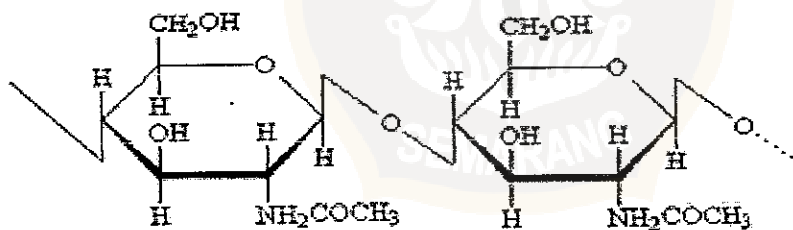


BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Senyawa Kitin

Kitin merupakan monomer dari (1,4)- β -N-asetil-D-glukosamin. Kitin juga merupakan komponen struktural berbagai jenis organisme dengan distribusi sangat luas. Kitin terdapat pada dinding sel fungi, pada prokariot (spora *Streptomyces* dan tangkai prostekat bakteri), protista dan pada invertebrata tetapi tidak ditemukan pada vertebrata (Gooday, 1990). Menurut Colwell *et al.*, (1984) kitin juga dapat ditemukan pada beberapa Molusca. Kitin juga ditemukan pada eksoskeleton dari anggota filum Arthropoda, seperti pada cangkang Crustacea, Insecta (kecoa, ulat sutera, kumbang), serta pada laba-laba. Rumus bangun kitin adalah sebagai berikut:

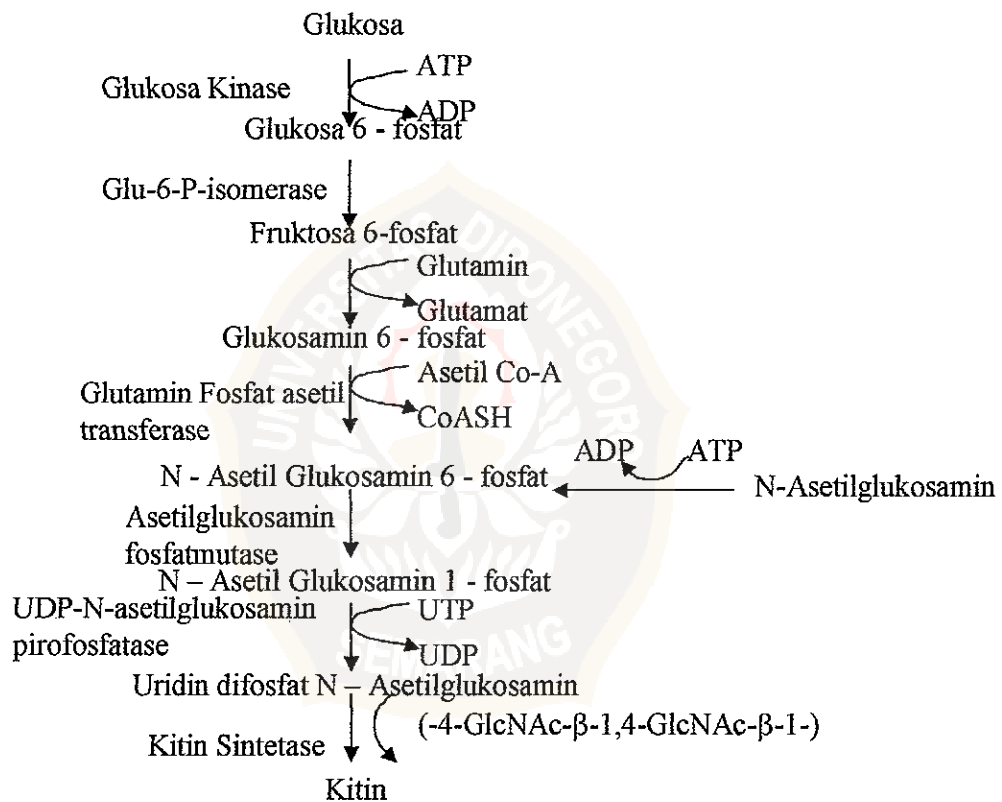


Gambar 01. Rumus bangun kitin (Gooday, 1990).

