin, pigmen, abu dan lainnya^[7] sehingga terbuang dengan percuma.

Secara tradisional, umumnya limbah kulit udang digunakan sebagai bahan campuran pembuatan kerupuk, petis, terasi dan untuk tambahan pakan ternak dikembalikan untuk budidaya udang itu sendiri dan harganya murah.^[8] Sedangkan salah satu pemanfaatan limbah kulit udang yang mempunyai prospek untuk dikembangkan dan memiliki nilai ekonomis cukup tinggi adalah mengolahnya menjadi kitin, kitosan dan glukosamina. Langkah ini sudah mulai dilakukan oleh beberapa negara maju, bahkan dikembangkan menjadi industri.^[9] Memanfaatkan limbah hasil laut ini membantu mengatasi masalah lingkungan dan mempromosikan nilai ekonomis produksi laut.^[10]

Kitin yang mempunyai rumus molekul $C_{18}H_{26}N_2O_{10}$ merupakan senyawa polisakarida yang tersusun dari ikatan linear β -1,4 N-asetil-D-glukosamina (Gambar 1). Kitin dapat diproduksi secara kimiawi maupun enzimatik. Untuk menghasilkan kitin bisa dengan cara kimia. Secara kimiawi dilakukan dengan cara hidrolisis menggunakan asam pekat misalnya asam klorida (HCl). Metode ini kurang ramah lingkungan, karena sangat banyak menggunakan bahan kimia. Selain itu, hasil yang diperoleh sangat sedikit (kurang dari 65%)

dan sulit dikontrol. Saat ini telah berkembang penelitian yang mensintesis kitin secara enzimatik seperti menggunakan enzim kitinase.^[11] Kitinase (EC 3.2.1.14) merupakan enzim glikosil hidrolase yang mengkatalisis degradasi kitin yaitu senyawa polimer dari N-asetilglukosamin yang membentuk ikatan linier β -1,4.^[12,13]



Gambar 1. Struktur kitin^[9]

Mikroorganisme penghasil kitinase belum banyak diketahui baik jumlah, diversitas maupun fungsi kitinase yang dihasilkan. Padahal kitin merupakan salah satu polimer yang melimpah di alam.^[14] Mikroba kitinolitik menarik untuk diisolasi karena kemampuannya menghidrolisis kitin menjadi turunan kitin misalnya kitosan, yang sangat bermanfaat dalam bidang kesehatan, industri makanan, bioteknologi sebagai biokontrol, pertanian sebagai agen pengendali hayati penyakit tanaman dan pengolahan limbah.^[12] Oleh karena itu dilakukan penelitian untuk mengetahui kemampuan isolat aktinomisetes *Streptomyces macrosporeus* InaCC A 454 asal Pulau Belitung dalam memproduksi enzim kitinase dengan substrat kitin dari limbah kulit udang.

2. METODE

2.1. Preparasi Koloidal Kitin^[15]

Sebanyak 20 g kitin yang berbentuk *flake* ditambah 400 mL HCl pekat, distirer selama 2 jam kemudian diinkubasi di dalam lemari pendingin selama 24 jam. Larutan tersebut disaring dengan *glass wool* dan filtrat yang dihasilkan ditambah akuades steril yang sudah

didinginkan dengan suhu 4°C selama satu malam, kemudian dinetralkan dengan 10 N NaOH sampai pH 7. Larutan disentrifugasi dengan kecepatan 7.780g selama 10 menit. Endapan yang diperoleh kemudian dibilas dengan akuades steril dan disentrifugasi lagi dengan kecepatan 7.780g selama 10 menit. Koloidal kitin tersebut kemudian disimpan di dalam lemari pendingin.

2.2. Isolat Sampel

Strain-strain aktinomisetes di dalam media agar miring mengandung koloidal kitin diinkubasi pada suhu 37°C di dalam inkubator selama lima hari.

2.3. Seleksi Aktinomisetes

Media seleksi dituangkan ke dalam cawan petri steril. Setelah dingin satu ujung ose aktinomisetes diinokulasikan dan diinkubasi di dalam inkubator dengan suhu 37°C selama lima hari.

2.4. Media Kultur^[16]

Isolat yang telah tumbuh di dalam media agar miring selanjutnya dimasukkan ke dalam media kultur Luria Bertani (LB) dengan pH 8. Media di kocok di atas pengocok dengan kecepatan 120 rpm pada suhu ruang selama tujuh hari. Setiap hari dilakukan pengukuran kerapatan optik (*Optical Density*) dibaca dengan spektrofotometer pada λ 600 nm.

2.5. Media Produksi Kitinase^[17]

Produksi kitinase dilakukan dengan menginokulasikan 0,5 ml suspensi mikroba dengan nilai OD tertinggi ke dalam 25 ml media produksi diinkubasi di dalam pengocok dengan kecepatan 120 rpm pada suhu ruang selama 7 hari. Setiap hari dilakukan pengambilan sampel sebanyak 2 ml dan dipisahkan supernatan dan endapannya, disentrifugasi dengan kecepatan 2.270 g selama 5 menit. Supernatan yang dihasilkan merupakan ekstrak kasar enzim kitinase. Supernatan ini

disimpan di dalam *refrigerator* untuk selanjutnya dianalisa aktivitas enzimnya untuk mengetahui waktu inkubasi optimum (hari), suhu optimum dan stabilitasnya, pH optimum dan stabilitasnya dan juga pengaruh penambahan ion logam.

