



TUGAS AKHIR - SB141510

PRODUKSI KITIN DEASETILASE OLEH *Bacillus* sp. SK II-5

QINTAN ISTIGHFARIN ATMAJA

1511 100 007

Dosen Pembimbing

Dr. techn. Endry Nugroho Prasetyo, MT.

JURUSAN BIOLOGI

Fakultas Matematika Dan Ilmu Pengetahuan Alam

Institut Teknologi Sepuluh Nopember

Surabaya 2015

“Halaman ini sengaja dikosongkan”



FINAL PROJECT - SB141510

CHITIN DEACETYLASE PRODUCTION BY NEWLY THERMOPHILIC ISOLATE *Bacillus* sp. SK II-5

QINTAN ISTIGHFARIN ATMAJA

1511 100 007

Advisor Lecturer

Dr. techn. Endry Nugroho Prasetyo, MT.

DEPARTMENT OF BIOLOGY

Faculty of Mathematic and Natural Science

Institut Teknologi Sepuluh Nopember

Surabaya 2015

“Halaman ini sengaja dikosongkan”

LEMBAR PENGESAHAN

PRODUKSI KITIN DEASETILASE OLEH

Bacillus sp. SK II-5

TUGAS AKHIR

Diajukan Untuk Memenuhi Salah Satu Syarat Memperoleh Gelar
Sarjana Sains -

Pada

Jurusan S-1 Biologi

Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

Institut Teknologi Sepuluh Nopember

Oleh:

QINTAN ISTIGHFARIN ATMAJA

NRP. 1511 100 007

Disetujui oleh Pembimbing Tugas Akhir

Dr. techn. Endry Nugroho P, S.Si, M.T. (Pembimbing 1)

Surabaya, 17 Juni 2015

Mengetahui,
Ketua Jurusan Biologi



Dr. rer. nat. Ir. Maya Shovitri, M.Si.
NIP. 19690907 199803 2 001

PRODUKSI KITIN DEASETILASE OLEH
Bacillus sp. SK II-5

Nama Mahasiswa : Quintan Istighfarin Atmaja
NRP : 1511100007
Jurusan : Biologi
Dosen Pembimbing : Dr. techn. Endry Nugroho P, MT.

Abstrak

Kitosan adalah produk deasetilasi kitin yang mempunyai banyak manfaat di berbagai bidang. Namun, selama ini solubilisasi kitin menjadi kitosan dilakukan melalui proses secara kimiawi yang tidak ramah lingkungan. Permasalahan dalam penelitian ini adalah bagaimana mengoptimalkan produksi kitin deasetilase sebagai agen biologi solubilisasi kitin oleh bakteri Bacillus sp. SK II-5 dengan memanfaatkan limbah perikanan.

Pada penelitian ini dilakukan optimasi produksi kitin deasetilase pada suhu, pH dan medium produksi enzim. Kandungan protein diukur berdasarkan metode Bradford dengan BSA (Bovine Serum Albumin) sebagai standar. Serta dilakukan purifikasi enzim dengan metode presipitasi ammonium sulfat bertingkat kemudian protein kitin deasetilase dikarakterisasi dengan pengukuran terhadap titik isoelektrik, aktivitas enzim, kandungan protein dan elektroforesis SDS-PAGE.

Hasil penelitian diperoleh aktivitas enzim paling optimum dihasilkan dari kombinasi medium kulit udang sebagai sumber karbon, pH 7 dan inkubasi pada suhu 60°C dengan aktivitas enzim tertinggi hasil purifikasi amonium sulfat pada fraksi 60-75% sebesar 969,14 U/ml dengan kandungan protein 0,0024 mg/ml. Kitin deasetilase dari Bacillus sp. SK II-5 memiliki titik isoelektrik pada pH 5 dan berat molekul 45 kDa

Kata kunci : Bacillus sp. SK II-5, Kitin Deasetilase, Karakterisasi Enzim, Optimasi Produksi

“Halaman ini sengaja dikosongkan”

PRODUCTION CHITIN DEACETYLASE BY
Bacillus sp. SK II-5

Name : Quintan Istighfarin Atmaja
NRP : 1511100007
Department : Biologi
Advisor Lecturer : Dr. techn. Endry Nugroho P, MT.

Abstract

Chitosan is a product of deacetylation chitin which has many benefits in various fields. Solubilization of chitin into chitosan has been done through chemical process which is harmful to the environment. The current study approaches the problem through green technology in which chitin deacetylase is optimized by *Bacillus* sp. SK II-5 as biological agent of chitin solubilization.

The production optimization of chitin deacetylase conducted in this study include the temperature, pH and enriched medium. The protein content was measured by Bradford method with BSA (Bovine Serum Albumin) as standard. The enzyme was purified by ammonium sulfate precipitation and characterized by measuring the isoelectrical point, enzyme activity, protein content and molecular weight.

Optimum enzyme activity was achieved through combination of medium shrimp shells as the carbon source with pH 7 at 60°C. with the highest enzyme activity results of purification of ammonium sulfate at 60-75% fraction of 0.00528 U / ml with a protein content of 0.0024 mg / ml. Chitin deacetylase from *Bacillus* sp SK II-5 has an isoelectric point at pH 5 and molecular weight 45 kDa

Key word : *Bacillus* sp. SK II-5, Chitin Deacetylase, Enzyme Characterization, Optimization Production

“Halaman ini sengaja dikosongkan”

KATA PENGANTAR

Assalamu`alaikum Wr. Wb

Alhamdulillah, puji syukur kehadirat Allah SWT serta junjungan kita, Nabi Muhammad SAW atas segala rahmat serta hidayah-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan tugas akhir yang berjudul **Produksi Kitin Deasetilase Oleh *Bacillus* sp. SK II-5.**

Dalam penyusunan Tugas Akhir ini penulis tentunya telah mendapat banyak masukan, motivasi, saran dan bimbingan dari berbagai pihak yang sangat berguna dan bermanfaat. Oleh karena itu dengan rendah hati penulis ucapkan terima kasih kepada :

1. Ibu Dr.rer.nat. Maya Shovitri, M.Si. sebagai Ketua Jurusan Biologi FMIPA ITS.
2. Bapak Dr. techn. Endry Nugroho Prasetyo, MT selaku dosen pembimbing Tugas Akhir untuk dorongan, ilmu, bimbingan dan semangatnya,
3. Ibu Wirdhatul Muslihatin, S.Si., M.Si dan Ibu Nur Hidayatul Alami, S.Si., M.Si selaku dosen penguji atas saran dan bimbingannya. Serta kepada Ibu Maharani Pertiwi Koentjoro, S.Si., M. Biotech yang telah member masukan berupa judul dan bimbingannya.
4. Abi Guntur Tri Atmodjo, Umi Siti Rochmatun dan adik Elva Faizati Atmaja atas segala doa restu, kasih sayang dan semangatnya,
5. Keluarga besar angkatan 2011 *Scylla serrata* Biologi ITS dan Paguyuban Beasiswa Karya Salemba Empat ITS.
6. Keluarga *Biomaterial and Enzyme Research Group* (Shabrina, Mayang, Risanda, Jay, Citra, Nivi, Qorip, dan Laras) atas segala semangat, doa dan kerja kerasnya.
7. Rekan-rekan yang tidak dapat disebutkan satu per satu.

Semoga ke depan penelitian ini tidak berhenti disini saja tetapi dapat bermanfaat bagi penulis khususnya dan masyarakat pada

umumnya. Kesempurnaan hanya milik yang Allah SWT, kekurangan hanya milik kita.

Wassalamu`alaikum Wr. Wb.

Qintan Istighfarin Atmaja

DAFTAR ISI

Halaman

HALAMAN JUDUL.....	i
LEMBAR PENGESAHAN.....	v
ABSTRAK.....	vii
ABSTRACT.....	ix
KATA PENGANTAR.....	xi
DAFTAR ISI.....	xiii
DAFTAR GAMBAR.....	xv
DAFTAR LAMPIRAN.....	xvii
BAB I PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	2
1.3 Batasan Masalah.....	2
1.4 Tujuan.....	3
1.5 Manfaat.....	3
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 Organisme Kitinolitik.....	5
2.2 <i>Bacillus</i> sp.....	5
2.3 Kitin.....	6
2.4 Kitosan.....	7
2.5 Enzim Kitinolitik.....	9
2.5.1 Kitin Deasetilase.....	9
2.5.2 Kitinase.....	10
2.6 Faktor yang Mempengaruhi Aktivitas Enzim.....	10
2.7 Faktor yang Mempengaruhi Produksi Enzim.....	11
2.8 Metode Taguchi.....	12
BAB III METODOLOGI	
3.1 Waktu dan Tempat Penelitian.....	15
3.2 Metode yang Digunakan.....	15
3.2.1 Persiapan Media.....	15

3.2.1.1	Persiapan Media Kultur	15
3.2.1.2	Persiapan Media Aklimatisasi	16
3.2.1.3	Persiapan Media Fermentasi	17
3.2.2	Peremajaan Isolat <i>Bacillus</i> sp. SK II-5	17
3.2.3	Kurva Pertumbuhan	17
3.2.4	Persiapan Starter	18
3.2.5	Optimasi Suhu, PH dan Substrat Medium Kitin	18
3.2.6	Isolasi dan Produksi Kitin Deasetilase	19
3.2.7	Purifikasi Kitin Deasetilase	
3.2.7.1	Presipitasi Protein Enzim dengan Amonium Sulfat	19
3.2.8	Uji Aktivitas Kitin Deasetilase	21
3.2.9	Uji Kandungan Protein	21
3.2.9.1	Uji Bradford	21
3.2.10	Karakterisasi Protein Kitin Deasetilase	22
3.2.10.1	Titik Isoelektrik	22
3.2.10.2	Analisis Elektroforesis SDS-PAGE	23
3.3	Rancangan Penelitian dan Analisa Data	24
3.3.1	Metode Taguchi	24
 BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN		
4.1	Kurva Pertumbuhan <i>Bacillus</i> sp. SK II-5	25
4.2	Optimasi Produksi Enzim	26
4.3	Purifikasi dan Karakterisasi Kitin Deasetilase	28
 BAB V KESIMPULAN DAN SARAN		
5.1	Kesimpulan	31
5.2	Saran	31
 DAFTAR PUSTAKA		
		33
 DAFTAR LAMPIRAN		
		43
 BIODATA PENULIS		
		53

DAFTAR GAMBAR

		Halaman
Gambar 2.1	Struktur Kitin.....	7
Gambar 2.2	Diagram Alir Sintesis Kitosan Di Alam.....	8
Gambar 2.3	Mekanisme Kitinolitik Oleh Kitin Deasetilase.....	9
Gambar 3.1	Optimasi Produksi Kitin Deasetilase.....	18
Gambar 4.1	Kurva Pertumbuhan <i>Bacillus</i> sp. SK II-5.....	25
Gambar 4.2	Hasil Optimasi Produksi Kitin Deasetilase.....	26
Gambar 4.3	Kandungan Protein Dan Aktivitas Kitin Deasetilase pada Tiap Fraksi Pemurnian Amonium Sulfat.....	28
Gambar 4.4	Titik isoelektrik kitin deasetilase.....	29
Gambar 4.5	Elektroforesis SDS PAGE.....	29

“Halaman Ini Sengaja Dikosongkan”

BAB I PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Limbah padat perikanan yang umumnya terdiri dari cangkang kepiting dan kulit udang banyak mengandung kitin yang merupakan polimer penyusun dinding sel *Zygomycetes* dan *Crustacea* (Prameela *et al.*, 2010; Arbia *et al.*, 2013; Dong Gao *et al.*, 1995; Galed *et al.*, 2005). Kitin terdiri dari monomer-monomer sakarida N-asetilglukosamin dengan ikatan β -1,4-glikosidik (Sharp, 2013) dan apabila atom nomor 2 pada gugus asetil dimodifikasi akan menghasilkan kitosan. Kitosan lebih mudah di aplikasikan dibanding kitin pada industri farmasi, biokimia, bioteknologi, biomedikal, pangan, kertas, tekstil, pertanian dan kesehatan karena sifatnya yang mudah larut dalam pelarut asam (Raval *et al.*, 2013; Choi *et al.*, 2004; Darmawan, 2007).

Secara aplikasi, metode konversi kitin menjadi kitosan dilakukan dengan cara deproteinisasi (NaOH 4%) dan demineralisasi (HCl 4%) (Arbia *et al.*, 2013). Tetapi, metode kimiawi tersebut dapat mereduksi jumlah polimer kitin yang terdapat di kulit udang dan cangkang kepiting (Bhaskar *et al.*, 2007). Solusi alternatif pengolahan kitin yang lebih efisien yaitu dengan metode fermentasi bakteri asam laktat dan kelompok *Vibrionacea* (Prameela *et al.*, 2010; Hunt *et al.*, 2007). Selain itu juga dikembangkan teknologi enzimatik kitin deasetilase yang diproduksi oleh fungi *Colletotrichum lindemuthianum* (Tsigos *et al.*, 1995), *Serratia* sp. (Kaur *et al.*, 2012) dan *Bacillus* sp. (Mathur *et al.*, 2011).

