Skripsi

ISOLASI DAN KARAKTERISASI ENZIM KITIN DEASITILASE DARI ISOLAT BAKTERI TERMOFILIK SUMBER AIR PANAS LEJJA KABUPATEN SOPPENG SULAWESI SELATAN

SUMIATI HADRIANI

H031 17 1317

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

ISOLASI DAN KARAKTERISASI ENZIM KITIN DEASITILASE DARI ISOLAT BAKTERI TERMOFILIK SUMBER AIR PANAS LEJJA KABUPATEN SOPPENG SULAWESI SELATAN

Skripsi ini diajukan sebagai salah satu syarat
untuk memperoleh gelar sarjana sains

Oleh

SUMIATI HADRIANI

H031 17 1317

MAKASSAR

2022

LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI

ISOLASI DAN KARAKTERISASI ENZIM KITIN DEASETILASE DARI ISOLAT BAKTERI TERMOFILK SUMBER AIR PANAS LEJJA KABUPATEN SOPPENG SULAWESI SELATAN

Disusun dan diajukan oleh

SUMIATI HADRIANI
H031171317

Telah dipertahankan di hadapan Panitia Ujian Sidang Sarjana Program Studi Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Hasanuddin
pada 16 maret 2022
dan dinyatakan telah memenuhi syarat kelulusan

Menyetujui,

Pembimbing Utama,

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

Pembimbing Pertama

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

Ketua Program Studi,

Dr. Abdul Karim, M.Si.
NIP. 196207101988031

PERNYATAAN KEASLIAN

Yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama	: Sumiati Hadriani
NIM	: H031171317
Program Studi	: Kimia
Jenjang	: S1

Menyatakan dengan ini bahwa Skripsi dengan judul Isolasi dan Karakterisasi Enzim Kitin Deasetilase dari Isolat Bakteri Termofilik Sumber Air Panas Lejja Kabupaten Soppeng Sulawesi Selatan adalah karya saya sendiri dan tidak melanggar hak cipta pihak lain. Apabila dikemudian hari terbukti bahwa sebagian atau keseluruhan skripsi ini adalah hasil karya orang lain yang saya pergunakan dengan cara melanggar hak cipta pihak lain, maka saya bersedia menerima sanksi.

Makassar, 16 Maret 2022

Yang Menyatakan

Sumiati Hadriani

PRAKATA

Segala puji bagi Allah yang telah menciptakan alam semesta beserta seisi-Nya. Maha suci Allah yang telah menciptakan segala ilmu pengetahuan yang ada di muka bumi ini. Shalawat serta salam semoga tetap tercurahkan kepada baginda Rasulullah Muhammad SAW yang telah mengorbankan jiwa dan raganya demi umatnya. Tulisan ini dipersembahkan kepada orang-orang yang sangat berarti dalam kehidupan sang penulis.

Ucapan terima kasih dan penghargaan yang setinggi-tingginya kepada Ibu **Dr. Hasnah Natsir, M.Si** dan Bapak **Abdur Rahman Arif, S.Si, M.Si** selaku pembimbing riset yang telah berkenan meluangkan waktu, tenaga dan pikiran dalam membimbing dan memberikan petunjuk yang begitu berharga dari awal pemikiran untuk menyusun skripsi hingga selesai. Keduanya merupakan orang terbaik dibidang Biokimia. Penulis juga menyampaikan ucapan terima kasih kepada:

1. Kedua orang tuaku **Muh. Tamrin Tahir** dan **Hasna** yang telah mendoakan dan membesarkan saya hingga seperti sekarang ini.
2. Kepada kakak-kakakku **Saharuddin Al-Ashar, Sumarni Hidayah, Lili Suriani, Abdul Majid** yang telah mengajarkan saya untuk tetap menjadi tiang terkuat dalam keluarga.
3. Seluruh **Dosen** Departemen Kimia Fakultas MIPA Universitas Hasanuddin yang senantiasa membagi ilmunya yang sangat berharga.
4. Kepada pembimbing akademik ibu **Dr. Hasnah Natsir, M.Si** yang telah mengarahkan dan membina serta menjadi pengganti orang tua di rantauan.

5. Tim Penguji Ujian Sarjana Kimia, yaitu ibu **Prof. Dr. Nunuk Hariani MS** dan bapak **Dr. Djabal Nur Basir, S.Si, M.Si** terima kasih atas bimbingan dan saran-sarannya.
6. Saudara-saudaraku **Chemistry 2017**, **Biokim Squad** dan **Tim Bakteri**, orang baik yang bahkan menangispun akan menemani, terima kasih telah memberi saya banyak pengalaman dalam berteman.
7. Pondok **Alfira** yang telah menjadi ruang menyendiri, ruang kenangan, tempat segala penat saya ekspresikan. Terima kasih telah menjadi ruang ketenangan buat saya.
8. Terima kasih kepada keluarga besar **Syamsuddin, SH** dan **Bungatang**, serta bapak **Alimudin** dan Kak **Nurwati** yang sudah membantu saya memberi pengalaman kuliah di Unhas.
9. Sahabat-sahabatku **Gentabuana Squad** (**Mecha, Lulu, Huda, Nisa, Mona, Yuyun, Ramlah, Haini**) terima kasih sudah menjadi saudara saya dirantauan, yang siap saya gelendoti, memberi tumpangan kamar, menjadi teman julid.
10. Ukhty Fillahku **bidadari perpus** (**Alfiah, Herna, Riska, Tenri, Anni, Trimel, Cimel, wiwinda**) dan **Wahyudin Rauf** selaku teman sepenelitian saya, terima kasih sudah menjadi bagian keluarga saya insyaaAllah hingga ke jannahnya, yang sudah menjadi kawan tertawa tanpa beban.
11. **Nurul Huda**, sahabat sejak maba yang selalu ada membantu akademik saya hingga selesai dan akhirnya bisa sarjana sama-sama.

Makassar, November 2021

Sumiati Hadriani
H031171317

ABSTRAK

Mikroba termofilik yang diisolasi dari sumber air panas merupakan penghasil enzim termostabil yaitu kitin deasetilase (CDA) dari bakteri termofilik yang dapat mendegradasi senyawa kitin menjadi kitosan. Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi dan mengkarakterisasi enzim CDA dari bakteri yang bersumber dari air panas Lejja Kabupaten Soppeng Sulawesi Selatan. Enzim CDA yang diproduksi pada medium fermentasi mengandung koloidal kitin dan dilakukan karakterisasi pH, suhu, konsentrasi substrat, stabilitas pH dan suhu serta pengaruh ion logam. Hasil penelitian menunjukkan bahwa, bakteri termofilik isolat T4.1 memproduksi enzim CDA secara maksimum pada jam ke-48. Hasil karakterisasi enzim CDA dari bakteri termofilik tersebut bekerja optimum pada pH 6,0; suhu 45ºC, konsentrasi substrat 1% dan diaktifkan oleh ion logam Mg^{2+}, CO^{2+}, Na^{2+} pada konsentrasi 1 mM.

Kata kunci: Mikroba termofilik, kitin deasetilase, *Bacillus circulans*, kitin, dan kitosan.

