

Skripsi

**ISOLASI DAN KARAKTERISASI BAKTERI TERMOFILIK PENGHASIL
ENZIM KITOSANASE DARI SUMBER AIR PANAS SULILI
KABUPATEN PINRANG SULAWESI SELATAN**

MOHAMMAD ARFADILLAH RUSTAM

H031 17 1305



**DEPARTEMEN KIMIA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2022**

**ISOLASI DAN KARAKTERISASI BAKTERI TERMOFILIK PENGHASIL
ENZIM KITOSANASE DARI SUMBER AIR PANAS SULILI
KABUPATEN PINRANG SULAWESI SELATAN**

*Skripsi ini diajukan sebagai salah satu syarat
untuk memperoleh gelar Sarjana Sains*

Oleh:

MOHAMMAD ARFADILLAH RUSTAM

H031 17 1305



MAKASSAR

2022

LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI

**ISOLASI DAN KARAKTERISASI BAKTERI TERMOFILIK PENGHASIL ENZIM
KITOSANASE DARI SUMBER AIR PANAS SULILI KABUPATEN PINRANG
SULAWESI SELATAN**

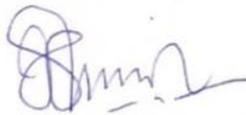
Disusun dan diajukan oleh

**MOHAMMAD ARFADILLAH RUSTAM
H031 17 1305**

Telah dipertahankan di hadapan Panitia Ujian Sidang yang dibentuk dalam rangka penyelesaian studi Program Sarjana Program Studi Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Hasanuddin pada 11 Januari 2022 dan dinyatakan telah memenuhi syarat kelulusan

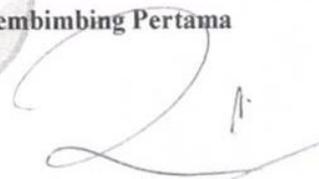
Menyetujui,

Pembimbing Utama



Dr. Hasnah Natsir, M.Si
NIP. 19620320 198711 2 001

Pembimbing Pertama



Abdur Rahman Arif, S.Si, M.Si
NIP. 19861008 201504 1 002

Ketua Program Studi,



Dr. Abdul Karim, M.Si
NIP. 19620710198803 1 002

PERNYATAAN KEASLIAN

Yang bertanda tangan dibawah ini :

Nama : Mohammad Arfadillah Rustam

NIM : H031171305

Program Studi : Kimia

Jenjang : S1

Menyatakan dengan ini bahwa Skripsi saya yang berjudul **Isolasi dan Karakterisasi Bakteri Termofilik Penghasil Enzim Kitosanase dari Sumber Air Panas Sulili Kabupaten Pinrang Sulawesi Selatan** adalah karya saya sendiri dan tidak melanggar hak cipta orang lain. Apabila dikemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan bahwa sebagian atau keseluruhan Skripsi ini hasil karya orang lain, maka saya bersedia menerima sanksi.

Makassar, 13 Januari 2022
Yang membuat pernyataan



Mohammad Arfadillah Rustam

PRAKATA

Bismillahirrohmanirrohim, segala puji dan syukur penulis panjatkan kehadiran Allah SWT karena berkat rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi dengan judul **“Isolasi dan Karakterisasi Bakteri Termofilik Penghasil Enzim Kitosanase dari Sumber Air Panas Sulili Kabupaten Pinrang”**.

Shalawat serta salam semoga tetap tercurah kepada junjungan Nabi Muhammad SAW, manusia terbaik sepanjang masa, yang telah menjadi guru terbaik dan menjadi suri tauladan bagi umat Islam di seluruh dunia.

Kepada kedua orang tua tercinta, ayahanda **Rustam Maddua** dan ibunda tercinta di surga **almh. Jumaeda** terima kasih untuk setiap semangat, motivasi, bantuan, kasih sayang dan doa yang senantiasa tak henti-hentinya diberikan kepada penulis, semoga Allah senantiasa memberikan rahmat berupa kasih sayang, keteguhan hati pada agama Allah. Terima kasih juga kepada saudara-saudara kandung penulis **Putri Hardianti Rustam, Aldi Rivaldi Rustam** dan **Fahrizaldi Rustam** yang selalu memberikan motivasi yang dijadikan sebagai penyemangat penulis dalam mengerjakan tugas akhir ini.

Ucapan terima kasih dan penghargaan penulis sampaikan kepada seluruh pihak yang membantu dalam proses penyelesaian skripsi ini, terutama kepada ibunda **Dr. Hj. Hasnah Natsir, M.Si** selaku pembimbing utama dan ayahanda **Abdur Rahman Arif, S.Si, M.Si** selaku pembimbing pertama yang menjadi orang tua penulis di kampus dan senantiasa meluangkan waktu, tenaga dan pikirannya dalam membimbing dan memberikan masukan yang baik terutama

dalam penyelesaian skripsi ini. Tak lupa pula penulis menghaturkan permohonan maaf yang sebesar-besarnya atas semua kesalahan yang tidak disengaja yang pernah dilakukan penulis hingga penulisan skripsi ini diselesaikan.

Penulis juga tak lupa mengucapkan terima kasih dan penghargaan yang sebesar-besarnya kepada:

1. Ayahanda **Dr. Eng Amiruddin**, selaku Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Hasanuddin beserta semua staf pegawai.
2. Ayahanda **Dr. Abd. Karim, M.Si**, selaku ketua Departemen Kimia, Ibu **Dr. St. Fauziah, M.Si**, selaku Sekertaris Departemen Kimia dan semua dosen-dosen kimia serta staf pegawai yang telah membantu proses perkuliahan selama ini.
3. Ayahanda **Dr. Firdaus Zenta, M.Si** selaku Ketua Tim Penguji Ujian Sarjana Kimia, dan Ibu **Dr. St. Fauziah, M.Si**, selaku Sekertaris Penguji Ujian Sarjana Kimia.
4. Seluruh staf pegawai lingkup fakultas dan analis Laboratorium di Departemen Kimia, terkhusus untuk Ibu **Mahdalia, S.Si, M.Si** dan kak **Andi Akbar, S.Si** selaku analis laboratorium Biokimia atas bantuan semangat serta arahnya selama penelitian berlangsung. Serta ucapan terima kasih kepada analis Laboratorium Bioteknologi Fakultas Peternakan Unhas **Kak Tri** dan analis Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Unhas **Pak Markus**.
5. Semua rekan kerja peneliti di lab biokimia terkhusus teman panel terkocak **Uri, Yura, Cumits** dan **Aidul Cadosmat** yang telah berjuang bersama, mengeluh bersama, dan menyelesaikan tugas akhir ini bersama-sama, juga

untuk teman peneliti lain **Huda, Yuyun, Mona, Moel, Wiwi, Farda, Fadli, Salim** dan **Ahmad**.

6. Semua teman-teman seperjuangan di Departemen Kimia, terkhusus **Kimia 2017** dan **Alifatik 2017**, terima kasih atas arahan dan masukan-masukannya selama kuliah.
7. My support system **Ikki, Uya**, dan **Tultan** terima kasih telah mensupport dan banyak membagi tawa kepada penulis selama di Makassar.
8. Sahabatku anggota **BRASA**; my brother and sister, serta teman perjuangan magang di Laboratorium Tanah BPTP Maros.
9. Sepupuku yang tercinta **Iswar, Hasra, Ratri, Syifa** dan **Dian**. Terima kasih telah banyak menghibur penulis dalam penyusunan tugas akhir ini.