Kitin deasetilase adalah glikoprotein dengan masa molekuler 24-150 kDa, memiliki aktivitas enzim optimum pada suhu 50°C dan pH optimumnya berkisar 4,5 - 8,5 (Jeraj *et al.*, 2006). Kitin deasetilase pertama kali di ekstrak dari dinding sel *Mucor rouxii* (Zhao *et al.*, 2010). Namun, kitin deasetilase yang diproduksi

oleh fungi memiliki produksi yang kecil karena proses pertumbuhannya yang lambat dan proses fermentasinya rumit.

Bacillus sp. memiliki potensi menghasilkan kitin deasetilase lebih efisien dibandingkan fungi karena kultivasinya lebih mudah dan pertumbuhannya lebih cepat (Kaur *et al.*, 2012). Produksi kitin deasetilase oleh *Bacillus* sp. dalam skala besar belum banyak dilakukan, sehingga dalam penelitian ini dilakukan optimasi produksi oleh *Bacillus* sp. SK II-5 dan karakterisasi kitin deasetilase yang memiliki aktivitas enzim yang tinggi dengan memanfaatkan limbah perikanan sebagai sumber karbon.

1.2 Rumusan Masalah

Kitosan adalah produk deasetilasi kitin yang mempunyai banyak manfaat di berbagai bidang. Namun, metode kimiawai yang digunakan untuk solubilisasi kitin menjadi kitosan tidak ramah lingkungan. Oleh karena itu perlu adanya agen hayati yang dapat digunakan untuk mengatasi permasalahan tersebut. Salah satu agen hayati yang memiliki aktivitas enzim kitin deasetilase tinggi adalah *Bacillus* sp. Sehingga dirumuskan permasalahan bagaimana mengoptimalkan produksi, karakterisasi, dan purifikasi kitin deasetilase oleh bakteri *Bacillus* sp. dengan memanfaatkan limbah perikanan.

1.3 Batasan Permasalahan

Batasan masalah dalam penelitian ini adalah :

- a. Bakteri yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Bacillus* sp. SK II-5 koleksi Laboratorium Mikrobiologi dan Bioteknologi, Jurusan Biologi, ITS.
- b. Produksi kitin deasetilase ditentukan dengan optimasi suhu, pH, dan medium.
- c. Karakterisasi enzim kitin deasetilase ditentukan menggunakan metode presipitasi protein bertingkat dengan ammonium sulfat, uji kadar total protein, titik isoelektrik dan berat molekul menggunakan SDS-PAGE.

- d. Medium fermentasi untuk produksi enzim kitin deasetilase berasal dari limbah perikanan yaitu cangkang kepiting dan kulit udang.

1.4 Tujuan

Tujuan dari penelitian ini adalah optimalisasi produksi, purifikasi, dan karakterisasi kitin deasetilase dari *Bacillus* sp. SK II-5 untuk solubilisasi limbah kulit udang dan cangkang kepiting.

1.5. Manfaat

Manfaat dari penelitian ini adalah memberikan metode alternatif untuk solubilisasi kitin menjadi kitosan dengan menggunakan teknologi enzim dan mengetahui karakteristik kitin deasetilase dari *Bacillus* sp. SK II-5.

“Halaman ini sengaja dikosongkan”

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Organisme kitinolitik

Kitin merupakan biopolimer terbesar kedua di dunia setelah selulosa yang bersifat tidak larut dalam air maupun sebagian besar pelarut organik. Sedangkan, kitosan yang disintesis dari kitin (biasanya berasal dari cangkang kepiting atau kulit udang) melalui proses deasetilasi secara kimiawi lebih banyak dimanfaatkan dalam bidang medis, kosmetik, dan pertanian karena memiliki sifat yang mudah larut dalam air serta lebih ramah lingkungan (Kaur *et al.*, 2012)

Beberapa enzim yang mampu mendegradasi kitin dihasilkan oleh berbagai macam mikroorganisme. Salah satunya yaitu enzim *Chitinase* yang mengkatalisis hidrolisis kitin menjadi monomer (NAG) dan oligomer oleh *Aeromonas hydrophila* (Halder *et al.*, 2013), *A. punctata* (Saima *et al.*, 2012), dan *Paenibacillus* sp. (De hui *et al.*, 2011). Enzim kitin deasetilase mengkonversi kitin menjadi kitosan dengan deasetilasi residu N-asetilglukosamin pada kitin oleh kelompok fungi yaitu *Mucor rouxii*, *Mortierella* sp. (Young-Ju *et al.*, 2008), *Colletotrichum lindemuthianum* (Tokuyasu *et al.*, 1999), *Rhizopus nigricans* (Jeraj *et al.*, 2006), dan kelompok mikroba yang terdiri dari *Bacillus* sp PT2-3 (Setyahadi *et al.*, 2006), *B. amyloliquefaciens* (Zhou *et al.*, 2010), dan *B. cereus* (Raval *et al.*, 2014).

2.2 *Bacillus* sp.

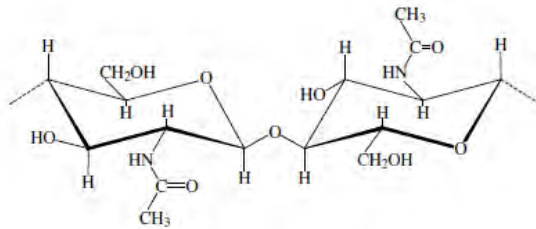
Bakteri dipercaya menjadi mediator utama dalam degradasi kitin di alam. Di tanah, laju hidrolisis kitin menunjukkan adanya korelasi dengan kelimpahan bakteri yang dipengaruhi oleh suhu, pH dan proses degradasinya (Beier *et al.*, 2013). Salah satu bakteri yang diketahui mempunyai kemampuan untuk degradasi kitin yaitu genus *Bacillus*. Gen *pdaA* pada *B. subtilis* diketahui mengkode protein enzim peptidoglikan deasetilase yang merupakan satu kelompok enzim dengan kitin deasetilase dari

famili karbohidrat esterase (Psylinakis *et al.*, 2005). Genus *Bacillus* dapat tumbuh dengan baik di berbagai macam sumber karbon (Madigan *et al.*, 2012). Salah satu sumber karbon yang dapat digunakan yaitu kitin. Penelitian mengenai optimasi medium yang dilakukan oleh He *et al.* (2013) disimpulkan bahwa *B. amyloliquefaciens* tumbuh paling baik pada medium yang mengandung kitin sebagai sumber karbon dibandingkan dengan pati, *yeast extract*, $MgSO_4$, K_2HPO_4 dan NaCl.

Genus *Bacillus* merupakan kelompok bakteri Gram-positif yang mensekresikan enzimnya ke luar sel sehingga disebut ekstraseluler enzim karena tidak melibatkan lisis sel dalam sekresi enzim (Okafor, 2007). Kitin deasetilase telah diisolasi dari *Bacillus* sp. asidofilik yang diisolasi dari kawah Kamojang, Jawa Barat, *B. stearothermophilus* dari Langoan, Sulawesi Utara dan *B. thermoleovorans* LW-4-11 dari Sulawesi Selatan yang dapat tumbuh pada suhu 70°C serta aktivitas kitin deasetilase yang tinggi. *B. thermoleovorans* LW-4-11 diketahui dapat memproduksi kitin deasetilase ekstraseluler pada suhu 80 °C (Toharisman *et al.*, 2008). Aktivitas enzim tersebut lebih besar daripada kitin deasetilase yang diproduksi oleh *Bacillus* sp. PT2-3 dari Pancuran Tujuh Baturaden, Jawa Tengah (Setyahadi *et al.*, 2006).

2.3 Kitin

Kitin adalah biopolimer yang terdiri atas unit D-*glucosamine* N-*acetyl* dengan ikatan β (1,4) gugus asam amino pada atom C nomor 2 dan gugus hidroksil pada atom C nomor 3 dan 6 pada kitosan (Patria, 2013). Kitin banyak ditemukan di kulit udang, cangkang kepiting, dinding sel fungi dan alga (De Hui *et al.*, 2011) Karena tingginya kandungan kekristalannya, kitin menjadi tidak mudah larut dalam pelarut organik (Tsigos *et al.*, 2000).



Gambar 2.1 Struktur Kitin (Dutta *et al.*, 2004).

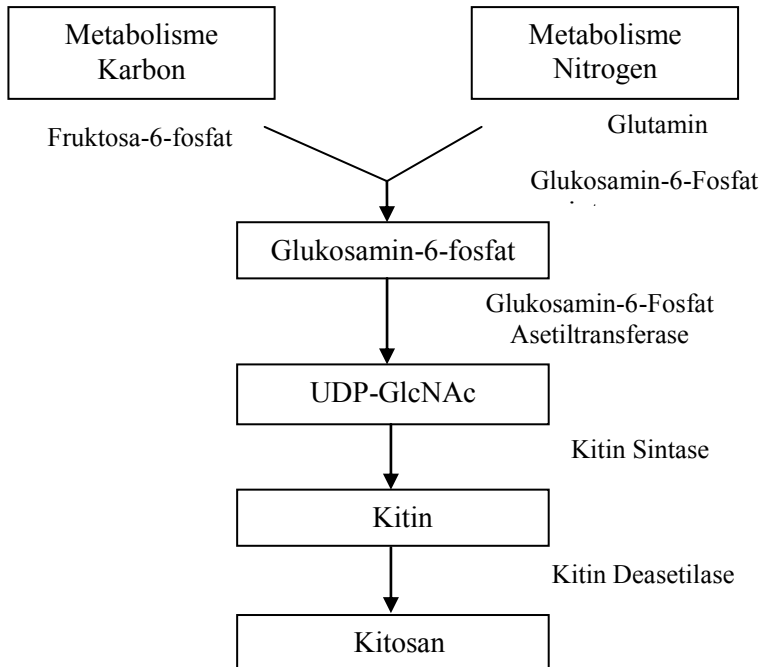
Struktur kitin dapat dimodifikasi dengan menghilangkan gugus asetil, yang berikatan dengan radikal amin pada atom C nomor 2 di cincin glukon melalui proses hidrolisis secara kimiawi dalam larutan alkalin untuk menghasilkan bentuk deasetilasi (Goy *et al.*, 2009). Berdasarkan struktur kristalnya, kitin dibagi menjadi 3 bentuk yaitu bentuk α -, β -, dan γ yang dibedakan berdasarkan orientasi mikrofibril pada kitin. Di alam, derajat deasetilasi kitin bervariasi dan oleh karena itu perbedaan tersebut menjadi pembeda kualitas kitosan (Beier *et al.*, 2013). Kitin merupakan substrat yang buruk untuk aktivitas enzim sehingga perlu dirubah menjadi koloidal kitin melalui metode *freeze-drying* untuk meningkatkan derajat deasetilasi 20 kali lipat. Derajat kristalinitas kitin harus di reduksi supaya enzim dapat mengakses struktur internal polisakarida (Zhao *et al.*, 2010).

2.4 Kitosan

Kitosan merupakan polimer yang mudah ter-biodegradasi dibandingkan dengan kitin, non-toksik pada hewan dan mudah larut dalam pelarut asam. Oleh karena itu, kitosan lebih mudah untuk diaplikasikan pada berbagai bidang seperti biomedis, pangan, kosmetik dan farmasi (Jeraj *et al.*, 2006). Di alam, kitosan dapat ditemukan secara alami pada dinding sel fungi *Zygomycetes*, *Chlorella* sp., dan jaringan kutikula serangga. Kitosan juga dapat disintesis dari *Mucor rouxii* dan *Colletotrichum lindemuthianum* dengan bantuan enzim *chitin synthetase* dan kitin deasetilase (Choi *et al.*, 2004). Kualitas kitosan ditentukan oleh hasil panen, viskositas intrinsik, berat

molekul, solubilitas, dan derajat deasetilasi, dimana derajat deasetilasi dinilai berdasarkan pada material dan prosesnya yang meliputi konsentrasi larutan alkali, suhu dan waktu (Patria, 2013).

Biosintesis kitosan membutuhkan koordinasi kerja enzim *chitin synthetase* dan *chitin decaetylase*. Kitin sintetase polimerisasi prekursor N-asetilglukosamin menjadi kitin sedangkan kitin deasetilase mengkatalisis deasetilase rantai kitin (Gauthier *et al.*, 2008) sehingga menghasilkan gugus glukosamin dan asam asetat (Kaur *et al.*, 2012).