ABSTRAC

Thermophilic microbes isolated from hot springs produce thermostable enzymes, namely chitin deacetylase (CDA) from thermophilic bacteria that can degrade chitin compounds into chitosan. This study aims to isolate and characterize CDA enzymes from bacteria sourced from Lejja hot water, Soppeng Regency, South Sulawesi. CDA enzymes produced in the fermentation medium contain colloidal chitin and characterization of pH, temperature, substrate concentration, pH and temperature stability and the effect of metal ions were carried out. The results showed that the thermophilic bacteria isolate T.41 produced the maximum CDA enzyme at 48 hours. The results of the characterization of the CDA enzyme from the thermophilic bacteria was obtained at pH 6.0; temperature of 45ºC, 1% substrate concentration and activated by metal ions Mg^{2+}, CO^{2+}, Na^{2+} at a concentration of 1 mM.

Keywords: Thermophilic microbes, chitin deacetylase, *Bacillus circulans*, chitin, and chitosan.

DAFTAR ISI

Halaman

PRAKATA iv

ABSTRAK vi

ABSTRAC vii

DAFTAR ISI viii

DAFTAR TABEL xi

DAFTAR GAMBAR xii

DAFTAR LAMPIRAN xiii

DAFTAR ARTI LAMBANG DAN SINGKATAN xiv

BAB I PENDAHULUAN 1

1.1 Latar Belakang 1

1.2 Rumusan Masalah 3

1.3 Maksud dan Tujuan Penelitian 4

1.3.1 Maksud Penelitian 4

1.3.2 Tujuan Penelitian 4

1.4 Manfaat Penelitian 4

BAB II TINJAUAN PUSTAKA 5

2.1 Tinjaun Umum Bakteri Termofilik 5

2.2 Bakteri Kitinolitik 6

2.3 Tinjauan Tentang Enzim 7

2.4 Faktor-Faktor yang Mempengaruhi Kerja Enzim 9

2.2.1 Konsentrasi Enzim 9

2.2.2 Konsentrasi Substrat..... 9
2.2.3 Pengaruh pH..... 11
2.2.4 Pengaruh Suhu 12
2.5 Enzim Kitin Deasetilase..... 13
2.6 Enzim Kitin Deasetilase Termostabil..... 14
2.7 Tinjauan Umum Kitin 15
2.8 Kitosan 16
BAB III METODE PENELITIAN..... 19
3.1 Bahan Penelitian..... 19
3.2 Alat Penelitian..... 19
3.3 Waktu dan Tempat Penelitian 20
3.4 Prosedur Penelitian..... 20
3.4.1 Pengambilan Sampel..... 20
3.4.2 Pembuatan Koloidal Kitin..... 20
3.4.3 Pembuatan Media..... 20
3.4.3.1 Pembuatan Media Luria Broth 20
3.4.3.2 Pembuatan Media Luria Agar 21
3.4.3.3 Pembuatan Media Selektif Kitin Deasetilase..... 21
3.4.3.4 Pembuatan dan Penyiapan Inokulum 21
3.4.3.5 Pembuatan Medium Produksi 22
3.4.4 Isolasi Bakteri Termofilik 22
3.4.5 Karakteristik Sifat Morfologi Bakteri Termofilik..... 23
3.4.6 Produksi Ekstrak Enzim Kitin Deasetilase 24
3.4.7 Pengukuran Aktivitas Enzim Kitin Deasetilase 25

3.4.8 Penentuan Kadar Protein dengan Metode Lowry 26

3.4.9 Karakterisasi Enzim Kitinolitik dari Mikroba Termofilik 26

BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN 29

4.1 Isolasi dan Seleksi Bakteri Kitinolitik..... 29

4.2 Penentuan Waktu Optimum 32

4.3 Pengukuran Aktivitas dan Kadar Protein dengan Metode Lowry . 34

4.4 Karakterisasi Enzim Kitin Deasetilase dari Isolat T4.1 34

4.4.1 Pengaruh pH terhadap Aktivitas Kitin Deasetilase dari Isolat T4.1 35

4.4.2 Pengaruh Suhu terhadap Aktivitas Kitin Deasetilase dari Isolat T4.1 37

4.4.3 Pengaruh Konsentrasi Substrat terhadap Aktivitas Kitin Deasetilase dari Isolat T4.1 38

4.4.4 Pengaruh Ion Logam terhadap Aktivitas Kitin Deasetilase dari Isolat T4.1..... 39

4.4.5 Pengaruh Suhu dan Lama Penyimpanan terhadap Aktivitas Kitin Deasetilase dari Isolat T4.1 42

4.4.6 Pengaruh Suhu dan Lama Penyimpanan terhadap Aktivitas Kitin Deasetilase dari Isolat T4.1 43

BAB V KESIMPULAN DAN SARAN..... 46

5.1 Kesimpulan 46

5.2 Saran..... 46

DAFTAR PUSTAKA 47

LAMPIRAN..... 54

DAFTAR TABEL

Tabel Halaman

1. Indeks Kitinolitik 30
2. Uji Biokimia Sederhana 31
3. Stabilitas suhu pada waktu inkubasi terhadap aktivitas enzim …… 43
4. Stabilitas pH pada waktu inkubasi terhadap aktivitas enzim 45

DAFTAR GAMBAR

Gambar Halaman

1. Pengaruh Konsentrasi Substrat Terhadap Kecepatan Reaksi..... 10
2. Hubungan Antara pH dengan Aktivitas Enzim..... 11
3. Hubungan Antara Suhu dengan Kecepatan Reaksi..... 12
4. Jalur Degradasi Kitin oleh Mikroba Struktur Kitin..... 13
5. Mekanisme Reaksi Gugus Asetil oleh Kitin Deasetilase..... 14
6. Struktur Kitin 16
7. Struktur Kitosan 18
8. Isolat Bakteri Kitinolitik 30
9. Uji Mikroskop Bakteri Gram Positif..... 30
10. Hasil Uji Biokimia Sederhana..... 32
11. Pengaruh Waktu Produksi Kitin Deasetilase 33
12. Pengaruh Nilai Aktivitas dan Kadar Protein..... 34
13. Pengaruh pH terhadap Aktivitas Spesifik Kitin Deasetilase..... 36
14. Pengaruh Suhu terhadap Aktivitas Spesifik Kitin Deasetilase 37
15. Pengaruh Substrat terhadap Aktivitas Spesifik Kitin Deasetilase..... 39
16. Pengaruh Penambahan Senyawa ion Logam 41
17. Pengaruh Suhu terhadap Kestabilan Enzim Kitin Deasetilase..... 42
18. Pengaruh pH terhadap Kestabilan Enzim Kitin Deasetilase..... 44

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran Halaman

1. Lokasi Pengambilan Sampel 53
2. Diagram Alir 54
3. Bagan Kerja..... 55
4. Pembuatan Reagen *Schalles*, Lowry A dan Lowry B, Glukosamin 67
5. Tabel dan Pehitungan..... 69
6. Dokumentasi Penelitian 75