Penulis menyadari masih banyak kekurangan dan kesalahan dalam penyusunan skripsi ini, oleh karena itu saran dan kritik yang bersifat membangun sangat penulis harapkan. Semoga tulisan ini dapat memberikan manfaat bagi penulis dan semua orang yang membaca tulisan ini. Aamiin.

Penulis,

2021

ABSTRAK

Enzim kitosanase merupakan enzim yang mengkatalisis reaksi endohidrolisis ikatan β -1,4-glukosida pada kitosan menjadi kitooligosakarida atau oligomer kitosan. Kitosanase termotabil dari bakteri termofilik memberikan hasil yang baik dalam memproduksi kitooligosakarida, namun masih sangat mahal untuk penggunaan dalam industri skala besar. Penelitian ini bertujuan untuk memproduksi dan mengkarakterisasi ekstrak kasar enzim kitosanase dari bakteri termofilik yang diisolasi dari sumber air panas Sulili Kabupaten Pinrang. Enzim kitosanase diproduksi pada media fermentasi yang mengandung *soluble* kitosan dan dilakukan karakterisasi terhadap suhu, pH, konsentrasi substrat, stabilitas pH dan suhu serta pengaruh ion logam. Hasil penelitian menunjukkan bahwa, kitosanase dari bakteri termofilik yang teridentifikasi sebagai *Bacillus* sp. isolat A.3-1 diproduksi secara maksimum pada waktu fermentasi 36 jam dengan substrat *soluble* kitosan 1 %. Selanjutnya hasil karakterisasi kitosanase menunjukkan bahwa, kitosanase ini bekerja optimum pada suhu 40 °C, pH 6, konsentrasi substrat (*soluble* kitosan) 1 %, diaktifkan oleh ion logam Co^{2+} , Ca^{2+} , Na^+ dan Mg^{2+} (pada konsentrasi <50 mM) serta dihambat oleh ion logam Zn^{2+} , K^+ dan Ba^{2+} . Selain itu, kitosanase ini stabil pada suhu 40 °C dan pH 6 selama 150 menit. Kitosanase termotabil dari bakteri termofilik *Bacillus* sp. isolat A.3-1 adalah enzim yang dalam tahapan selanjutnya dapat digunakan untuk produksi kitooligosakarida.

Kata kunci: Bakteri termofilik, kitosanase, kitosan, dan kitooligosakarida

ABSTRACT

Chitosanase is an enzyme that catalyzes the endohydrolysis reaction of β -1,4-glucoside bonds in chitosan to become chitooligosaccharides or chitosan oligomers. Thermostable chitosanase from thermophilic bacteria gives good results in producing chitooligosaccharides, but is still very expensive for large-scale industrial use. This study aims to produce and characterize crude extract of chitosanase enzyme from thermophilic bacteria isolated from Sulili hot springs, Pinrang Regency. Chitosanase enzymes were produced in fermentation media containing soluble chitosan and were characterized by temperature, pH, substrate concentration, pH and temperature stability and the effect of metal ions. The results showed that, chitosanase from thermophilic bacteria identified as *Bacillus* sp. isolate A.3-1 produced maximum at 36 hours fermentation time with 1% chitosan soluble substrate. Furthermore, the results of chitosanase characterization showed that this chitosanase worked optimally at a temperature of 40 °C, pH 6, substrate concentration (soluble chitosan) 1%, activated by metal ions Co^{2+} , Ca^{2+} , Na^+ and Mg^{2+} (at concentrations <50 mM) and inhibited by metal ions Zn^{2+} , K^+ and Ba^{2+} metals. In addition, this chitosanase is stable at a temperature of 40 °C and pH 6 for 150 minutes. Thermostable chitosanase from thermophilic bacteria *Bacillus* sp. isolate A.3-1 is an enzyme which in the next step can be used for the production of chitooligosaccharides.

Keywords: Thermophilic bacteria, chitosanase, chitosan, and chitooligosaccharides

DAFTAR ISI

	halaman
PRAKATA.....	v
ABSTRAK.....	viii
ABSTRACT.....	ix
DAFTAR ISI.....	ix
DAFTAR TABEL.....	xii
DAFTAR GAMBAR.....	xiv
DAFTAR LAMPIRAN.....	xv
DAFTAR SIMBOL DAN SINGKATAN.....	xvi
BAB I PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	4
1.3 Maksud dan Tujuan Penelitian.....	4
1.3.1 Maksud Penelitian.....	4
1.3.2 Tujuan Penelitian.....	4
1.4 Manfaat Penelitian.....	5
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	6
2.1 Bakteri Termofilik.....	6
2.2 Kitosan dan Kitoooligosakarida.....	8
2.3 Tinjauan Umum Tentang Enzim.....	10
2.4 Enzim Kitosanase.....	11
2.4.1 Mikroorganisme Penghasil Enzim Kitosanase.....	14
2.4.2 Isolasi Enzim Kitosanase dari Bakteri Termofilik.....	15

2.5 Aplikasi Enzim Kitosanase dan Produknya.....	16
BAB III METODE PENELITIAN.....	19
3.1 Bahan Penelitian	19
3.2 Alat Penelitian	19
3.3 Waktu dan Tempat Penelitian.....	19
3.4 Prosedur Penelitian	20
3.4.1 Pengambilan Sampel	20
3.4.2 Pembuatan Substrat	20
3.4.2.1 Pembuatan Substrat Koloidal Kitosan	20
3.4.2.2 Pembuatan Substrat <i>Soluble</i> Kitosan	20
3.4.3 Pembuatan Media	21
3.4.3.1 Pembuatan Media Luria Broth.....	21
3.4.3.2 Pembuatan Media Luria Agar.....	21
3.4.3.3 Pembuatan Media Selektif.....	21
3.4.3.4 Pembuatan dan Penyiapan Inokulum.....	21
3.4.3.5 Pembuatan Media Fermentasi.....	22
3.4.4 Isolasi Bakteri Termofilik.....	22
3.4.5 Karakteristik Sifat Morfologi dan Biokimia Isolat.....	23
3.4.5.1 Karakterisasi Bakteri Penghasil Kitosanase secara Mikroskopis dengan Pewarnaan Gram.....	23
3.4.5.2 Uji Biokimia Sederhana.....	24
3.4.6 Produksi Ekstrak Enzim Kitosanase	26
3.4.7 Pengukuran Aktivitas Enzim Kitosanase	26
3.4.8 Penentuan Kadar Protein dengan Metode Lowry	27
3.4.9 Karakterisasi Enzim Kitosanase	28

