

KARAKTERISASI ENZIM KITINASE *Bacillus* sp. YANG
BERSIFAT ANTAGONIS TERHADAP *Ganoderma boninense*
PENYEBAB PENYAKIT BUSUK PANGKAL BATANG PADA
KELAPA SAWIT

OLEH
FARAH NABILA

MINAT HAMA DAN PENYAKIT TUMBUHAN
PROGRAM STUDI AGROEKOTEKNOLOGI



UNIVERSITAS BRAWIJAYA
FAKULTAS PERTANIAN
JURUSAN HAMA DAN PENYAKIT TUMBUHAN
MALANG
2015

**KARAKTERISASI ENZIM KITINASE YANG DIHASILKAN
BAKTERI BPPTCC 2 DAN BERSIFAT ANTAGONIS TERHADAP
PENYAKIT BUSUK PANGKAL (*Ganoderma boninense*) PADA
KELAPA SAWIT**

OLEH

FARAH NABILA

115040207111036

**MINAT HAMA DAN PENYAKIT TUMBUHAN
PROGRAM STUDI AGROEKOTEKNOLOGI**

SKRIPSI

Diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh

Gelar Sarjana Pertanian Strata Satu (S-1)



UNIVERSITAS BRAWIJAYA

FAKULTAS PERTANIAN

JURUSAN HAMA DAN PENYAKIT TUMBUHAN

MALANG

2015

LEMBAR PERSETUJUAN

Judul Skripsi : Pengujian Konsorsium Mikroba Antagonis untuk Mengendalikan Penyakit Pustul Bakteri (*Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines*) pada Tanaman Kedelai.
Nama : Novia Dwirani
NIM : 115040201111217
Program Studi : Agroekoteknologi
Minat : Hama Penyakit Tumbuhan
Menyetujui : Dosen Pembimbing

Pembimbing Utama,

Pembimbing Pendamping,

(Luqman Qurata Aini, SP .M.Si. Ph.D)
NIP. 197209191998021001

(Muhammad Akhid Syib'li, SP., M.P)
NIK. 201304 870826 1 001

Mengetahui,
Ketua Jurusan Hama dan Penyakit Tumbuhan

Dr. Ir. Bambang Tri Rahardjo, SU
NIP. 19550403 198303 1 003

Tanggal Persetujuan :

LEMBAR PENGESAHAN

Mengesahkan

MAJELIS PENGUJI

Penguji I

Penguji II

Nama Dosen Penguji / Pembimbing III
NIP.

Nama Dosen Pembimbing II
NIP.

Penguji III

Penguji IV

Nama Dosen Pembimbing I
NIP.

Nama Ketua Majelis
NIP.

Tanggal Lulus : <<tanggal yudisium>>



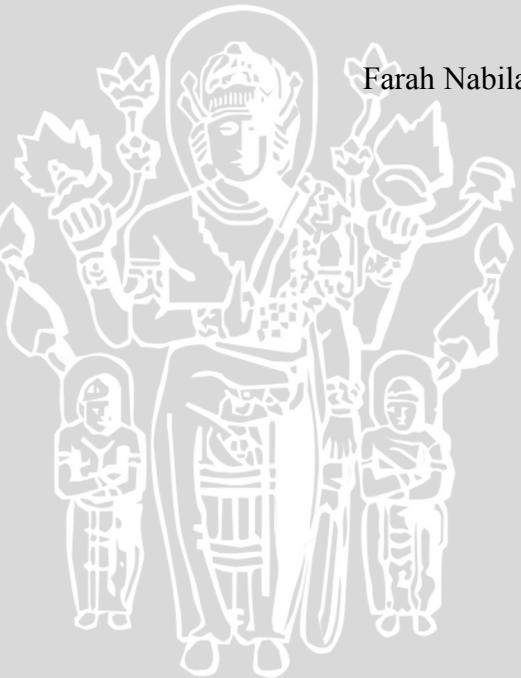
PERNYATAAN

Saya menyatakan bahwa segala pernyataan dalam skripsi ini merupakan penelitian saya sendiri, dengan bimbingan komisi pembimbing. Skripsi ini tidak pernah diajukan untuk memperoleh gelar di perguruan tinggi manapun dan sepanjang pengetahuan saya juga tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan orang lain, kecuali dengan jelas ditunjukkan rujukannya dalam naskah ini dan disebutkan dalam daftar pustaka.

Malang, Agustus 2015

Farah Nabila

UNIVERSITAS BRAWIJAYA



KATA PENGANTAR

Segala puji dan syukur penulis panjatkan kepada Tuhan Yang Maha Esa atas kasih dan penyertaan-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini. Penulisan skripsi ini dilakukan dalam rangka memenuhi salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Pertanian pada Fakultas Pertanian Universitas Brawijaya. Penulis mengucapkan rasa terimakasih dan hormat sebesar-besarnya kepada :

1. Dr. Ir. Bambang Tri Rahardjo, SU selaku Ketua Jurusan Hama dan Penyakit Tumbuhan Fakultas Pertanian Universitas Brawijaya Malang.
2. Luqman Qurata Aini, SP .M.Si. Ph.D selaku pembimbing I dan IMuhammad Akhid Syib'li, SP., M.P selaku pembimbing II.
3. Dr. Ir. Siswa Setyahadi, M.Sc., selaku pembimbing lapangan.
4. Seluruh staf pengajar Fakultas Pertanian Universitas Brawijaya.
5. Syamsi Rizal, Laras, Ervin, Faranissa, Rohana, Dhanu, Yudit, Rizky atas semua bantuan dan canda tawa selama hidup di Malang.
6. Teman-teman dan kakak-kakak di LAPTIAB-BPPT atas segala bantuannya selama penulis menjalani penelitian ini;
7. Para sahabat dan seluruh pihak yang tidak dapat disebutkan satu persatu atas segala dukungan, bantuan, dan semangat yang diberikan baik secara langsung maupun tidak langsung.

Akhir kata, penulis berharap Allah SWT selalu menyertai kita semua dengan kasih-Nya yang tidak pernah berubah. Penulis menyadari penelitian dan penyusunan skripsi ini masih belum sempurna sehingga penulis memohon maaf atas segala kesalahan yang ada. Oleh karena itu, penulis mengharapkan kritik dan saran yang membangun. Semoga skripsi ini dapat membawa manfaat bagi pengembangan ilmu pengetahuan.

Penulis

2015



RIWAYAT HIDUP

Penulis merupakan putri pertama dari tiga bersaudara pasangan Zainuddin dan Hamida. Penulis memulai pendidikan dasar di SDN SETU II (1999-2005), kemudian melanjutkan pendidikan di SMPN 8 Tangerang Selatan (2005-2008), selanjutnya di SMAN 3 Tangerang Selatan (2008-2011). Pada tahun 2011 penulis melanjutkan pendidikan di Program Studi Agroekoteknologi Fakultas Pertanian Universitas Brawijaya Malang melalui jalur SPMK.

Selama menempuh pendidikan di Perguruan Tinggi, penulis memiliki pengalaman organisasi intra kampus yaitu dalam berbagai kepanitiaan diantaranya panitia INAGURASI FP UB 2011 sebagai anggota divisi konsumsi, dan panitia RANTAI III sebagai divisi pendamping. Penulis pernah melakukan kegiatan magang kerja selama tiga bulan dari bulan Juli – Oktober 2014 di LAPTIAB BPPT Serpong, Tangerang Selatan – Banten.



DAFTAR ISI

SUMMARY	i
RINGKASAN	ii
KATA PENGANTAR	iii
RIWAYAT HIDUP	v
DAFTAR ISI.....	vi
DAFTAR TABEL	viii
DAFTAR GAMBAR.....	ix
I. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Tujuan Penelitian	3
1.3 Hipotesis Penelitian	3
1.4 Manfaat Penelitian	3
II. TINJAUAN PUSTAKA	4
2.1 Kelapa Sawit	4
2.1.1 Morfologi Tanaman Kelapa Sawit	4
2.1.2 Syarat Tumbuh	5
2.2 Penyakit Busuk Pangkal Batang Kelapa Sawit	6
2.2.1 Biologi Penyebab Penyakit	6
2.2.2 Daur Hidup Penyakit	7
2.2.3 Gejala Serangan	8
2.2.4 Faktor yang Mempengaruhi	9
2.2.5 Pengendalian Penyakit	9
2.3 Bakteri Kitinolitik	10
2.3.1 Senyawa Kitin	10
2.3.2 Klasifikasi Kitinase	11

2.4 Biosintesis Enzim Kitinase	13
2.5 Klasifikasi Enzim Kitinase	14
2.6 Metode Pemekatan Enzim	15
2.7 Kegunaan Enzim Kitinase	16
2.8 Faktor yang Mempengaruhi Aktivitas Enzim.....	17
III. METODOLOGI	19
3.1 Tempat dan Waktu	19
3.2 Alat dan Bahan.....	19
3.3 Cara Kerja	20
3.3.1 Pembuatan Koloidal Kitin	20
3.3.2 Pembuatan Media	20
3.3.3 Seleksi Isolat Potensial	20
3.3.3.1 Pembentukan Zona Bening	21
3.3.3.2 Produksi Enzim Kitinase	21
3.4 Penentuan Aktivitas Enzim.....	22
3.5 Penentuan Kadar Protein.....	22
3.6 Pengendapan dengan Ammonium Sulfat.....	23
3.7 Dialisis	23
3.8 Identifikasi Enzim Berdasarkan SDS PAGE dan Zimogram	24
3.9 Peremajaan <i>Ganoderma boninense</i>	25
3.10 Uji Antagonis Bakteri BPPT CC 2 Terhadap <i>Ganoderma boninense</i>	25
IV. HASIL DAN PEMBAHASAN.....	26
4.1 Seleksi Isolat Potensial	26
4.2 Produksi dan Pemurnian Parsial Kitinase	27
4.3 Karakterisasi Kitinase Hasil Pemurnian	30
4.4 Potensi Bakteri BPPT CC 2 dalam Menghasilkan Antagonis terhadap <i>Ganoderma boninense</i>	33
V. KESIMPULAN DAN SARAN	36
5.1 Kesimpulan	36
5.2 Saran	36
DAFTAR PUSTAKA	37