\

DAFTAR SIMBOL DAN SINGKATAN

λ	=	Panjang Gelombang
A	=	Absorban
b/v	=	Berat/volume
BSA	=	Bovine Serum Albumin
IR	=	Infra Merah
LA	=	Luria Agar
M	=	Molaritas
N	=	Normalitas
OD	=	*Optical dencity*
pH	=	Tingkat keasaman
Rpm	=	Rotasi per menit
µL	=	mikroliter
Unit	=	Satuan aktifitas
Unit/mg	=	Unit per milligram
Unit/mL	=	Unit per milliliter

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Indonesia merupakan negara kepulauan yang memiliki iklim tropis dan beberapa daerah pegunungan berapi dengan aktivitas vulkanik yang tinggi, sehingga banyak ditemukan lokasi sumber daya panas bumi yang tersebar di seluruh kepulauan Indonesia. Di Indonesia khususnya Sulawesi Selatan memiliki sumber mata air panas di beberapa wilayah diantaranya mata air panas Ere Bambang Pencong di Gowa, permandian air panas Makula di Tana Toraja, mata air panas Eremerasa di Bantaeng, mata air Sulili dan Lemosusu di Pinrang, mata air panas Pincara di Luwu Utara, dan mata air panas Lejja di Soppeng. Salah satu sumber mata air panas yang memiliki akses yang mudah di Sulawesi Selatan yaitu mata air panas Lejja yang berada di Kabupaten Soppeng. Sumber mata air panas ini ditemukan pada kawasan hutan lindung yang berada di Lejja, Desa Bulu, Kecamatan Marioriawa dan telah menjadi objek wisata di daerah tersebut.

Daerah sumber air panas dan kawah gunung merapi selain sebagai objek wisata juga sebagai sumber bakteri termofilik yang dapat menghasilkan enzim termostabil. Mata air panas Lejja kaya akan mineral dan suhunya mencapai 60ºC dengan kandungan sulfur mencapai 1,5%. Kondisi ini sangat berpeluang untuk memperoleh bakteri termofilik di sumber air tersebut. Mahmudah dkk (2016) telah mengisolasi bakteri termofilik dari sumber air panas Lejja dan memperoleh bakteri genus *Pseudosmonas* sp. Menurut Edward, (1990) mikroba ekstrim termofilik tumbuh pada kisaran suhu 55ºC-88ºC dan mampu mengeksplorasikan enzim termostabil (Arfah dkk., 2014). Bakteri termofilik merupakan kelompok bakteri

yang dapat beradaptasi dengan kondisi lingkungan yang bersuhu tinggi (Ahmaloka, 2006). Salah satu hal yang dapat menyebabkan mikroba termofilik mampu bertahan hidup dan berkembang biak pada suhu ekstrim yang tinggi yaitu karena memiliki molekul pensintesis protein yang stabil terhadap panas dan membran lipid sel termofil mengandung banyak asam lemak jenuh yang dapat membentuk ikatan hidrofobik yang sangat kuat (Brock dan Madigan, 1991).

Bakteri termofilik menghasilkan enzim termostabil yang sangat penting dalam proses industri dan bioteknologi, seperti dalam teknik-teknik biologi molekuler untuk kegiatan penelitian dan kemampuan enzim untuk mengubah tepung, makanan, pengelolaan sampah, pembuatan kertas dan sintesis zat-zat organik (Sutiamiharja, 2008). Pada saat ini kebutuhan enzim termofilik pada bidang industri, pangan, kesehatan dan bioteknologi sangat diminati penggunaannya. Bakteri termofilik termasuk golongan bakteri yang memiliki kemampuan yang sangat berbeda dengan golongan bakteri lain karena kemampuannya untuk beradaptasi dan tumbuh pada suhu tinggi serta kondisi ekstrim. Bakteri termofilik dapat diperoleh dari sumber air panas, kawasan geothermal, dan tumpukan sampah-sampah yang membusuk yang telah menghasilkan panas cukup tinggi sebagai akibat metabolismenya (Volk dan Wheeler, 1988).

Penelitian bakteri termofilik dari sumber air panas sebelumnya telah dilakukan diantaranya oleh Setyahadi dkk (2006) telah mengisolasi isolat bakteri asal Pancuran Tujuh Baturaden Jawa Tengah penghasil enzim kitin deasetilase dengan memperoleh bakteri genus *bacillus*, Muharni (2009) telah mengisolasi 8 isolat bakteri penghasil enzim kitinase dari sumber air panas Danau Ranau Sumatra Selatan, Natsir (2010) telah mengisolasi isolat bakteri *Bacillus lichenformis* HSA3-1a dari sumber air panas Sulili Pinrang penghasil kitinase dan Hendarsyah (2006)

telah mengisolasi bakteri penghasil kitin deasetilase dari isolat bakteri asal Pancuran Tujuh Baturaden Jawa Tengah.

Bakteri kitinolitik adalah salah satu bakteri termofilik yang menghasilkan enzim kitinase dan kitin deasitilase. Enzim kitin deasitilase merupakan salah satu enzim kitinolitik yang mampu mengkonversi kitin menjadi kitosan dalam proses deasetilasi N-asetil glukosamin yang memiliki banyak manfaat dalam kehidupan sehari-hari. Hasil konversi kitin menjadi kitosan dapat dimanfaatkan untuk menurunkan kolesterol dalam darah, antikoagulan dalam darah, agen hipokolesteromik, antitumor, sebagai fungisida, pelapis buah-buahan pasca panen dan juga sebagai komponen alat-alat operasi serta penggunaanya dalam teknologi kromatografi (Angka dan Suhartono, 2000). Hal ini menjadikan peluang kitin deasitilase sebagai pengkonversi kitin secara enzimatis yang ramah lingkungan (Akhsani dkk., 2017).

Berdasarkan uraian pada latar belakang lokasi sumber air panas permandian Lejja di Kabupaten Soppeng Sulawesi Selatan yang suhunya 57ºC pH 8,0 memungkinan adanya bakteri penghasil enzim kitin deasetilase. Dengan demikian telah dilakukan eksplorasi bakteri termofilik di Lejja Kabupaten Soppeng Sulawesi Selatan.

1.2 Rumusan Masalah

Adapun rumusan masalah dalam penelitian ini adalah:

1. bagaimana karaktersitik bakteri termofilik hasil isolasi dari sumber air panas Lejja Kabupaten Soppeng Sulawesi Selatan?
2. berapa waktu optimum produksi enzim kitin deasitilase dari isolat bakteri termofilik sumber air panas Lejja Kabupaten Soppeng Sulawesi Selatan?

3. bagaimana karakteristik kitin deasitilase yang dihasilkan dari isolat bakteri termofil pendegradasi kitin yang berasal dari sumber air panas Lejja Kabupaten Soppeng Sulawesi Selatan?

1.3 Maksud dan Tujuan Penelitian

1.3.1 Maksud Penelitian

Maksud penelitian ini adalah untuk memperoleh isolat bakteri termofilik penghasil enzim kitin deasetilase yang berperan dalam proses degdradasi kitin menjadi kitosan yang diperoleh dari sumber air panas.