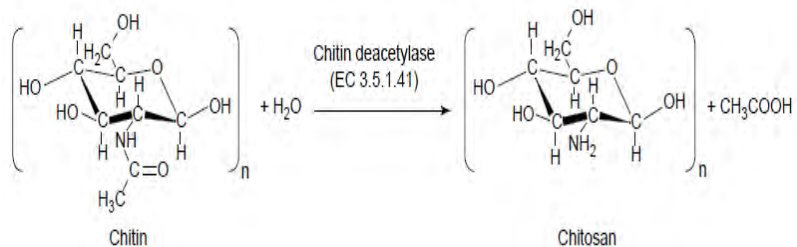


Gambar 2.2 Diagram Alir Sintesis Kitosan Di Alam (Ghormade *et al.*, 2010)

2.5 Enzim Kitinolitik

2.5.1 Kitin Deasetilase

Kitin deasetilase merupakan enzim yang mengkatalisis ikatan antara asetil dan gugus amin pada unit N-asetilglukosamin kitin dengan menghasilkan glukosamin (Jaworska, 2010). Berdasarkan CAZY *database*, Kitin deasetilase adalah kelompok enzim karbohidrat esterase (He *et al.*, 2014) yang memiliki berat molekul 24 hingga 150 kDa, suhu optimum aktivitas enzim 50°C, sedangkan pH optimum bervariasi antara 4,5 hingga 8,5 (Jeraj *et al.*, 2006).



Gambar 2.3 Mekanisme Kitinolitik Oleh Kitin Deasetilase

(Tsigos *et al.*, 2000).

Kitin deasetilase pertama kali diidentifikasi dan dipurifikasi secara parsial dari ekstrak fungi *Mucor rouxii* (Araki *et al.*, 1975). Selain itu beberapa mikroorganisme yang diketahui mampu memproduksi kitin deasetilase adalah *Bacillus amyloliquefaciens* (Zhou *et al.*, 2010), Menurut Tokuyasu *et al.* (1999), kelompok fungi Deuteromycetes yaitu *Colletotrichum lindemuthianum* mampu mensekresikan enzim tersebut saat menyerang tanaman inang. Namun, jumlah enzim yang dihasilkan dari kultur filtrat sangat sedikit untuk dikarakterisasi. *Saccharomyces cerevisiae* memproduksi enzim tersebut saat pembentukan askospora (Ghormade *et al.*, 2010)

Beberapa faktor yang mempengaruhi ekstraksi enzim adalah tipe pelarut, rasio dari padatan ke cair, suhu, tipe agitasi

dan waktu kontak (Pirota *et al.*, 2012). Tiga faktor utama yang mempengaruhi deasetilasi enzimatis pada kitin dan turunannya yaitu komponen dan aktivitas enzim; struktur kitin; dan pola interaksi antara enzim dan molekul kitin. dibutuhkan pemahaman yang baik untuk mengetahui mekanisme reaksi dan korelasi antara struktur substrat kitin dan deasetilasi enzimatis (Martinou *et al.*, 1995). Derajat deasetilasi kitosan merupakan parameter kualitas yang sangat penting untuk mengetahui presentasi gugus asetil yang dapat dihilangkan dari kitin menjadi kitosan. Tingginya derajat deasetilasi menunjukkan bahwa kandungan gugus asetil pada kitosan rendah (Patria, 2013).

2.5.2 Kitinase

Kitinase adalah enzim yang mampu menghidrolisis *insoluble* kitin menjadi komponen oligomer dan monomer kitin yang dapat ditemukan di berbagai macam organisme seperti virus, bakteri, fungi serangga, tanaman tingkat tinggi dan hewan. Beberapa bakteri yang diketahui mampu mengekspresikan enzim ini yaitu *Aeromonas*, *Serratia*, *Vibrio*, *Streptomyces* dan *Bacillus*. Kitinase dapat diklasifikasikan menjadi endokitinase dan eksokitinase. Endokitinase memotong kitin di sisi dalam dan menghasilkan multimer GlcNAc. Eksokitinase mengkatalisis hidrolisis kitin menjadi GlcNAc, kitobiosa atau kitotriosa (Saima *et al.*, 2013).

2.6 Faktor yang Mempengaruhi Aktivitas Enzim

Peran enzim dalam reaksi kimia berfungsi untuk mempercepat terjadinya reaksi. Oleh karena itu menurut Saini (2010) aktivitas enzim dipengaruhi oleh beberapa faktor yang meliputi :

a. Konsentrasi substrat

Aktivitas enzim akan menurun apabila konsentrasi substrat rendah. Apabila konsentrasi substrat meningkat secara bertahap, maka aktivitas enzim akan meningkat. Hingga akhirnya akan sampai pada titik dimana konsentrasi substrat tidak akan meningkatkan aktivitas enzim sehingga kurva aktivitas enzim

akan konstan. Hal ini dikarenakan enzim mengalami efek kejenuhan yang berarti semua molekul enzim yang tersedia sedang mengkatalisis reaksi sehingga pada titik ini penambahan substrat akan menjadi faktor penghambat dan reaksi berjalan secara konstan.

b. Konsentrasi enzim

Jika konsentrasi substrat lebih besar daripada konsentrasi substrat, 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.

c. Suhu

Suhu optimum adalah suhu paling baik untuk aktivitas enzim. Enzim tidak dapat bereaksi pada suhu kurang dari 5°C, setiap peningkatan 10 °C dapat meningkatkan laju aktivitas enzim dua kali lipat. Setiap peningkatan suhu lebih dari 45°C akan menurunkan laju reaksi dan pada suhu 60 °C akan berhenti. Oleh karena itu pada suhu yang tinggi, enzim akan mengalami denaturasi dan menjadi non- fungsional.

d. pH

enzim sangat sensitif terhadap perubahan pH. Enzim yang berbeda akan mempunyai pH optimal yang berbeda. Beberapa enzim dapat bekerja dalam suasana asam, netral dan basa.

2.7. Faktor-faktor yang Mempengaruhi Produksi Enzim

Beberapa faktor yang dapat meningkatkan produksi enzim menurut Okafor *et al.* (2007) yaitu :

b. Pemilihan strain.

Strain bakteri yang berasal dari alam dapat di mutagenisasi untuk meningkatkan variasi gen.

c. Faktor lingkungan.

Penginduksi sangat dibutuhkan untuk meningkatkan produksi enzim ekstraseluler. Enzim ekstraseluler

disekresikan ke medium tanpa melibatkan sel lisis oleh bakteri Gram - positif. Sedangkan sebagian besar bakteri Gram - negatif mensekresikan enzimnya saat sel lisis. Sebagian besar enzim diproduksi saat idiofase dan produksi maksimum biasanya terjadi pada akhir fase log serta awal dari fase stasioner. Hasil produksi dapat ditingkatkan dengan menambah permeabilitas dinding sel

d. Kontrol regulator.

Kontrol regulator meliputi induksi, katabolit dan *feedback regulations*. Dengan menekan katabolit, dapat meningkatkan produksi enzim.

e. Manipulasi genetik.

Gen spesifik yang mengontrol sekresi enzim ekstraseluler dapat di kloningkan untuk mengontrol sintesis enzim. Sehingga enzim dapat disekresikan ekstraseluler gen spesifik dapat diperbanyak melalui gen amplifikasi sehingga dapat meningkatkan hasil produksi enzim.

2.8 Metode Taguchi

Metode Taguchi merupakan suatu metodologi baru di bidang teknik yang bertujuan untuk memperbaiki kualitas produk dan proses sekaligus menekan biaya dan sumber daya (Soejanto, 2009). Metode Taguchi berupaya mencapai sasaran tersebut dengan menjadikan produk dan proses tidak sensitif terhadap berbagai faktor gangguan (*noise*), seperti: material, perlengkapan manufaktur, tenaga kerja manusia, dan kondisi-kondisi operasional. Metode Taguchi menjadikan produk dan proses memiliki sifat kokoh (*robust*) terhadap faktor-faktor gangguan tersebut. Oleh karena itu metode Taguchi juga disebut perancangan kokoh (*robust design*). Filosofi Taguchi terdiri dari tiga konsep utama, yaitu:

1. Kualitas harus didesain ke dalam produk, sehingga tidak hanya cukup dengan memeriksanya.

2. Kualitas terbaik dicapai dengan meminimumkan deviasi dari target. Produk harus didesain sedemikian, sehingga kokoh (*robust*) terhadap faktor lingkungan.
3. Kualitas harus diukur sebagai fungsi dari deviasi dari standar tertentu dan kerugian harus diukur pada seluruh sistem.

Metode Taguchi memperkenalkan pendekatan desain eksperimen yang dapat merancang suatu produk dan proses yang kokoh terhadap kondisi lingkungan, mengembangkan kualitas produk yang kokoh terhadap variasi komponen, dan meminimalkan variasi di sekitar target. Metode Taguchi memiliki beberapa kelebihan bila dibandingkan dengan metode desain eksperimen lainnya. Kelebihan-kelebihan tersebut antara lain (Soejanto, 2009):

1. Metode Taguchi lebih efisien karena dapat melaksanakan penelitian yang melibatkan banyak faktor dan level faktor.
2. Metode Taguchi dapat memperoleh proses yang menghasilkan produk secara konsisten dan kokoh terhadap faktor yang tidak dapat dikontrol.
3. Metode Taguchi dapat menghasilkan kesimpulan mengenai respon faktor-faktor dan level dari faktor kontrol yang menghasilkan respon optimum.

Namun demikian, metode Taguchi memiliki struktur rancangan yang sangat kompleks. Metode ini juga memiliki rancangan yang mengorbankan pengaruh interaksi yang cukup signifikan. Untuk mengatasi hal tersebut, pemilihan rancangan percobaan harus dilakukan secara hati-hati dan sesuai dengan tujuan penelitian.

“Halaman ini sengaja dikosongkan”

BAB III METODOLOGI

3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini telah dilaksanakan pada bulan Januari - Juni 2015 di Laboratorium Mikrobiologi dan Bioteknologi Jurusan Biologi, Laboratrium Kimia Mikroorganisme Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Institut Teknologi Sepuluh Nopember, Laboratorium Proteomik dan Laboratorium Gastroenteritis dan Salmonellosis *Institut Tropical Disease* Universitas Airlangga.

3.2 Metode yang digunakan

Cara kerja penelitian ini diawali dengan persiapan media kultur dan aklimatisasi yang dilanjutkan dengan proses optimasi produksi kitin deasetilase dengan parameter suhu, pH dan substrat medium menggunakan rancangan penelitian Taguchi. Selanjutnya, dilakukan proses isolasi dan produksi kitin deasetilase dengan metode sentrifugasi dan diikuti dengan uji aktivitas kitin deasetilase dengan metode Tokuyasu *et al.* (1996). Setelah didapatkan kombinasi medium produksi yang mampu menghasilkan aktivitas *crude* enzim tertinggi, maka dilakukan purifikasi amonium sulfat bertingkat, uji kandungan protein, titik isoelektrik dan elektroforesis SDS-PAGE untuk mengetahui karakteristik kitin deasetilase yang dihasilkan oleh *Bacillus* sp. SK II-5

3.2.1 Persiapan Media

3.2.1.1. Persiapan Media Kultur

Media padat digunakan untuk kultur dan peremajaan isolat *Bacillus* sp SK II-5. *Bacillus* sp SK II-5 . dalam penelitian ini adalah koleksi Laboratorium Mikrobiologi dan Bioteknologi Jurusan Biologi, FMIPA, ITS. 20 gram *Nutrient Agar* (NA) dilarutkan dalam 1 liter akuades kemudian dipanaskan hingga suhu 100°C sambil diaduk diatas *magnetic stirrer* sampai larut. Setelah mendidih, NA dipipet sebanyak 5 ml ke dalam tabung

reaksi kemudian ditutup dengan sumbat dan disterilkan dalam autoklaf selama 15 menit pada suhu 121°C dan tekanan 1,5 atm. Tabung selanjutnya diletakkan dalam posisi miring dan dibiarkan memadat.

Media *Nutrient Broth* (NB) digunakan untuk peremajaan isolat bakteri. 13 gram *Nutrient Broth* (NB) dilarutkan dalam 1 liter akuades dan dipanaskan hingga mendidih sambil diaduk diatas *magnetic stirer* sampai larut. Setelah mendidih, NB dimasukkan ke dalam erlenmeyer kemudian ditutup dengan sumbat dan disterilisasi dalam autoklaf selama 15 menit pada suhu 121°C dan tekanan 1,5 atm.

3.2.1.2. Persiapan Media Aklimatisasi

Media aklimatisasi digunakan untuk membiasakan *Bacillus* sp. tumbuh dalam media yang mengandung kitin sebagai sumber karbon. Kitin yang digunakan berasal dari limbah kulit udang dan cangkang kepiting yang dihaluskan. Pembuatan kitin diawali dengan mempersiapkan limbah kulit udang dan cangkang kepiting sebanyak 1 kg. Limbah dibersihkan terlebih dahulu menggunakan air. Selanjutnya, limbah kulit udang dan cangkang kepiting dihaluskan dengan blender. Kemudian direbus dalam akuades mendidih untuk menghilangkan mikroorganisme yang dapat menyebabkan pembusukan. Setelah itu, limbah di oven pada suhu 60°C selama satu malam untuk dikeringkan. Setelah kering, limbah ditumbuk hingga halus dan di saring (Halder *et al.*, 2013).