DAFTAR TABEL

Nomor	Halaman
1. Hasil Konfirmasi Isolat Potensial	26
2. Nilai Absorbansi Beberapa Konsentrasi N-Asetilglukosamin	27
3. Hasil Uji Aktivitas Enzim	28
4. Nilai Absorbansi Beberapa Konsentrasi Bovine Serum Albumin	30
5. Kadar Protein Enzim Kitinase Kasar dan Hasil Pemurnian	31
6. Hasil Uji Aktivitas Spesifik Enzim Kitinase Kasar dan Hasil Pemurnian .	32



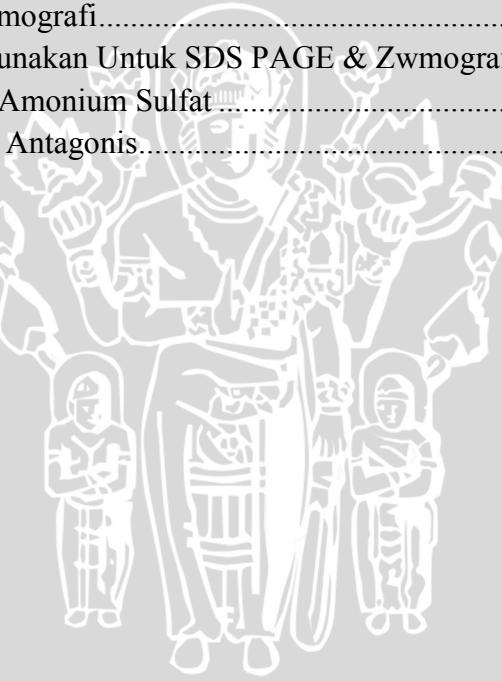
TABEL GAMBAR

Nomor	Halaman
1. Miselium <i>Ganoderma boninense</i>	6
2. Struktur Kimia Kitin	11
3. Skema Pemutusan Enzim Kitinolitik	12
4. Struktur Kitinase	13
5. Isolat <i>G.boninense</i>	20
6. Kurva Kalibrasi N-asetilglukosamin	27
7. Kurva Kalibrasi BSA	30
8. Hasil SDS PAGE.....	32
9. Hasil Zymografi	33
10. Pembentukan Zona Bening	34
11. Isolat Bakteri <i>Bacillus</i> sp. Potensial	35
12. Penghambatan Bakteri <i>Bacillus</i> sp. Terhadap <i>G.boninense</i>	35



DAFTAR LAMPIRAN

Nomor	Halaman
1. Data dan Kurva Kalibrasi N-asetilglukosamin.....	41
2. Data dan Kurva Kalibrasi BSA	42
3. Kitin <i>Flakes</i> Kolloidal Kitin.....	43
4. Data Absorbansi dan Perhitungan Aktivitas Kitinase	44
5. Data Absorbansi dan Perhitungan Kadar Protein.....	45
6. Pembuatan Reagen	46
7. Komposisi Gel SDS PAGE dan Zymografi	49
8. Perhitungan Aktivitas Kitinase.....	50
9. Perhitungan Kadar Protein	51
10. Perhitungan Aktivitas Spesifik.....	52
11. Perhitungan rf Zimografi.....	53
12. Marker yang Digunakan Untuk SDS PAGE & Zwmografi	54
13. Tabel Presipitasi Amonium Sulfat	55
14. Table Anova Uju Antagonis.....	56



1. PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Ganoderma.sp adalah jamur pangkal batang yang bersifat saprofit dan juga bersifat patogen pada tanaman kelapa sawit (*Elaeis guineensis jack*). Di Indonesia, penyakit busuk pangkal batang oleh *G.boninense* adalah penyakit yang terpenting dalam perkebunan kelapa sawit. Karena insiden penyakit ini semakin lama semakin meningkat. Kelapa sawit yang dibudidayakan sesudah penanaman beberapa generasi akan mendapat serangan yang lebih berat dari penyakit busuk pangkal batang. Menurut Venkatarayyan (1936), jenis *G.boninense* dapat menyerang 44 jenis tanaman, yang termasuk kedalam 34 genus *Elaeis*, antara lain: kelapa, pinang, dan kelapa sawit. Sumber infeksi yang berperan pentng bagi tanaman kelapa sawit diantaranya tungkul – tungkul kelapa dan kelapa sawit itu sendiri (Khairuddin,1993). Penularan penyakit ini terjadi melalui kontak akar tanaman sehat dengan sumber infeksi didalam tanah seperti potongan akar padat dan batang yang mengandung koloni patogen (Haryono,2000).

G.boninense termasuk jamur yang membentuk banyak tubuh buah dan sampai sekarang peran sporanya belum diketahui dengan jelas. Namun pada umumnya dianggap bahwa spora (Basidiospora) tidak dapat menyebabkan terjadinya infeksi langsung pada tanaman kelapa sawit, sehingga diduga bahwa dengan spora ini jamur dapat berkembang pada tungkul – tungkul atau kayu – kayu yang seterusnya bahan – bahan ini dapat menjadi sumber infeksi bagi kelapa sawit sehat. Jadi spora lebih berfungsi untuk menyebarkan sumber infeksi (Haryono,2000).

Pengendalian penyakit busuk pangkal batang dapat dilakukan juga dengan menggunakan agens hayati seperti bakteri kitinolitik (Duffy, 1995). Bakteri tersebut mampu mengeluarkan enzim yang dapat menguraikan dinding sel jamur atau hama yang mengandung komponen kitin. Bakteri kitinolitik dapat menghasilkan endokitinase, kitobiase, dan eksokitinase yang bekerja secara sinergis dalam mendegradasi kitin menjadi N-asetilglukosamin bebas. Selain kemampuannya mendegradasi kitin secara langsung, kitinase melepaskan oligo-



N-asetilglukosamin yang berfungsi mengaktifkan mekanisme pertahanan tubuh tanaman (Gohel *et al.* 2006).

Bacillus sp. BPPT CC 2 merupakan isolat yang diperoleh dari hasil penapisan air di Sumatera Utara. Isolat ini berbentuk batang dan berpotensi sebagai penghasil enzim kitinase. Optimasi telah dilakukan untuk produksi N-asetilglukosamin menggunakan enzim kitinase yang berasal dari bakteri ini. Menurut Manggadani (2012), bakteri *Bacillus* sp. BPPTCC 2 memiliki rendemen N-asetilglukosamin tertinggi sampai dengan nilai 99.41% dari proses hidrolisis 3% substrat kitin flakes dengan aktivitas sebesar 0.2 Unit enzim dengan pH 7.0 dan suhu inkubasi 37°C selama 5 hari (Maggadani 2012). Hasil tersebut sangat tinggi, sehingga mengindikasikan bahwa enzimkitinase dari *Bacillus* sp. BPPTCC 2 dapat digunakan untuk biokonversi kitin menjadi N-asetilglukosamin untuk kepentingan industri.

Enzim kitinase memiliki peranan penting pada pengendalian busuk pangkal batang (*Ganoderma boninense*) pada kelapa sawit. Bakteri *Bacillus* sp. BPPTCC 2 memiliki potensi untuk menghasilkan enzim kitinase. Namun, penelitian yang telah dilakukan hanya pada kualitatif sehingga perlu dilakukan penelitian lebih lanjut secara kuantitatif.

1.2. Tujuan

1. Mengetahui isolat *Bacillus* sp. BPPTCC 2 sebagai penghasil enzim kitinase dan antagonis terhadap *G. boninense*
2. Mengukur aktivitas enzim kitinase dari bakteri *Bacillus* sp. BPPTCC 2 secara kuantitatif.
3. Mengukur kadar protein dari bakteri *Bacillus* sp. BPPTCC 2 secara kuantitatif.
4. Mengetahui konfirmasi aktivitas enzim kitinase dan antagonisme yang dihasilkan isolat *Bacillus* sp. BPPTCC 2
5. Mengukur tingkat kemurnian enzim kitinase dari bakteri *Bacillus* sp. BPPTCC 2 secara kuantitatif

1.3. Hipotesis



1. Isolat *Bacillus* sp. BPPTCC 2 merupakan bakteri penghasil enzim kitinase dan bersifat antagonis terhadap *G. boninense*.
2. Isolat *Bacillus* sp. BPPTCC 2 memiliki aktivitas enzim yang tinggi.
3. Isolat *Bacillus* sp. BPPTCC 2 memiliki kadar protein yang tinggi.
4. Isolat *Bacillus* sp. BPPTCC 2 memiliki tingkat kemurnian yang tinggi.

1.4. Manfaat

1. Penelitian ini diharapkan memberikan kontribusi pada perkembangan iptek terutama pada bidang perkebunan
2. Bahan informasi untuk penelitian yang lebih lanjut dan instansi terkait



2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Kelapa Sawit

Berdasarkan bukti-bukti yang ada, kelapa sawit diperkirakan berasal dari Nigeria, Afrika barat. Namun ada pula yang menyatakan tanaman tersebut berasal dari Amerika, yakni Brazilia. Tanaman kelapa sawit berasal dari tanaman tersier, yang merupakan daratan penghubung yang terletak di antara Afrika dan Amerika. Kedua daratan itu kemudian terpisah oleh lautan menjadi dua benua Afrika dan Amerika sehingga tempat asal komoditas kelapa sawit tidak lagi dipermasalahkan orang (Risza, 1994). Kelapa sawit saat ini telah berkembang pesat di Asia Tenggara, khususnya Indonesia dan Malaysia, dan justru bukan di Afrika barat atau Amerika yang dianggap sebagai daerah asalnya. Masuknya bibit kelapa sawit ke Indonesia pada tahun 1948 hanya sebanyak empat batang yang berasal dari Bourbon (Mauritus) dan Amsterdam. Keempat batang bibit kelapa sawit tersebut ditanam di Kebun Raya Bogor dan selanjutnya disebarluaskan di Deli Sumatera Utara (Risza, 1994).