2.6. Pengujian Aktivitas Kitinase^[17]

Aktivitas kitinase diuji dengan mengukur kadar gula amino sebagai produk hidrolisis kitin oleh kitinase. Senyawa *N*-asetilglukosamina (GlcNAc) digunakan sebagai standar untuk penghitungan aktivitas kitinase. Satu unit kitinase adalah banyaknya enzim yang dapat menghasilkan 1 μ mol *N*-asetilglukosamina dari substrat koloidal kitin per menit pada suhu 50°C, pH 8,0. Larutan kitinase yang menghasilkan GlcNAc terlalu tinggi diencerkan terlebih dahulu dan faktor pengenceran digunakan dalam perhitungan aktivitasnya.

Sebanyak 0,25 ml larutan enzim direaksikan dengan 0,25 ml substrat 1% koloidal kitin dengan bufer glisin-NaOH 0,05M pH 8 dan diinkubasi pada suhu 50°C selama 30 menit. Reaksi enzimatik dihentikan dengan memasukkan campuran ke dalam air mendidih selama 5 menit. Selanjutnya disentrifugasi dengan kecepatan 7.780g selama 5 menit dan supernatan dipisahkan dari endapan. Sebanyak 250 μ l supernatan ditambah 50 μ l potasium tetraborat, dididihkan selama 3 menit dan didinginkan dengan segera. Ditambahkan 1,25 ml reagen 4-(dimetil amino)benzaldehida (DMAB), diinkubasi pada suhu 37°C selama 20 menit dan OD dibaca dengan spektrofotometer pada λ 584 nm.

2.7. Karakterisasi Enzim

2.7.1. pH optimum dan stabilitas

pH optimum untuk aktivitas kitinase diukur pada bufer glisin-NaOH 0,05 M pH 7,5; 8; 8,5; dan 9 pada suhu optimum. Untuk stabilitas, enzim diinkubasi selama 30 menit pada pH bufer masing-masing 7,5; 8; 8,5; dan 9 pada suhu optimum.

2.7.2. Suhu optimum dan stabilitas

Suhu optimum untuk aktivitas kitinase ditentukan pada 30, 40, 50, 60 dan 70°C, dan untuk stabilitas, enzim diinkubasi selama 30 menit pada suhu masing-masing 30, 40, 50, 60 dan 70°C.

2.7.3. Pengaruh ion logam

Pengaruh ion logam Ca^{2+} , Mn^{2+} , K^+ , Na^+ , Cu^{2+} , Hg^{2+} , dalam bentuk garam darimasing-masing CaCl_2 , MnCl_2 , KCl , NaCl , CuCl_2 , HgCl_2 sebagai aktivator atau inhibitor terhadap aktivitas kitinase dengan cara mereaksikan larutan enzim dengan substrat 1% kitin dengan 1 mM ion logam tersebut di dalam kondisi suhu optimum dan pH optimum dibandingkan dengan enzim di dalam kondisi suhu optimum dan pH optimum tanpa penambahan logam.

2.8. Identifikasi strain aktinomisetes^[18]

Identifikasi strain menggunakan sekuensing 16S rDNA gen di amplifikasi menggunakan spesifik primer 20F (5'-GATTTTGATCCTGGCTCAG-3') dan 1500R (5'-GTTACCTTGTTACG ACTT-3'). Reaksi PCR dijalankan mengikuti protokol dan agarose elektroforesis. DNA sekuensing dilakukan di *First Base* (Malaysia). Hasil analisa sekuen dianalisis dengan BLAST server dari Biology workbench (SDSC).

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

Kitin yang digunakan untuk pembuatan koloidal kitin berasal dari limbah kulit udang (krustasea) yang telah melalui proses pencucian, penghilangan kandungan mineral (demineralisasi) dan penghilangan kandungan protein (deproteinasi).^[8] Untuk mendapatkan kitin dari kulit udang, ekstraksi lebih efisiensi melalui proses demineralisasi lebih dahulu diikuti deproteinasi.^[19] Kitin yang dipreparasi dengan hidrolisis parsial menggunakan HCl pekat akan menghasilkan koloidal kitin yang mampu menginduksi kitinase kompleks seperti N-asetilglukosamin.^[20] Kitin yang digunakan sebagai substrat, diproses terlebih dahulu agar lebih mudah didegradasi oleh mikroba menjadi enzim.^[21]

Kitin ($\text{C}_8\text{H}_{13}\text{NO}_5$)_n adalah polisakarida struktural utama dari jamur dan arthropoda seperti serangga dan krustasea. Ketersediaan kitin melimpah di alam, kedua setelah selulosa.^[22] Hingga saat ini limbah padat dari krustasea belum diolah dan dimanfaatkan secara maksimal sehingga menyebabkan pencemaran lingkungan berupa bau tidak sedap, menjadi sumber penyakit dan merusak estetika lingkungan serta memerlukan biaya tinggi untuk mengelolanya.^[14] Sementara itu, pemanfaatannya sebagai tambahan pakan ternak, nilai jualnya sangat rendah.^[8] Udang sebagai kelompok krustasea kaya akan kandungan kitin yang digunakan untuk menginduksi produksi enzim kitinase.^[23] Sebagai salah satu negara pengekspor udang, Indonesia berpeluang memproduksi kitin, karena limbah yang dihasilkan cukup besar.^[24] Industri enzim adalah salah satu sektor pasar yang paling cepat berkembang dan menghasilkan pendapatan terbesar di dunia. Hanya 20 enzim saat ini yang digunakan pada level industri. Hal ini menunjukkan kebutuhan untuk penelitian enzim lebih lanjut dan pengembangan dengan biaya murah beserta aplikasinya. Salah satu enzim yang berpotensi adalah kitinase. Aktinomisetes merupakan komponen penting dari populasi mikroba pada sebagian besar tanah ekstrim yang dapat menghasilkan enzim ekstraseluler dengan potensi besar secara komersial. Selain itu, pemanfaatan mikroba ini termasuk teknologi ramah lingkungan (*green technology*).^[25]