Untuk membuat medium aklimatisasi, disiapkan 1 gram bubuk kitin kulit udang dan cangkang kepiting. Kemudian dilarutkan dalam 1 liter medium NB. Ditambahkan akuades hingga 1 liter kemudian dipanaskan hingga suhu 100°C sambil diaduk diatas *magnetic stirer* sampai larut. Kemudian ditutup dengan kapas dan disterilkan dalam autoklaf selama 15 menit pada suhu 121°C dan tekanan 1,5 atm.

3.2.1.3. Persiapan Media Fermentasi

Enzim Kitin deasetilase diperoleh dengan cara fermentasi cair yang ditambahkan substrat sumber kitin pada medium fermentasi. Sumber kitin dalam medium fermentasi berasal dari kitin komersial, bubuk kulit udang dan bubuk cangkang kepiting.

Komposisi medium fermentasi (Lampiran 3) diaduk dengan *magnetic stirer* pada suhu 70°C sampai larut. Kemudian ditutup dengan sumbat dan disterilkan (Setyahadi, 2006).

3.2.2. Peremajaan Isolat *Bacillus* sp. SK II-5

Bacillus sp. SK II-5 digoreskan pada media NA miring secara aseptik, kemudian diinkubasi dalam suhu ruang selama dua hari hingga tumbuh koloni bakteri. Setelah itu, isolat disimpan dalam lemari pendingin dan diremajakan setiap 2 minggu. *Bacillus* sp. SK II-5 yang telah berumur dua hari diremajakan pada erlenmeyer yang berisi 100 ml medium NB sebanyak tiga ose.

3.2.3. Kurva Pertumbuhan.

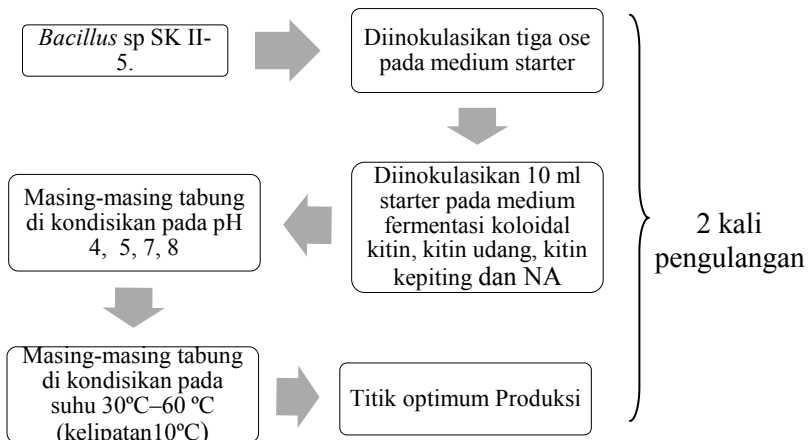
Kurva pertumbuhan digunakan untuk mengetahui fase lag, eksponensial, stasioner, dan fase kematian sel bakteri *Bacillus* sp (Madigan *et al.*, 2012). Kurva pertumbuhan dibuat berdasarkan hubungan antara DO (Densitas Optik) bakteri dengan waktu inkubasi. Strain bakteri diambil sebanyak tiga ose kemudian disuspensikan ke dalam erlenmeyer yang berisi 100 ml media NB aklimatisasi dan medium fermentasi yang telah disterilkan dalam autoklaf pada 121°C, 1,5 atm selama 15 menit. Kemudian erlenmeyer dirotary *shaker* pada suhu kamar dengan kecepatan 125 rpm. Diambil 2 ml kemudian diukur densitas optiknya setiap 1 jam pada panjang gelombang λ 600 nm selama 24 jam. Setiap kali pengukuran diulang dua kali. Setelah itu dibuat grafik hubungan waktu dengan densitas optik dan diperoleh kurva pertumbuhan bakteri.

3.2.4. Persiapan Starter

Setelah diketahui fase eksponensial bakteri dari kurva pertumbuhan, isolat *Bacillus* sp SK II-5 sebanyak 10 ml yang telah teraklimatisasi dalam medium aklimatisasi dan fermentasi diinokulasikan pada erlenmeyer 250 ml yang berisi 100 ml medium fermentasi. Lalu, diinkubasi selama 18 jam pada suhu 55°C (Setyahadi *et al.*, 2006). Setelah nilai *Optical Density* yang di ukur dengan spektrofotometer sudah mencapai nilai 0,6-0,8, maka isolat dapat dipindahkan ke dalam medium fermentasi untuk dilakukan optimasi produksi

3.2.5. Optimasi Suhu, pH, dan Medium Substrat Kitin

Untuk menentukan pH optimum, variasi pH yang digunakan antara pH 4,5,7,8 dengan jenis buffer yang berbeda yaitu Buffer sitrat-fosfat untuk pH 4-5, Buffer fosfat 0,05 M digunakan untuk pH 7-8 (Zhao *et al.*, 2010). Penentuan suhu optimum dilakukan dalam kisaran suhu 30°C–60 °C sehingga diperoleh suhu optimum dengan aktivitas enzim tertinggi (Setyahadi *et al.*, 2006). Sedangkan penentuan komposisi medium yang terbaik substrat kitin digunakan variasi 4 variabel yaitu medium substrat kitin udang, kepiting, koloidal kitin (kontrol positif) dan *Nutrient Agar* (kontrol negatif).



Gambar 3.1 Optimasi Produksi Kitin Deasetilase

3.2.6. Isolasi dan Produksi Kitin Deasetilase.

Larutan inokulum sebanyak 10 ml diinokulasikan ke dalam Erlenmeyer yang berisi 90 ml media fermentasi yang telah disterilkan. Kultur diinkubasi pada suhu optimasi dalam medium fermentasi selama 18 jam di *rotary shaker* dengan kecepatan 150 rpm. Setelah jam ke-18 didapatkan ekstrak kasar enzim (*crude enzyme*) (Setyahadi *et al.*, 2006). Enzim dipanen dengan cara sentrifugasi pada 8000 rpm selama 15 menit pada suhu 4°C untuk memisahkan dari sel bakteri dan sisa media (Emmawati *et al.*, 2007). Hasil supernatan yang diperoleh merupakan ekstrak kasar enzim, kemudian diukur kandungan protein, purifikasi, dan aktivitas enzimnya.

3.2.7. Purifikasi Kitin Deasetilase.

3.2.7.1. Presipitasi Protein Enzim dengan Ammonium Sulfat ((NH₄)₂SO₄).

Prinsip presipitasi adalah penggumpalan protein non-enzim dengan penambahan garam. Ion garam yang ditambahkan mempengaruhi kelarutan protein. Pada konsentrasi rendah, ion ini akan mengelilingi molekul protein dan mencegah mereka bersatu sehingga protein melarut. Peristiwa ini disebut *salting in*. Pada konsentrasi tinggi, terjadi peningkatan muatan listrik di sekitar protein, yang akan menarik mantel air dari koloid protein. Peristiwa hidrofobik antarmolekul protein pada suasana ionik tinggi akan menurunkan kelarutan protein. Peristiwa tersebut dikenal dengan *salting out* (Suri, 2013).

Ekstrak kasar enzim kitin deasetilase dimurnikan dengan cara pengendapan bertahap ammonium sulfat (NH₄)₂SO₄ dengan fraksi 0-30%, 30%-45%, 45%-60% dan 60%-75%. Caranya adalah sebagai berikut :

a. Pengendapan 0-30%

(NH₄)₂SO₄ ditimbang sebanyak 3,52 g, kemudian ditambahkan ke dalam 20 ml larutan ekstrak kasar kitin deasetilase dalam gelas beaker 50 ml. Penambahan dilakukan sedikit demi sedikit sambil diaduk dengan menggunakan gelas

pengaduk. Setelah semua $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ yang ditambahkan larut kemudian dibiarkan 1 jam. Endapan enzim dipisahkan dengan sentrifugasi menggunakan kecepatan 3000 rpm, pada suhu 40°C selama 30 menit. Dihasilkan supernatan I dan endapan I.

b. Pengendapan 30-45%

Supernatan I dimasukkan ke dalam gelas beaker 50 ml kemudian ditambah dengan 1,88 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Penambahan dilakukan sedikit demi sedikit sambil diaduk dengan menggunakan gelas pengaduk. Setelah semua $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ yang ditambahkan larut kemudian dibiarkan 1 jam. Endapan enzim dipisahkan dengan sentrifugasi menggunakan kecepatan 3000 rpm, pada suhu 40°C selama 30 menit. Dihasilkan supernatan II dan endapan II.

c. Pengendapan 45-60%

Supernatan II dimasukkan ke dalam gelas beaker 50 ml kemudian ditambah dengan 1,97g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Penambahan dilakukan sedikit demi sedikit sambil diaduk dengan menggunakan gelas pengaduk. Setelah semua $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ yang ditambahkan larut kemudian dibiarkan 1 jam. Endapan enzim dipisahkan dengan sentrifugasi menggunakan kecepatan 3000 rpm, pada suhu 40°C selama 30 menit. Dihasilkan supernatan III dan endapan III.

d. Pengendapan 60-75 %

Supernatan III dimasukkan ke dalam gelas beaker 50 ml kemudian ditambah dengan 2,06 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Penambahan dilakukan sedikit demi sedikit sambil diaduk dengan menggunakan gelas pengaduk. Setelah semua $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ yang ditambahkan larut kemudian dibiarkan 1 jam. Endapan enzim dipisahkan dengan sentrifugasi menggunakan kecepatan 10000 rpm, pada suhu 40°C selama 10 menit. Dihasilkan supernatan IV dan endapan IV.

3.2.8. Uji Aktivitas Kitin Deasetilase

Aktivitas kitin deasetilase diukur menggunakan metode Tokuyasu et al. (1996) yang telah dimodifikasi. Larutan digesti yang terdiri dari 3 ml enzim, 8 mg kitin dan 1 ml buffer diinkubasi selama 30 menit pada suhu 50°C (Ischaidar, 2014) kemudian aktivitas enzim diterminasi dengan penambahan asam setat 33% sebanyak 200µl. Untuk pengontrolan, penambahan enzim dilakukan sesaat setelah penambahan asam asetat. Setelah digesti, konsentrasi residu glukosamin yang terbentuk dari reaksi deaminasi dihitung berdasarkan oksidasi menggunakan NaNO₂, mengikuti metode spektrofotometrik menggunakan indol HCl sesuai dengan Dische dan Borenfreund (1950) yang telah dimodifikasi sebagai berikut : larutan digesti dipipet sebanyak 200 µl ditambahkan 200 µl asam asetat 33% dan 200 µl NaNO₂ 5%. Larutan divorteks dan dibiarkan selama 10 menit pada suhu ruang. Ditambahkan 500 µl asam askorbat 0,1 mM dan digoyang selama 30 menit pada suhu ruang. Selanjutnya ditambahkan 800 µl HCl 5% dan 80 µl indol 1% dalam etanol. Campuran reaksi ini dididihkan dalam air mendidih selama 5 menit hingga terbentuk warna merah kejinggaan. Larutan kemdian didinginkan selanjutnya ditambah etanol absolut 800 µl dan divortek. Konsentrasi glukosamin yang terbentuk diketahui melalui reaksi warna coklat kemerahan yang terjadi dan diukur pada 492 nm. Satu unit aktifitas enzim dinyatakan sebagai jumlah enzim yang memproduksi 1 µmol residu glukosamin permenit. Standar yang digunakan adalah konsentrasi glukosamin pada 10 mg/ 10 ml.

3.2.9. Uji Kandungan Protein

3.2.9.1. Uji Bradford.

Untuk membuat pereaksi Bradford, sebanyak 100 mg *Coomassie Brilliant Blue G-250* dilarutkan dalam 50 ml etanol 95%, tambahkan 100 ml 85% (w/v) asam fosfat. Encerkan sampai warna melarut semua dan saring menggunakan kertas saring Whatman No.1 hingga volume 1 L, sehingga didapatkan

konsentrasi 0,01% (w/v) *Coomassie Brilliant Blue G-250*, 4,7% (w/v) etanol, dan 8,5% (w/v) asam fosfor.

Konsentrasi protein diukur dengan menggunakan standar protein Bovine Serum Albumin (BSA) dengan konsentrasi 0,1 hingga 1 mg/ml. pada gelombang spektrofotometer 595 nm (Putranto, 2006). Pembuatan larutan standar yaitu dengan melarutkan 100 mg *Bovine Serum Albumin* (BSA) dilarutkan dalam 50 ml akuades. Larutan dikocok secara perlahan dan jangan sampai berbusa. Setelah homogen ditambah akuades hingga volume 1000 ml. Konsentrasi akhir larutan standar adalah 1 mg/ml BSA. Larutan standar sebanyak 40 µl dimasukkan dalam tabung reaksi dan ditambahkan larutan bradford sebanyak 2 ml. Larutan divortek dan dibiarkan selama 5 menit. Larutan kemudian diukur serapannya pada spektrofotometer dengan panjang gelombang 595 nm. Blanko diperlakukan seperti sampel namun larutan standar diganti dengan akuades. Nilai yang diperoleh dibuat grafik dengan persamaan $Y = ax + b$, dimana Y adalah nilai absorbansi dan x adalah nilai konsentrasi protein.