Menurut Blackwell dan Walton (1973), ada tiga macam bentuk kitin yang dibedakan berdasarkan susunan rantai molekulnya. Bentuk pertama yang paling banyak dijumpai adalah bentuk α kitin dengan rantai antiparalel antar monomernya, sangat kuat dan bersifat anhidrous (Ogawa dan Yui, 1994). Bentuk ini dijumpai pada Arthropoda dan fungi. Bentuk kedua adalah β kitin dengan

rantai paralel antar monomernya dengan bentuk kristal monoklinal, banyak dijumpai pada seta polichaeta dan pena *Loligo sp.* Bentuk ketiga adalah γ kitin yang memiliki ikatan campuran antara paralel dan anti paralel pada molekulnya dan dapat ditemukan pada garis perut *Loligo sp.*

Menurut Schelegel dan Schmidt (1994), kitin terbentuk dari selulosa dengan menggantikan gugus-gugus hidroksil pada atom C-2 glukosa dengan gugus amino yang terasetilasi.



Gambar 02. Biosintesis Kitin (Mensencal, 1991)

Menurut Roehig (1984), kitin dapat digunakan sebagai bahan pengikat pakan ternak dan bahan pengental dalam industri kosmetik. Di bidang medis, kitin

digunakan sebagai bahan penjahit jaringan, bahan pengobatan luka bakar, terapi infeksi oleh jamur, agen anti tumor, dan agen homeostatis.

2.2 Bakteri Kitinolitik

Menurut Gooday (1990), produksi kitin diperkirakan 10^{10} - 10^{11} ton pertahunnya, sehingga proses degradasi kitin merupakan hal yang penting untuk mencegah penimbunan karbon dan nitrogen secara global. Kitinase dapat diproduksi oleh beberapa bakteri dari gram positif dan gram negatif. Berbagai bakteri kitinolitik tersebut memproduksi kitinase untuk autolisis, morfogenesis, dan nutrisi.

Bakteri kitinolitik tersebar luas pada semua habitat yang produktif, seperti laut, air tawar, maupun tanah. Berbagai mikroorganisme dari kelompok bakteri yang dilaporkan mempunyai aktivitas kitinolitik dapat dilihat pada tabel 01.

Tabel 01. Genus Bakteri Penghasil Kitinase

No	Genus bakteri kitinolitik	Acuan
1	Streptomyces	Miyashita <i>et al.</i> , (1993); Okazaki <i>et al.</i> , (1995); Tsujibo <i>et al.</i> , (1995).
2	Bacillus	Mitzutomi, (1995); Sakai <i>et al.</i> , (1995).
3	Aeromonas	Ueda <i>et al.</i> , (1996), Wenuganen., (1997).
4	Serratia	Futch <i>et al.</i> , (1996); Krishnan <i>et al.</i> , (1999).
5	Enterobacter	Chernin <i>et al.</i> , (1995).
6	Pseudomonas	Wang <i>et al.</i> , (1997)
7	Arthrobacter	Okazaki <i>et al.</i> , (1999).
8	Vibrio	Svitil <i>et al.</i> , (1997).

(Pujiyanto, 1997)

2.3 Tinjauan Umum Enzim

Enzim merupakan biokatalisator, yang dalam jumlah sedikit mampu menyebabkan perubahan – perubahan yang berhubungan dengan proses seluler. Enzim mempunyai kemampuan mempercepat reaksi kimia dan tidak berubah setelah reaksi selesai. Enzim termasuk senyawa organik yang dihasilkan oleh sel – sel hidup yang terdiri dari protein murni atau gabungan antara protein dan gugus non protein (Pelczar dan Chan, 1986).

Menurut Poedjiadi (1994), fungsi utama dari enzim adalah sebagai katalis proses biokimia yang terjadi di dalam sel maupun di luar sel. Enzim dapat mempercepat reaksi 10^8 sampai 10^{11} kali lebih cepat daripada dilakukan tanpa katalis.

Ada dua tipe enzim menurut tempat sintesisnya yaitu, enzim intraseluler (endoenzim) dan enzim ekstraseluler (eksoenzim). Sintesis kedua enzim tersebut terjadi di dalam sel. Enzim intraseluler adalah enzim yang berfungsi di dalam sel untuk sintesis bahan seluler dan menguraikan nutrien untuk menyediakan energi yang dibutuhkan oleh sel. Enzim ekstraseluler adalah enzim yang berfungsi di luar sel, berfungsi melangsungkan perubahan – perubahan pada nutrien di sekitarnya sehingga memungkinkan nutrien tersebut memasuki sel (Pelczar dan Chan, 1986). Enzim ekstraseluler biasanya disekresikan oleh mikroorganisme tanah, misalnya khamir dan bakteri tanah (Priest, 1992).