3.4.9.1 Penentuan pH Optimum	28
3.4.9.2 Penentuan Suhu Optimum	28
3.4.9.3 Penentuan Substrat Optimum	28
3.4.9.4 Pengaruh Ion Logam.....	29
3.4.9.5 Stabilitas pH.....	29
3.4.9.6 Stabilitas Suhu	30
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	31
4.1 Isolasi Bakteri Termofilik Penghasil Enzim Kitosanase	31
4.2 Identifikasi Bakteri Termofilik Penghasil Enzim Kitosanase	32
4.3 Penentuan Waktu Produksi Optimum Enzim Kitosanase	36
4.4 Karakterisasi Enzim Kitosanase	39
4.4.1 Karakterisasi pH	39
4.4.2 Karakterisasi Suhu	41
4.4.3 Karakterisasi Konsentrasi Substrat	42
4.4.4 Pengaruh Ion Logam	43
4.4.5 Stabilitas pH.....	45
4.4.6 Stabilitas Suhu	47
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN.....	49
5.1 Kesimpulan	49
5.2 Saran	49
DAFTAR PUSTAKA	50
LAMPIRAN.....	57

DAFTAR TABEL

Tabel	halaman
1. Klasifikasi bakteri berdasarkan suhu pertumbuhan	6
2. Mikroba penghasil enzim kitosanase	14
3. Beberapa enzim golongan kitinolitik yang diproduksi pada kondisi optimum berbeda	16
4. Aplikasi produk enzim kitosanase berupa kitooligosakarida.....	17
5. Indeks kitinolitik	32
6. Hasil uji biokimia sederhana.....	35
7. Data kadar protein dan aktivitas spesifik kitosanase dari <i>Bacillus</i> sp. isolat A.3-1 pada berbagai waktu produksi.....	38

DAFTAR GAMBAR

Gambar	halaman
1. Kurva pertumbuhan bakteri	8
2. Struktur kitosan	9
3. Struktur kitooligosakarida.....	10
4. Daerah pemotongan enzim kitosanase.....	12
5. Dua mekanisme utama hidrolisis ikatan glikosidik enzimatik oleh kitosanase	13
6. Seleksi bakteri termofilik penghasil enzim kitosanase	32
7. Hasil uji gram bakteri.....	33
8. Pengaruh waktu produksi terhadap pertumbuhan bakteri <i>Bacillus</i> sp. isolat A.3-1 dan <i>Bacillus</i> sp. isolat S.3-1	36
9. Pengaruh pertumbuhan bakteri terhadap aktivitas kitosanase dari <i>Bacillus</i> sp. isolat A.3-1	37
10. Pengaruh waktu produksi terhadap aktivitas kitosanase dari <i>Bacillus</i> sp. isolat A.3-1 dan <i>Bacillus</i> sp. isolat S.3-1	39
11. Pengaruh pH terhadap aktivitas kitosanase dari <i>Bacillus</i> sp. isolat A.3-1 pada kondisi: suhu 40 °C dan konsentrasi substrat 1%	40
12. Pengaruh suhu terhadap aktivitas kitosanase <i>Bacillus</i> sp. isolat A.3-1 pada kondisi: pH 6 dan konsentrasi substrat 1%	41
13. Pengaruh konsentrasi substrat terhadap aktivitas kitosanase <i>Bacillus</i> sp. isolat A.3-1 pada kondisi: suhu 40 °C dan pH 6	43
14. Pengaruh ion logam terhadap aktivitas relatif kitosanase <i>Bacillus</i> sp. isolat A.3-1 pada kondisi: suhu 40 °C, pH 6 dan konsentrasi substrat 1%	44
15. Stabilitas pH pada kondisi: suhu 40 °C dan konsentrasi substrat 1% ..	46
16. Stabilitas suhu pada kondisi: pH 6 dan konsentrasi substrat 1%	47

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	halaman
1. Diagram alir	57
2. Bagan kerja	58
3. Pembuatan reagen	69
4. Pembuatan standar glukosamin.....	70
5. Tabel dan perhitungan.....	71
6. Dokumentasi	79
7. Peta dan titik pengambilan sampel.....	83

DAFTAR SIMBOL DAN SINGKATAN

Simbol/Singkatan	Arti
EC	<i>Enzyme Code</i>
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i>
Da	Dalton
kDa	Kilodalton
OD	<i>Optical Density</i>
MR	<i>Methyl Red</i>
VP	Voges Proskauer

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Indonesia merupakan salah satu negara di dunia yang termasuk bagian dari lintasan *the pasific ring of fire* atau cincin api pasifik. Keadaan ini sejalan dengan banyaknya gunung berapi aktif dan penyebaran daerah geotermal. Sebanyak 70 gunung berapi tersebar dari Pulau Sumatera, Jawa, Bali, Sulawesi, Kalimantan, Maluku, dan Papua, menghasilkan sekitar 256 mata air panas yang teridentifikasi di seluruh negeri (Darma dkk., 2010).

Sumber air panas adalah mata air yang dihasilkan dari kerak bumi setelah mengalami pemanasan geotermal. Indonesia khususnya Sulawesi Selatan memiliki beberapa sumber mata air panas salah satunya adalah sumber air panas Sulili yang terletak di Kecamatan Paleteang Kabupaten Pinrang sekitar 182 km dari Kota Makassar. Sifat fisik dan kimia yang dimiliki sumber air panas ini yaitu suhu air mencapai 40-57 °C dengan pH berada disekitar 7 dan mengandung belerang (Umar dkk., 2020). Sumber air panas seperti ini merupakan media pertumbuhan yang cocok bagi bakteri termofilik.

Bakteri termofilik merupakan bakteri yang dapat hidup pada suhu ekstrim yaitu pada suhu 40-60 °C. Menurut Kumar dan Nussinov (2001) bakteri termofilik mampu bertahan hidup pada suhu ekstrim karena memiliki kandungan enzim dan protein yang sangat stabil terhadap panas. Selain itu, molekul penyintesis protein dari bakteri ini stabil terhadap panas dan membran lipid selnya mengandung banyak asam lemak jenuh yang dapat membentuk ikatan hidrofobik yang sangat kuat sehingga dapat berfungsi secara optimal pada suhu yang sangat tinggi.

Keunggulan bakteri termofilik yaitu dapat menghasilkan enzim yang tahan pada suhu tinggi (enzim termostabil). Enzim-enzim tersebut mampu bertahan dan aktif pada temperatur yang tinggi. Sifat seperti ini sangat dibutuhkan oleh industri-industri berbasis enzim. Penggunaan enzim yang mampu bertahan pada suhu tinggi dalam bidang bioteknologi dapat menurunkan biaya operasional dan meningkatkan kecepatan reaksi, seperti penggunaan enzim dari bakteri *Thermus aquaticus* pada proses PCR (Irena, 2010).

Upaya identifikasi bakteri termofilik dari mata air panas Sulawesi telah berhasil dilakukan pada tahun 2004 di sumber air panas Tomapaso Manado oleh Yuli dkk. (2004). Diikuti oleh laporan awal lainnya tentang bakteri termofilik penghasil enzim termostabil diantaranya oleh Natsir dkk. (2010) yang mengisolasi enzim termostabil dari sumber air panas Sulili Kabupaten Pinrang, Arfah dkk. (2014) mengisolasi dari sumber air panas Lejja Kabupaten Soppeng dan Natsir dkk. (2014) dari sumber air panas Panggo Kabupaten Sinjai.