Pengukuran konsentrasi sampel dilakukan dengan cara mereaksikan 100 µl larutan sampel enzim dengan larutan bradford sebanyak 5 ml, divortex dan di inkubasi dalam suhu ruang dalam kondisi gelap selama 2 menit. Lalu diukur absorbansinya dengan spektrofotometer pada gelombang 595 nm. Nilai absorbansi kemudian dimasukkan ke dalam kurva standar untuk menentukan konsentrasi protein yang terkandung dalam sampel enzim.

3.2.10. Karakterisasi Protein Kitin Deasetilase

3.2.10.1. Titik Isoelektrik

Pertama, disiapkan 6 tabung reaksi bersih dan kering, lalu dimasukkan 1 ml kitin deasetilase pada tiap-tiap tabung. Pada setiap tabung ditambahkan 1 ml larutan buffer asetat masing-masing dari PH 3,4,5,6,7 dan 8. Kemudian dikocok, lalu dicatat derajat kekeruhannya setelah 0,10, dan 30 menit. Diamati hasilnya. Diamati berapa tabung yang terbentuk maksimal. Selanjutnya semua tabung dipanaskan diatas penangas air.

Diamati hasilnya. Pembentukan endapan kekeruhan paling cepat atau paling banyak merupakan titik isoelektrik (Burgess dan Thomson, 2002).

3.2.10.2. Analisis Elektroforesis SDS-PAGE

Elektroforesis merupakan satu cara untuk memisahkan fraksi-fraksi campuran berdasarkan atas pergerakan partikel-partikel koloid yang bermuatan, di bawah pengaruh medan listrik. Prinsip SDS-PAGE dapat digunakan untuk menentukan bobot molekul dan tingkat kemurnian suatu sampel. SDS-PAGE dilakukan dengan 10% poliakrilamida gel, menggunakan standar massa molekul tinggi (Bio-Rad) *ovalbumin* (45 kDa), *Bovine Serum Albumin* (66,2 kDa) dan *Phosphorylase b* (97,4 kDa), β -*galactosidase* (116,25 kDa), dan *myosin* (200 kDa).

Persiapan awal yang perlu dilakukan dalam elektroforesis adalah pembuatan gel. Metode yang digunakan dalam pembuatan gel adalah metode Bollag dan Edelstein (1991). Bahan untuk *separating gel* dicampur satu persatu dengan memasukkan tetrametilen diamina (TEMED) pada akhir campuran. Larutan tersebut diaduk dan dipipet perlahan ke dalam plate kaca sampai 1,5 cm dari permukaan kaca lalu didiamkan sekitar 15-20 menit. Dalam proses ini diusahakan agar tidak terbentuk gelembung udara. Setelah gel memadat, campuran *stacking gel* dipipet perlahan ke dalam *plate* kaca lalu dengan segera dimasukkan sisir (10 sumur) sebagai tempat memasukkan sampel.

Sampel yang telah dipanaskan pada suhu 100°C selama 3 menit dicampurkan dengan buffer sampel lalu dilakukan *loading* sampel ke dalam sumur sebanyak 12 μ l. Berbeda halnya dengan sampel, Marker yang di-*loading* ke dalam sumur sebanyak 10 μ l. Sebelum running dilakukan, buffer elektroforesis dimasukkan ke dalam *chamber*. Running elektroforesis dilakukan pada 100 Volt, 50 mA dalam kondisi dingin. Waktu yang diperlukan untuk running elektroforesis sekitar 1,5 jam.

Setelah pemisahan, gel dilepas dari plate kaca lalu direndam dalam larutan fiksasi (25% metanol + 12% asam asetat)

selama 1 jam. Selanjutnya, gel tersebut direndam dalam larutan etanol 50% selama 20 menit dan larutan etanol 30% selama 2x20 menit. Setelah itu, gel tersebut direndam dalam larutan *enhancer* (larutan $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) selama 1 menit. Gel kemudian dicuci dengan akuabides selama 3x2 menit. Setelah dicuci dengan akuabides, gel direndam dalam larutan staining *Coomassie Brilliant Blue* selama 30 menit lalu dibilas cepat dengan akuabides selama 2x20 detik. Kelebihan warna dihilangkan dengan larutan *destaining* (larutan Na_2CO_3 + formaldehida 37%) sampai diperoleh pita-pita protein yang jelas teramati dengan latar belakang yang relatif jernih. Reaksi dihentikan dengan menggunakan larutan fiksasi (Bollag dan Edelstein, 1991).

3.3. Rancangan Penelitian dan Analisa Data.

3.3.1. Metode Taguchi

Untuk menentukan kondisi optimal suatu respon (aktivitas enzim) dari variabel bebas digunakan rancangan penelitian Taguchi sehingga didapat suatu kombinasi 3 faktor yaitu suhu dengan 4 level (30°C, 40 °C, 50 °C dan 60 °C), pH dengan 4 level (pH 4,5,6 dan 7) dan medium dengan 4 level (kitin, kulit udang, cangkang kepiting dan tanpa sumber karbon) yang mengoptimalkan respon. Data kemudian di analisis dengan *General Linier Model* ANOVA. Variabel metode penelitian ini adalah :

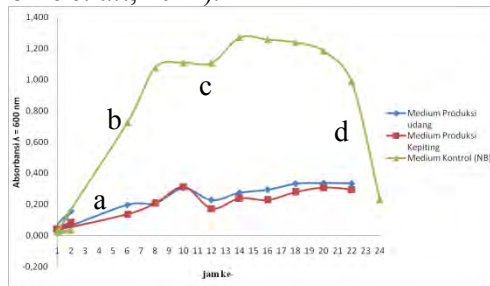
- a. Variabel bebas : suhu, medium, dan pH.
- b. Variabel respon : aktivitas enzim.

Kemudian data yang diperoleh akan didapat titik optimum dan diinterpretasikan dalam bentuk *main effect plot*.

BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1. Kurva Pertumbuhan *Bacillus* sp. SK II-5.

Pengamatan kurva pertumbuhan dilakukan selama 24 jam untuk mengetahui profil tumbuh dari *Bacillus* sp. SK II-5. Pada Gambar 4.1 tampak bahwa fase lag pertumbuhan *Bacillus* sp. SK II-5 tersingkat dicapai dalam medium produksi udang dan medium NB yaitu selama 2 jam masa inkubasi. Fase lag terlama dicapai oleh medium produksi kepiting selama 4 jam karena bakteri mengalami adaptasi fisiologis dengan struktur kristal α -kitin yang memiliki ikatan hidrogen rapat, sehingga mencegah adanya molekul lain untuk masuk ke dalam fase kristalnya serta dipengaruhi oleh besarnya komposisi kitin di cangkang kepiting yang lebih besar daripada kulit udang (Younes *et al.*, 2015; Arbia *et al.*, 2013 ; Rollfe *et al.*, 2012).



Gambar 4.1 Kurva Pertumbuhan *Bacillus* Sp. SK II-5.

Keterangan : a. Fase Lag b. Fase Eksponensial c. Fase Stasioner d. Fase kematian.

Formulasi medium untuk menentukan profil pertumbuhan *Bacillus* sp. SK II-5 pada Gambar 4.1 di atas menggunakan kulit udang dan cangkang kepiting sebagai sumber karbon. Hal ini menjadi penting karena diharapkan *Bacillus* sp. SK II-5 dapat teradaptasi dengan ketersediaan sumber karbon dalam bentuk polimer kitin (Setyahadi *et al.*, 2006; Willey *et al.*, 2008). Menurut Rollfe *et al.* (2012) bahwa mikroorganisme akan

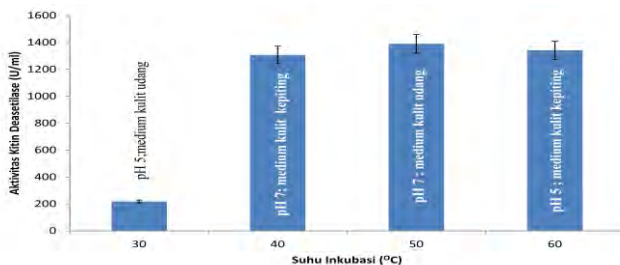
memanfaatkan sumber karbon yang tersedia dilingkungan sekitarnya ketika sumber karbon utamanya tidak tersedia.

Di medium produksi udang dan kepiting, fase eksponensial dimulai pada jam ke-4. Sedangkan di medium kontrol (NB) dimulai pada jam ke-3. Pada medium NB fase eksponensial dimulai lebih cepat karena komposisi pada medium NB tersusun atas senyawa yang dapat di konsumsi secara langsung oleh mikroorganisme yaitu berupa *Beef extract* dan pepton. *Beef extract* dan pepton merupakan materi nutrisi yang tersusun atas senyawa peptida pendek sehingga mudah di manfaatkan oleh mikroorganisme (Lappage *et al.*, 1970).

Fase kematian hanya dapat diamati pada kultur yang menggunakan medium NB, hal ini dikarenakan kandungan di dalam medium NB sangat mudah dimanfaatkan oleh mikroba. Fenomena ini berlawanan dengan medium produksi, karena sifat medium yang sukar untuk di cerna sehingga sampai jam ke-24 fase kematian belum tercapai. Madigan *et al.* (2012) menyatakan bahwa pertumbuhan akan melambat karena faktor nutrisi yang rendah.

4.2. Optimasi Produksi Kitin Deasetilase

Optimasi produksi kitin deasetilase bertujuan untuk mengetahui kombinasi medium, pH, dan suhu yang menghasilkan nilai aktivitas enzim maksimum. Hasil maksimum aktivitas kitin deasetilase pada tiap variasi suhu dapat diamati pada Gambar 4.2.



Gambar 4.2 Hasil Optimasi Produksi Kitin Deasetilase

Pada Gambar 4.2 dapat dilihat bahwa hasil aktivitas kitin deasetilase tertinggi tercapai menggunakan medium udang sebagai substrat pada kondisi suhu 50°C dan pH 7 yaitu sebesar 1390,44 U/ml. Sebaliknya, pada kondisi suhu 30 °C dan pH 5 aktivitas terendah tercapai sebesar 218,14 U/ml dari pilihan aktivitas terbaik pada variasi suhu yang dibandingkan. Sedangkan nilai aktivitas kitin deasetilase terendah dari seluruh percobaan ditunjukkan oleh medium kepiting sebagai substrat pada kondisi suhu 50°C dan pH 4 yaitu sebesar 191,48 U/ml (Lampiran 5). Aktivitas kitin deasetilase *Bacillus* sp. SK II-5 meningkat seiring dengan naiknya suhu. Hal ini dikarenakan bakteri *Bacillus* sp. SK II-5 pada mulanya diisolasi dari kawah Dieng dan tergolong dalam bakteri termofilik sehingga juga mempengaruhi suhu produksinya (Tsurayya, 2013). Akan tetapi jika telah melampaui suhu optimumnya, maka, aktivitasnya pun akan menurun karena terjadinya kerusakan pada struktur molekul protein enzim (Pelczar, 1972; Setyahadi *et al.*, 2006).

Pada Gambar 4.2, dapat terlihat bahwa medium dengan kondisi pH 7 memiliki aktivitas kitin deasetilase enzim tertinggi, hal ini karena pH 6-7 merupakan pH optimum dari pertumbuhan genus *Bacillus* sp (Raevuori dan Genigeorgis, 1975). Produksi kitin deasetilase sangat tergantung dari pH medium, apabila pH medium sesuai dengan pH pertumbuhan mikroba maka aktivitas kitin deasetilase yang diproduksi akan meningkat (Setyahadi *et al.*, 2006).

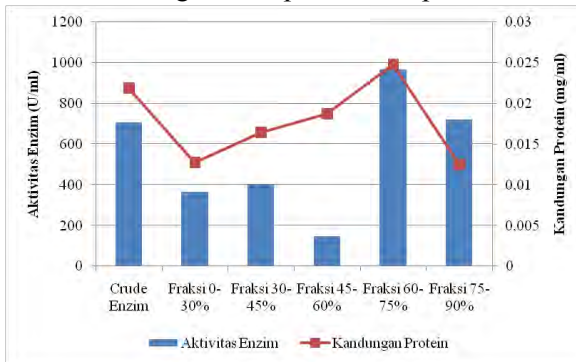
Penggunaan kulit udang sebagai sumber karbon dalam kombinasi medium menghasilkan aktivitas kitin deasetilase yang tertinggi (Lampiran 5). Hal ini dikarenakan struktur polimer dalam kulit udang lebih renggang daripada cangkang kepiting dan bubuk kitin sehingga kulit udang lebih mudah dihidrolisis sebagai sumber karbon (Arbia *et al.*, 2013).