1.3.2 Tujuan Penelitian

Adapun tujuan dalam penelitian ini adalah:

1. mengisolasi dan mengidentifikasi bakteri termofilik dari sumber air panas Lejja Kabupaten Soppeng Sulawesi Selatan.
2. menentukan waktu produksi optimum enzim kitin deasitilase dan kurva pertumbuhan mikroba dari isolat bakteri termofilik sumber air panas Lejja Kabupaten Soppeng Sulawesi Selatan.
3. menentukan karakteristik kitin deasitilase yang dihasilkan dari isolat bakteri termofilik pendegradasi kitin yang berasal dari sumber air panas Lejja Kabupaten Soppeng Sulawesi Selatan.

1.4 Manfaat Penelitian

Manfaat dari penelitian ini adalah memberikan informasi ilmiah tentang potensi enzim kitin deasetilase sebagai pendegradasi kitin yang bersumber dari bakteri termofilik khususnya yang diisolasi dari daerah ekstrim seperti sumber air panas Lejja Kabupaten Soppeng Sulawesi Selatan.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Tinjauan Umum Bakteri Termofilik

Mikroorganisme termofilik tumbuh baik pada lingkungan dengan temperatur yang tinggi, seperti pada daerah gunung berapi dan sumber air panas. Mikroorganisme termofilik menjadi pilihan yang baik sebagai sumber enzim termostabil dibandingkan yang berasal dari hewan dan tumbuhan. Hal ini dikarenakan mikroorganisme dapat diproduksi dalam jumlah yang besar dengan prosedur pemisahan yang sangat relatif sederhana (Singh dan Shailendra, 2007).

Menurut Irena dalam Tuntun dan Huda (2014) keunggulan bakteri termofilik yaitu dapat menghasilkan enzim yang tahan pada suhu tinggi atau enzim termostabil. Enzim-enzim ini mampu bertahan dan aktif pada temperatur yang tinggi. Sifat enzim yang seperti ini sangat dibutuhkan oleh industri-industri berbasis enzim. Penggunaan enzim yang mampu bertahan pada suhu tinggi dalam bidang bioteknologi mampu menurunkan biaya operasi dan dapat meningkatkan kecepatan reaksi.

Mikroorganisme termofilik menjadi pilihan yang baik sebagai sumber enzim termostabil. Aplikasi enzim didalam bioteknologi semakin menuntut enzim yang bersifat tahan lingkungan karena faktor utama yang paling merusak enzim adalah suhu, maka usaha pertama yang akan dilakukan adalah mencari mikroba penghasil enzim-enzim termofilik dari berbagai sumber alam (Suhartono, 2000). Bakteri termofilik dapat dikelompokkan menjadi dua kelompok, diantaranya yaitu obligat termofilik yaitu bakteri yang tidak dapat hidup pada suhu diatas 50ºC dan fakultatif termofilik yaitu dapat hidup pada suhu 50ºC hingga 66ºC atau pada suhu

yang lebih rendah 38ºC. Bakteri termofilik dapat tumbuh pada suhu yang tinggi yaitu kisaran suhu 45ºC hingga 55ºC dengan kisaran pH (10>x>2). Kelompok bakteri termofil tergolong dalam kelompok *Archaebacteria* yang secara umum struktur selnya memiliki beberapa kelebihan. Kelompok ini umumnya memiliki daya adaptasi yang tinggi terhadap kondisi lingkungan yang bersifat ekstrim seperti temperatur, kadar garam, pH, tekanan, dan oksigen dimana pada mikroorganisme lain yang tidak dapat mempertahankan aktivitas hidupnya (De Rossa dkk., 1986).

Akhsani dkk (2017) telah mengisolasi bakteri kawasan geotermal Dieng dan memperoleh isolat bakteri KSR HA 24 dengan menggunakan media agar kitin, memperoleh aktivitas enzim optimal pada waktu produksi jam ke-18. Fikrinda (2000) berhasil mengisolasi bakteri termofilik yang berasal dari tanah ekosistem air hitam, kalimantan tengah. Mikroba termofilik yang telah ditemukan yaitu *Thermonospora*, *Termoactinomyces*, *Thermonospora chormogena*, *Streptomyces*, *Bacillus*, *Actinomycetes*, dan juga *Thermu*s (Mayende dkk., 2006)

Pada saat ini bakteri termofilik dipelajari dan diteliti secara intensif karena alasan pengembangan penelitian dasar dan aplikasi bioteknologi. Bakteri penghasil berbagai jenis enzim 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 dan meningkatkan kecepatan reaksi (Aguilar dkk., 1998).

2.2 Bakteri Kitinolitik

Bakteri kitinolitik merupakan kelompok bakteri yang mampu menghasilkan enzim kitinase untuk menguraikan zat kitin (Budiani dkk., 2004). Bakteri kitinolitik mampu menghidrolisis kitin menjadi turunannya secara enzimatis dengan cara memanfaatkan kitin sebagai karbon (Ruma dkk., 2020). Salah satu enzim yang

banyak digunakan dalam bidang industri baik pangan maupun non pangan ialah enzim kitinase dan kitin deasetilase. Peranan enzim tersebut menjadi perhatian besar karena berperan terhadap kehidupan masyarakat dalam bidang pangan maupun non pangan yang mendorong para ilmuan dan peneliti melakukan ekplorasi mikroorganisme kitinolitik (Natsir dkk., 2013).

Bakteri kitinolitik adalah bakteri penghasil enzim kitinase yang mampu mendegradasi kitin menjadi N-asetilglokosamin (Muharni dan Widjajanti, 2011). Berbagai penelitian telah dilakukan menggunakan bakteri kitinolitik, salah satunya yaitu sebagai pengendali hayati terhadap serangga (Widiastuti dan Marbawati, 2016).

2.3 Tinjauan Tentang Enzim

Pada awalnya, enzim dikenal sebagai protein oleh Sumner (1926) yang telah berhasil mengisolasi urease dari tumbuhan kara pedang. Urease adalah enzim yang mampu menguraikan urea menjadi CO_2 dan NH_3. Beberapa tahun kemudian Northrop dan Kunitz mengisolasi pepsin, tripsin, kimotripsin dan selanjutnya semakin banyak enzim yang dapat diisolasi dan membuktikan bahwa enzim tersebut adalah protein (Poedjiadi, 1994). Enzim merupakan unit fungsional dari metabolisme sel dan bekerja dengan urutan yang teratur. Enzim mengakatalisis ratusan reaksi bertahap yang menguraikan molekul nutrien, reaksi yang menyimpan dan mengubah energi kimiawi dan yang membuat makromolekul sel dari prekursor sederhana (Lehninger, 1997). Enzim adalah benda tak hidup yang diproduksi oleh sel hidup. Enzim menyusun sebagian besar total protein dalam sel (Susanti dan Fibriana, 2017). Melalui aktivitasnya, sistem enzim terkoordinasi dengan baik menghasilkan suatu hubungan yang harmonis diantara sejumlah aktivitas dari metabolik yang sangat diperlukan untuk menunjang kehidupan (Lehninger, 1997).