Kelapa sawit di Indonesia dewasa ini merupakan komoditas primadona. Luasnya perkebunan kelapa sawit terus berkembang dan tidak hanya merupakan monopoli perkebunan besar negara atau perkebunan besar swasta. Perkebunan kelapa sawit yang semula hanya di Sumatera Utara dan Daerah Istimewa Aceh saat ini sudah berkembang di beberapa provinsi antara lain Sumatera Barat, Sumatera Selatan, Jambi, Bengkulu, Riau, Kalimantan Timur, Kalimantan Barat, Kalimantan Tengah, Kalimantan Selatan, Irian Jaya, Sulawesi Selatan, Sulawesi Tengah, Sulawesi Utara dan Jawa Barat. Permintaan minyak kelapa sawit disamping digunakan sebagai industri pangan juga digunakan sebagai bahan mentah industri non pangan. Jika dilihat dari biaya produksinya, komoditas kelapa sawit jauh lebih rendah dari pada minyak nabati yang lainnya (Risza, 1994). Di Sumatera, sebagai sentral perkebunan kelapa sawit, banyak daerah baru tumbuh akibat langsung dari perkebunan sawit. Hal yang cukup fantastis terjadi di provinsi Riau yang meliputi lima kabupaten, Siak, Pelelawan, Rokan Hulu, Indragiri Hulu dan Kampar. Sepanjang jalur lintas timur, lintas tengah, dan lintas



barat Sumatera antara Medan-Palembang, di kanan kiri jalan yang terlihat hanyalah hamparan perkebunan sawit dan karet. Tidak heran jika total luas areal tanaman kelapa sawit di seluruh Indonesia dalam 20 tahun terakhir berkembang cukup pesat (Budiyanto *et al.* 2005). Sebagai negara penghasil kelapa sawit terbesar, Indonesia telah menjadikan komoditas ini sebagai penggerak utama, pemicu dan pemacu ekonomi Indonesia. Kelapa sawit mengakumulasi hampir seluruh kegiatan penelitian pengembangan dan rekayasa. Produksi minyak sawit mentah (CPO) diperkirakan melewati 13 juta ton pada 2005, sedikit lebih rendah dari produksi Malaysia sebagai produsen CPO terbesar didunia (Lukman, 2005).

Klasifikasi Kelapa sawit menurut Tjitrosoepomo (2002) adalah sebagai berikut:

Kingdom	:	Plantae
Divisi	:	Spermatophyta
Subdivisi	:	Angiospermae
Klas	:	Monocotyledoneae
Ordo	:	Arecales
Famili	:	Arecaceae
Genus	:	Elaeis
Spesies	:	<i>Elaeis guineensis</i> Jacq.

2.1.1 Morfologi Tanaman Kelapa Sawit

Kelapa sawit termasuk pohon. Tingginya dapat mencapai 24 m. Bunga dan buahnya berupa tandan, bercabang banyak. Buahnya kecil, bila masak berwarna merah kehitaman. Daging buahnya padat. Daging dan kulit buahnya mengandung minyak. Minyaknya itu digunakan sebagai bahan minyak goreng, sabun, dan lilin. Ampasnya dimanfaatkan untuk makanan ternak. Ampas yang disebut bungkil itu digunakan sebagai salah satu bahan pembuatan makanan ayam.

2.1.2 Syarat Tumbuh Kelapa Sawit

Kelapa sawit berkembang biak dengan biji, tumbuh di daerah tropika, pada ketinggian 0-500 m diatas permukaan laut. Kelapa sawit menyukai tanah yang subur, di tempat terbuka dan dengan kelembapan yang tinggi. Kelembapan tinggi



itu antara lain ditentukan oleh adanya curah hujan yang tinggi, sekitar 2000-2500 mm pertahun. Tumbuhan kelapa sawit dibedakan atas dua bagian, yakni bagian vegetatif dan generatif. Menurut Risza (1994) bagian vegetatif meliputi akar, batang, dan daun, sedangkan bagian generatif meliputi bunga, buah dan biji.

2.2. Penyakit Busuk Pangkal Batang Pada Kelapa Sawit

1. Biologi Penyebab Penyakit

Menurut Agrios (1996) taksonomi penyakit busuk pangkal batang yaitu :

Kingdom	: Fungi
Phylum	: Basidiomycota
Class	: Basidiomycetes
Subclass	: Agaricomycetidae
Order	: Polyporales
Family	: Ganodermataceae
Genus	: Ganoderma
Species	: <i>Ganoderma boninense</i> Pat.



Gambar 1. miselium *G.boninense*(Abadi, 1987)

Basidiospora berbentuk elips dengan warna keemasan, bagian sisi atas membentuk seperti irisan yang datar agak lengkung, permukaannya terlihat berduridankadangterlihatvakuola.Percobaanuntukmembentukbasidiokarp padabiakkannurnibelumpernahberhasil.Pembiakkancendawanpadamedia agar berupa dekstrose, kentang, dan agar malt, membentuk koloni miselia berwarna putih seperti kapas dan padaumur 8 hari atau lebih, maka biakkan

mengalami perubahan warna menjadi kuning kecoklatan pada bagian tengahnya (Abadi, 1987). Basidiospora

tidak mempunyaikemampuanparasitikyangcukup tetapi mempunyaikemampuan saprofitik untuk mengkoloni substrat dan membangun inokulum yang berpotensi untuk menginfeksi tanaman sehat. Cara penularan utamanya yang terjadi di lapangan adalah melalui kontak akar pada tanaman sakit (Turner, 1981).

Sejumlah faktor lingkungan telah dilaporkan memiliki pengaruh terhadap perkembangan penyakit busuk pangkal batang. Kondisi yang melemahkan tanaman dapat mempredisposisi infeksi. Tekstur tanah pesisir yang liat, kadar Na dan Mg yang tinggi dan kekurangan hara tertentu dapat meningkatkan insiden di lapangan (Turner, 1981). Di Indonesia, *G. boninense* dapat tumbuh pada pH 3-8.5 dengan temperatur optimal 30°C dan terganggu pertumbuhannya pada suhu 15°C dan 35°C, dan tidak dapat tumbuh pada suhu 40°C. Penyebab busuk pangkal batang pada kelapa sawit berbeda di tiap negara.

Di Afrika Selatan, busuk pangkal batang disebabkan oleh *G. lucidum* Karst. sedangkan di Nigeria disebabkan oleh jamur *G. zonatum*, *G. encidum*, *G. colossus*, dan *G. applanatum*. Di Malaysia, spesies teridentifikasi sebagai penyebab busuk pangkal batang yaitu *G. boninense*, sementara *G. tornatum* hanya ditemukan tumbuh di pedalam dan tarantinggi dengan curah hujan tinggi. Di Indonesia, jamur *G. boninense* Pat. teridentifikasi sebagai spesies jamur yang paling gumen menyerang padatanaman kelapa sawit (Jing, 2007).

2. Daur Hidup Penyakit Busuk Pangkal Batang

Di Indonesia, *G. boninense* Pat. dapat tumbuh pada pH 3-8.5 dengan temperatur optimal 30°C dan terganggu pertumbuhannya pada suhu 15°C dan 35°C, dan tidak dapat tumbuh pada suhu 40°C. Penyebab busuk pangkal batang pada kelapa sawit berbeda di tiap negara. Di Afrika Selatan, busuk pangkal batang disebabkan oleh *G. lucidum* Karst. sedangkan di Nigeria disebabkan oleh jamur *G. zonatum*, *G. encidum*, *G. colossus*, dan *G. applanatum*. Di Malaysia, spesies



teridentifikasi sebagai penyebab busuk pangkal batang yaitu *G. boninense* Pat., sementara *G. tornatum* hanya ditemukan tumbuh di pedalam dan tarantinggi dengan curah hujan tinggi. Di Indonesia, jamur *G. boninense* Pat. teridentifikasi sebagai spesies jamur yang paling gumpum menyerang pada tanaman kelapa sawit (Jing, 2007).

3. Gejala Serangan Busuk Pangkal Batang

Gejala ditandai dengan mati dan mengeringnya tanaman dapat terjadi bersamaan dengan adanya serangan rayap. Dapat diasumsikan jika gejala pada daun terlihat, maka setengah batang kelapa sawit telah hancur oleh *G. boninense* Pat. Padatanaman belum menghasilkan, saat gejala muncul, tanaman akan mati setelah 7 sampai 12 bulan, sementara tanaman dewasa akan mati setelah 2 tahun. Saat gejala tajuk muncul, biasanya setengah dari jaringan didalam pangkal batang sudah mati oleh *G. boninense* Pat. Sebagai tambahan, gejala internal yang ditandai dengan busuk pangkal batang muncul. Dalam jaringan yang busuk, luka terlihat dari area berwarna coklat muda diikuti dengan area gelap seperti bayangan pita, yang umumnya disebut zona reaksi resin (Semangun, 1990).

Secara mikroskopik, pada jaringan korteks dari akar yang terinfeksi berubah menjadi coklat sampai putih. Pada serangan lanjutan, jaringan korteks menjadiparuh dan mudah hancur. Jaringan stelak arteri infeksi menadi hitam pada serangan berat. Hifa umumnya berada pada jaringan korteks, endodermis, perisel, xilem dan floem. *Klamidosporae* sering dibentuk untuk bertahan hidup pada kondisi ekstrim. Bilatan aman sawit sudah terserang berat, tubuh buah jamur akan muncul pada bagian pangkal batang *G. boninense* Pat. akan terbentuk pada pangkal batang atau akar sakit didekat batang. Tanaman mati dalam 6-12 bulan setelah terlihat gejala awal pada daun, dan banyak tanaman sakit tumbang sebelum badan buah jamur terbentuk terutama pada tanaman mudah dengan generasi tanaman yang lebih besar, misalnya pada pertanaman sawit generasi ketiga dan keempat (Susanto, 2007).