Kombinasi optimum yang menghasilkan aktivitas kitin deasetilase tertinggi (Gambar 4.2) berbeda dengan hasil analisis menggunakan uji statistik Taguchi (*General Linier Model ANNOVA test*) yaitu tercapai pada kombinasi suhu 60 °C dan pH

7 dengan kulit udang sebagai substrat (Lampiran 6). Walaupun demikian rata-rata aktivitas kitin deasetilase yang di produksi dari kedua nilai kombinasi optimum tersebut tidak berbeda nyata (Lampiran 6).

4.3. Purifikasi dan Karakterisasi Kitin Deasetilase

Pemurnian kitin deasetilase menggunakan garam amonium sulfat dengan konsentrasi bertingkat bertujuan untuk memisahkan protein tertentu berdasarkan tingkat kelarutannya (*salting out*) (Juan, 1990). Hasil purifikasi kitin deasetilase menggunakan variasi konsentrasi garam dapat diamati pada Gambar 4.3.



Gambar 4.3 Kandungan Protein dan Aktivitas Kitin Deasetilase pada Tiap Fraksi Pemurnian Amonium Sulfat.

Purifikasi amonium sulfat dilakukan pada percobaan kombinasi suhu 60°C dan pH 7 dengan substrat kulit udang. Pada Gambar 4.3, dapat dilihat bahwa nilai aktivitas kitin deasetilase tercapai tertinggi pada fraksi 60-75% yaitu sebesar 969,14 U/ml. Hal ini menunjukkan bahwa protein kitin deasetilase terkonsentrasi pada fraksi tersebut. Selain itu, purifikasi dikatakan berhasil apabila aktivitas hasil purifikasi meningkat dibandingkan dengan aktivitas *crude* enzim sebelum dipurifikasi. Purifikasi menggunakan ammonium sulfat diatas dapat meningkatkan aktivitas kitin deasetilase sebesar 37% dari *crude* sebelum purifikasi (706,04 U/ml).

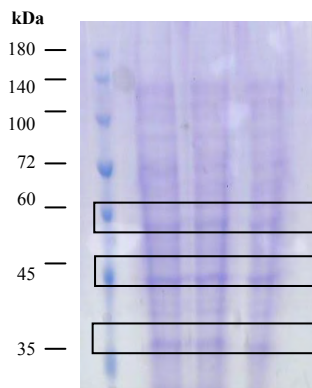
Untuk mengkonfirmasi hasil purifikasi protein kitin deasetilase, maka dilakukan karakterisasi dengan metode uji kandungan protein, titik isoelektrik dan SDS-PAGE. Aktivitas pada fraksi 60-75% (tertinggi) menunjukkan konsentrasi protein yang tinggi juga yaitu sebesar 0,024 mg/ml yang diperoleh melalui uji Bradford (Lampiran 7).

Titik isoelektrik merupakan kondisi molekul protein mempunyai muatan positif dan negatif yang sama sehingga saling menetralkan atau bermuatan nol (Tsigos *et al.*, 2000). Titik isoelektrik kitin deasetilase yang terpurifikasi tercapai pH 5 yang mencirikan karakter kitin deasetilase yang akan terkoagulasi pada rentang pH 5-6 (Tsigos *et al.*, 2000). Gambar 4.4 menunjukkan adanya koagulasi yang menandakan posisi titik isoelektrik enzim kitin deasetilase.



Gambar 4.4 Titik Isoelektrik Enzim Kitin Deasetilase.

Gambar 4.5 menunjukkan pita-pita protein kitin deasetilase hasil elektroforesis SDS-PAGE.



Gambar 4.5 Elektroforesis SDS-PAGE

Berdasarkan Gambar 4.5, terdapat 3 band protein hasil elektroforesis SDS-PAGE pada berat molekul 60 kDa, 45 kDa dan 35 kDa. Namun, dari ketiga band tersebut band yang paling jelas pada 45 kDa. Sehingga kemungkinan besar berat molekul kitin deasetilase hasil purifikasi yang dihasilkan oleh *Bacillus* sp. SK II-5 memiliki berat molekul sebesar 45 kDa. Hal ini sesuai dengan berat molekul yang dimiliki *Bacillus* yang memiliki rentang berat molekul 30-45 kDa (Raval *et al.*, 2013).

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1. Kesimpulan

Kesimpulan dari penelitian optimasi produksi kitin deasetilase oleh *Bacillus* sp. SK II-5 adalah :

1. Aktivitas enzim tertinggi sebesar 1390,44 U/ml pada kombinasi suhu inkubasi 50°C dan pH 7 dengan menggunakan kulit udang sebagai substrat.
2. Purifikasi amonium sulfat mampu meningkatkan aktivitas enzim sebesar 37% pada fraksi 60-75% dengan kandungan protein sebesar 0,024 mg/ml.
3. Kitin deasetilase hasil purifikasi memiliki karakteristik titik isoelektrik adalah pada pH 5 dengan berat molekul dominan 45 kDa.

5.2. Saran

Saran untuk penelitian selanjutnya yaitu pemilihan strain merupakan hal yang sangat esensial untuk menghasilkan kitin deasetilase dengan aktivitas enzim yang tinggi. Perlu adanya optimasi *inducer* dan sumber karbon untuk melengkapi optimasi medium produksi.

“Halaman Ini Sengaja Dikosongkan”

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1. Kesimpulan

Kesimpulan dari penelitian optimasi produksi kitin deasetilase oleh *Bacillus* sp. SK II-5 adalah :

1. Aktivitas enzim tertinggi sebesar 1390,44 U/ml pada kombinasi suhu inkubasi 50°C dan pH 7 dengan menggunakan kulit udang sebagai substrat.
2. Purifikasi amonium sulfat mampu meningkatkan aktivitas enzim sebesar 37% pada fraksi 60-75% dengan kandungan protein sebesar 0,024 mg/ml.
3. Kitin deasetilase hasil purifikasi memiliki karakteristik titik isoelektrik adalah pada pH 5 dengan berat molekul dominan 45 kDa.

5.2. Saran

Saran untuk penelitian selanjutnya yaitu pemilihan strain merupakan hal yang sangat esensial untuk menghasilkan kitin deasetilase dengan aktivitas enzim yang tinggi. Perlu adanya optimasi *inducer* dan sumber karbon untuk melengkapi optimasi medium produksi.

“Halaman Ini Sengaja Dikosongkan”

DAFTAR LAMPIRAN

		Halaman
Lampiran 1	Metode Penelitian	41
Lampiran 2	Komposisi Medium Produksi (untuk 1L)	42
Lampiran 3	Tabel Pengamatan Kurva Pertumbuhan <i>Bacillus</i> sp SK II-5.....	43
Lampiran 4	Kurva Standar Glukosamin.....	44
Lampiran 5	Nilai Aktivitas Enzim Hasil Optimasi Produksi Kitin Deasetilase	45
Lampiran 6	Analisis General Linier Model ANOVA (<i>Analysis of Variance</i>) Optimasi Produksi Kitin Deasetilase	46
Lampiran 7	Nilai Aktivitas Enzim dan Kandungan Protein Setelah Purifikasi Amonium Sulfat.....	47
Lampiran 8	Kurva Standar BSA (<i>Bovine Serum Albumin</i>).....	48

“Halaman Ini Sengaja Dikosongkan”

DAFTAR PUSTAKA

- Arbia, W., Arbia, L., Adour, L., dan Amrane, A. 2013. Chitin Extraction from Crustacean Shells Using Biological Methods. **Food Technol. Biotechnol.** 51 (1) 12–25 (2013).
- Ariningsih, A., Noor, A., dan Natsir, N. 2003. Usaha biokonversi kitin asal kepiting rajungan menjadi khitosan. **Marina Chimica Acta**, April 2003, hal. 9-12.
- Beier, S., dan Bertilsson, S. 2013. Bacterial chitin degradation-mechanisms and ecophysiological strategies. Review article **Frontiers in Microbiology** published : 14 June 2013.
- Bhaskar, N., Suresh, P. V., Sakhare, P.Z., dan Sachindra, N.M. 2007. Shrimp biowaste fermentation with *Pediococcus acidolactici* CFR2182: Optimization of fermentation conditions by response surface methodology and effect of optimized conditions on deproteination/demineralization and carotenoid recovery. **Enzyme and Microbial Technology** 40 (2007) 1427–1434.
- Bollag, D., dan Edelstein, S. J. 1991. **Protein Methods**. New York : John Willey and Sons.
- Bradford, M. M. 1976. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **Analytical Biochemistry** 72, 248-254 (1976).
- Choi, Y. J., Kim, E.J., Piao, Z., Yun, Y.C., dan Shin, Y.C. 2004. Purification and Characterization of Chitosanase from *Bacillus* sp. Strain KCTC 0377BP and Its Application for the Production of Chitosan Oligosaccharides. **Applied and Environmental Microbiology**, Aug. 2004, p. 4522–4531.

Darmawan, E., Mulyaningsih, S., dan Firdaus, F. 2007. Karakteristik Khitosan yang Dihasilkan dari Limbah Kulit Udang dan Daya Hambatnya terhadap Pertumbuhan *Candida albicans*. **Logika**, Vol. 4, No. 2, Juli 2007.

De Hui, D. A. I., Wei, L., Wei-lian, H., dan Xiao-ying, S. 2011. Effect of Medium Composition on the Synthesis of Chitinase and Chitin Deacetylase from Thermophilic *Paenibacillus sp.*Hul. **Procedia Environmental Sciences** 8 (2011) 620 – 628.

Dische, Z dan E. Borenfrund. 1950. A Spectrophotometric method for the microdetermination of hexosamines. **J. Biol. Chem.** 1950, 184:517-522

Dong Gao, X., Katsumoto, T., dan Onodera, K. 1995. Purification and Characterization of Chitin Deacetylase from *Absidia Coerulea*. **J. Biochem.** 117, 257-263 (1995).

Dutta, P. K., Dutta, J., dan Tripathi, V.S. 2004. Chitin and Chitosan : Chemistry, Properties and Applications. **Journal of Scientific & Industrial Research** Vol. 63, January 2004, pp 20-31.

Emmawati, A., Laksmi Jenie, B.S., dan Fawzuya, Y.N.,. 2007. Kombinasi perendaman dalam natrium hidoksida dan Aplikasi kitin deasetilase terhadap kitin kulit udang Untuk menghasilkan kitosan dengan berat molekul Rendah. **Jurnal Teknologi Pertanian** 3(1) : 12-18, Agustus 2007

Galed, G., Miralles, B., Panos, I., Santiago, A., dan Heras, A. 2005. N-Deacetylation and depolymerization reactions of chitin/chitosan: Influence of the source of chitin. **Carbohydrate Polymers** 62 (2005) 316–320.

Gauthier, C., Clerisse, F., Dommes, J., dan Jaspar-Versali, M.F.. 2008. Characterization and cloning of chitin deacetylases from *Rhizopus circinans*. **Protein Expression and Purification** 59 (2008) 127–137.

Goy, R. C., de Britto, D., dan Assis, O.B.G. 2009. A Review of the Antimicrobial Activity of Chitosan. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, vol. 19, no 3, p. 241-247, 2009.

Ghormade, V., Kulkarni, V., Doiphode, N., Rajamohanan, P.R., dan Deshpande, M.V. 2010. Chitin Deacetylase: A Comprehensive Account On Its Role In Nature And Its Biotechnological Applications. Current Research, Technology And Education Topics In Applied Microbiology And Microbial Biotechnology **Formatex 2010**.

Halder, S, K., Maity, C., Jana, A., Das, A., T. Paul., Mohapatra, P.K.D., Pati, B.R., dan Mondal, K.C. 2013. Proficient biodegradation of shrimp shell waste by *Aeromonas hydrophila* SBK1 for the concomitant production of antifungal chitinase and antioxidant chitosaccharides. **International Biodeterioration & Biodegradation** 79 (2013) 88e97.

He, Y., Xu, J., Wang, S., Zhou, G., dan Liu, V 2014. Optimization of medium components for production of chitin deacetylase by *Bacillus amyloliquefaciens* Z7, using response surface methodology. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, 2014 Vol. 28, No. 2, 242–247.

Hunt, D., Gevers. D.E., Vahora, N.M., dan. Polz, M.F. 2007. Conservation of the Chitin Utilization Pathway in the Vibrionaceae. **Appl. Environ. Microbiol.** 2008, 74 (1) : 44.

Ischaidar., Natsir, H., dan Dali, S., 2014. Production and Application of Chitin Deacetylase from *Bacillus licheniformis*

HSA3-1a as Biotermicide. **Marina Chimica Acta, April 2014 Vol. 15 No. 1.**

Jaworska, M.M. 2010. Kinetics of Thermal Deactivation of Chitin Deacetylase. **Progress on Chemistry and Application**. Volume XV, 2010.

Jeraj, N., Kunič, B., Lenasi, H., dan Breskvar, F. 2006. Purification and molecular characterization of chitin deacetylase From *Rhizopus nigricans*. **Enzyme and Microbial Technology** 39 (2006) 1294–1299.

Juan, A.A. 1990. **Separation Processes in Biotechnology**. New York. Marcel Dekker.