Menurut Kuhne (1878), enzim berasal dari kata *inzyme* yang berarti sesuatu di dalam ragi. Berdasarkan beberapa penelitian dapat disimpulkan bahwa enzim merupakan suatu protein yang berupa molekul-molekul besar. Pada enzim terdapat bagian protein yang tidak dapat tahan panas yaitu disebut dengan apoenzim, sedangkan bagian yang bukan protein adalah bagian yang aktif dan diberi nama gugus prostetik biasanya berupa logam seperti besi, tembaga, seng atau suatu bahan senyawa organik yang mengandung logam. Apoenzim dan gugus prostetik merupakan suatu kesatuan yang disebut holoenzim, tetapi ada juga bagian enzim yang apoenzim dan gugus prostetiknya tidak menyatu. Bagian gugus prostetik yang lepas disebut koenzim, yang aktif seperti halnya gugus prostetik. Contoh koenzim yaitu vitamin atau bagian vitamin misalnya vitamin B1, B2, B6, niasin dan biotin (Harahap dan Fauziyah, 2012).

Enzim berfungsi sebagai pengkatalis untuk proses biokimia yang terjadi dalam sel maupun yang ada di luar sel. Suatu enzim dapat mempercepat suatu reaksi 10^8 hingga 10^{11} kali lebih cepat dibandingkan dengan dilakukan tanpa katalis. Enzim dapat berfungsi sebagai katalis yang sangat efisien, di samping itu memiliki derajat kekhasan yang tinggi. Seperti juga pada katalis lainnya, enzim dapat menurunkan energi aktivasi suatu reaksi kimia (Poedjiadi, 1994). Enzim yang berasal dari mikroba biasanya banyak digunakan di perindustrian. Penggunaan bakteri untuk menghasilkan suatu enzim memiliki keuntungan baik secara teknik maupun ekonomi (Poernomo dkk., 2017).

Enzim mempunyai kekhasan seperti yang telah dijelaskan yaitu hanya bekerja pada satu reaksi saja. Suatu zat atau substrat harus memiliki hubungan atau kontak antara enzim dengan substrat untuk dapat bekerja. Oleh karena itu, tidak

seluruh bagian enzim dapat berhubungan dengan substrat. Hubungan antara substrat dengan enzim hanya terjadi pada bagian tertentu saja. Tempat atau bagian enzim yang mengadakan hubungan atau kontak dengan substrat dinamakan bagian aktif (*active site*). Hubungan hanya mungkin terjadi apabila bagian aktif mempunyai ruang yang tepat dapat menampung substrat. Apabila substrat mempunyai bentuk atau konformasi lain, maka tidak dapat ditampung pada bagian aktif suatu enzim. Dalam hal ini enzim itu tidak dapat berfungsi terhadap substrat (Poedjiadi, 1994).

2.4 Faktor-faktor yang Mempengaruhi Kerja Enzim

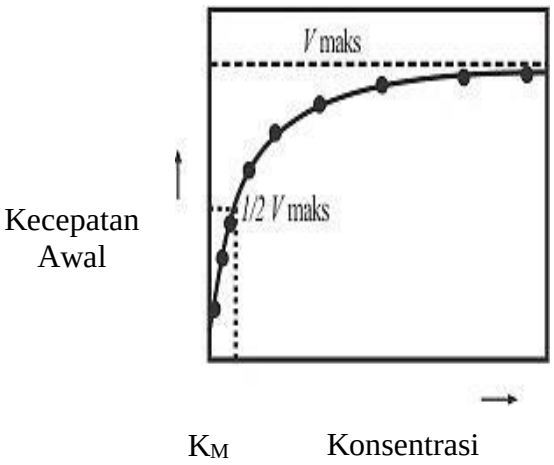
2.4.1. Konsentrasi Enzim

Kecepatan suatu reaksi yang menggunakan enzim bergantung pada konsentrasi enzim. Ketika konsentrasi substrat lebih besar daripada konsentrasi enzim, maka laju reaksi akan berjalan lambat. Hal ini dikarenakan hanya ada beberapa molekul enzim yang akan mengkonversi substrat menjadi produk sehingga aktivitas enzim akan menurun. Peningkatan konsentrasi enzim harus diiringi dengan peningkatan konsentrasi substrat sehingga laju reaksi akan meningkat (Saini, 2010).

2.4.2. Konsentrasi Substrat

Konsentrasi substrat berpengaruh terhadap kontak enzim-substrat. Enzim dan substrat memiliki spesifitas yang tinggi. Apabila substrat cocok dengan enzim, maka kinerja enzim juga akan optimal (Irawati, 2016). Kompleks enzim substrat untuk dapat terjadi diperlukan adanya kontak antara enzim dengan substrat. Kontak ini terjadi pada suatu tempat atau bagian enzim yang disebut bagian aktif. Pada

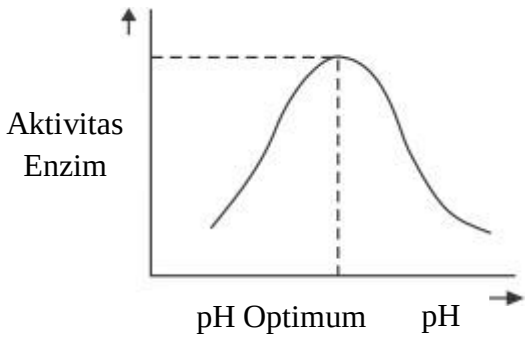
konsentrasi substrat rendah, bagian aktif enzim ini hanya dapat menampung sedikit substrat. Ketika konsentrasi suatu substrat diperbesar, makin banyak substrat yang dapat berhubungan dengan enzim pada bagian aktif tersebut. Dengan demikian konsentrasi kompleks enzim substrat makin besar yang menyebabkan makin banyaknya kecepatan reaksi. Hardi dkk (2017) telah melakukan penelitian mengenai karakterisasi enzim kitinase dari isolat bakteri termofilik B1211 asal air panas Bora dan mendapatkan hasil penelitian konsentrasi substrat maksimum isolat bakteri termofil dihasilkan pada konsentrasi 0,2% dengan aktivitas 0,71 U/mL. Pada suatu batas konsentrasi substrat tertentu, semua bagian aktif telah dipenuhi oleh substrat atau telah jenuh dengan substrat. Dalam keadaan ini, bertambah besarnya konsentrasi substrat tidak menyebabkan bertambah besarnya konsentrasi dari kompleks enzim substrat sehingga jumlah dari hasil reaksinya pun tidak bertambah besar. Pengaruh konsentrasi substrat terhadap kecepatan reaksi dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Pengaruh konsentrasi substrat terhadap kecepatan reaksi (Poedjiadi,2009)