Aktivitas enzim kitinase isolat-isolat aktinomisetes pada penelitian ini ditapis secara kualitatif pada media agar kitin, karena mudah, cepat dan zona bening yang terbentuk mudah dilihat. Mikroorganisme penghasil kitinase belum banyak diketahui baik jumlah, diversitas maupun fungsi kitinase yang dihasilkan. Padahal kitin salah satu polimer yang melimpah di alam.^[14] Aktivitas kitinolitik dari aktinomisetes lebih tinggi dibandingkan dari jamur dan bakteri lain.^[26]

Aktivitas kitinase secara kualitatif ditentukan dengan adanya zona bening di sekitar koloni pada medium agar kitin.^[27] Mikroba yang mampu memproduksi kitinase secara kualitatif setelah waktu inkubasi tertentu

ditandai dengan adanya zona bening.^[27] Zona bening yang terbentuk di sekitar isolat menunjukkan bahwa isolat dapat mendegradasi kitin menghasilkan kitinase ekstraseluler yang memecah makromolekul kitin menjadi molekul kitin yang lebih kecil sebagai monomer N-asetil-D-glukosamin.^[10,27] Setiap mikroba mempunyai kecepatan berbeda dalam mendegradasi kitin, tergantung pada suhu, konsentrasi substrat, waktu inkubasi dan pH.^[28]

Strain-strain yang dipilih untuk diseleksi pada penelitian ini adalah strain yang mudah tumbuh dan tidak mudah terkontaminasi. Sebanyak empat belas strain dari tanah bekas pertambangan batubara Tanjung Pdam P. Belitung diuji aktivitas kitinolitik nyasecara kualitatif, yang ditentukan oleh indeks kitinolitiknya. Indeks kitinolitik diperoleh berdasarkan perbandingan diameter zona bening dengan diameter koloni.^[29] Indeks kitinolitik umumnya digunakan sebagai salah satu metode *screening*/penapisan. Metode ini banyak digunakan karena mampu menapis isolat dalam jumlah banyak dan waktu singkat.^[30]

Hasil seleksi secara kualitatif menunjukkan bahwa terdapat sebelas strain yang menghasilkan kitinase. Strain-strain tersebut memiliki indeks kitinolitik 1,3 – 2,77 (Tabel 1).

Kitinase yang dihasilkan dari tiap isolat mempunyai aktivitas yang berbeda-beda. Hal ini disebabkan perbedaan kemampuan adaptasi isolat dengan medium atau lingkungan hidupnya, antara lain suhu, pH, dan sumber nutrisi yang digunakan. Kemampuan tersebut ditentukan oleh gen yang dimilikinya.

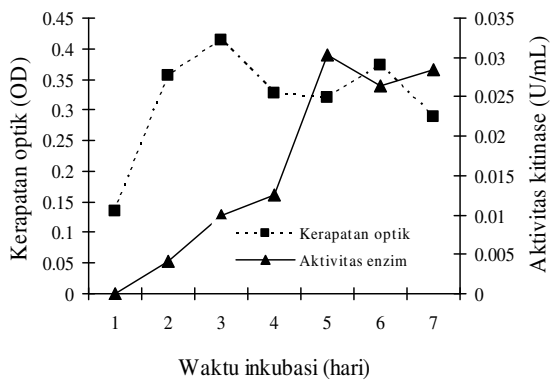
Sebagian besar mikroorganisme dari tanah dan air adalah pendegradasi kitin yang baik dan beberapa diantaranya dapat memanfaatkan kitin sebagai sumber karbon dan nitrogen. Kitinase banyak dimanfaatkan sebagai agen biokontrol terutama bagi tanaman yang terserang infeksi mikroorganisme. Selain itu, senyawa turunan kitin yang terbentuk sebagai hasil degradasi kitinase juga banyak dimanfaatkan pada bidang kesehatan, industri, pangan dan lain-lain.^[14]

Pada Tabel 1 terlihat bahwa strain yang memiliki indeks kitinolitik tertinggi yaitu 2,77 adalah strain BB 32. Hasil tersebut lebih baik dibandingkan dengan hasil penelitian sebelumnya,^[31] dimana indeks kitinolitik *Beauveria bassiana* isolat BB 200109 adalah sebesar 1,035. Oleh karena itu, strain ini dipilih untuk diuji lebih lanjut.

Tabel 1. Uji kualitatif kitinase aktinomisetes dari Tanjung Pdam P. Belitung

No.	Strain	Φ Koloni	Φ Zona bening	Indeks Kitinolitik
1.	BB 2.1	-	-	-
2.	BB 2.3	-	-	-
3.	BB 2.6	7	14	2
4.	BB 2.7	10	15	1,5
5.	BB 3.6	6	10	1,67
6.	BB 5.5	20	26	1,3
7.	BB 5.9	-	-	-
8.	BB 5.10	11	12	1,09
9.	BB 6.1	10	13	1,3
10.	BB 8.1	12	23	1,92
11.	BB 9.5	8	12	1,64
12.	BB 9.7	15	21	1,4
13.	BB 32	13	36	2,77
14.	BB 81	17	40	2,35

Pengaruh waktu inkubasi terhadap pertumbuhan strain BB 32 pada media kultur ditunjukkan oleh nilai kerapatan optik (OD) dan aktivitas enzim kitinase (U/mL). OD tertinggi didapat setelah masa inkubasi tiga hari yaitu sebesar 0,413 setelah pengenceran sepuluh kali. Sedangkan aktivitas enzim optimum dicapai pada hari ke lima sebesar 0,0304 U/mL (Gambar 2).