4. Faktor yang Mempengaruhi



Saatini,pertumbuhanpenyakit*G.boninense*diperkebunankelapa sawit terutamadipicu oleh generasi perkebunan. Semakin tinggi generasi perkebunan, semakin parah serangan penyakit hingga menyerang tanaman belum menghasilkan.Padaperkebunankelapa sawit di lahan gambut, perkembangan infeksi*G.boninense* cenderung meningkat,disebabkanolehmechanisme pemencaran melalui basidiospora. Penyakit busuk pangkal batang terutama menyebar melalui kontak akar daritanaman sehat dengan sumber inokulum yang dapat berupa akar atau batang sakit.Selain batang kelapa sawit, akar yang terinfeksi merupakan inokulum utama penyakit*G.boninense* pada kelapa sawit. Mekanisme infeksi didukung oleh pola persebaran penyakit yang mengelompok (Idris, 2008).

Tanaman sakit biasanya di kelingi oleh tanaman sakit dengan jalur lebih ringan. Banyak sekali kelapa sawit yang mati akibat busuk pangkal batang ketika sistem *underplanting* digunakan.Karenanya metode ini menGGUNAKAN sistem penanaman tanaman mudah bawahtanaman tua. Disisi lain,basidiospora juga telah dinyatakan memainkan peranan penting dalam menyebarkan penyakit. Basidiosporatidak selalu membentuk miselium sekunderdantubuh buah karena memerlukan tipe perkawinan yang sama. Basidiospora dibebaskan dan menyebar secarabesar-besaran pada pukul 22.00-06.00,dan lebih sedikit pada pukul 12.00-16.00.Pemencaran ini juga dibantu oleh kumbang *Oryctes rhinoceros* yang larvanya umum ditemukan pada batang kelapa sawit yang busuk (Susanto, 2007).

5. Pengendalian Penyakit Busuk Pangkal Batang

Hasil-hasil penelitian yang telah dilakukan menghasilkan strategi pengendalian penyakit BPB yang paling menjalikannya itu dengan menerapkan pengendalian terpadu yang merupakan kombinasi dari pengendalian hayati yaitu perlakuan bibit dengan jamur antagonis (*Trichoderma* spp. dan *Gliocladium* spp.) dan Mikoriza,pemanfaatan tanaman yang toleran terhadap serangan *Ganoderma*, pembuatan paritis isolasi untuk tanaman terinfeksi,dan pemusnahannya inokulum



dengan cara membongkar tanah dan memusnahkan tungkul-tungkul serta akar-akar tanaman terinfeksi kemudian dibakar (Lizarmi, 2011).

SusantodanAgus (2008) menyatakan bahwa wainfeksi pada tanaman muda (umur 1–6 tahun) tanaman dimatikan dengan melakukan penyuntikkan. Pada daerah bekas tanaman sakit dibuat lubang besar berukuran 1m x 1m x 60cm kemudian lubang dibiarkan minimal selama 6 bulan, baru dilakukan penanaman dan pemberian 200gr *Trichoderma* atau 400gr *Marfu*. Tanah untuk menimbun kembali sisipan diambil dari topsoil yang baru. Perlakuannya yang sama juga diberikan pada tanaman muda yang terserang berat *G.boninense*. Di areal konversi, bila ada tanaman yang terserang *G.boninense* dibuat parit keliling pohon sejarak 2,5m dari pangkal pohon sedalam 80cm. Kemudian ditabur belerang ke dinding parit sebelah dalam sebanyak 3-4kg/pohon. Padatanaman umur 7–23 tahun dilakukan pembumbunan pada pangkal pohon dengan tujuan menumbuhkan akar baru dan mencegah agar pohon tidak tumbang, namun pembumbunan tidak mampu untuk membunuh patogen *G.boninense*. Pembumbunan minimal selebar 75 cm dan tinggi 30 cm.

2.3. Enzim Kitinase

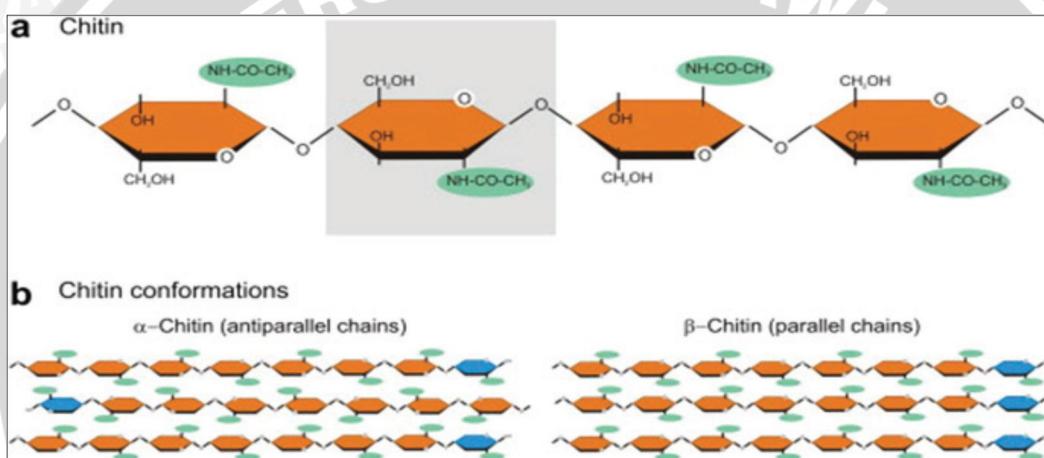
1. Senyawa Kitin

Kitin adalah suatu polisakarida, polimer linier yang tersusun oleh monomernya β -1,4-N-asetilglukosamin. Kelimpahan kitin di alam menempati urutan terbesar kedua setelah selulosa dan terdistribusi luas di lingkungan biosfer seperti pada kulit *crustaceae* (kepiting, udang dan lobster), ubur-ubur, komponen struktural *eksoskeleton* insekt, dinding sel fungi (22-40%), alga juga dalam *nematoda*, binatang ataupun tumbuhan. Pada binatang, kitin merupakan struktur yang rigid pada eksoskeleton. Hal ini dikarenakan pada rantai polimer N-asetilglukosamin terdapat ikatan hidrogen antar molekul membentuk mikrofibril menghasilkan struktur yang stabil dan rigid, tidak larut dalam air sehingga dapat mengkristal (Emma, 1997).

Seperti halnya pada fungi, kitin yang ditemukan dalam tanaman juga mendukung dinding selnya. Keberadaan kitin di alam yang sangat melimpah ini



dengan cepat terdegradasi, karena adanya beberapa bakteri dan fungi yang mempunyai enzim kitinase yang mampu mendegradasi kitin. Kitin dapat didegradasi dalam dua jalur. Pertama adalah degradasi oleh mekanisme kitinolitik yang menghidrolisis ikatan β -1,4-glikosida, atau polimer mengalami deasetilasi pertama yang selanjutnya dihidrolisis oleh kitosanase. Jumlah kitin yang dapat dihasilkan per tahunnya dalam biosfer sangat banyak sekali. Pada tahun 1993 diperkirakan dunia dapat memperoleh kembali kitin dari invertebrata laut sebanyak 37.000 ton dan meningkat menjadi 80.000 ton pada tahun 2000 (Kihaciro *et al.* 2002).

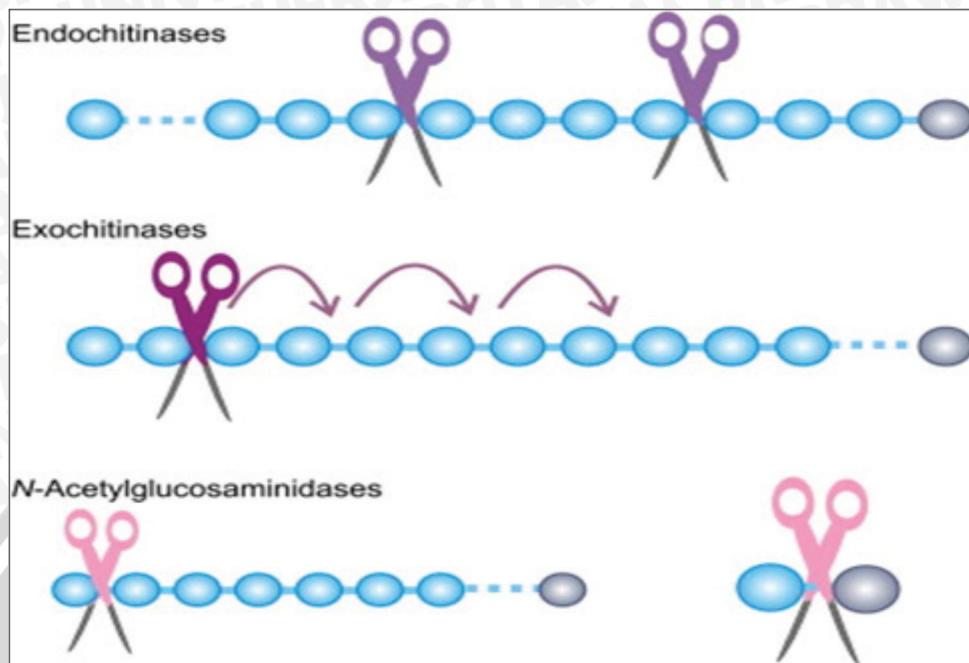


Gambar 2. Struktur kimia dari kitin. Kotak abu-abu menunjukkan satu subunit N-acetylglucosamine dari rantai kitin. (b) Dua jenis utama dari kitin dicirikan oleh penataan rantai antiparalel (α -kitin) atau parallel (β -kitin) (Scopes, 1994).