Proses isolasi bakteri termofilik dari sumber air panas dengan tujuan penggunaan bakteri sebagai penghasil enzim termostabil untuk diaplikasikan dalam dunia industri dan kesehatan semakin intensif (Firliani dkk., 2015). Eksplorasi bakteri termofilik dari berbagai sumber hidrotermal seperti sumber air panas saat ini banyak dilakukan karena permintaan akan enzim termostabil terus meningkat. Salah satu enzim yang saat ini banyak diproduksi dan diperdagangkan adalah enzim kitosanase yang menghasilkan turunan kitosan atau kitooligomer.

Kitosanase menarik perhatian beberapa peneliti karena potensi aplikasinya dalam bidang pengobatan, pertanian, dan *nutraceutical* (Doan dkk., 2019). Enzim kitosanase merupakan enzim yang mengkatalisis reaksi endohidrolisis ikatan β -1,4-glukosida pada kitosan menjadi turunan kitosan atau kitooligosakarida

(Sarni dkk., 2015). Turunan kitosan yang dihasilkan memiliki keunggulan yang lebih tinggi dibandingkan kitosan polimernya. Kitoooligosakarida diketahui lebih aktif secara biologis dan larut dalam air, oleh karena itu menarik perhatian para peneliti dan kalangan penggunaannya di bidang industri dan kesehatan (Chasanah, 2010).

Kitoooligosakarida sebenarnya dapat dihasilkan dengan iradiasi sonik dan hidrolisis secara kimiawi. Hidrolisis secara kimiawi dan iradiasi sonik kurang diminati karena bersifat acak, tidak terkontrol, efisiensi yang rendah dan menghasilkan oligomer kitosan dengan derajat polimerisasi yang rendah serta menghasilkan lebih banyak monomer D-glukosamin dan tidak ramah lingkungan. Sedangkan, hidrolisis secara enzimatik menggunakan enzim kitosanase lebih diminati karena bersifat spesifik, terkontrol, menghasilkan oligomer kitosan dengan derajat polimerisasi yang lebih tinggi dan glukosamin yang dihasilkan lebih sedikit serta ramah lingkungan (Sarni dkk., 2016). Selain itu, Hirano (1988) telah melaporkan bahwa proses alternatif untuk produksi kitoooligosakarida terkontrol dapat dilakukan secara enzimatik yaitu dengan enzim kitosanase.

Beberapa peneliti sebelumnya telah berhasil mengisolasi dan mengidentifikasi bakteri penghasil kitosanase. Yoon dkk. (2000) berhasil menemukan isolat bakteri genus *Bacillus* penghasil kitosanase termotabil dari sumber air panas di Korea. Chasanah dkk. (2006) juga berhasil mengisolasi *Bacillus licheniformis* MB-2 dari sumber air panas Tompasso di Manado dengan kemampuan spesifik menghasilkan produk oligomer kitosan berantai 5 (pentamer) dan 7 (heptamer), dan Razak dkk. (2018) berhasil memperoleh isolat bakteri B1211 penghasil kitosanase termotabil yang diisolasi dari sumber air panas Bora Kabupaten Sigi Sulawesi Tengah.

Berdasarkan uraian pada latar belakang, maka memungkinkan adanya bakteri termofilik penghasil kitosanase yang diisolasi dari sumber air panas Sulili, Kabupaten Pinrang, Sulawesi Selatan. Mengingat manfaat dari bakteri termofilik sebagai penghasil enzim kitosanase termostabil, maka perlu dilakukan kajian penelitian tentang bakteri termofilik penghasil kitosanase dari sumber air panas Sulili Pinrang, Sulawesi Selatan.

1.2 Rumusan Masalah

Adapun rumusan masalah dalam penelitian ini adalah :

1. bagaimana karakteristik bakteri termofilik penghasil kitosanase yang diisolasi dari sumber air panas Sulili Pinrang ?
2. berapa lama waktu produksi optimum enzim kitosanase dari isolat bakteri termofilik sumber air panas Sulili Pinrang ?
3. bagaimana karakteristik enzim kitosanase hasil isolasi dari isolat bakteri termofilik sumber air panas Sulili Pinrang ?

1.3 Maksud dan Tujuan Penelitian

1.3.1 Maksud Penelitian

Maksud dari penelitian ini adalah untuk memperoleh isolat bakteri termofilik yang memiliki aktivitas kitosanolitik serta memberikan informasi terhadap eksplorasi enzim kitosanase dari sumber air panas.

1.3.2 Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini antara lain :

1. mengisolasi dan mengidentifikasi bakteri termofilik penghasil enzim kitosanase dari sumber air panas Sulili Pinrang.

2. menentukan waktu produksi optimum enzim kitosanase dari isolat bakteri termofilik sumber air panas Sulili Pinrang.
3. menentukan karakteristik enzim kitosanase yang diisolasi dari isolat bakteri termofilik sumber air panas Sulili Pinrang.

1.4 Manfaat Penelitian

Hasil penelitian ini diharapkan memberikan informasi ilmiah tentang bakteri termofilik golongan kitinolitik penghasil enzim kitosanase dari sumber air panas Sulili Pinrang yang teridentifikasi genusnya.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Bakteri Termofilik

Bakteri termofilik merupakan bakteri yang tergolong dalam kelompok *Archaeobacteria* yang secara umum struktur selnya memiliki beberapa kelebihan dibandingkan dengan kelompok bakteri lainnya. Kelompok ini umumnya memiliki daya adaptasi yang sangat tinggi terhadap kondisi lingkungan yang bersifat ekstrim seperti suhu, kadar garam, pH, tekanan, dan oksigen dimana mikroorganisme lain tidak dapat mempertahankan aktivitas hidupnya. Bakteri termofilik dapat tumbuh pada suhu yang relatif tinggi yaitu kisaran suhu 40-60 °C dengan kisaran pH (10 > pH > 2) (De Rossa dkk., 1986). Bakteri termofilik merupakan salah satu jenis bakteri yang diklasifikasikan berdasarkan suhu pertumbuhan optimalnya, selain itu terdapat jenis bakteri lain yang diklasifikasikan pada suhu optimalnya seperti pada Tabel 1.

Tabel 1. Klasifikasi bakteri berdasarkan suhu pertumbuhan (Prescott dkk., 2003)

Klasifikasi	Suhu Pertumbuhan (°C)		
	Minimum	Optimum	Maksimum
Psikrofilik	0-5	5-15	15-20
Mesofilik	10-20	20-37	35-37
Termofilik	25-45	40-60	60-80

Bakteri termofilik mampu tumbuh optimal pada lingkungan ekstrim panas yaitu pada daerah-daerah geotermal di darat maupun di laut dalam. Bakteri termofilik dapat lebih tahan pada suhu tinggi disebabkan oleh keistimewaan yang dimiliki pada membran selnya yang berhubungan dengan lingkungan luar. Diduga