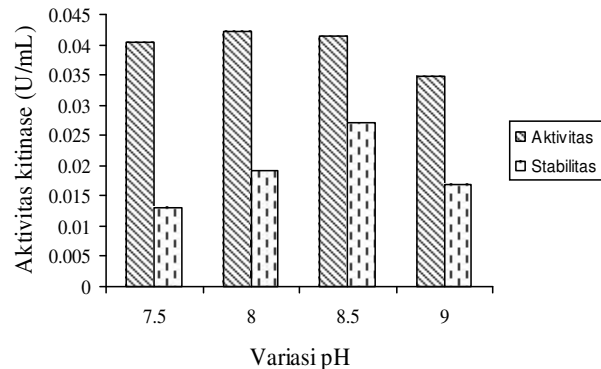
Gambar 2. Pengaruh waktu inkubasi terhadap kerapatan optik (OD) dan aktivitas enzim kitinase

Dekomposisi kulit udang berupa kitin oleh mikroorganisme kitinolitik *Streptomyces* sp. TH-11, tidak mudah dan membutuhkan waktu cukup panjang hingga 16 hari.^[32] Hal ini disebabkan molekul karbon dan nitrogen yang terperangkap besar sehingga kitin tidak larut di alam.

Hasil pengamatan kurva pertumbuhan dan aktivitas enzim kitinase yang terlihat pada Gambar 2, menunjukkan bahwa aktivitas enzim tidak berkaitan dengan pertumbuhan sel strain BB 32. Fase eksponensial pertumbuhan strain BB 32 terjadi pada hari ketiga, akan tetapi pada hari tersebut aktivitas enzim masih pada fase lag. Aktivitas enzim kitinase mencapai peningkatan tertinggi pada hari kelima, pada saat mikroba mengalami penurunan pertumbuhan. Setelah itu, pada hari keenam terjadi kenaikan kembali walaupun tidak sebesar pada hari ketiga. Demikian juga dengan aktivitas enzim, dimana setelah terjadi penurunan pada hari keenam terjadi kenaikan pada hari ketujuh.

Variasi pH yang diuji memiliki pengaruh terhadap produksi enzim. Aktivitas enzim optimum pada pH 8 adalah sebesar 0,0421 U/mL dan stabilitasnya sebesar 45,84% (Gambar 3). Enzim kitinase merupakan suatu protein yang memiliki aktivitas biokimiawi sebagai katalis suatu reaksi dan enzim ini sangat rentan terhadap kondisi lingkungan.^[33] Berbagai penelitian menunjukkan bahwa kitinase dari genus *Streptomyces* memiliki

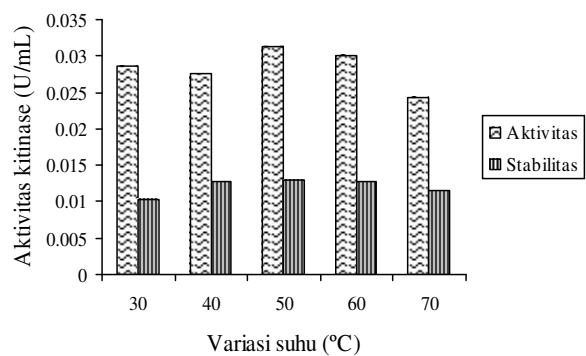
aktivitas optimal pada pH yang bervariasi dan memiliki stabilitas pada kisaran pH yang luas, yaitu dari asam sampai basa.^[25,28,29]



Gambar 3. Pengaruh pH substrat kitin

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 sampai netral.^[30]

Aktivitas kitinase optimum pada suhu 50°C pada pH 8 sebesar 0,0312 U/mL, dan stabilitasnya 0,0128 U/mL, terjadi penurunan sebesar 41,6% (Gambar 4).



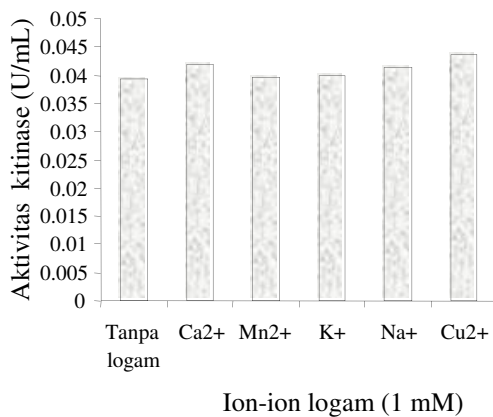
Gambar 4. Pengaruh suhu inkubasi terhadap aktivitas dan stabilitas kitinase

Pengaruh suhu pada reaksi enzimatik merupakan fenomena yang kompleks. 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 aktivitasnya.^[34]

Hasil penelitian sebelumnya menyatakan bahwa aktivitas kitinase *Streptomyces* sp. dari tanah mempunyai aktivitas optimum pada inkubasi hari keenam, pH 7, suhu 30 °C.^[35]

Streptomyces menghasilkan kitinase yang bermanfaat untuk aplikasi bioteknologi dan merupakan salah satu mikroorganisme terbaik dan banyak diminati untuk dipelajari aspek produksi serta biokimia kitinase melalui berbagai kondisi dan lingkungan.^[32,35]



Gambar 5. Pengaruh penambahan ion logam terhadap aktivitas kitinase

Ion logam dengan konsentrasi 1 mM dapat berperan sebagai aktivator atau inhibitor enzim. Kitinase dari strain BB 32 diaktifkan oleh kation divalen CaCl₂, MnCl₂, CuCl₂, dan kation monovalen KCl, NaCl. Peningkatan aktivitas masing-masing sebesar 6,65 % (Ca²⁺), 0,38% (Mn²⁺), 10,78% (Cu²⁺), 1,17% (K⁺) dan 4,90% (Na⁺). Ion logam merupakan unsur yang tidak dapat dibentuk sendiri oleh tubuh manusia, hewan maupun tumbuh-tumbuhan, sehingga disebut sebagai unsur esensial. Secara alami, di dalam konsentrasi tertentu, ion logam dibutuhkan oleh makhluk hidup sebagai ko faktor proses metabolisme di dalam tubuh untuk membantu kerja enzim, misalnya Zn, Cu, Fe, Co dan Mn. Beberapa ion logam, misalnya tembaga (Cu) dan seng (Zn) dapat bergabung

dengan metalotionein, yaitu suatu protein yang memiliki berat molekul rendah.