Kaur, K., Dattajirao, V., Shrivastava, V., dan Bhardwaj, U. 2012. Isolation and Characterization of Chitosan-Producing Bacteria from Beaches of Chennai, India. **Enzyme Research** Volume 2012, Article ID 421683.

Kusumaningsih, T., Masykur, A., dan Arief, U. 2004. Pembuatan Kitosan dari Kitin Cangkang Bekicot (*Achatina fulica*). **Biofarmasi** 2 (2) : 64:68, Agustus 2004, ISSN : 1693-2242.

Lapage S., Shelton J., dan Mitchell T., 1970, **Methods in Microbiology**, Norris J. and Ribbons D., (Eds.), Vol. 3A, Academic Press, London

Madigan, M. T., Martinko, J.M., Stahl, D.A., dan Clark, D.P. 2012. **Brock : Biology of Microorganisms Thirteenth Edition**. Pearson Education Inc. United States of America.

Martinou, A., Kafetzopoulos, D., dan Bouritois, V. 1995. Chitin Deacetylation by Enzymatic means : Monitoring of Deacetylation Processes. **Carbohydrate research** 273 (1995) 235-242.

Mathur, A., Rawat, A., Bhatt, G., Baweja, S., Ahmad, F., Grover, A., Madhav, K., Dhand, M., Mathur, D., Verma, S.K., Singh, S.K., dan Dua, V.K. 2011. Isolation of *Bacillus* producing Chitinase from Soil: Production and Purification of Chito-oligosaccharides from Chitin Extracted from Fresh Water Crustaceans and Antimicrobial Activity of Chitinase. **Recent Research in Science and Technology** 2011, 3(11): 01-06.

Okafor, N. 2007. **Modern Industrial Microbiology and Biotechnology**. Science Publishers. USA.

Patria, A. 2013. Production and characterization of Chitosan from shrimp shells waste. **AAFL Bioflux**, 2013, Volume 6, Issue 4.

Pelczar, M. J. 1972. **Microbiology** . New York: Mc-Graw Hill Book Company

Pirola, R. D. P. B., Miotto, L.S., Delabona, P.S., dan Farinnas, C.S. 2012. Improving the Extraction Conditions of Endoglucanase Produced By *Aspergillus niger* Under Solid-State Fermentation. **Brazilian Journal of Chemical Engineering** Vol. 30, No. 01, pp. 117 - 123, January - March, 2013.

Psylinakis, E., Boneca, I.G., Mavromatis, K., Deli, A., Hayhurst, E., Foster, S.J., Vårum, K.M., dan Bouriotis, V. 2005. Peptidoglycan *N*-Acetylglucosamine Deacetylases from *Bacillus cereus*, Highly Conserved Proteins in *Bacillus anthracis*. **J. Biol. Chem.** 2005, 280:30856-30863.

Prameela, K., Mohan, C.M., Smitha, P.V., dan Hemalatha, K.P.J. 2010. Bioremediation of Shrimp Biowaste by Using Natural Probiotic for Chitin and Carotenoid Production an Alternative Method to Hazardous Chemical Method. **International Journal of Applied Biology and Pharmaceutical Technology** Volume: I: Issue-3: Nov-Dec -2010.

Putranto, W.S. 2006. Purifikasi dan karakterisasi protease yang dihasilkan *Lactobacillus* dalam fermentasi susu sapi perah. **Seminar Nasional Bioteknologi “ Capturing Opportunities through Biotechnology”** Pusat Penelitian Bioteknologi – LIPI 15-16 November 2006.

Raval R., Raval, K., dan Moerschbacher BM. 2013. Enzymatic Modification of Chitosan Using Chitin Deacetylase Isolated from *Bacillus cereus*. **Volume 2 issue 1 2 : 617 doi:10.4172/scientificreports. 617.**

Raeuori, M., dan Genigeorgis, C. 1975. Effect Of PH And Sodium Chloride on Growth of *Bacillus cereus* In Laboratory Media And Certain Foods. **Applied Microbiology**, Jan 1975, P. 68-73. Vol. 29, No.1.

Rolfe, M.D., Rice, C.J., Lucchini, S., Pin, C., Thompson, A., Cameron, A.D.S., Alston, M., Stringer, M.F, Betts, R.P., Baranyi, J., Peck, M.W., dan Hinton, J.C.D. 2012. Lag Phase Is a Distinct Growth Phase That Prepares Bacteria for Exponential Growth and Involves Transient Metal Accumulation. **Journal of Bacteriology** p. 686–701.

Saima., Kuddus, M., dan Ahmad, R.I.Z. 2013. Isolation of novel chitinolytic bacteria and production optimization of extracellular chitinase. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology** (2013) 11, 39–46

Saini, B. L. 2010. **Introduction to Biotechnology**. Laxmi publication

Setyahadi, S., Bunasor, T.K., dan Hendarsyah, D. 2006. Karakterisasi Kitin Deasetilase Termotabil Isolat Bakteri Asal Pancuran Tujuh Baturaden, Jawa Tengah. **Jurnal Teknol. dan Industri Pangan**, Vol.XVII No. 1 Th. 2006.

Sharp, R. G. 2013. A Review of the Applications of Chitin and Its Derivatives in Agriculture to Modify Plant-Microbial Interactions and Improve Crop Yields. **Agronomy** **2013**, 3, 757-793; doi:10.3390/agronomy3040757.

Soejanto, I. 2009. **Design Eksperimen dengan Metode Taguchi**. Graha Ilmu. Yogyakarta.

Sulpice, R., Trenkamp, S., Steinfath, M., Usadel, B., Gibon, Y., Witucka-Wall, H., Pyl, E., Tschoep, H., Steinhauser, M.C., Guenther, M., Hoehne, M., Rohwer, J.M., Altmann, T., Fernie, A.R., dan Stitt, M. 2010. Network Analysis of Enzyme Activities and Metabolite Levels and Their Relationship to Biomass in a Large Panel of *Arabidopsis* Accessions. **The Plant Cell**, Vol. 22: 2872–2893, August 2010,

Suri, W. L., Syukur, S., dan Jamsari. 2013. Optimization of Protease Activit from Lactid Acid Bacteria (LAB) *Pediococcus pentosaceus* Isolated from Soursoup Fermentation (*Annona muricata* L.). **Jurnal Kimia Unand** (ISSN No. 2303-3401), Vol. 2 No. 1, Maret 2013.

Suryadi, Y., Priyatno, T.P., Samudra, I.M., Susilowati, D.N., Lawati, N., dan Kustaman, E. 2013. Pemurnian Parsial Dan Karakterisasi Kitinase Asal Jamur Entomopatogen *Beauveria Bassiana* Isolat BB 200109. **Jurnal AgroBiogen** 9(2): 77-84.

Swastawati, F., Wijayanti, I., dan Susanto, E. 2008. Pemanfaatan Limbah Kulit Udang Menjadi Edible Coating untuk Mengurangi Pencemaran Lingkungan. **Volume 4 No. 4 Desember 2008**.

Trisnawati, E., Andesti, A., dan Saleh, A. 2013. Pembuatan kitosan dari limbah cangkang kepiting sebagai bahan pengawet buah duku dengan variasi lama pengawetan. **Jurnal Teknik Kimia** No. 2, Vol. 19, April 2013.

Tsurayya, N. 2013. **Bakteri Keratinase dari Kawah Dieng dan Limbah Peternakan Ayam**. Tugas Akhir ITS. Surabaya.

Tsigos, I., Martinou, A., Kafetzopoulos, D., dan Bouriotis, V. 2000. Chitin deacetylases: new, versatile tools in Biotechnology. **TIBTECH** JULY 2000 (Vol. 18).

Tsigos, I., dan Bouriotis, V. 1995. Purification and Characterization of Chitin Deacetylase from *Colletotrichum lindemuthianum*. **The Journal of Biological Chemistry** Vol. 270, No. 44, Issue of November 3, pp. 26286–26291, 1995.

Toharisman, A., dan Suhartono, M.T. 2008. **Partial purification and characterization of chitin deacetylase produced by *Bacillus thermoleovorans* LW-4-11**. Pusat Penelitian Bioteknologi IPB. Bogor

Tokuyasu, K., Kameyama, M.O dan K. Hayasi, 1996. Purification and Characterization of Extracelullar Chitin Deacetylase from *Colletotrichum Lindemuthianum*. **J. Biosci. Biotechnol. Biochem.**, 60 (10): 1598 - 1603.

Tokuyasu, K., Kaneko, S., Hayashi, K., dan Mori, Y. 1999. Production of a recombinant chitin deacetylase in the culture medium of *Escherichia coli* cells. **FEBS Letters** 458 (1999) 23-26.

Trudel, J. dan Asselin, A. 1989. Detection of Chitinase Activity after Polyacrylamide Gel Elektrophoresis. **Anual Biochemistry. Tibtech** (18) : 305 – 313.

Willey, J. M., Sherwood, L.M., dan Woolverton, C.J. 2006. **Microbiology Prescott, Harley and Klein`s**. Mc-Graw Hill. USA.

Younes,I., dan Rinaudo, M. 2015. Chitin and Chitosan Preparation from Marine Sources, Structure, Properties and Application. **Mar. Drug** **2015**, 13, 1133-1174.

Young-Ju, K., Zhao, Y., Oh, K.T., Nguyen, V.N., dan Park, R.D. 2008. Enzymatic Deacetylation of Chitin by Extracellular Chitin Deacetylase from a Newly Screened *Mortierella* sp. DY-52. **J. Microbiol. Biotechnol.** (2008), 18(4), 759–766.

Zhao, Y., Park, R.D., dan Muzzarelli, R.A.A. 2010. Chitin Deacetylases : Properties and Applications. **Mar. Drugs** 2010, 8, 24-46.

Zhou, G., Zhang, H., He, Y., dan He, L. 2010. Identification of a chitin deacetylase producing bacteria isolated from soil and its fermentation optimization. **African Journal of Microbiology Research** Vol. 4(23), pp. 2597-2603, 4 December, 2010.

“Halaman ini sengaja dikosongkan”

Biodata Penulis

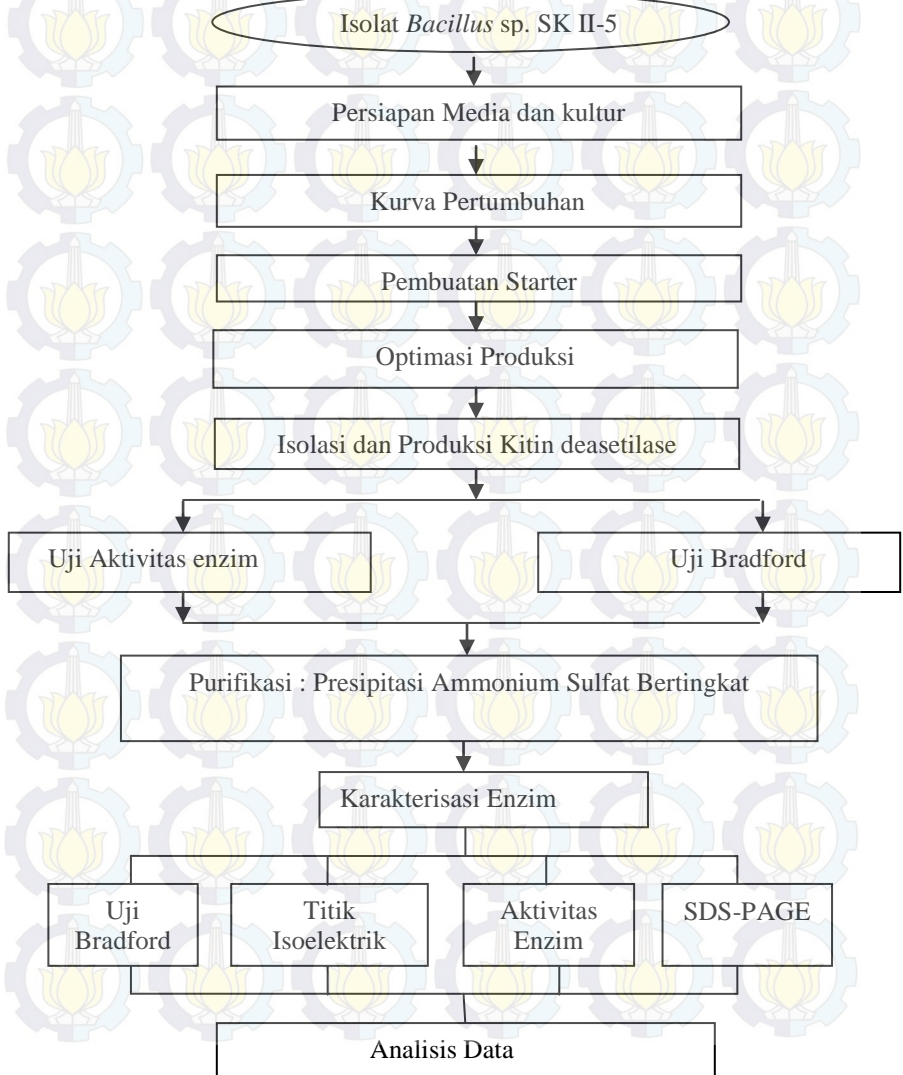


Penulis bernama lengkap Qintan Istighfarin Atmaja atau biasa dipanggil Qintan adalah putri sulung dari pasangan Guntur Tri Atmodjo dan Siti Rochmatun. Penulis kelahiran Gresik, 27 Desember 1992 ini memiliki hobi kuliner, jalan-jalan dan membaca buku. Sebelumnya penulis sempat menimba ilmu di MINU Tratee Putri Gresik, SMPN 2 Kebomas Gresik dan SMAN 1 Kebomas Gresik sebelum resmi menjadi mahasiswi jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Institut Teknologi Sepuluh Nopember. Semasa kuliah penulis sempat aktif di berbagai macam organisasi kemahasiswaan dimulai dari menjadi staf magang Kementerian Pengembangan Sumber Daya Mahasiswa (PSDM) BEM ITS periode 2011-2012, Sekretaris Umum GERIGI 2012, Sekretaris Umum II HIMABITS periode 2012-2013, Staf Kementerian Pengembangan Sumber Daya Mahasiswa (PSDM) BEM ITS periode 2012-2013, LKMM-TM, Sekretaris Umum HIMABITS periode 2013-2014. Selain di lingkungan kampus, penulis juga berkesempatan untuk aktif di lingkungan luar kampus yaitu di Paguyuban Beasiswa Karya Salemba Empat (KSE) sebagai staf Pengembangan Sumber Daya Mahasiswa (PSDM) Periode 2012-2013 dan Kepala Divisi Kaderisasi *Student Resource Development* (SRD) periode 2014-2015. Selain itu, penulis juga berkesempatan merasakan lembah Tidar Akademi Militer Magelang dalam program *Indofood Leadership Camp Batch 6* saat mendapatkan program beasiswa KSE. Penulis dapat dihubungi ke nomor 08563344583 atau iqintan@gmail.com.