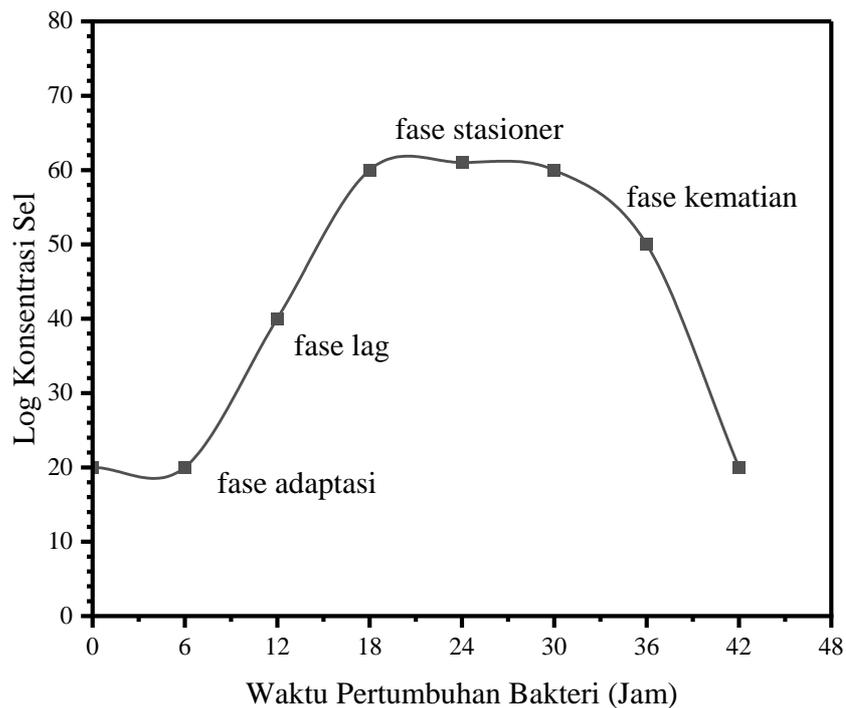
asam lemak penyusun komponen membran lebih jenuh sehingga membuat membran ini lebih stabil dan tahan pada suhu tinggi (Puspita, 2007).

Bakteri termofilik merupakan mikroba yang potensial memproduksi enzim termostabil. Enzim seperti ini sangat diperlukan dalam industri baik pangan maupun non pangan karena mengurangi kemungkinan kontaminan dan lebih ekonomis. Bakteri termofilik dapat menghasilkan enzim termostabil karena memiliki protein yang dapat bekerja pada kondisi lingkungan dengan suhu tinggi dimana protein/enzim lain dapat mengalami denaturasi (Sugiyono dkk., 2003).

Penelitian terhadap bakteri termofilik yang diisolasi dari sumber air panas telah banyak dilakukan, diantaranya yang dilakukan oleh Asnawi (2006) berhasil mengisolasi beberapa genus bakteri termofilik dari air panas Pacet, Jawa Timur, yaitu *Bacillus* sp., *Thermus* sp., *Acetogenium* sp., *Pseudomonas* sp., Dewi (2008) berhasil mengisolasi bakteri termofilik penghasil enzim kitinase dari sumber air panas Tinggi Raja, Simalungun, Sumatera Utara. Muharni (2010) telah menemukan bakteri *Bacillus* sp. dari air panas Danau Ranau Sumatera Selatan. Kurniawan (2011) telah menemukan bakteri *Bacillus* sp. dari sumber air panas Semurup Kabupaten Kerinci, Jambi. Rahayu (2014) berhasil mengisolasi bakteri termofilik penghasil enzim protease dari sumber air panas Sulili Kabupaten Pinrang, Sulawesi Selatan.

Menurut Poernomo dan Purwanto (2003), pemilihan bakteri sebagai sumber enzim mempunyai beberapa keuntungan bila dibandingkan dengan enzim yang diisolasi dari tanaman, hewan maupun fungi sebab sel bakteri relatif lebih mudah ditumbuhkan, kecepatan tumbuh relatif lebih cepat, skala produksi sel lebih mudah ditingkatkan, biaya produksinya relatif lebih murah, dan waktu yang dibutuhkan dalam proses produksi lebih pendek. Pertumbuhan bakteri dalam suatu media

mengalami fase-fase yang berbeda. Kurva pertumbuhan bakteri merupakan gambaran sejak awal hingga terhenti mengadakan kegiatan. Kurva ini terbagi menjadi beberapa fase yaitu fase adaptasi, fase lag/pertumbuhan, fase stasioner/tetap, dan fase kematian (Waluyo, 2004). Kurva pertumbuhan dari bakteri dapat dilihat pada Gambar 1.

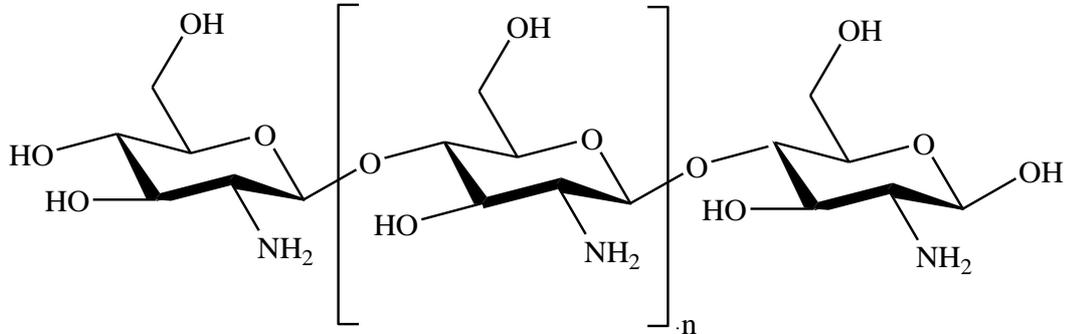


Gambar 1. Kurva pertumbuhan bakteri (Waluyo, 2004)

2.2 Kitosan dan Kitooligosakarida

Kitosan merupakan limbah dari bagian-bagian tubuh udang yang tidak dimanfaatkan dan dibuang pada proses pengolahan yang terdiri dari kepala, jengger atau genjer, kulit, ekor atau kotoran (Thalib, 2011). Kitosan merupakan senyawa hasil deasetilasi kitin, terdiri dari unit N-asetil glukosamin dan N-glukosamin. Adanya gugus reaktif amino pada atom C-2 dan gugus hidroksil pada atom C-3 dan C-6 bermanfaat sebagai pengawet produk-produk perikanan, sebagai flokulan dan membantu proses *reverse* osmosis dalam penjernihan air, aditif untuk produk

agrokimia, pengawet benih, dan antibakteri (Joles dan Muzarelli, 1999; Shahidi dkk., 1999; Rochima, 2005 dan Arif dkk., 2014).