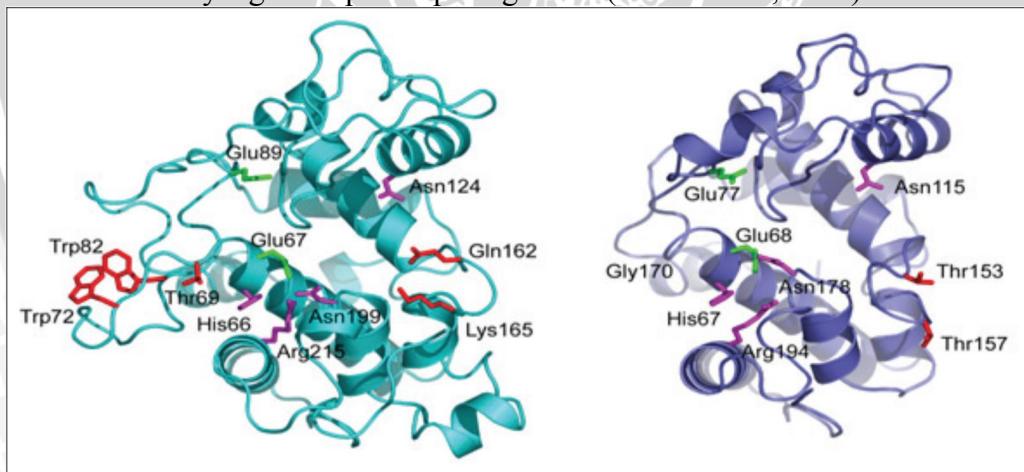
2. Klasifikasi Kitinase

Kitinase dapat diperoleh dari berbagai organisme, termasuk virus, bakteri, jamur, serangga, tumbuhan tingkat tinggi dan hewan, yang mampu menghidrolisis kitin (Park *et al.*, 1997). Semua enzim yang dapat mendegradasi kitin disebut sebagai kitinase. Peran kitinase dalam organisme sangat beragam. Berdasarkan mode of action, kitinase dapat diklasifikasikan ke dalam dua kategori utama, endo dan ekso-kitinase. Endokitinase mendegradasi kitin secara acak dari dalam menghasilkan oligomer pendek N-asetil-D-glukosamin. Eksokitinase memotong kitin hanya dari ujung non reduksi. Bila hasil pemotongan berupa dimer (β -1,4-Nasetil-glukosamin) disebut kitobiosidase,

namun bila potongan yang dihasilkan berupa monomer maka enzim tersebut dinamakan N-asetilglukosaminidase (Shakhsbazar, 2009). Berdasarkan komposisi asam amino dan kesamaan sekuen, kitinase dapat diklasifikasikan ke dalam lima kelas, I, II, III, IV dan V. Kitinase pada tanaman sebagian besar berada dalam kelas 1-IV. Kitinase kelas I, memiliki domain N-terminal kaya sistein dan domain kitin berikatan hevein (chitin-binding hevein-like domain). Kitinase kelas II tersusun dari domain katalitik yang monomernya homologi dengan domain katalitik kitinase kelas I, tetapi tidak memiliki domain N-terminal kaya sistein dan domain kitin berikatan hevein. Selain pada tanaman, kitinase kelas II juga ditemukan pada jamur dan bakteri. Kitinase kelas III hanya memiliki sekuen yang homologi dengan kitinase Hevea brasiliensis, dan tidak memiliki kesamaan sekuen dengan kitinase tanaman lain. Kitinase kelas IV memiliki kesamaan struktur tetapi sekuen berbeda dengan kitinase kelas I dan kitinase ini mewakili kelompok kitinase ekstraseluler. Kitinase kelas V, umumnya kitinase yang terdapat pada bakteri. Semua kitinase dikelompokkan menjadi tiga keluarga hidrolase glycosyl (GH) yaitu keluarga (family) 18, 19 dan 20. Family 18 meliputi kitinase dari bakteri, jamur, virus, dan beberapa kitinase dari tanaman dan hewan (kelas III dan V). Family 19 meliputi keseluruhan kitinase tanaman (kelas I, II, dan IV). Family 20 meliputi β -N-acetylhexosaminidases dari bakteri streptomycetes dan manusia (Shakhsbazar, 2009).



Gambar 3. Skema pola pemutusan domain enzimkitinolitik. Subunit dari rantai kitin diperlihatkan dengan warna biru terang dan ujung gulapereduksi dengan warna abu-abu. Garis putus-putus menunjukkan bahwa substrat polimer lebih panjang dari yang ditampilkan pada gambar (Shakhsbazau, 2009).



Gambar 4. Struktur GH19 kitinase barley (kiri, ID PDB 1cns) dan ChiG dari *S. coelicolor* (kanan, ID PDB 2cjl). Rantai samping katalitik ditampilkan dalam warna hijau. Rantai samping beberapa residu yang terlibat dalam mengikat substrat dan katalisis ditampilkan dalam warna merah dan ungu (Cohen and Chet, 1998).

2.4 Biosintesis Enzim Kitinase Pada Mikroorganisme

Pengamatan biosintesis enzim kitinase melalui sistem represor-induser. Kitin dan produk hasil degradasinya (oligomer/monomer) berperan sebagai induser (Sahai *and* Manocha, 1993). Glukosamin dapat menginduksi kitinase karena pada kitosan (kitin yang menghasilkan deasetilase) masih terdapat sekitar 10-20% residu asetyl (Sahai *and* Manocha, 1993).

Pengaturan sintesis kitinase dipengaruhi juga oleh produk akhir (katabolit) berupa GlcNAc dan glukosa. Kitin yang dipreparasi dengan hidrolisis parsial dengan HCl 10 N akan menghasilkan koloidal kitin yang mampu menginduksi kitinase kompleks seperti N-asetilglukosaminidase, endokitinase dan kitobiosidase pada *Aeromonas caviae* (Inbar *and* Chet, 1991), *Enterobacter agglomerans* (Chernin *et al.* 1995) dan *Trichoderma harzianum* (Haran *et al.* 1995).

Kemampuan menginduksi sintesis kitinase dipengaruhi kemampuan sel mikroorganisme untuk mengenal struktur fisik kitin seperti susunan rantai. Beberapa mikroorganisme memproduksi protein seperti lektin yang mengikat secara khusus kristal α -kitin. Sel juga dapat mengenal derajat deasetilasi dari jumlah glukosamin dan GlcNAc relatif yang dibebaskan selama degradasi kitin.

2.5 Klasifikasi Enzim Kitinase

Kitinase poli 1,4- β (2 asetamido-2deoksi-D-glukosaminide) glikanohidrolase adalah enzim yang menghidrolisis ikatan β -1,4-asetamido-2 deoksi-D-glikosida dari kitin dan kitodekstrin (Bielka *et al.* 1984).mekanisme proses hidrolisis tersebut tergantung dari tipe-tipe kitinase dan kemampuan mengkatalis dengan produk akhir yang berbeda.

Polimer *N*-asetilglukosamin yang cukup banyak ditemukan dalam dinding sel jamur dan eksoskeleton dari serangga dan krustasea, dimana kesamaan rangkaian peptida dan eksoskeleton untuk mengelompokkan kitinase ke dalam lima kelas. Kelas I, II, dan IV terdiri dari kitinase yang bersumber dari tanaman dan secara struktural tidak berhubungan dengan kelas III dan V. Kitinase kelas III diperoleh terutama dari tumbuhan dan jamur, sedangkan kelas V mewakili sebagian besar bakteri kitinase (Cohen *et al.* 1998).



Sistem tata nama dan penggolongan enzim kitinase masih banyak menimbulkan keracunan. Harman *et al* (1993) membagi kitinase dalam tiga tipe yaitu:

- a. *Eksokitinase* (belum memiliki nomor *entry* dalam *Enzyme Nomenclature*) dinamakan juga kitobiosidase atau kitin-1,4- β -kitobiosidase, yaitu enzim yang mengkatalis secara aktif pembebasan unit-unit diasetilkotobiose tanpa ada unit-unit monosakarida atau oligosakarida yang dibentuk. Pemotongan hanya terjadi pada ujung non reduksi mikrofibril kitin dan tidak secara acak.
- b. *Endokitinase* (EC. 3.2.1.14) yaitu ensim yang memotong secara acak ikatan β -1,4 bagian internal mikrofibril kitin. Produk akhir yang terbentuk berupa oligomer pendek N-asetilglukosamin (GlcNAc) yang mempunyai berat molekul rendah seperti kitotetraose, kitotriose dengan didominasi oleh diasetilkotobiose. Produk yang dihasilkan bersifat mudah larut.
- c. β -1,4-*N* asetilglukosamidase (EC.3.2.1.30) adalah suatu enzim kitinolitik yang bekerja pada pemutusan diasetilkotobiose, kitotriose dan kitotetraose dengan menghasilkan monomer-monomer GlcNAc.

2.6 Metode Pemekatan Cairan Enzim dan Pengukuran Aktifitas Kitinase

Enzim yang berada pada cairan kultur belum 100% terdiri atas protein enzim yang diinginkan, sehingga perlu pemurnian untuk memisahkannya dari senyawa-senyawa lain. Tahap awal dalam pemurnian enzim adalah pemekatan medium kultivasi. Pemekatan dapat dilakukan dengan beberapa cara yaitu ultrafiltrasi, liofiliasi dan mengendapkan protein dengan ammonium sulfat, aseton, etanol, atau polietilen glikol (PEG) (Scopes, 1994). Pemekatan enzim kitinase dari *Streptomyces* dengan ammonium sulfat pada kejemuhan 70% dan etanol dingin, dapat meningkatkan kemurnian enzim berturut-turut 5 dan 3,5 kali dibanding enzim kasarnya (Lloyd *et al.* 1965). Sementara itu Singh *et al.* (1999) menyatakan bahwa protein kitinase dari *Streptomyces* sp. 385 yang dipekatkan dengan



polietilen glikol (PEG), kemurniannya meningkat sebanyak 11,9 kali dibanding enzim kasarnya..