Pada konsentrasi tertentu, ion logam dapat bertindak sebagai aktivator yang dapat meningkatkan aktivitas enzim dan dapat pula bertindak sebagai penghambat (inhibitor) sehingga menurunkan aktivitas enzim. Pada umumnya memiliki kerentanan yang berbeda-beda. Ion logam diperlukan oleh enzim sebagai komponen pada sisi aktifnya.^[36] Penambahan ion logam dengan konsentrasi optimum dapat meningkatkan konsentrasi kompleks logam substrat, kemudian merubah potensial elektrokinetik protein enzim sehingga proses aktivasi menjadi optimal.^[37] Jika konsentrasi logam di atas atau di bawah konsentrasi optimum, maka kesetimbangan dan potensial elektrokinetik tidak mencapai atau melebihi batas (*range*) yang diinginkan dan menyebabkan proses aktivasi tidak optimal bahkan dapat menginhibisi enzim yang berakibat pada penurunan aktivitas.

Aktivitas kitinase *A. terreus* diaktifkan oleh ion logam Ca²⁺, Mn²⁺, Na²⁺, K⁺, Mg²⁺ dan Cu²⁺ dan dihambat oleh ion logam Cd²⁺, Zn²⁺, Pb²⁺ dan Hg²⁺.^[38] Aktivitas kitinase *Streptomyces* sp. M-20 optimal pada pH 5 dan pada suhu 30°C. Ion logam Mg²⁺, Ca²⁺, Cu²⁺, Co²⁺, Ag⁺, Hg⁺, Sn²⁺, Fe²⁺, Fe³⁺ bertindak sebagai inhibitor.^[39] Kitinase dari *Enterobacter* sp. diaktifkan oleh ion logam Ca²⁺, K²⁺ dan Mg²⁺, namun dihambat oleh ion logam Hg²⁺, Cu²⁺ dan Co²⁺.^[40] Pada *Bacillus* sp. BG-11 ion logam Ca²⁺, Ni²⁺ dan Triton x-100 dapat menstimulasi aktivitas enzim hingga 20% sedangkan ion logam Ag²⁺ dan Hg²⁺ menghambat aktivitas enzim hingga 50%.^[41] Sedangkan ion logam Co²⁺, Fe³⁺, Zn²⁺, Cd²⁺ dan Cu²⁺ memiliki efek meningkatkan aktivitas kitinase.^[42]

Pada analisis 16S ribosomal DNA strain aktinomisetes ini, diperoleh sekuen dengan panjang 928 bp. Kemudian sekuen tersebut dibandingkan dengan sekuen pada *database Gen Bank* NCBI menggunakan *BLAST algorithm*. Berdasarkan hasil analisis, strain aktinomisetes tersebut menunjukkan homologi/kesamaan sebesar 100% dengan *Streptomyces macrosporeus* (Tabel 2). *S.*

macrosporeus termasuk order *Helotiales*, kelas *Leotiomycetes*, phylum *Ascomycota*, kingdom *Fungi*.^[43]

Streptomyces merupakan kelompok aktinomisetes yang paling banyak memproduksi antibiotik dan selalu menjadi sumber bagi ribuan senyawa bioaktif. Satu organisme dapat memproduksi lebih dari satu jenis antibiotik bahkan masing-masing antibiotik yang dihasilkan tidak saling berhubungan.^[44] Contohnya *Streptomyces macrosporeus* yang dapat menghasilkan Carbomycin (Magnamycin) - B447.^[43]

Sebagian besar isolat *Streptomyces* yang diisolasi dari tanah menghasilkan enzim hidrolitik, misalnya enzim selulase^[45] dan kitinase.^[46]

Tabel 2. Homologi sekuen nukleotida strain BB 32 dari P. Belitung dengan Blast Database

Nama Strain	Hasil Blast	Fasta
BB 32 dari	<i>Streptomyces macrosporeus</i>	GTGGCGAACGGGTGAG TAACACGTGGGCAATCT GCCCTGCACTCTGGGAC AAGCCCTGGAAACGGG GTCTAATACCGGATACT GACCCGCTGGGCATCC AGGCGGTTCGAAAGCT CCGGCGGTGCAGGATG AGCCCGCGGCCTATCA GCTTGTTGGTGAGGTAA CGGCTCACCAAGGCGA CGACGGGTAGCCGGCC TGAGAGGGCGACCGGC CACACTGGGACTGAGA CACGGCCAGACTCCTA CGGGAGGCAGCAGTGG GGAATATTGCACAATG GGCGAAAGCCTGATGC AGCGACGCCGCGTGAG GGATGACGGCCTTCGG GTTGTAAACCTCTTTCA GCAGGGAAGAAGCGAA AGTGACGGTACCTGCA GAAGAAGCGCCGGTA ACTACGTGCCAGCAGC CGCGGTAATACGTAGG GCGCGAGCGTTGTCCG GAATTATTGGGCGTAAA GAGCTCGTAGGCGGCTT GTCGCGTCGGTTGTGAA AGCCCGGGGCTTAACC CCGGGTCTGCAGTCGAT ACGGGCAGGCTAGAGT TCGGTAGGGGAGATCG GAATTCCTGGTGTAGCG GTGAAATGCGCAGATA TCAGGAGGAACACCGG
P. Belitung	1760 bits, 928 bp, 100%, 0.0	