2.4.3. Pengaruh pH

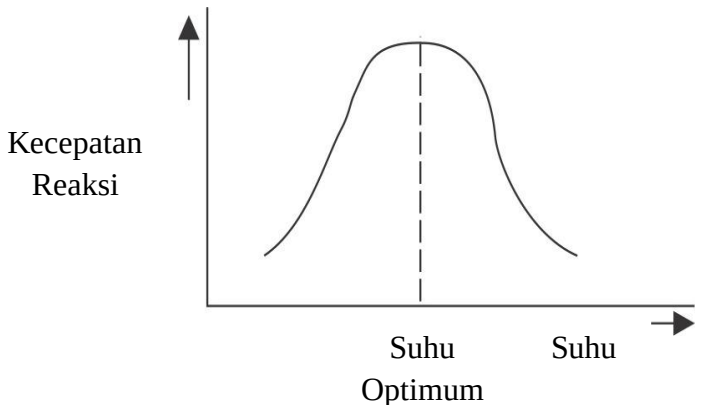
Pada umumnya, struktur dari ion enzim tergantung pada pH lingkungannya. Enzim dapat berbentuk ion positif dan ion bermuatan ganda (*zwitter ion*). Demikian dengan perubahan pH lingkungan akan berpengaruh terhadap efektivitas bagian dari enzim dalam membentuk kompleks enzim substrat. Disamping pengaruh terhadap struktur ion pada enzim, pH rendah atau pH tinggi dapat pula menyebabkan terjadinya proses denaturasi dan ini akan mengakibatkan menurunnya aktivitas enzim (Poedjiadi, 2009). Pergeseran pH dari pH optimum akan menyebabkan perubahan besar pada reaksi yang dikatalisis enzim (Murray dkk., 2003). Derajat keasaman (pH) sangat berkaitan dengan keberadaan ion hidrogen. Konsentrasi ion hidrogen sangat mempengaruhi aktivitas enzim, karena enzim aktif apabila asam amino yang merupakan sisi aktif enzim berada dalam keadaan ionisasi tepat. pH terlalu asam atau terlalu basa akan menyebabkan enzim terdenaturasi sehingga enzim tidak aktif (Prima, 2012). Maziah (2009) telah melakukan penelitian mengenai produksi dan karakterisasi protease isolat bakteri termofilik dari sumber air panas Platungan Kendal, sebagian besar mikroorganisme tumbuh dengan baik pada pH 6,0-8,0 dan penelitian yang telah dilakukan didapatkan pH optimum untuk pertumbuhan yaitu pH 8,0. Hubungan antara pH dengan aktivitas enzim dapat dilihat pada Gambar 2.



Gambar 2. Hubungan antara pH dengan aktivitas enzim (Poedjiadi, 2009)

2.4.4. Pengaruh Suhu

Beberapa faktor yang menyebabkan enzim dapat bekerja dengan optimal dan efisien salah satunya yaitu temperatur (Novianti dkk., 2012). Temperatur mempengaruhi aktivitas enzim (Wuryanti, 2004). Laju suatu reaksi yang dikatalisis oleh enzim sama seperti pada reaksi kimia umumnya, yaitu akan meningkat bila suhu naik. Pada suhu rendah reaksi kimia oleh enzim berlangsung lambat, sedangkan pada suhu yang lebih tinggi reaksi berlangsung lebih cepat. Enzim merupakan suatu protein, maka kenaikan suhu dapat menyebabkan denaturasi. Apabila terjadi proses denaturasi, maka bagian aktif enzim terganggu dan dengan konsentrasi efektif enzim menjadi berkurang dan kecepatan reaksi pun akan menurun (Poedjiadi, 2009). suhu merupakan faktor utama yang harus diketahui (Sari, 2010), karena setiap enzim akan berfungsi secara optimal pada suhu tertentu. Kecepatan reaksi menurun tajam di atas suhu optimal karena enzim merupakan protein yang akan terdenaturasi pada suhu yang tinggi (Fitriani, 2003). Wahyuna dkk (2012) telah mengisolasi dan mengkarakterisasi bakteri termofilik asal sungai Medang Jambi dengan memperoleh suhu optimum 60ºC, dari hasil penelitiannya dilaporkan bahwa isolat yang dihasilkan mampu hidup pada suhu rentang 30ºC-90ºC. Hubungan antara suhu dengan kecepatan reaksi dapat dilihat pada Gambar 3.



Gambar 3. Hubungan antara suhu dengan kecepatan reaksi (Poedjiadi, 2009)

2.5 Enzim Kitin Deasetilase

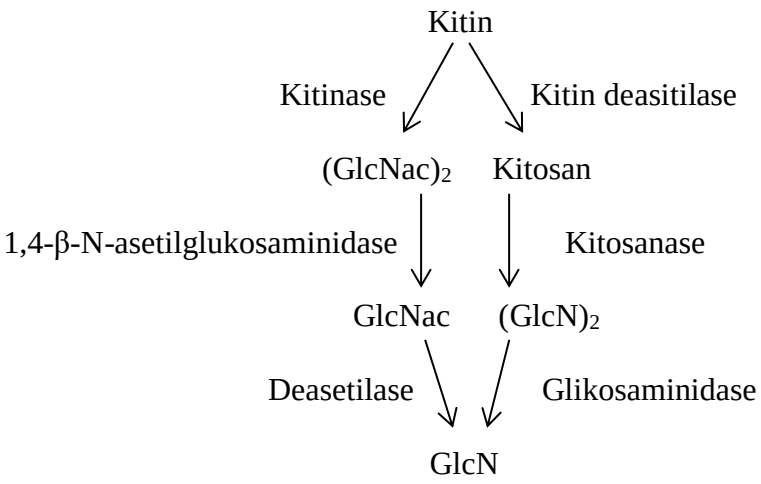
Kitin deasitilase merupakan salah satu enzim yang bersifat kitinolitik. Sejak beberapa tahun terakhir, eksplorasi enzim-enzim kitinolitik seperti kitinase, kitin deasitilase dan kitosanase, terutama yang berasal dari mikroba semakin meningkat. Beberapa cara bisa dilakukan untuk memperoleh kitosan maupun dalam bentuk oligomernya (Fawzya dkk., 2004). Enzim kitin deasetilase adalah enzim yang dapat mengkatalisis konversi kitin menjadi kitosan dalam proses deasetilase N-asetilglukosamin (Husniati dkk., 2012).

Di alam, kitin tersedia amat berlimpah dan merupakan biopolimer kedua terbanyak setelah selulosa. Pada umumnya, kitin dapat dijumpai pada cangkang luar hewan golongan krustasea, arthropoda dan juga dapat ditemukan pada komponen dasar dinding sel di beberapa jenis fungi. Turunan dari kitin, kitosan, memiliki jangkauan aplikasi yang lebih luas dibandingkan bentuk dasar kitin karena pada tiap molekul kitosan, gugus aminnya bermuatan positif setelah terdeasetilasi dari gugus amida (Hendarsyah, 2006).

Enzim pendeasetilasi kitin, bekerja mengkatalisis perubahan kitin menjadi kitosan sehingga dapat dimanfaatkan untuk produksi kitosan melalui proses enzimatis. Pembuatan kitosan dengan menggunakan kitin deasetilase sangat menguntungkan sebab dapat menghasilkan molekul kitosan dengan derajat deasetilase yang lebih seragam dibandingkan dengan proses kimia biasa (Tokuyasu dkk., 1996).

Setyahadi dkk (2006) mengisolasi bakteri termofilik asal Pancuran Tujuh Baturaden Jawa Tengah dan memperoleh isolat *Bacillus* sp. sebagai penghasil enzim kitin deasetilase yang diketahui bahwa enzim ini dapat menghidrolisis kitin melalui pemutusan ikatan N-asetamido pada kitin dan mengubahnya menjadi kitosan yang memiliki banyak manfaat dalam berbagai bidang. Uraian aplikasi dari

kitin deasitilase yaitu melibatkan enzim kitin deasitilase (EC. 3.5.1.4.1) yang menghasilkan kitosan. Selanjutnya enzim kitosanase menghidrolisis ikatan 1,4-β-glikosida pada kitosan menghasilkan kitobiosa, kemudian dihidrolisis lebih lanjut oleh glukosaminidase yang kemudian menjadi glukosamin (Natsir, 2010). seperti yang terlihat pada Gambar 4.