Pengendapan protein dengan ammonium sulfat adalah cara yang paling banyak digunakan. Hal ini disebabkan karena ammonium sulfat mudah didapatkan, harganya relatif murah, bersifat menstabilkan enzim serta dapat mencegah aktifitas enzim proteolitik. Garam ammonium sulfat konsentrasi 2-3 M dapat menstabilkan enzim selama beberapa tahun. Kelemahannya adalah tidak dapat mengendapkan seluruh protein yang telah larut dan bila mengandung logam dapat merusak enzim (Scopes, 1994).

Pengukuran aktifitas kitinase dalam memecah kitin dapat dilakukan dengan beberapa cara seperti yang disebutkan Jeaniaux (1966) dan Cabib (1987) yaitu:

- a. Berdasarkan pengurangan substrat.
 1. Metode turbidimetri (nepelometri yaitu mengukur variasi turbiditas (kekeruhan) suspensi koloidal kitin selama kitinolisis. Pengukuran ini hanya cocok untuk enzim dengan aktifitas tinggi tapi bersifat cepat dan akurat. Misalnya pengukuran aktifitas enzim endokitinase.
 2. Metodel viskosimetri yaitu pengukuran aktifitas enzim kitinase terhadap derivat kitin yakni kitosan, glikol kitin atau karboksimetikitin yang ditandai dengan terjadinya pengurangan viskositas substrat.
- b. Berdasarkan pembentukan produk akhir yaitu GlcNAc (Metode Reissig, 1955). Yaitu pengukuran secara kolorimetrik produk akhir berupa GlcNAc yang dibebaskan dari kitin dengan p-dimetilaminobenzaldehida. μmol GlcNAc yang dibebaskan dari kitin selama 1 jam dalam kondisi yang ditetapkan dianggap sebagai satu unit aktifitas kitinase.
- c. Spectrometer Assay
Yaitu proses yang menggunakan substrat dari kromogen 3,4, dinitrofenil tetra N-asetilkototetraose.

d. Radiometer Assay

Pengukuran produk diuji dengan menentukan radioaktifitasnya setelah penghilangan kitin yang belum dipecah dengan cara penyaringan atau disentrifugasi. Pengujian ini untuk mengetahui sensifitas enzim kitinase dengan menggunakan substrat yang berlabel ^{14}C atau ^3H .

2.7 Kegunaan Enzim Kitinase

Enzim kitinase berperan penting dalam kontrol fungi patogen tanaman secara mikroparasitisme. Kemampuan beberapa spesies sebagai mikroorganisme biokontrol yang sangat efektif untuk menghambat pertumbuhan fungi patogen tanaman dikaitkan dengan kemampuannya menghasilkan enzim kitinase (Paulitz and Belanger, 2001). Kitinase yang diproduksi mikroorganisme dapat menghidrolisis struktur kitin, senyawa utama penyusun dinding sel tabung kecambah spora dan miselia, sehingga jamur tidak mampu menginfeksi tanaman (Priyanto *et al.* 2000).

Kitinase mendapat perhatian yang besar, terutama karena peranan mereka dalam morfogenesis jamur dan parasitisme. Kepentingan enzim ini dalam banyak aplikasi kontrol biologi juga telah didokumentasikan (Sahai dan Manocha, 1993). Salah satu contoh penyakit sasaran yang potensial dikendalikan dengan mikroorganisme kitinolitik adalah penyakit karat daun kedelai yang disebabkan jamur *Phakopsora pachyrhizi* Syd (Priyanto *et al.* 2000).

Kemampuan bakteri untuk memproduksi kitinase sangat bervariasi, mungkin disebabkan perbedaan kecil pada gen yang mengkodenya (Tronsmo dan Harman, 1993). Variasi ini tidak saja terlihat dari jumlah aktifitas kitinase total yang diproduksi setiap speciesnya, tetapi juga pada jenis kitinase yang dihasilkan. Semua enzim yang dapat mendegradasi kitin, disebut kitinase total atau kitinase non-spesifik (Nugroho *et al.* 2003).

2.8 Faktor-faktor Yang Mempengaruhi Aktifitas Enzim

Enzim mampu mempercepat reaksi kimia paling sedikit 1 juta kali lebih cepat dari reaksi yang tidak dikatalis. Laju reaksi yang dikatalis enzim lebih cepat dari katalis lain. Dalam sentesis enzim, parameter lingkungan sangat



mempengaruhi (Darwis dan Sunarti, 1992). Aktifitas suaenzim dipengaruhi oleh beberapa faktor, yaitu pH, konsentrasi substrat dan enzim, suhu dan adanya aktivator atau inhibitor (Lehninger, 1997).

PH berpengaruh karena sifat ionik gugus karboksil dan gugus amino mudah dipengaruhi pH. Hal ini menyebabkan daerah katalik dan konformasi enzim jadi berubah. Perubahan pH juga menjadi penyebab denaturasi protein dan mengakibatkan hilangnya aktifitas enzim. Untuk mempelajari enzim, terlebih dahulu harus dicari pH optimum dengan menggunakan buffer yang sesuai (Girindra, 1993).

Pengaruh suhu terlihat pada reaksi-reaksi kimia, karenanya reaksi yang dikatalis enzim peka terhadap suhu. Hal ini disebabkan karena enzim merupakan struktur protein pula yang akan mengalami denaturasi jika suhunya dinaikkan dan menyebabkan menurunnya daya kerja enzim.

Girindra (1993) menyebutkan bahwa kecepatan enzim bereaksi dipengaruhi pada konsentrasi enzim yang berperan sebagai katalisator. Suatu reaksi yang dikatalis oleh enzim terlebih dahulu terbentuk kompleks enzim substrat (EZ), yang kemudian terurai menjadi enzim dan produknya.

Aktifitas enzim sendiri diperbesar dengan adanya aktifator yang mengaktifkan enzim. Aktifator tersebut dapat berupa logam dan non logam yang merupakan zat-zat non spesifik yang mengaktivkan proses enzimatis. Umumnya aktifator ini merupakan bahan yang tahan panas dan berberat molekul relatif rendah (Baldwin, 1973).

2.9 Potensi Bakteri Kitinolotik untuk Mengendalikan *G.boninense*

Pemanfaatan mikrob kitinolitik merupakan salah satu cara pengendalian hayati yang efektif untuk fungi patogen tanaman. Mikrob ini dapat digunakan langsung sebagai agens antagonis atau menggunakan protein murni dari mikrob kitinolitik atau melalui manipulasi gen (Singh *et al.* 1999). Enzim kitinase yang diproduksi mikrob kitinolitik dapat menghidrolisis struktur kitin, yang merupakan struktur utama penyusun dinding sel, spora, tabung kecambah, dan miselia fungi, sehingga fungi tidak mampu menginfeksi tanaman. Salah satu



penyakit yang dapat dikendalikan dengan mikrob kitinolitik adalah penyakit karat daun kedelai yang disebabkan oleh fungi *Phakopsora pachyrhizi* Syd. Penyakit ini sukar dikendalikan dengan varietas tahan karena pergeseran ras patogen yang cepat sementara sumber ketahanan kedelai sangat terbatas (Priyatno *et al.* 2001). Pengendalian hayati fungi dengan menggunakan mikroorganisme kitinolitik didasarkan pada kemampuan mikroorganisme menghasilkan enzim kitinase dan β 1,3-glukanase yang dapat melisis sel fungi (El-Katatny *et al.* 2000). Kemampuan kitinolitik bakteri sebagai agens biokontrol patogen dilaporkan oleh Inbar *and* Chat (1991), yang menggunakan *Aeromonas caviae* untuk mengendalikan beberapa fungi patogen tanaman. Selain *A. caviae* beberapa bakteri kitinolitik dilaporkan memiliki potensi sebagai pengendali hayati misalnya *P. syringae*, *Burkholderiacepasia*, *Bacillus subtilis*, *Agrobacterium radiobacter*, *Enterobacter cloacae* dan *Streptomyces griseoviridis*, *Actinomycetes*, (Fravel *et al.* 1998).

3. METODOLOGI PENELITIAN

3.1. Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilaksanakan di Balai Pengkajian dan Penerapan Teknologi (BPPT) PUSPIPTEK Serpong, Tangerang Selatan-Banten. Penelitian ini dilaksanakan pada bulan November 2014 hingga Juli 2015.

3.2. Alat dan Bahan

3.2.1. Alat

Peralatan yang dipergunakan adalah alat sentrifugasi berpendingin berkecepatan tinggi Hitachi CR 21G, *Cool Centrifuge Sorvall-Fresco*, *Thermomixer MS- 100 Thermo-Scientific*, Kuhner *shaker RGH-16*, Heidolph *shaker UNIMAX 1010*, *Rotary Incubator GFL*, spektrofotometer UV-Vis Genesys 10v, pH meter Inolab WPS series, Timbangan digital Radwag WPS 50/C/2, *Magnetic stirrer IKA*, *Minichiller Hubber*, Lemari Es (Sanyo, Polytron, National, Sharp), Pearce®*Silver Staining Kit*, perlengkapan elektroforesis, otoklaf, dan alat-alat gelas.

3.2.2. Bahan

Isolat *Bacillus sp.* BPPTCC-2 (kultur koleksi BPPT), isolat *G.boninense* (kultur koleksi Lab.Biotek-BPPT) flake kitin (berasal dari pengolahan kulit udang oleh BPPT), N-Asetil-D-Glukosamin baku [Sigma-Aldrich], bahan-bahan lain yang digunakan adalah ekstrak khamir [Himedia], pepton [Himedia], serbuk agar, Na₂HPO₄ [Merck], NaH₂PO₄ [Merck], KH₂PO₄ [Merck], NaCl (Himedia), NH₄Cl [Merck], MgSO₄.7H₂O [Merck], CaCl₂.2H₂O [Merck], Asam 3,5-Dinitrosalisisat [Sigma-Aldrich], *Bovine serum albumin* (BSA) [Sigma-Aldrich], Triton X-100 [Sigma-Aldrich], Ammonium persulfat (APS) [Sigma-Aldrich], Tetrametilendiamina (TEMED) [Sigma-Aldrich], Tris-base [BioRad], Merkaptoetanol [Sigma-Aldrich], bromfenol biru [Sigma-Aldrich], formaldehida, Glutaraldehida [Sigma-Aldrich], *Dialysis Tubing Cellulosa Membrane* [Sigma-Aldrich].