Genus aktinomisetes yang dapat memanfaatkan kitin sebagai sumber karbon dan nitrogen antara lain: *Streptomyces*, *Streptosporangium*, *Nocardia*, *Micromonospora* dan *Actinoplanes*. Diantara kelima genus aktinomisetes tersebut, kemampuan kitinolitik genus *Streptomyces* banyak mendapat perhatian peneliti. Jenis-jenis *Streptomyces* yang telah diketahui mampu menghasilkan kitinase, antara lain: *S. antibioticus*, *S. alboflavus*, *S. albus*, *S. rubrreticuli*, *S. griseus*, *S. scabies*, *S. orientalis*, *S. lividans*, *S. Olivaceo viridis* dan *S. Tendae*.^[46]

Aktivitas kitinase dari *Streptomyces* sp. PTK 19 dengan konsentrasi substrat kitin 0,4% pada waktu inkubasi enam hari, pH 6 dan suhu 30°C masing-masing sebesar 1,84 U/mL, 3,08 U/mL, 3,170 U/mL.^[47]

Aktivitas kitinase *Streptomyces* sp. A813 menghidrolisis kitin menghasilkan *N-acetyl-D-glucosamine* (GlcNAc).^[48] GlcNAc ini banyak digunakan untuk terapi pengobatan osteoarthritis (nyeri sendi) dan sebagai makanan suplemen.



Gambar 6. Zona bening di sekitar *S. macrosporeus*

Pembentukan zona bening pada media yang mengandung kitin menunjukkan bahwa *S. Macrosporeus* dapat menghasilkan enzim kitinase ekstraseluler yang berfungsi menghidrolisis kitin. Hasil hidrolisis ini dapat digunakan sebagai agen antitumor, anti *inflammatory*, pengontrol kadar gula dalam

darah, bahan dasar pembuatan benang operasi dan suplemen.^[49]

4. KESIMPULAN

Kitin dari limbah kulit udang dapat menghasilkan aktivitas kitinase optimum secara fermentasi dengan isolat BB 32 setelah diinkubasi selama lima hari sebesar 0,0304 U/mL, pada pH 8 sebesar 0,0421 U/mL dan stabilitasnya sebesar 45,84%, pada suhu 50°C sebesar 0,0312 U/mL dengan stabilitas terjadi penurunan sebesar 41,6%. Kation divalen CaCl₂, MnCl₂, CuCl₂, dan kation monovalen KCl, NaCl sebagai. Hasil identifikasi secara molekuler isolat BB 32 adalah *Streptomyces macrosporeus*.

DAFTAR PUSTAKA

- [1] Kementerian Kelautan dan Perikanan [KKP]. "Statistik Perikanan Tangkap, Perikanan Budaya dan Ekspor – Impor Setiap Provinsi seluruh Indonesia". Pusat Data Statistik dan Informasi, Sekretariat Jenderal Kementerian Kelautan dan Perikanan, Jakarta. Rep. 2012. <http://kkp.go.id/>
- [2] T. Kusumastanto. (2007). "Kebijakan dan Strategi Peningkatan Produktivitas dan Daya Saing Produk Perikanan Nasional". Presented at Agrinex Conference and Expo, Jakarta.
- [3] N.S. Indrasti, Suprihatin, dan W.K. Setiawan. "Kombinasi kitosan-ekstrak pala sebagai bahan antibakteri dan pengawet alami pada filet kakap merah (*Lutjanus sp.*)". Jurnal Teknologi Industri Pertanian, vol. 22 (2), pp. 122-130, 2012.
- [4] S. Pudjiastuti. "Laporan kinerja kementerian kelautan dan perikanan 2014". Kementerian Kelautan dan Perikanan (KKP). Jakarta. Rep. 2014.
- [5] Nadia, L.M. Hazairin, Supitjah, P. Ibrahim, Bustami. "Produksi dan karakterisasi nano kitosan dari cangkang udang windu dengan metode gelasi ionik". *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia* 17, No. 2 (Agustus 2014): 119-126.
- [6] Azhar, Minda, J. Efendi, E. Syofyeni, R.M. Lesi, dan S. Novalina. "Pengaruh konsentrasi NaOH dan KOH terhadap derajat deasetilasi kitin dari kulit udang". *Eksakta* 1, No. 11, pp. 1-8, Feb. 2010.
- [7] R. Marguerite. Physical properties of chitosan and derivatives in sol and gel states. In *Chitosan-Based Systems for Biopharmaceuticals: Delivery, Targeting and Polymer Therapeutics*. Chichester, UK: John Wiley & Sons, 23-44, 2012.
- [8] H.K. No, S.P. Meyers, and K.S. Lee. "Isolation and characterization of chitin from crawfish shell waste". *J. Agric. and Food Chem*, vol. 37 (3), 575-579, May/June. 1989.
- [9] S. Setyahadi. (2006). "Pengembangan proses produksi secara mikrobiologi". Presented at Seminar Nasional Chitin-Chitosan, THP FPIK-IPB, Bogor.
- [10] Haliza, Winda, dan M.T. Suhartono. "Karakteristik kitinase dari mikrobia". *Buletin Teknologi Pascapanenan Pertanian*, vol. 8 (1), pp. 1-14, 2012.
- [11] Herdyastuti, Nuniek, T.J. Raharjo, Mudasir and S. Matsjeh. "Chitinase and chitinolytic microorganism : Isolation, characterization and potential". *Indon. J. Chem*, vol. 9 (1), pp. 37-47, Mar. 2009.
- [12] H. Sashiwa, S. Fujishima, N. Yamano, N. Kawasaki, A. Nakayama, E. Muraki, K. Hiraga, K. Oda, and S. Aiba. "Production of N-acetyl-D-glucosamine from α -chitin by crude enzymes from *Aeromonas hydrophyla* H-2330". *Carbohydrate Res.* vol. 337 (8), pp. 761-763, Apr. 2002.
- [13] J. Madhuprakash, A. Singh, S. Kumar, M. Sinha, P. Kaur, S. Sharma, A.R. Podile, and T.P. Singh. "Structure of chitinase D from *Serratia proteamaculans* reveals the structural basis of its dual action of hydrolysis and transglycosylation". *Int. J. Biochem. Mol. Biol*, vol. 4 (4), 166-178, Dec. 2013.