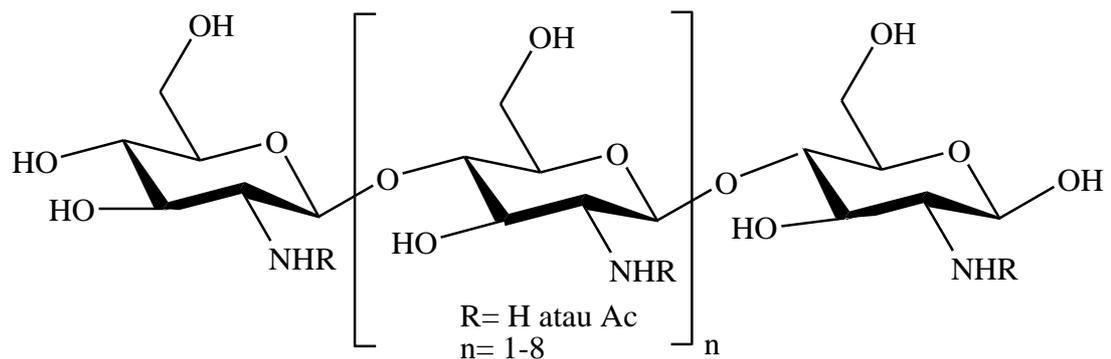
Gambar 2. Struktur kitosan (Lodhi dkk., 2014)

Unit penyusun kitosan merupakan disakarida (1-4)-2-amino-2-deoksi- β -D-glukosa. Rumus molekul dari kitosan adalah $(C_6H_{11}NO_4)_n$ yang strukturnya dapat dilihat pada Gambar 2. Kitosan dapat diperoleh dari deasetilasi sempurna atau parsial kitin (Arif, 2013). Seperti halnya kitin yang dapat diubah menjadi lebih sederhana, kitosan dapat dipotong dan potongan kitosan dikenal dengan nama oligomer kitosan atau kitooligosakarida (Thalib, 2011).

Kitooligosakarida merupakan senyawa kitosan yang terdegradasi dengan berat molekul rata-rata kurang dari 3900 Da atau derajat polimerisasi kurang dari 20 (Lodhi dkk., 2014). Beberapa penelitian sebelumnya telah menarik minat untuk mengubah kitosan menjadi kitooligosakarida karena kelarutan air yang tinggi, viskositas rendah, dan sifat biologis kitooligosakarida yang sangat baik. Dalam memperoleh molekul yang terdepolimerisasi ini, terdapat dua strategi utama yang telah dikembangkan yaitu proses kimiawi dan enzimatik (Liang dkk., 2016).

Proses kimiawi dan enzimatik telah digunakan untuk memproduksi kitosan oligomer. Hidrolisis asam pada kitosan menghasilkan berbagai oligosakarida yang tidak spesifik (Bosso dkk., 1986). Hidrolisis kitosan secara enzimatik bersifat

spesifik, terkontrol, menghasilkan oligomer kitosan dengan derajat polimerisasi yang lebih tinggi dan sedikit glukosamin yang dihasilkan serta ramah lingkungan sehingga cara enzimatik ini lebih baik dan umumnya digunakan dalam memproduksi kitooligosakarida (Sarni dkk., 2016). Struktur kitooligosakarida dapat dilihat pada Gambar 3.



Gambar 3. Struktur kitooligosakarida (Lodhi dkk., 2014)

2.3 Tinjauan Umum Tentang Enzim

Enzim merupakan kelompok protein yang berperan penting dalam aktivitas biologi. Enzim berfungsi sebagai katalisator yang dapat mengatur reaksi tertentu sehingga dalam keadaan normal tidak terjadi penyimpangan hasil reaksi. Enzim biasa disebut biokatalisator karena enzim mengkatalisator reaksi-reaksi tanpa mengubah struktur reaksi (Haedar dkk., 2017).

Aktivitas enzim dipengaruhi oleh berbagai faktor. Faktor tersebut diantaranya seperti pH, suhu, pelarut, kekuatan ion, dan adanya inhibitor atau aktivator. Oleh karena itu sangat penting untuk mengetahui sifat-sifat/karakteristik enzim yang meliputi pH optimum, suhu optimum, pengaruh penambahan ion logam, dan ketahanan enzim terhadap panas.

Pengaruh suhu pada reaksi enzimatik merupakan suatu fenomena yang kompleks (Winarno, 1983). Meningkatnya aktivitas enzim sampai pada suhu

optimum tertentu disebabkan oleh bertambahnya energi kinetik yang mempercepat gerak vibrasi, translasi, serta rotasi enzim dan substrat sehingga memperbesar peluang keduanya untuk saling berinteraksi. Pada suhu yang tinggi protein akan cepat mengalami kerusakan (denaturasi) (Suhartono, 1989).

Menurut Lehninger (1998) enzim memiliki pH optimum yang khas, yaitu pH yang menyebabkan aktivitasnya maksimum. Umumnya enzim optimum pada pH 4,5–8. Nilai pH optimum enzim tidak selalu sama dengan pH lingkungan normalnya (dapat sedikit berada di atas atau di bawah pH lingkungan normalnya) (Winarno, 1983)

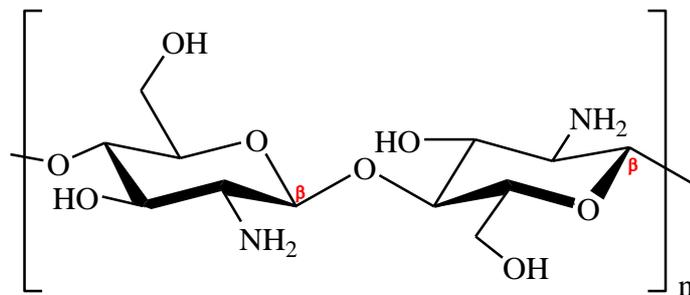
Kestabilan (ketahanan) enzim dapat diartikan sebagai kestabilan aktivitas enzim selama penyimpanan enzim, selama penggunaan enzim tersebut, dan kestabilan terhadap berbagai senyawa yang bersifat merusak enzim misalnya pelarut-pelarut tertentu (asam atau basa), oleh pengaruh luar misalnya suhu (panas), dan pH yang ekstrim. Penentuan daya tahan enzim terhadap panas umumnya dilakukan pada suhu dan pH optimum enzim tersebut (Suhartono, 1989).

2.4 Enzim Kitosanase

Enzim pendegradasi kitosan dikenal dengan istilah kitosanase. Enzim kitosanase merupakan enzim yang menghidrolisis kitosan pada ikatan glikosidik kitosan untuk menghasilkan oligomer kitosan. Penggunaan enzim kitosanase untuk memproduksi oligomer kitosan merupakan salah satu cara yang dipilih karena lebih aman dan bersifat spesifik dibandingkan dengan penggunaan reaksi kimia (Thalib, 2011). Kitosan oligomer yang dihasilkan adalah dimer sampai heptamer. Depolimerisasi enzimatik kitosan sangat bermanfaat dan ramah lingkungan. Oleh karena itu, memperoleh protokol yang efisien untuk produksi kitosanase dan

transformasi kitosan menjadi kitooligosakarida bioaktif akan sangat diinginkan untuk menghasilkan kitosan oligomerik ini secara efisien (Liang dkk., 2016).