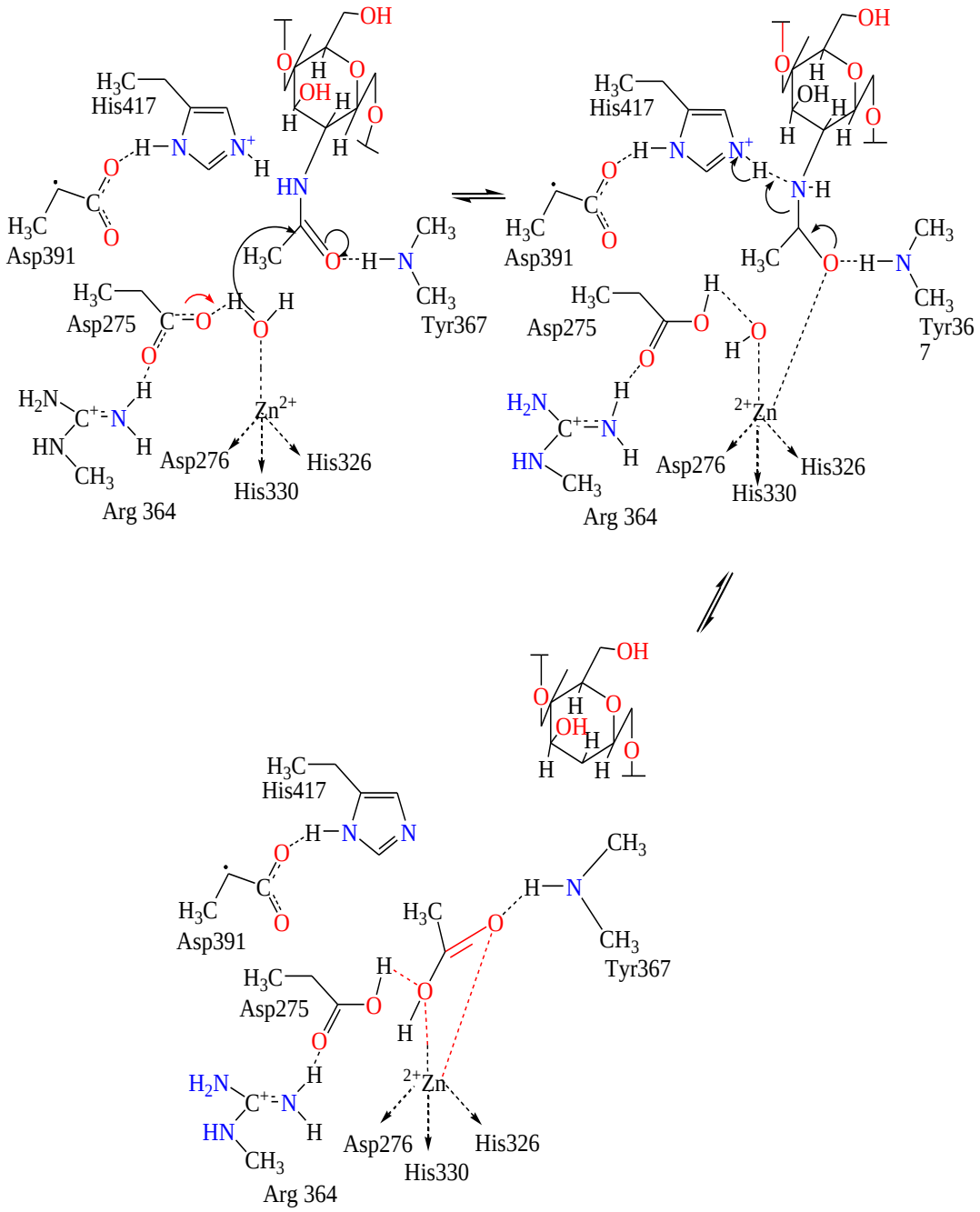


Gambar 4. Jalur degradasi kitin oleh mikroba (Gooday, 1990 dalan Natsir 2010)
Keterangan:

$(GlcNac)_2$ = Diasetil kitobiosa
GlcNac = N-asetil glukosamin
$(GlcN)_2$ = Kitobiosa
GlcN = Glukosamin

2.6 Enzim Kitin Deasetilase Termostabil

Kitin deasetilase adalah enzim yang aktif mengkatalisis degradasi kitin. Kitin deasetilase menghidrolisis kitin menjadi produk yang mempunyai daya guna yang lebih tinggi seperti kitosan (Nasran dkk., 2003). Enzim termostabil, karena manfaat biokonversinya, telah banyak dipergunakan untuk keperluan industri. Secara umum mekanisme katalisis gugus asetil pada kitin oleh kitin deasetilase dapat dilihat pada Gambar 5.



Gambar 5. Mekanisme Katalisis gugus asetil pada kitin oleh kitin dasetilase (Blair dkk., 2005).

Pada proses katalisis gugus asetil pada kitin oleh kitin deasetilase akan mengkatalisis penghilangan gugus N-asetil dengan mengikat molekul air pada seng yang terikat erat. Asp275 mengabstraksi protein dan molekul air yang menciptakan nukleofil untuk menyerang karbon dalam substrat untuk menghasilkan zat antara

oksanion tetrahedral. Muatan pada perantara ini distabilkan oleh logam dan nitrogen Tyr367. His417 kemudian memprotonasi zat antara ini pada nitrogen lalu menghasilkan amina bebas dan juga produk asetat pada seng seperti yang dapat dilihat pada struktur.

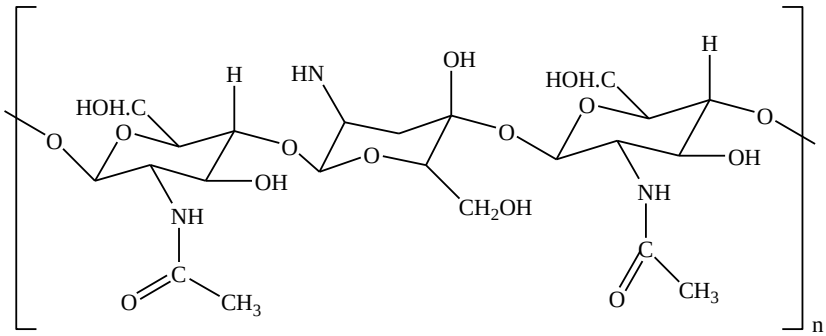
2.7 Tinjauan Umum Kitin

Kitin berasal dari bahasa yunani (*khiton*), yang berarti baju rantai dari besi karena sesuai dengan fungsinya sebagai jaket pelindung untuk hewan-hewan golongan invertebrata. Kitin pertama kali diteliti oleh H. Bracconot (1811) dalam residu ekstrak jamur yang dinamakan fungi. Pada tahun 1823 Odins mengisolasi suatu senyawa kutikula serangga sejenis ekstra yang disebut dengan nama kitin (Marganof, 2003).