- [14] R.S. Patil, V.V. Ghormade, and M.V. Despande. “Chitinolytic enzymes: an exploration”. *J. Enzyme and Microb. Technol*, vol. 26 (7), pp. 473-483, Apr. 2000.
- [15] W.K. Roberts, C.P. Selitrennikoff. “Plant and bacterial chitinases differ in antifungal activity”. *J. General Microbiol*, vol. 134, pp. 169-176, 1998.
- [16] M.E. Mahata, A. Dharma, I. Ryanto, and Y. Rizal. “Characterization of extracellular chitinase from bacterial isolate 99 and *Enterobacter* sp. G-1 from Matsue City, Japan”. *J. Microbiol. Indon*, vol. 2 (1), pp. 34-38, Apr. 2008.
- [17] N. Widhyastuti. “Produksi kitinase ekstraseluler *Aspergillus rugulosus* 501 secara optimal pada media cair”. *Jurnal Berita Biologi*, vol. 8 (6), 547-553, 2007.
- [18] A.J. Nugroho. “Identifikasi 12 isolat aktinomisetes ‘Kultur Koleksi LIPI MC’ secara molekular”. Pusat Penelitian Biologi- LIPI. Cibinong, Tech. Rep, 2009.
- [19] B. Wahyuntari, Junianto, and S. Setyahadi. “Process design of microbiological chitin extraction”. *J. Microbiol. Indon*, vol, 5 (1), pp. 39-45, 2011.
- [20] L. Cahyani. “Pemanfaatan tepung cangkang udang sebagai media produksi kitinase oleh bakteri kitinolitik isolat 26”. Skripsi. Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember, 2013.
- [21] M.A-A. Shadia, M.E. Moharam, H.A. Hamed, and F.E. Mouafi. “Extracellular metabolites produced by a novel strain, *Bacillus alvei* NRC-14: 1. some properties of the chitinolytic system”. *New York Sci. J*, vol. 5 (1), pp. 53- 62, 2012.
- [22] C.R. Shen, Y.S. Chen, C.J. Yang, J.K. Chen, C.L. Liu. “Colloid chitin azure is a dispersible, low-cost substrate for chitinase measurements in a sensitive, fast, reproducible assay”. *J. Biomol. Screen*, vol. 15 (2), pp. 213-217, Feb. 2010.
- [23] Y. Suryadi, T.P. Priyatno, D.N. Susilowati, I.M. Samudra, N. Yudhistira dan E.D. Purwakusumah. “Isolasi dan karakterisasi kitinase asal *Bacillus cereus* 11 UJ”. *Jurnal Biologi Indonesia*, vol. 9 (1), pp. 51-62, 2013.
- [24] E. Purwanti, Sukarsono, and S. Zaenab. “Teknologi pemanfaatan limbah pengolahan udang dengan metode deasetilasi”. *Jurnal Dedikasi*, vol. 1 (1), 65-72, Mei 2003.
- [25] D. Prakash, N. Nawani, M. Prakash, M. Bodas, A. Mandal, M. Khetmalas, and B. Kapadnis. “Actinomycetes: A repertory of green catalysts with a potential revenue resource”. *BioMed Res. Int* 2013, Article ID 264020, 8 pages, 2013.
- [26] Rachmawaty dan Madihah. “Potensi perlakuan awal limbah kulit udang untuk produksi enzim kitinase oleh *Trichoderma virens* pada fermentasi substrat padat”. *Jurnal Bionature*, vol. 14 (1), pp. 33-37, Apr. 2013.
- [27] R. Fadli. Limbah Kitin Yang Bernilai Tambah. <http://www.djpdspkp.kkp.go.id/artikel-921-limbah-kitin-yang-bernilai-tambah.html>, Mar. 2015. Diakses 3 April 2015.
- [28] M.S. Brzezinska, M. Walczak, E. Lalke-Porczyk, and W. Donderski. “Utilization of shrimp-shell waste as a substrate for the activity of chitinases produced by microorganisms”. *Polish J. Environ. Studies*, vol. 19 (1), pp. 177-182, 2010.
- [29] L. Apriani. “Seleksi bakteri penghasil enzim kitinolitik serta pengujian beberapa variasi suhu dan pH untuk produksi enzim”. Skripsi. Departemen Biologi FMIPA Universitas Indonesia, Depok, 2008.
- [30] E.F. Sharaf, A.E-A.Q. El-Sarrany and M. El-Deeb. “Biorecycling of shrimp shell by *Trichoderma viride* for production of antifungal chitinase”. *African J. Microbiol. Res.*, vol. 6 (21), pp. 4538-4545, Jun. 2012.