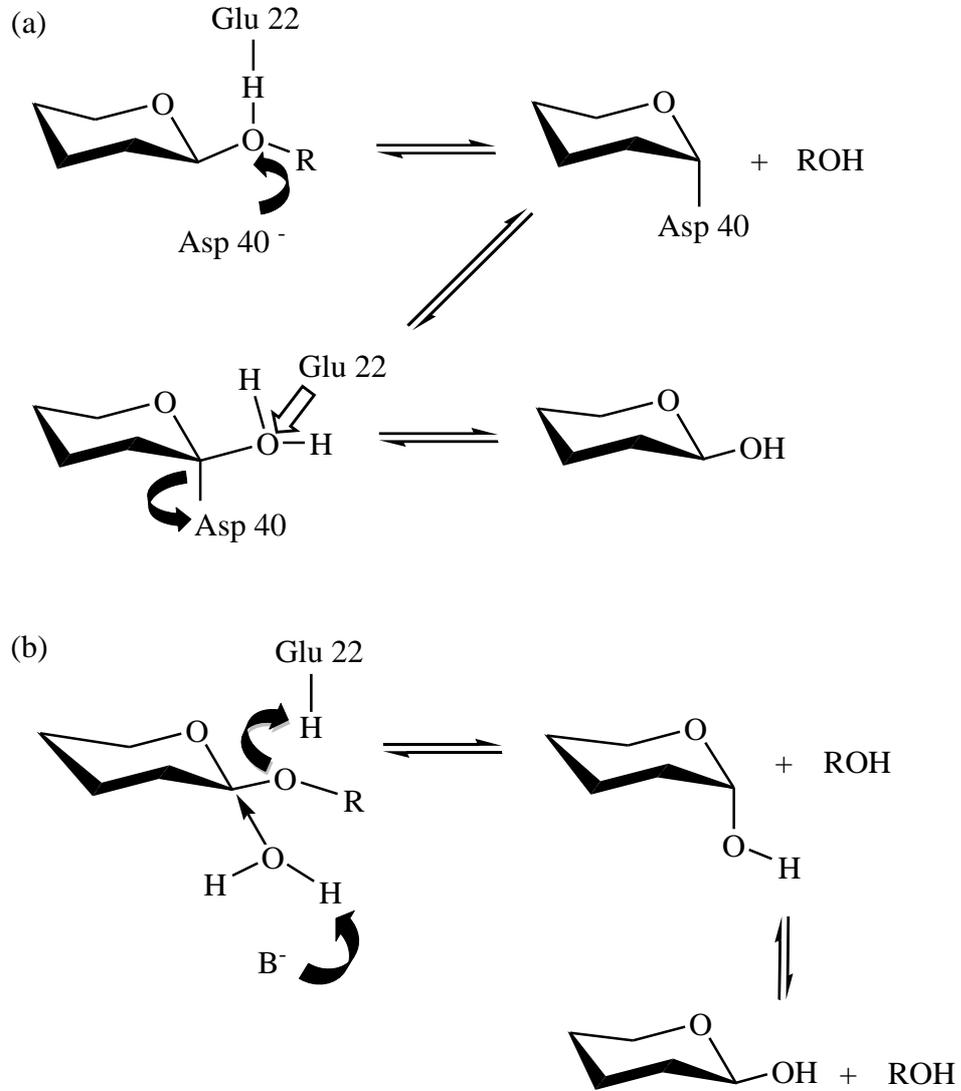
Kitosanase (EC 3.2.1.132) umumnya adalah enzim *endo splitting*. Enzim ini dapat menghidrolisis kitosan menjadi kitooligosakarida dan glukosamin. Kemampuan untuk menghidrolisis ikatan β -glukosaminidat (GlcN) dan N-asetil- β -glukosaminidat (GlcNAc) pada kitosan berbeda pada tingkat deasetilasi tergantung pada jenis mikroorganisme penghasil kitosanase (Chiang dkk., 2003). Daerah pemotongan dari enzim kitosanase dapat dilihat pada Gambar 4.



Gambar 4. Daerah pemotongan enzim kitosanase (Lodhi dkk., 2014)

Kitosanase (EC 3.2.1.132) telah menarik banyak perhatian ilmiah dan industri dalam beberapa tahun terakhir. Enzim ini mengkatalisis degradasi kitosan menjadi N-kitooligosakarida melalui hidrolisis dari ikatan 2-amino-2-deoksi-D-glukosida (Chasanah dkk., 2009). Kitosanase diklasifikasikan menjadi tiga kelas berdasarkan kekhususan enzim: enzim kelas I, yang memisahkan ikatan β -1,4 antara N-asetil glukosamin (GlcNAc) dan glukosamin (GlcN) dan antara GlcN-GlcN; enzim kelas II, yang hanya memisahkan GlcN-GlcN; dan enzim kelas III, yang memisahkan GlcN-GlcNAc dan GlcN-GlcN (Chasanah dkk., 2006). Berdasarkan konfigurasi anomerik proton C1 dari gula reduksi akhir yang diperoleh dari produk enzimatik, kitosanase dari kelompok yang berbeda mungkin terlibat dalam berbagai

jenis katalisis: baik mekanisme penahan (Gambar 5a) atau mekanisme pembalik (Gambar 5b).



Gambar 5. Dua mekanisme utama hidrolisis ikatan glikosidik enzimatik oleh kitosanase (Thadathil dan Velappan, 2014).

Glikosidase penahan mengkatalisis hidrolisis melalui mekanisme perpindahan ganda dua langkah dengan salah satu atau dua residu asam amino esensial yang berfungsi sebagai nukleofil dan lainnya sebagai asam/basa umum. Sebaliknya, glikosidase pembalik mengikuti mekanisme perpindahan tunggal satu langkah dengan bantuan asam umum dan basa umum. Basa umum mempolarisasikan

molekul air untuk mengembangkan nukleofil yang lebih kuat untuk menyerang karbon anomerik, sedangkan asam umum memprotonasi oksigen glikosidik untuk mempercepat reaksi. Dalam reaksi dengan enzim kitosanase, asam amino Glu22 ditemukan bertindak sebagai donor proton dan bekerjasama dengan Asp40, sehingga mengaktifkan molekul air untuk menyerang karbon anomerik dari residu glukosamin dalam substrat (Fukamizo dkk., 2000).

2.4.1 Mikroorganisme Penghasil Enzim Kitosanase

Enzim kitosanase dapat diperoleh dari tanaman, bakteri, dan jamur (Razak dkk, 2018). Kitosanase dihasilkan oleh bakteri, jamur dan tanaman sebagai enzim ekstraseluler atau intraseluler. Sebagian besar bakteri dan jamur menghasilkan kitosanase ekstraseluler. Sedangkan pada tanaman dan *zygomycetes* menghasilkan kitosanase intraseluler (Sarni dkk., 2015). Beberapa mikroba penghasil kitosanase di antaranya adalah dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Mikroba penghasil enzim kitosanase (Zilda dkk., 2006)

No.	Mikroba	Sumber
1	<i>Myxobacter</i>	(Hedges dan Wolfe, 1974),
2	<i>Penicillium</i>	(Fenton dan Eveleigh, 1981),
3	<i>Pseudomonas</i>	(Yoshihara dkk., 1992),
4	<i>Streptomyces</i>	(Bocher dkk., 1992),
5	<i>Mucor</i>	(Alfonso dkk., 1992),
6	<i>Fusarium</i>	(Shimosaka dkk.,1993),
7	<i>Enterobacter</i>	(Yamasaki dkk., 1993),
8	<i>Trichoderma</i>	(Nogawa dkk., 1998),
9	<i>Matsuebacter</i>	(Park dkk., 1999),
10	<i>Bacillus</i>	(Omumasaba dkk., 2000),
11	<i>Burkholderia</i>	(Shimosaka dkk., 2000),
12	<i>Aspergillus</i>	(Cheng dan Li, 2000).