3.3. Metode

3.3.1. Konfirmasi Isolat Bakteri *Bacillus* sp. BPPTCC 2 sebagai Penghasil Enzim Kitinase

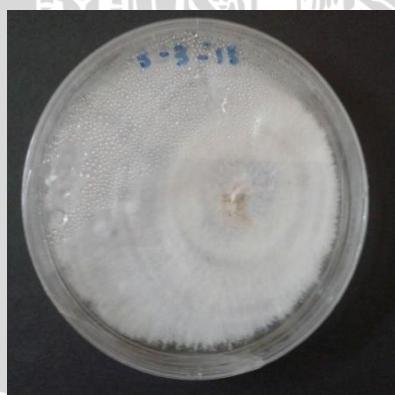
Konfirmasi isolat potensial dilakukan dengan melakukan pengecekan zonabening yang dibentuk oleh isolat BPPTCC 2. Inokulasi isolat bakteri dari stok gliserol ke dalam media LB cair steril dan diinkubasikan pada suhu 37°C selama 12 jam disertai pengadukan 150 rpm. Sebanyak 0,5 mL inokulat tersebut dipindahkan ke 5 mL media steril dan diinkubasi lagi selama 6 jam. Inokulat kemudian diteteskan sebanyak 1,0 μ L pada media produksi padat yang mengandung 3% koloidal kitin dan diinkubasi pada suhu 37°C. Isolat yang menghasilkan kitinase akan menunjukkan zona bening di sekelilingnya (Wen *et al.* 2002).

Bagian bakteri yang menghasilkan zona bening kemudian diinokulasikan kembali ke medium LB steril dan diinkubasikan pada suhu 37°C selama 6 jam. Stok kultur agar miring dibuat dengan menginokulasi isolat penghasil zona bening tersebut dalam media LB agar miring steril dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.

3.3.2. Uji Antagonis Bakteri BPPTCC 2 Terhadap *G.boninense*

3.3.2.1. Peremajaan Isolat *G.boninense*

Isolat *G.boninense* diperoleh dari Lab. Bioteknologi BPPTSerpong, kemudian isolat tersebut di subkultur pada media PDA dengan pH 7. Simpan subkultur tersebut pada suhu ruang dan amati selama 2 minggu.



Gambar 5. Isolat *G.boninense*
[dokumentasi pribadi]

3.3.2.2. Uji Antagonis

Bakteri BPPTCC 2 diremajakan di media LB selama 72 jam pada suhu 37°C. Kemampuan bakteri kitinolitik dalam menghambat pertumbuhan fungi diuji dengan uji antagonisme *in vitro* dalam cawan petri. Biakan fungi ditumbuhkan di media PDA dengan jarak 3,5 cm dari cakram tempat inokulum bakteri. Biakan tersebut diinkubasi selama 72 jam pada suhu ruang. Selanjutnya suspensi bakteri kitinolitik yang telah ditumbuhkan pada media LB dan diinokulasikan pada cakram dengan diameter 0,5 cm di bagian tengah media kitin sebanyak 0,01 ml. Biakan diinokulasi pada suhu 30°C. Aktivitas penghambatan ditentukan berdasarkan zona hambat yang terbentuk di sekitar koloni. Pengamatan dimulai dari hari ke-5 sampai hari ke-10 (Irawati, 2008).

3.3.3. Pembuatan Stok dan Pemurnian Parsial Enzim Kitinase

3.3.3.1. Pembuatan Koloidal Kitin

Kitin yang akan digunakan sebagai substrat diproses terlebih dahulu menjadi koloidal kitin sesuai dengan metode Wen *et al.* (2002). Untuk membuat koloidal kitin 10%, sebanyak 10,0 g serbuk kitin dimasukkan secara bertahap ke 120,0 mL HCl pekat pada suhu 4°C disertai dengan pengadukan kuat. Proses pengadukan ini dilakukan selama semalam pada suhu 4°C. Suspensi kitin dalam HCl pekat ini kemudian ditambahkan kedalam 4,0 L etanol 95% dan disertai pengadukan kuat. Proses ini kembali dilakukan selama semalam pada suhu ruang. Campuran ini kemudian disentrifugasi pada kecepatan 6000 rpm selama 20 menit pada suhu 4°C. Endapan yang diperoleh kemudian dicuci dengan akuades hingga netral (pH 7,0). Lalu tambahkan air sampai 100 mL.

3.3.3.2. Pembuatan Media Produksi Enzim

Media yang digunakan terdiri dari dua macam yaitu media pemeliharaan dan media produksi. Media pemeliharaan digunakan media LB (*Luria Bertani*) yang terdiri dari Pepton 1%; Ekstrak khamir 0,5%; dan NaCl 0,5% dan untuk media padat digunakan serbuk agar 2%. Media dilarutkan dalam akuades dan diatur pHnya menjadi pH 7,0. Media kemudian disterilisasi dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit.

Media produksi kitin *flakes* menggunakan media M9 yang memiliki komposisi antara lain Na₂HPO₄ 0,065%; KH₂PO₄ 0,15%; NaCl 0,025%; NH₄Cl 0,05%; MgSO₄ 0,012%; CaCl₂ 0,0005%; dan kitin *flakes* 3%. Bahan-bahan yang telah ditimbang dilarutkan dalam akuades dan diatur pHnya menjadi 7,0. Media kemudian disterilisasi dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit (Wen *et al.* 2002).

3.3.3.3. Pembuatan Stok Enzim Kitinase



Isolat dari stok agar miring diambil 2-3 ose dan diinokulasi ke dalam 5 mL media LB cair. Inkubasi dilakukan pada suhu 37°C dengan pH 7,0 dan kecepatan putaran 150 rpm selama 12 jam. 1,0 mL dari inokulat tersebut dimasukkan ke dalam 10 mL media LB cair dengan pH 7,0 dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 6 jam. Kultur inokulum kemudian ditambahkan ke 100 mL media produksi yang mengandung 3% kitin *flakes*. Setelah inkubasi pada 37°C selama 3 hari, kultur supernatan diambil dengan cara centrifugasi 6000 rpm selama 15 menit pada suhu 4°C.

3.3.3.4. Pemurnian Parsial dengan Ammonium sulfat

Ekstrak enzim kasar yang telah diperoleh diendapkan dengan variasi konsentrasi dari ammonium sulfat (20%, 40%, 60%, 80%). Penambahan ammonium sulfat dilakukan pada suhu 4°C dan diaduk selama 1 jam dan disentrifuse dengan kecepatan 3000 rpm selama 10 menit pada suhu 4°C pelet yang diperoleh diresuspensi dengan buffer L-Histidine 0,02 M pH 5,58 dengan perbandingan 1:2.

3.3.3.5. Dialisis

Enzim yang telah diendapkan dengan ammonium sulfat kemudian dimurnikan lebih lanjut dengan dialisis. Membrane tubing selulosa yang digunakan untuk dialysis sebelumnya dicuci dengan air RO untuk menghilangkan kontaminan seperti gliserol. Enzim yang telah diresuspensi kemudian dimasukkan ke dalam membrane dialysis dengan ukuran 12,4 kDa dan diinkubasi dalam buffer L-Histidine 0,02 M ph 5,58 selama 12-16 jam pada suhu 4°C.

3.3.3.6. Pengujian Aktivitas Enzim

3.3.3.6.1. Pembuatan Kurva Kalibrasi N-asetilglukosamin

Pembuatan kurva standar didasarkan pada hasil nilai absorbansi stock solution NAG pada beberapa konsentrasi. Konsentrasi NAG yang digunakan ialah pada konsentrasi 0 NAG mg/mL; 0,05; 0,1; 0,15; 0,2; 0,25; 0,3; 0,35; 0,4 dan 0,5 NAG mg/mL. konsentrasi NAG tersebut kemudian dilarutkan dengan air RO hingga mencapai volume masing masing konsentrasi sebesar 0,6 ml. Masing-masing konsentrasi tersebut selanjutnya ditambahkan 0,6 ml DNS dan diinkubasikan pada air mendidih selama 15 menit dan dihitung absorbansinya pada panjang gelombang 540 nm.

3.3.3.6.2. Uji Aktivitas Enzim

Didalam suatu tabung dimasukkan campuran yang terdiri dari 0,3 mL 1% koloidal kitin dan 0,3 mL larutan enzim. Campuran tersebut diinkubasi pada suhu 37°C selama 30 menit. Reaksi dihentikan dengan penambahan 0,6 mL pereaksi Asam dinitrosalisislat. Campuran kemudian disentrifugasi untuk mengendapkan sisa kitin yang tidak terhidrolisis dan inkubasi dalam air mendidih selama 15 menit dan didinginkan sampai suhu ruangan. Pengukuran dilakukan dengan metode spektofotometri pada panjang gelombang 540 nm. Kontrol dibuat dengan kondisi sama seperti sampel, namun enzim ditambahkan setelah penambahan asam dinitrosalisislat.

Rumus Perhitungan Aktivitas Enzim :

$$\text{Aktivitas kitinase (U/mL)} = \frac{[\text{GlcNAc}] \times \text{faktor pengenceran} \times 1000}{\text{BM GlcNAc} \times \text{waktu inkubasi} \times \text{volume enzim}}$$

Keterangan :

[GlcNAc] = konsentrasi N-asetilglukosamin

BM GlcNAc = 221,21

Waktu inkubasi = 30 menit

Volume sampel = 0,3 mL

3.3.3.7. Penentuan Kadar Protein

3.3.3.7.1. Pembuatan Kurva Kalibrasi Bovine Serum Albumin



Sebanyak 20 μL sampel uji dipipet dan dimasukkan dalam *microtube*. Ke dalam *microtube* ditambahkan 1000 μL reagen Bradford. Kemudian *microtube* dihomogenkan dan diinkubasi selama 15 menit pada suhu ruang. Absorbansi diukur pada 595 nm. Kadar protein kemudian diukur dengan memasukan absorbansi ke dalam persamaan kurva kalibrasi. Kurva kalibrasi kadar protein dibuat dengan melarutkan menggunakan *Bovine Serum Albumin* (BSA) sebagai standar.