- [31] Y. Suryadi, T.P. Priyatno, I.M. Samudra, D.N. Susilowati, N. Lawati dan E. Kustaman. “Pemurnian parsial dan karakterisasi kitinase asal jamur entomopatogen *Beauveria bassiana* isolat BB200109. Jurnal Agro Biogen, vol. 9 (2), pp. 77-84, 2013.
- [32] K.C. Hoang, T.H. Lai, C.S. Lin, Y.T. Chen, and C.Y. Liao. “The chitinolytic activities of *Streptomyces* sp. TH-11”. Int. J. Mol. Sci., vol. 12 (1), pp. 56–65, 2011.
- [33] R. Hamid, M.A. Khan, M. Ahmad, M.M. Ahmad, M.Z. Abidin, J. Musarrat, and S. Javed. “Chitinases: an update”. J. Pharmacy BioAllied Sci., vol. 5 (1), pp. 21–29, Jan.-Mar. 2013
- [34] N.R. Mubarik, I. Mahagiani, A. Anindyaputri, S. Santoso and I. Rusmana. “Chitinolytic bacteria isolated from chili rhizosphere: chitinase characterization and its application as biocontrol for whitefly (*Bemisia tabaci* Genn.)”. Am. J. Agric. and Biol. Sci., vol. 5 (4), pp. 30-35, 2010.
- [35] B. Sowmya, D. Gomathi, M. Kalaiselvi, G. Ravikumar, C. Arulraj and C. Uma. “Production and purification of chitinase by *Streptomyces* sp. from soil”. J. Advanced Scientific Res., vol. 3 (3), pp. 25-29, 2012.
- [36] H. Tsujibo, T. Kubota, M. Yamamoto, K. Miyamoto and Y. Inamori. “Characterization of chitinase genes from an alkaliphilic actinomycete, *Nocardiosis prasina* OPC-131”. Appl. and Environ. Microbiol., vol. 69 (2), pp. 894–900, Feb. 2003.
- [37] S. Setyahadi, T.K. Bunasor dan D. Hendarsyah. “Karakterisasi kitin deasetilase termotabil isolat bakteri asal Pancuran Tujuh, Baturaden, Jawa Tengah”. Jurnal Teknologi dan Industri Pangan, vol. 17 (1), pp. 44-49, 2006.
- [38] A.M. Farag, H.M. Abd-Elnabey, H.A.H. Ibrahim, and M. El-Shenawy. “Purification, characterization and antimicrobial activity of chitinase from marine-derived *Aspergillus terreus*”. The Egyptian J. Aquatic Res., May 2016.
- [39] K.J. Kim, Y.J. Yang, and J.G. Kim. “Purification and characterization of chitinase from *Streptomyces* sp. M-20”. J. Biochem and Mol. Biol., vol. 36 (2), pp. 185-189, Mar. 2003.
- [40] N. Dahiya, R. Tewari, R.P. Tiwari, and G.S. Hoondal. “Chitinase from *Enterobacter* sp. NRG4: its purification, characterization and reaction pattern”. J. Biotechnol, vol. 8 (2), pp. 134–145, Aug. 2005.
- [41] B. Bhushan and G.S. Hoondal. “Isolation, purification and properties of a thermostable chitinase from an alkalophilic *Bacillus* sp. BG-11”. Biotechnol Letters, vol. 20 (2), pp. 157–159, Feb. 1998.
- [42] J. Wang, J. Zhang, F. Song, T. Gui and J. Xiang. “Purification and characterization of chitinases from ridgetail white prawn *Exopalaemon carinicauda*”. Molecules, vol. 20, pp. 1955–1967, 2105.
- [43] L. Ettlinger, R. Corbaz and R. Hutter. “Zur Systematik der Actinomyceten 4. Eine Arteneinteilung der Gattung *Streptomyces* Waksman and Henrici”. Arch Mikrobiol, vol. 31 (2), pp. 326-358, Sept. 1958.
- [44] A. Nurkanto, F. Listyaningsih, H. Julistiono and A. Agusta. “Eksplorasi keanekaragaman aktinomisetes Tanah Ternate sebagai sumber antibiotik”. J. Biol. Indon., vol. 6 (3), pp. 325-329, Jun. 2010.
- [45] S. Ratnakomala, Fahrurrozi, G. Kartina, and P. Lisdiyanti. “Pemanfaatan aktinomisetes Indonesia untuk produksi inokulum bakteri pendegradasi lignoselulosa. Pusat Penelitian Bioteknologi, LIPI. Cibinong. Rep. Des. 2009.
- [46] Yurnaliza. 2002. Senyawa khitin dan kajian aktivitas enzim mikrobial pendegradasinya.

repository.usu.ac.id/bitstream/123456789/826/1/Biologi. Diakses 24 Nov. 2008.

- [47] V. Thiagarajan, R. Revathi, K. Aparanjini, P. Sivamani, M. Girilal, C.S. Priya, and P.T. Kalaichelvan. “Extracellular chitinase production by *Streptomyces* sp. PTK 19 in submerged fermentation and its lytic activity on *Fusarium oxysporum* PTK 2 cell wall”. *International Journal of Current Research*, vol. 1, pp. 30-44, Oct. 2011.
- [48] I. Saskiawan dan R. Handayani. “Hidrolisis kitin melalui fermentasi semi padat untuk produksi N-asetilglukosamina”. *Jurnal Berita Biologi*, vol. 10 (6), pp. 721-728, Des. 2011.
- [49] R.S. Pratiwi, T.E. Susanto, Y.A.K. Wardani, dan A. Sutrisno. “Enzim kitinase dan aplikasi di bidang industri: kajian pustaka”. *Jurnal Pangan dan Agroindustri*, vol. 3 (2), pp. 878-887, Jul. 2015.