Kitosanase dari masing-masing organisme menghasilkan pola hidrolisis yang berbeda tergantung pada tingkat deasetilasi substrat. Diantara semua organisme penghasil kitosanase, bakteri mendapat perhatian khusus karena bakteri mampu memproduksi secara cepat kandungan biomassa sehingga senyawa bioaktif bisa diproduksi lebih mudah, cepat, dan banyak dalam skala bioteknologi (Sarni dkk., 2015). Selain itu menurut Kendra dkk. (1989) kitosanase yang berasal dari mikroorganisme juga penting dalam pengaturan keseimbangan lingkungan, daur ulang biomaterial kitin, preparasi enzimatik kitooligosakarida biofungsional, dan untuk kontrol biologi kapang patogen pada tanaman. Dalam rangka mendapatkan kitosanase baru yang bisa digunakan untuk produksi oligomer kitosan skala besar, skrining bakteri dari berbagai sumber telah banyak dilakukan. Beberapa sumber kitinolitik bakteri yang pernah diteliti adalah udang (Putro, 1982), tanah (Zhu dkk., 2003; Choi dkk., 2004), air laut dan sedimen sumber air panas (Chasanah, 2004) serta spons (Uria dan Chasanah, 2005).

2.4.2 Isolasi Enzim Kitosanase dari Bakteri Termofilik

Bakteri termofilik menjadi pilihan yang baik sebagai sumber enzim termostabil. Aplikasi enzim didalam bioteknologi semakin menuntut enzim yang bersifat tahan lingkungan. Faktor utama yang paling merusak enzim adalah suhu, oleh karena itu usaha pertama yang akan dilakukan adalah mencari mikroba penghasil enzim-enzim termofilik dari berbagai sumber alam (Suhartono, 2000). Bakteri termofilik mengandung protein yang tahan terhadap panas dan tahan denaturasi sehingga mampu beradaptasi dengan kondisi lingkungan bersuhu ekstrim (Kumar dan Nussinov, 2001). Tidak hanya memiliki toleran terhadap suhu lingkungannya yang bersifat ekstrim, bakteri termofilik juga mampu untuk bertahan hidup dan berkembang biak pada kondisi suhu yang ekstrim tersebut (Brock, 1986).

Oligomer kitosan dapat diperoleh dengan hidrolisis kimia atau enzimatik. Cara enzimatik jauh lebih baik karena kemampuannya dalam memproduksi oligomer kitosan dengan spesifisitas yang tinggi. Kitosanase berasal dari bakteri menerima banyak perhatian khusus karena mereka dapat mempertahankan ekologi dan ekosistem lingkungan. Salah satu jenis bakteri yang berpotensi dimanfaatkan adalah termofilik karena memiliki kemampuan untuk hidup pada suhu tinggi yang berharga dalam industri (Razak dkk., 2018). Suatu enzim dapat diisolasi dari berbagai jenis mikroorganisme pada kondisi suhu dan pH optimum dapat dilihat pada Tabel 3.

Tabel 3. Beberapa enzim golongan kitinolitik yang diproduksi pada kondisi optimum berbeda

No.	Mikroorganisme dan Enzim	Kondisi Optimum	Sumber
1	Enzim kitosanase dari bakteri kitinolitik T5a1 yang diisolasi dari terasi	Suhu 50 °C pH 7,0, stabil pada 40 °C selama 200 menit, ion Mg ²⁺ dan Zn ²⁺ inhibitor, ion Ca ²⁺ aktivator	Zilda dkk., 2006
2	Enzim Kitosanase dari <i>Klebsiella</i> sp. asal spons	Suhu 40 °C pH 8, dengan aktivitas 0,309 U/mL (5,235 U/mg), konsentrasi substrat 1%, ion Zn ²⁺ , Mg ²⁺ , Cu ²⁺ inhibitor, Co ²⁺ , Ca ²⁺ , Ni ²⁺ aktivator	Sarni dkk., 2015
3	Enzim Kitosanase dari Bakteri Termofilik B1211 asal Sumber Air Panas Bora, Sigi, Sulawesi Tengah	Suhu 60 °C, substrat 1% menghasilkan kitosanase kasar aktivitas 0,408 U/mL, kadar protein 9,887 mg/mL, waktu fermentasi 5 hari, agitasi 90 rpm	Razak dkk., 2018
4	Enzim Kitinase dari <i>Bacillus</i> sp. HSA,3-1a asal Sumber Air Panas Sulili Pinrang Sulawesi Selatan	Suhu 55 °C pH 7,0, waktu fermentasi 2 hari, Mg ²⁺ , Ca ²⁺ , Mn ²⁺ aktivator, Co ²⁺ , Fe ²⁺ , Zn ²⁺ inhibitor	Natsir dkk., 2010

2.5 Aplikasi Enzim Kitosanase dan Produknya

Kitosanase merupakan salah satu enzim kitinolitik, selain kitinase dan kitin deasetilase. Kitosanase berfungsi sebagai enzim pendegradasi kitosan menjadi

oligomer kitosan atau kitooligomer dengan derajat polimerisasi yang tinggi. Kitosanase memiliki fungsi metabolisme dalam makhluk hidup karena dapat menghidrolisis kitosan dengan berat molekul tinggi menjadi kitooligosakarida yang dapat diangkut dalam sel dan digunakan sebagai sumber karbon dan nitrogen. Selain itu kitosanase juga berfungsi sebagai perlindungan terhadap mikroorganisme pengganggu (Sarni dkk., 2015).

Sejak diketahui memiliki berbagai kelebihan, seperti kelarutan dalam air dan aktivitas biologis yang lebih baik dari bentuk polimernya, oligosakarida kitosan atau disebut kitooligosakarida sebagai produk katalisis enzim kitosanase menarik perhatian peneliti dan banyak digunakan di bidang industri. Turunan dari kitosan ini juga memiliki aplikasi yang luas dalam bidang kesehatan, farmasi, pangan, dan pertanian (Chasanah, 2010).

Tabel 4. Aplikasi produk enzim kitosanase berupa kitooligosakarida (Doan dkk., 2018)

Aplikasi Kitooligosakarida	Sumber pustaka
anti-inflamasi	Azuma dkk., 2015
anti-oxidatif	Liang dkk., 2017
anti-tumor	Liang dkk., 2007
Pengawet	Sun dkk., 2017
Prebiotik	Liang dkk., 2013

Pada bidang kesehatan kitooligosakarida memiliki aktivitas sebagai anti tumor dan anti kolestrol. Goosen (1997) melaporkan bahwa oligomer kitosan ini mampu menjadi agregat sel tumor leukemia *in vitro*. Selain itu, kitooligosakarida mampu menghambat pembentukan *micelle* yang mengandung kolestrol, berperan sebagai antimikroba dan memiliki aktifitas *elicitor*. Selain itu aplikasi lain dari turunan kitosan ini pada bidang kesehatan dapat dilihat pada Tabel 4.

Kitooligosakarida diklaim memiliki kemampuan untuk mengikat lemak berlebih, mendukung kekebalan, menurunkan gula darah, dan mengontrol tekanan darah. Selain itu kitooligosakarida juga dapat mencegah sembelit, meningkatkan penyerapan kalsium, mencegah penyakit jantung, dan menurunkan kadar asam urat dalam darah. Serta memiliki aktivitas antikanker dan antibakteri (Chasanah, 2010).