“Halaman ini sengaja dikosongkan”

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Metode Penelitian



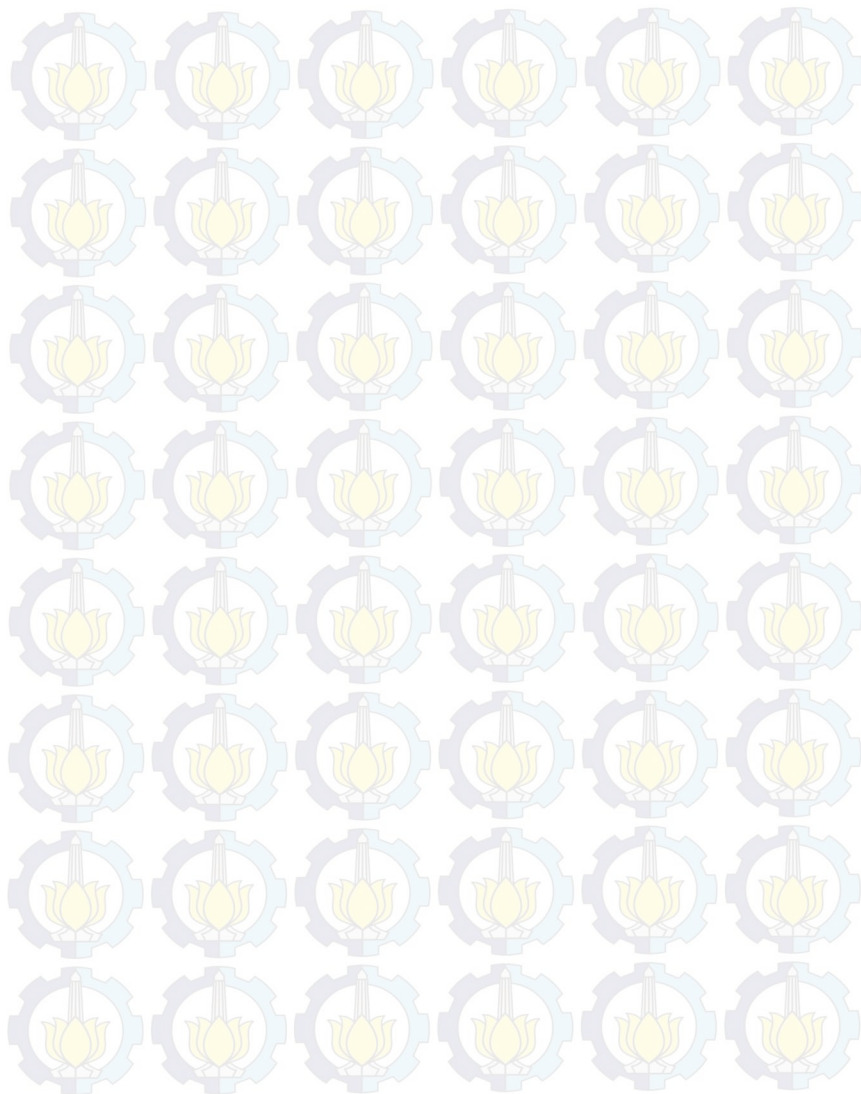
Lampiran 2. Komposisi Medium Produksi (untuk 1 L).

- | | | |
|----|---|---------|
| a. | Kitin/ bubuk kepiting/ bubuk udang | 0,5% |
| b. | <i>Yeast extract</i> | 0,2% |
| c. | Amonium sulfat ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) | 0,2% |
| d. | KH_2PO_4 | 0,1% |
| e. | <i>Tryptone</i> | 0,1% |
| f. | $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 0,01% |
| g. | Akuades | 1 Liter |

Lampiran 3. Tabel Pengamatan Kurva Pertumbuhan *Bacillus* sp. SK II-5 (pada panjang gelombang $\lambda = 600$ nm).

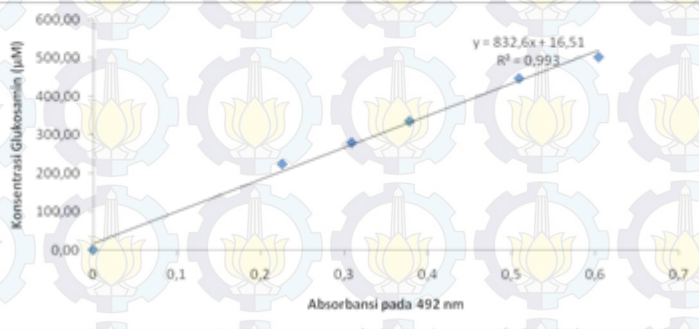
Jam Ke-	Medium Produksi Udang	Medium Produksi Kepiting	Medium NB (kontrol)
0	0,006	0,006	0,000
1	0,039	0,040	0,024
2	0,158	0,086	0,035
3	0,110	0,194	0,074
4	0,182	0,185	0,549
5	0,194	0,137	0,580
6	0,197	0,137	0,725
7	0,210	0,147	0,914
8	0,206	0,207	1,076
9	0,309	0,309	1,093
10	0,305	0,313	1,108
11	0,303	0,300	1,108
12	0,228	0,173	1,106
13	0,278	0,215	1,228
14	0,274	0,238	1,269
15	0,279	0,233	1,246
16	0,294	0,228	1,257
17	0,287	0,297	1,277
18	0,176	0,113	1,237
19	0,206	0,073	1,197
20	0,333	0,279	1,182
21	0,345	0,288	1,126
22	0,337	0,307	0,985
23	0,347	0,303	0,911

24	0,334	0,296	0,232
----	-------	-------	-------



Lampiran 4. Kurva Standar Glukosamin.

Absorbansi ($\lambda = 492 \text{ nm}$)	Konsentrasi Glukosamin (mM/ml)
0	0,00
0,226	223,25
0,309	279,06
0,378	334,88
0,509	446,50
0,604	502,32



Lampiran 5. Nilai Aktivitas Enzim Hasil Optimasi Produksi Kitin Deasetilase (U/ml).

Suhu	PH	Medium	Pengulangan		Rata-Rata	Standar Deviasi	Persen Deviasi
			1	2			
30	4	1	163,19	203,15	183,17	28,26	15,43
30	5	2	299,74	136,55	218,14	115,39	52,90
30	6	3	859,24	789,30	824,27	49,45	6,00
30	7	4	109,90	206,48	158,19	68,29	43,17
40	4	2	1195,61	1202,27	1198,94	4,71	0,39
40	5	1	979,14	992,46	985,80	9,42	0,96
40	6	4	73,27	156,53	114,90	58,87	51,24
40	7	3	1202,27	1412,09	1307,18	148,36	11,35
50	4	3	226,47	156,53	191,50	49,45	25,82
50	5	4	193,16	199,82	196,49	4,71	2,40
50	6	1	293,08	263,10	278,09	21,19	7,62
50	7	2	1315,51	1465,38	1390,44	105,97	7,62
60	4	4	106,57	186,50	146,54	56,52	38,57
60	5	3	1531,98	1152,32	1342,15	268,46	20,00
60	6	2	972,48	1109,02	1040,75	96,55	9,28
60	7	1	1395,44	825,94	1110,69	402,70	36,26

Keterangan :

Medium 1 : Sumber Karbon Kitin

Medium 2 : Sumber Karbon Kulit Udang

Medium 3 : Sumber Karbon Cangkang Kepiting

Medium 4 : Tanpa Sumber Karbon

Lampiran 6. Analisis General Linier Model ANOVA (*Analysis of Variance*) Optimasi Produksi Kitin Deasetilase.

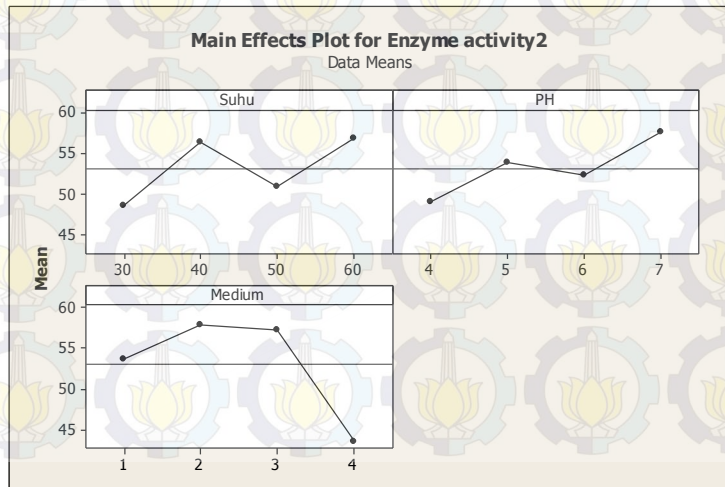
General Linear Model: Enzyme activity2 versus Suhu; PH; Medium

Factor	Type	Levels	Values
Suhu	fixed	4	30; 40; 50; 60
PH	fixed	4	4; 5; 6; 7
Medium	fixed	4	1; 2; 3; 4

Analysis of Variance for Enzyme activity2, using Adjusted SS for Tests

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Suhu	3	196,33	196,33	65,44	1,92	0,228
PH	3	152,22	152,22	50,74	1,49	0,310
Medium	3	522,47	522,47	174,16	5,10	0,043
Error	6	204,86	204,86	34,14		
Total	15	1075,87				

S = 5,84316 R-Sq = 80,96% R-Sq(adj) = 52,40%

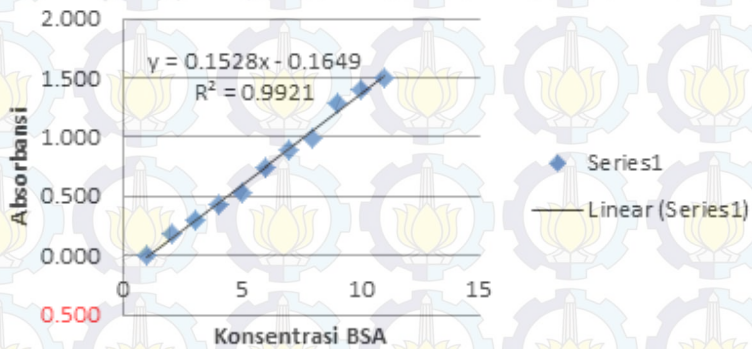


Lampiran 7. Nilai Aktivitas Enzim dan Kandungan Protein Setelah Purifikasi Amonium sulfat

Fraksi	Aktivitas Enzim (U/ml)	Kandungan Protein (mg/ml)
Crude Enzim	706,0448	0,021888
Fraksi 0-30%	366,344	0,012768
Fraksi 30-45%	406,3088	0,016416
Fraksi 45-60%	146,5376	0,018696
Fraksi 60-75%	969,1464	0,024776
Fraksi 75-90%	722,6968	0,012464

Lampiran 8. Kurva Standar BSA (*Bovine Serum Albumin*).

Konsentrasi (Mg/ml)	Absorbansi
0	0,000
0,1	0,188
0,2	0,307
0,3	0,432
0,4	0,524
0,5	0,747
0,6	0,886
0,7	0,992
0,8	1,281
0,9	1,409
1	1,504

Kurva Standar BSA

“Halaman ini sengaja dikosongkan”