Berdasarkan ada tidaknya substrat dan pembentukan enzim, maka enzim dibedakan menjadi dua tipe, yaitu enzim konstitutif dan enzim adaptif. Enzim konstitutif adalah enzim yang selalu dihasilkan oleh sel, sedangkan enzim adaptif

(terinduksi) adalah enzim yang dihasilkan oleh sel sebagai respon terhadap adanya substrat tertentu. Substrat atau senyawa yang strukturnya menyerupai substrat yang dapat menyebabkan proses pembentukan enzim (induksi enzim) disebut induser (Pelczar dan Chan, 1986).

Enzim dapat berupa protein murni atau gabungan antara protein dan gugus non protein. Protein enzim disebut apoenzim, sedangkan gugus non protein disebut kofaktor. Kofaktor ada dua macam, yaitu yang terikat kuat pada enzim disebut gugus prostetik, dan yang tidak terikat kuat pada enzim disebut sebagai koenzim (Pelczar dan Chan, 1986).

Enzim akan terdenaturasikan oleh panas, terpresipitasikan (terendapkan) oleh etanol atau garam – garam anorganik berkonsentrasi tinggi seperti amonium sulfat. Enzim juga tidak dapat melewati membran semi permeabel atau membran selektif (tidak terdialisis) (Pelczar dan Chan, 1986).

Menurut Poedjiadi (1994), aktivitas enzim dipengaruhi oleh beberapa faktor, yaitu konsentrasi enzim, konsentrasi substrat, pH, suhu dan inhibitor. Dalam penetapan aktivitas enzim secara kuantitatif, perlu diketahui mengenai sifat reaksi yang dikatalisis, konsentrasi substrat, pH optimum, suhu optimum dan metoda analisis untuk menentukan lenyapnya substrat atau munculnya produk - produk reaksi (Pelczar dan Chan, 1986). Uji aktivitas enzim secara kuantitatif dinyatakan dalam unit enzim. Unit enzim adalah serangkaian enzim yang mengkatalisis transformasi satu mikromol substrat setiap menit pada temperatur, konsentrasi substrat, dan pH tertentu unit (U)/mL substrat/menit (Parker, 1986).

Aktivitas enzim biasanya digunakan untuk menggambarkan banyak enzim yang berperan dalam suatu reaksi. Metode spektrofotometri dapat digunakan untuk menentukan aktivitas enzim. Pada metode ini, tiap senyawa mampu menyerap cahaya secara maksimum pada panjang gelombang cahaya tertentu. Penyerapan cahaya menyebabkan intensitas cahaya pada panjang gelombang tersebut akan berkurang, sehingga cahaya yang keluar dari kuvet spektrofotometer yang mengandung larutan senyawa tersebut juga berkurang. Menurut hukum Beer - Lambert, penurunan intensitas cahaya atau disebut "Optical Density" (OD) berbanding lurus dengan konsentrasi senyawa yang menyerap cahaya. Pengukuran ini dilakukan dengan alat spektrofotometer yang menggunakan absorpsi atau serapan cahaya pada panjang gelombang tertentu (Sadikin, 2002).

2.4 Faktor yang Mempengaruhi Produksi Enzim

Produksi enzim memerlukan sejumlah besar nutrisi, baik untuk biosintesis maupun untuk pertumbuhan sel. Faktor – faktor yang mempengaruhi produksi enzim diantaranya; kebutuhan akan nutrisi, nitrogen, suhu inkubasi, pH medium, agitasi dan lama waktu fermentasi.

1. Sumber Nutrien

Nutrien yang dipergunakan untuk produksi enzim harus memenuhi persyaratan yang diperlukan untuk memperoleh energi membentuk biomassa sel dan hasil metabolit.

Mikroorganisme memerlukan sejumlah nutrisi untuk keperluan pertumbuhan dan produksi enzim. Pada dasarnya media tersebut mengandung

senyawa-senyawa sebagai sumber karbon, nitrogen, vitamin dan mineral (Moat dan Foster, 1995).

Menurut Brock dan Madigan (1994), sumber karbon dan senyawa-senyawa lain yang diperlukan sebagai pemacu produksi enzim dikenal dengan induser. Enzim yang bersifat induser dalam pengaturan sintesis enzim adalah menginaktifkan protein represor yang akan terikat pada gen operator yang menghambat proses transkripsi (Mayes *et al.*, 1987; Pelczar and Chan, 1986).