Kitin dapat dibuat dalam berbagai bentuk yaitu serbuk, bubuk, larutan, gel, membran, serat, atau kapsul. Salah satu fungsi penting kitin adalah kemampuannya untuk menyerap ion logam. Strukturnya memungkinkan terjadinya pengompleksan sempurna dengan ion logam, khususnya pada logam transisi (Mudasir dkk., 2008).

Proses deasetilasi, kitin dapat dijadikan kitosan (Hasanela dkk., 2020). Kitin merupakan suatu molekul kompleks yang biasanya ditemukan pada hewan golongan krutasea seperti udang, lobster dan kepiting juga pada fungi dan jamur. Kitin merupakan polimer berantai lurus yang tersusun atas residu N-asetilglukosamina melalui ikatan β (1-4) dengan kuantitas atau persediaan yang sangat berlimpah dan merupakan biopolimer terbesar nomor dua di alam setelah selulosa. Tekhnologi yang tepat akan menghasilkan suatu limbah yang diproduksi oleh industri perikanan yang dapat diolah menjadi kitin beserta dengan turunannya (Setyahadi dkk., 2006).

Kitin tidak mampu berdiri sendiri tetapi bergabung dengan senyawa lain di alam. Asetilasi kitin seringkali tidak lengkap secara alami, sedangkan kitosan biasanya masih mengandung gugus asetil dengan kadar yang berbeda-beda. Oleh karena itu, kitin atau kitosan sebenarnya pada dasarnya adalah ko-polimer N-asetil-D-glukosamin dan D-Glukosamin. Derajat deasetilasi kitin biasanya kurang dari 10%. Secara umum derajat deasetilasi kitosan terdiri sekitar 60% dan sekitar 90% hingga 100% untuk kitosan yang mengalami deasetilasi penuh. Harga tersebut tergantung dari bahan baku kitin yang digunakan dan proses yang dilakukan (Suhardi, 1992). struktur kitin adalah sebagaimana ditunjukkan pada Gambar 6.



Gambar 6. Struktur kitin (Natsir, 2000)

Kitin memiliki ukuran molekul yang relatif besar dan kelarutan rendah, sulit diserap tubuh manusia, sehingga aplikasinya sangat terbatas dan menjadi sumber utama pencemaran senyawa organik. Sampai saat ini pengolahan limbah untuk mendapatkan kitin ada dua cara, yaitu pengolahan secara kimiawi dengan cara demineralisasi dan deproteinasi melalui penambahan asam atau basa kuat kemudian secara biokimia dengan cara dilakukan penambahan enzim proteolitik untuk deproteinasi dan juga melibatkan kitinase untuk mendegradasi suatu limbah kitin (Haliza dan Suhartono, 2012).

Salah satu kelemahan kitin adalah kelarutannya yang relatif rendah pada pH netral sehingga membuat adanya keterbatasan pada aplikasinya. Kelarutan yang rendah salah satunya disebabkan oleh besarnya molekul kitin. Depolimerasi merupakan upaya untuk memperbaiki suatu kelarutan dan juga sifat fungsional kitin (Prashanth dan Tharanathan, 2007). Agustina dkk (2015) telah mengisolasi kitin dari kulit udang yang diperoleh dari pasar Kebun Roek Ampenan kota Mataram dengan proses deimeralisasi dengan HCl 1,5 M dan deproteinasi dengan NaOH 3,5% serta disintesis menjadi kitosan sesuai dengan hasil karakterisasi kitosan sebagai berikut: rendemen transformasi kitin menjadi kitosan 67,08%, memiliki tekstur serbuk berwarna putih, tidak berbau, memiliki kadar air <10%, larut sempurna dalam asam asetat 2% dengan derajat deasetilasi sebesar 84,85%.

Sarwono (2010) telah melakukan penelitian mengenai pemanfaatan kitin sebagai bahan anti mikroba dengan proses deasetilasi menghasilkan kitosan. Dalam penelitiannya berbagai produk dapat dibuat dengan bahan campuran kitosan yang menjadikan teknologi pembuatan kitin mampu membantu perekonomian rakyat Indonesia yang banyak menghasilkan *shellfish* yang merupakan bahan baku dari kitin.

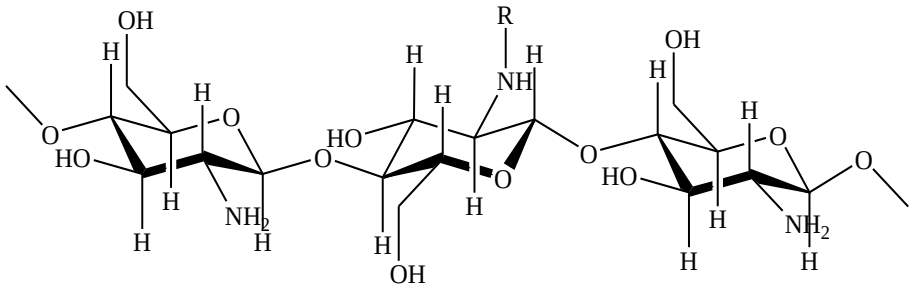
2.8 Kitosan

Kitosan dihasilkan oleh deasetilasi molekul basa N (nitrogen) parsial pada kitin, yang secara komersil diekstrak dari kulit udang dan kerang. Deasetilasi tersebut berlangsung secara enzimatis dibantu oleh kitin deasetilase. Kitin dan kitosan dapat diperoleh dari limbah hasil laut khususnya kelas krustease seperti udang, kepiting, ketam dan kerang (Nur'aini dan Apriyani., 2015).

Kitosan merupakan biomaterial yang masih terus dikembangkan hingga saat ini, karena terbukti tidak toksik, *biocompatibility*, dan *biodegrability* dibandingkan

dengan polimer lainnya, sehingga kitosan sangat berguna dalam bidang biomedis (Rasni, 2017). Kitosan dan modifikasinya telah dimanfaatkan secara komersial dalam industri pangan, kosmetika, pertanian, farmasi, kesehatan, penanganan limbah dan penjernihan air (Hasri, 2010). Kitosan berpotensi dijadikan antimikroba karena mengandung gugus aminopolisakarida yang dapat menghambat pertumbuhan mikroba (Wardaniati dkk., 2009). Berat molekul kitin umumnya sekitar 1.000.000 Da sementara kitosan 100.000 hingga 200.000 Da (Li dkk., 1992).

Bakteri kitinolitik yang mendegradasi kitin dan turunannya telah banyak diisolasi dari berbagai sumber seperti tanah, spons dan limbah udang dan rajungan. Sumber lain yang diduga potensial untuk isolasi bakteri kitinolitik adalah terasi yang merupakan produk fermentasi berbahan baku rebon. Zilda dkk (2006) telah megisolasi bakteri kitinolitik penghasil enzim kitosanase yang diperoleh dari hasil isolasi terasi. Struktur kitosan seperti ditunjukkan pada Gambar 7.



Gambar 7. Struktur kitosan (Natsir, 2000)