2. Sumber Nitrogen

Sumber nitrogen dapat diserap dalam bentuk anorganik atau organik. Sumber anorganik antara lain $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NH_4NO_3 , $(\text{NH}_4)_3\text{PO}_4$, NH_4Cl dan KNO_3 dan nitrogen organik berupa urea. Sumber nitrogen ini akan digunakan untuk pembentukan asam amino dan protein (Brock dan Madigan, 1994).

3. Suhu Inkubasi

Suhu merupakan salah satu faktor yang dapat mempengaruhi pertumbuhan, perbanyakan dan daya hidup mikroorganisme. Moat dan Foster (1995), menyatakan suhu mempengaruhi sintesis enzim. Suhu optimum untuk sintesis enzim tidak perlu sama dengan suhu optimum untuk pertumbuhan mikroorganisme. Brock dan Madigan (1994), melaporkan bahwa suhu inkubasi akan mempengaruhi aktivitas metabolisme sel dan sistem reaksi enzim yang bekerja didalamnya.

4. Kadar Ion Hidrogen (pH)

Setiap mikroorganisme mempunyai kisaran pH untuk pertumbuhannya. Menurut Moat dan Foster (1979), pH akan berpengaruh terhadap aktivitas enzim yang mengkatalisis reaksi-reaksi biokimia dalam sel dan berpengaruh juga terhadap permeabilitas membran sel. Enzim terdiri dari gugus yang bisa mengalami ionisasi sehingga pH medium akan mempengaruhi struktur dan fungsinya. Pertumbuhan sel mikroorganisme juga dipengaruhi oleh pH dan banyak kasus pH optimum dari kecepatan spesifik maksimum mikroorganisme berbeda dengan kestabilan pH enzim ekstraseluler (Brock dan Madigan, 1994).

5. Agitasi

Menurut Brock dan Madigan (1994), agitasi (pengadukan) pada proses fermentasi menyebabkan larutan media tetap dalam keadaan homogen. Pada kultur mikroorganisme biasanya oksigen diberikan dalam bentuk udara. Cara suplai oksigen bervariasi tergantung dari skala prosesnya. Dalam skala laboratorium biasanya menggunakan erlenmeyer yang volumenya 250 – 500 ml dan diisi dengan 50 – 100 ml kultur kemudian digojog dalam kondisi tertentu .

6. Lama Waktu Inkubasi

Bakteri yang ditumbuhkan pada media yang mengandung kitin sebagai sumber karbon, dimungkinkan akan mampu menghasilkan kitinase. Enzim yang dihasilkan ini digolongkan sebagai metabolit primer. Metabolit primer biasanya akan dibentuk pada fase pertumbuhan logaritmik (tropofase) dan berperan penting dalam penyusunan makromolekul esensial maupun enzim. Pada fase pertumbuhan

logaritmik akan terjadi pertumbuhan sel dengan cepat dan produksi enzim akan cepat memasuki fase stasioner (Brock dan Madigan, 1994).

2.5 Enzim Kitinase

Enzim kitinase merupakan enzim yang mengkatalisis reaksi ikatan β -1,4-glikosidik yang terdapat pada kitin. Substrat yang dapat dihidrolisis oleh enzim kitinase meliputi kitin (kitosan terasetilasi, koloid, glikol-kitin), kitosan, kitooligosakarida, diasetilkitobiosa. Produk yang dihasilkan dari reaksi hidrolisis substrat dapat berupa kitooligasakarida meliputi diasetilkitobiosa, kititriosa, kitotetraosa, dan N-asetil glukosamin (Schomburg dan Salzmann, 1991).

Gooday (1990) menyatakan lintasan perombakan kitin yang belum diketahui disebut kitinoklastik, sedangkan jika lintasan tersebut melibatkan hidrolisis ikatan β (1,4) glikosida, maka prosesnya disebut kitinolitik. Hidrolisis ikatan ini dilakukan oleh enzim kitinase. Eksokitinase memecah bagian diasetilkitobiosa dari ujung non reduksi dari suatu rantai kitin, sedangkan endokitinase memecah bagian ikatan glikosida rantai kitin secara acak dan menghasilkan diasetilkitobiosa sebagai hasil utama yang bersama-sama dengan triasetil kitobiosa akan dirombak secara perlahan menjadi disakarida dan monosakarida.

Tidak terdapat perbedaan yang cukup jelas antara aktivitas endo dan ekso kitinase dan siklus hidrolisisnya sangat tergantung pada keadaan substrat. Sebagai contoh, kristal β kitin murni dari spina diatom hanya terdegradasi dari ujung oleh kitinase *Streptomyces* dengan hanya membebaskan diasetilkitobiosa, sementara

koloidal kitin didegradasi menjadi oligomer dan disakarida. Dasetil kitobiosa (sering disebut kitobiosa) dihidrolisis menjadi N-asetilglukosamin oleh β -N-asetilglukosaminidase menjadi N-asetil glukosamin. Beberapa β -N-asetilglukosamidase dapat memiliki aktivitas eksokitinase, memotong unit monosakarida dari ujung non reduksi suatu rantai kitin. Dasetil kitobiosa dan N-asetil glukosamin selanjutnya diangkut ke dalam sel. Metabolisme lebih lanjut dari N-asetil glukosamin dapat melalui fosforilasi menjadi N-asetil-glukosamin-6-fosfat, atau melalui deasetilasi menjadi glukosamin, disusul dengan proses deaminasi (Wenuganen, 1997).

Menurut Wenuganen (1997), lintasan alternatif degradasi kitin adalah melibatkan deasetilasi kitin menjadi kitosan. Lintasan ini penting pada lingkungan-lingkungan yang mengandung sejumlah kitosan pada sedimen perairan. Kitosanase dapat menghidrolisis ikatan β -(1,4) menghasilkan kitobiosa, dan kitobiosa dihidrolisis menjadi glukosamin oleh glukosaminidase.

Sifat fisik dan kimia, serta mekanisme reaksi enzimatik yang terjadi untuk enzim kitinase berbeda-beda untuk tiap makhluk hidup yang mensintesisnya. Hal ini terjadi karena masing-masing kitinase memiliki peran metabolik yang berbeda (Kondo *et al*, 2002).

Menurut Rout *et al* (1999), aktivitas kitinase (unit) didefinisikan sebagai jumlah mikromol N-asetil glukosamin yang dihasilkan per 1 ml supernatan per jam. Tingkat aktivitas kitinase yang dihasilkan oleh masing-masing organisme berbeda-beda. Kitinase yang diproduksi oleh mikroorganisme, produksi dan aktivitas filtrat enzim dipengaruhi oleh pH, suhu, jenis organisme dan keberadaan

kitin sebagai induser enzim (Rout *et al.*, 1999). Menurut Schomburg dan Salzmann (1991), aktivitas katalitik enzim kitinase dapat dihambat oleh inhibitor antara lain allosamidin, histimidin, arsenat, fosfat, tripsin, Fe^{2+} , Sn^{2+} , Mg^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , KCN, Mn^{2+} , Zn^{2+} , dan Ca^{2+} .

2.6 Biosintesis Enzim

Biosintesis enzim dalam sel sangat diperlukan untuk berlangsungnya suatu kehidupan. Enzim merupakan biokatalisator yang mengendalikan reaksi - reaksi kimia di dalam sel. Enzim yang memecah makromolekul pada umumnya bersifat ekstraseluler, yaitu enzim - enzim yang diproduksi dari dalam sel dan akan disekresikan ke luar sel. Enzim ini akan menghidrolisis makromolekul menjadi komponen yang lebih kecil sehingga dapat masuk ke dalam sel.

Berdasarkan proses pembentukan enzim dapat dibedakan antara enzim konstitutif dan induktif. Enzim konstitutif adalah enzim yang selalu dihasilkan sel tanpa dipengaruhi oleh substrat yang digunakan. Enzim induktif adalah enzim yang diproduksi oleh sel bila ada substrat yang sesuai. Suatu senyawa yang menginduksi pembentukan enzim ini dikenal sebagai induser. Adanya induser yang ditambahkan dalam media akan mengikat protein represor dan menyebabkan tidak aktif, sehingga sintesis enzim dapat berlangsung (Brock and Madigan, 1994).

Menurut Brock dan Madigan (1994), selain adanya induksi, pengaturan biosintesis enzim ekstraseluler dipengaruhi oleh jumlah katabolit yang terdapat dalam media pertumbuhan dan dikenal sebagai represi katabolit. Disamping

senyawa hasil akhir yang tidak dapat dimetabolisme oleh sistem yang bersangkutan, glukosa atau gula sejenis juga dapat menghambat sintesis enzim tertentu.

2.7 Potensi Mikroorganisme Kitinolitik

Berbagai laporan menyebutkan bahwa organisme penghasil kitinase sangat potensial digunakan dalam bidang pertanian sebagai agen biokontrol yang efektif terhadap sejumlah fungi fitopatogenik. Panda (1999) menyebutkan bahwa kitinase dari *Trichoderma harzianum* terbukti aktif untuk melawan secara luas fungi tanah patogen. *Aeromonas caviae* digunakan untuk mengontrol serangan *Rhizoctonia solani* dan *Fusarium oxysporum* pada kapas dan *Sclerotium rolfsii* pada buncis. Kitinase yang dihasilkan oleh *Serratia marcescens* juga efektif untuk melawan fungi patogen *S. rolfsii*. Filtrat kultur *Aphanicladium* terbukti menghambat pertumbuhan *Necteria haematococca* yang menyerang kapri. Di samping digunakan untuk mengendalikan fungi patogen, kitinase yang dihasilkan *S. marcescens* juga efektif melawan larva *Galleria mellonella*.

Menurut Panda (1999), selain berguna dalam biokontrol terhadap beberapa patogen tanaman, organisme penghasil kitinase juga efektif digunakan dalam proses biokonversi limbah dengan kandungan kitin tinggi menjadi produk-produk yang lebih berguna. Di samping itu, dalam bidang farmasi, aplikasi enzim kitinase juga sangat potensial. Hidrolisis kitin oleh kitinase menghasilkan N-asetil glukosamin yang dapat dikonversi menjadi hexa-N-asetil kitobiosa, suatu oligosakarida yang memiliki aktivitas anti tumor. Di bidang medis, kitinase

digunakan untuk terapi penyakit-penyakit yang disebabkan oleh fungi. Dalam bidang rekayasa genetika fungi, kitinase digunakan untuk preparasi protoplas.

2.8 Enzim Termostabil

Menurut Hartiko (1994), enzim termostabil adalah enzim yang memiliki waktu paruh lebih besar daripada enzim-enzim yang dihasilkan oleh mikroorganisme mesofilik setelah diperlakukan suhu 50° C dalam waktu yang ditentukan.

Dengan data waktu paruh maka mudah ditentukan :

1. Bilamana enzim imobil harus diganti
2. Sampai setinggi berapa suhu operasional diberlakukan
3. Industri penghasil enzim dapat mengetahui umur simpan produk enzim
4. Dapat dibandingkan sifat termostabilitas enzim-enzim yang sama tetapi dari sumber yang berbeda (Hartiko, 1994).

Enzim termostabil dari mikroorganisme termofilik memiliki kecepatan reaksi yang tidak berbeda dengan enzim yang sama dari mikroorganisme mesofilik, walaupun reaksi berlangsung pada suhu yang lebih tinggi menyebabkan reaksi berlangsung lebih cepat. Hal ini dapat dipahami bahwa mikroorganisme termofilik yang telah optimal pada suhu lebih tinggi memang tidak harus memerlukan reaksi berlangsung lebih cepat. Enzim yang dihasilkan oleh mikroorganisme mesofilik umumnya memberikan reaksi yang lebih tinggi pada suhu reaksi yang lebih tinggi. Enzim termostabil dapat dimanfaatkan pada bidang-bidang industri seperti terlihat pada Tabel 01 (Hartiko, 1994).

Tabel 02. Pemanfaatan Enzim Termostabil

Enzim	Suhu Kerja (° C)	Aplikasi Utama
Amilase	90-110	Hidrolisis amilum, peragian, industri roti, detergen
Glukoamilase	50-60	Hidrolisis maltodekstrin
Pulunase	50-60	Sirup glukosa
Isomerase xilosa	45-55	Sirup fruktosa
Pektinase	20-50	Penjernihan cairan anggur
Selulase	45-55	Hidrolisis selulosa
Laktase	30-50	Hidrolisis laktosa, pengolahan bahan makanan

(Hartiko, 1994).

Penggunaan enzim termostabil pada suhu tinggi akan menguntungkan dalam hal menaikkan transfer massa dan mengurangi viskositas. Disamping itu enzim termostabil dapat digunakan untuk reaksi biokonversi pada suhu tinggi tanpa kekhawatiran berlangsungnya denaturasi maupun kontaminasi oleh mikroorganisme lain (Hartiko, 1994).

2.9 Hipotesis

Biosintesis enzim kitinase pada mikroorganisme membutuhkan kitin sebagai induser enzim. Kitin diduga banyak terdapat dalam sampel yang digunakan dalam penelitian sehingga isolasi bakteri dari sampel ini diharapkan mampu mendapatkan isolat bakteri kitinolitik. Inkubasi pada suhu tinggi yang berbeda diharapkan dapat memperoleh bakteri kitinolitik termotoleran penghasil enzim termostabil.