3.3.3.7.2. Penentuan Kadar Protein

Sebanyak 20 μL sampel uji dipipet dan dimasukkan dalam *microtube*. Ke dalam *microtube* ditambahkan 1000 μL reagen Bradford. Kemudian *microtube* dihomogenkan dan diinkubasi selama 15 menit pada suhu ruang. Absorbansi diukur pada 595 nm. Kadar protein kemudian diukur dengan memasukan absorbansi ke dalam persamaan kurva kalibrasi. Kurva kalibrasi kadar protein dibuat dengan melarutkan menggunakan *Bovine Serum Albumin* (BSA) sebagai standar.

3.3.4. Karakterisasi Hasil Pemurnian

3.3.4.1. SDS PAGE

Elektroforesis dilakukan menggunakan sodium dodesil sulfat gel poliakrilamida (SDS-PAGE) 12% berdasarkan metode Copeland (1994). Penanda protein yang digunakan adalah *low molecular weight marker* yang mengandung *phosphorylase b* (97 kDa), albumin (66 kDa), ovalbumin (45 kDa), *carbonic anhydrase* (30 kDa), *trypsin inhibitor* (21,1 kDa), dan α -lactalbumin (14,4 kDa). Penanda protein ini disiapkan dengan melarutkan 3 μL penanda protein dengan 12 μL *SDS sample buffer*. Perlakuan yang sama juga diberikan untuk sampel yang akan dielektroforesis. Elektroforesis dijalankan pada 125 volt, 100 A selama 2 jam. Pewarnaan protein dilakukan dengan menggunakan metode *silver staining* menggunakan Pierce[®]*Silver Staining Kit*. Gel yang sudah selesai dielektroforesis dicuci dengan air selama 5 menit sebanyak 2 kali. Kemudian gel difiksasi selama 15 menit dengan campuran 30% etanol : 10% asam asetat sebanyak 2 kali. Gel lalu dicuci kembali dengan 10% etanol sebanyak 2 kali, lalu dilanjutkan dengan pencucian menggunakan air selama 5 menit sebanyak 2 kali. Gel lalu direndam dengan *sensitizer working solution* yang disiapkan dengan melarutkan 50 μL larutan stok *sensitizer* ke dalam 25 mL air sebanyak 1 menit. Gel kemudian dicuci dengan air selama 1 menit sebanyak 2 kali. Gel yang telah dicuci kemudian diwarnai dengan *stain working solution* yang disiapkan dengan melarutkan 0,5 mL *enhancer* dengan 25 mL larutan *silver stain* selama 30 menit. Gel kemudian dicuci kembali dengan air selama 20 detik sebanyak 2 kali. Lalu warna gel

dimunculkan dengan direndam disertai pengocokan ringan dalam larutan *developer* yang disiapkan dengan melarutkan 0,5 mL *enhancer* dalam 25 mL larutan stok *developer* selama 2-3 menit hingga warna pita muncul dan kontras dengan warna latar gel. Reaksi dihentikan dengan penambahan asam asetat 5% selama 10 menit.

3.3.4.2. Zimografi

Perkiraan bobot molekul kitinase dilakukan dengan analisis zimogram dalam gel poliakrilamida 12% yang mengandung 0,1% substrat kitin. Selanjutnya, sebanyak 15 μ L sampel (12 μ L *sample buffer* dan 3 μ L enzim) dimasukkan dalam sumur pada gel pengumpul, kemudian elektroforesis dijalankan pada 125 volt dan 100 A selama 2 jam. Setelah elektroforesis, gel poliakrilamida direnaturasi dengan merendamnya dalam 2,5% triton X-100 (Merck) selama 1 jam. Selanjutnya, gel direndam dalam buffer L-Histidin 0,02 M pH 7 pada suhu 60°C selama 30 menit. Untuk menghentikan reaksi enzim, gel diinkubasi pada suhu 4°C selama 15 menit. Gel diwarnai dengan pewarna *Congo Red* (Merck) 0,1% (w/v) selama 30 menit, kemudian dicuci dengan NaCl 1 M selama kurang lebih 60 menit. Pita kitinase diketahui dengan munculnya zona bening pada gel yang telah dicuci dengan HCl 1 M. Berat molekul kitinase ditentukan dengan mengukur nilai faktor retensi (Rf) dari zona bening kitinase yang terbentuk pada zimogram, kemudian dikonversikan ke dalam persamaan standar berat molekul. Kurva kalibrasi berat molekul dibuat dengan mengukur nilai Rf dari penanda protein LMW yang mengandung 6 jenis protein standar yang telah diketahui berat molekulnya.



4. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1. Hasil

4.1.1. Konfirmasi Isolat Potensial

Seluruh isolat bakteri menunjukkan aktivitas munculnya zona bening ketika dibiakkan pada media LB termodifikasi yang mengandung koloidal kitin 3%. Hasil konfirmasi isolat uji potensial disajikan pada tabel 1. Uji pembentukan zona bening digunakan pada awal skrining untuk melakukan konfirmasi terhadap bakteri penghasil kitinase. Metode ini mudah diaplikasikan dan memberikan hasil seleksi awal yang baik.

Tabel 1. Hasil konfirmasi isolat potensial

Isolat	Hasil Konfirmasi
BPPTCC 2 O	Menghasilkan zona bening
BPPTCC 2 W	Tidak menghasilkan zona bening
BPPTCC 2 R	Tidak menghasilkan zona bening

Dari hasil konfirmasi isolat yang potensial dalam menghasilkan enzim kitinase menghasilkan hasil yang berbeda. Dari 3 isolat yang di uji hanya satu isolat saja yang menghasilkan aktivitas kitinase berupa munculnya zona bening yaitu pada isolat BPPTCC 2 O. Zona bening mulai terbentuk pada hari ke 2 dan makin lama akan semakin melebar diameternya sampai seluruh substrat koloidal kitin habis didegradasi oleh bakteri sehingga menjadi bening seluruhnya (Kuk *et al.*, 2005).

4.1.2. Uji Antagonis Bakteri BPPT CC 2 terhadap *G.boninense*

Hasil uji antagonis isolat bakteri kitinolitik terhadap *G.boninense* menunjukkan isolat bakteri BPPTCC 2 memiliki kemampuan sangat nyata dalam menghambat pertumbuhan *G.boninense*. Kemampuan antagonis isolat ditandai dengan adanya zona hambat yang terbentuk pada daerah pertemuan koloni bakteri dengan jamur. Nilai rataan uji antagonisme bakteri BPPTCC 2 terhadap *G.boninense* terus meningkat pada pengamatan ke 5 hingga hari ke 10, hal ini dilihat dari nilai rataan 3 ulangan yang memiliki nilai masing masing, pada hari ke-5 sebesar 3,88mm, hari ke-6 sebesar 5,23mm, hari ke-7 6,53mm, hari ke-8 sebesar 7,28mm, hari ke-9 sebesar 7,66mm serta hari ke-10 sebesar 7,96mm.

4.1.3. Perhitungan Aktivitas Enzim Kitinase Ekstrak Kasar

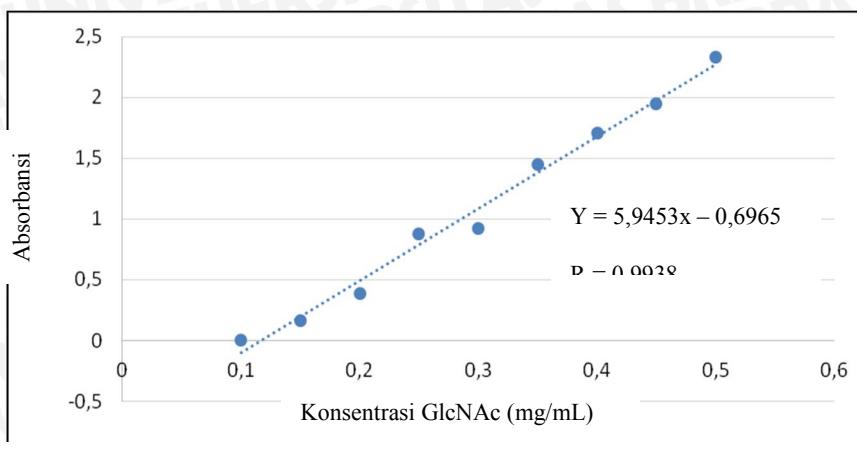


4.1.3.1. Pembuatan Kurva Standar N-asetilglukosamin

Aktivitas enzim dihitung berdasarkan jumlah gula pereduksi yang dihasilkan dengan metode Miller (1959) termodifikasi menggunakan kurva standar N-asetilglukosamin. Satu unit aktivitas kitinase adalah jumlah enzim yang menghasilkan $1\mu\text{mol}$ N-asetilglukosamin permenit (Wen *et al.* 2002). Pembuatan kurva standar didasarkan pada hasil absorbansi stock solution N-asetilglukosamin pada beberapa konsentrasi. Kurva standar dibuat dari beberapa variasi konsentrasi baku pembanding N-asetilglukosamin yang diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 540nm. Konsentrasi yang digunakan ialah 0 NAG/mL; 1; 1,5; 2; 2,5; 3; 3,5; 4; 4,5; dan 5 NAG/ml.

Tabel 2. Nilai Absorbansi Beberapa Konsentrasi

No.	NAG	
	Konsentrasi NAG (mg/ml)	Absorbansi
1	0	0
2	0,1	0,006
3	0,15	0,168
4	0,2	0,387
5	0,25	0,874
6	0,3	0,922
7	0,35	1,445
8	0,4	1,709
9	0,45	1,945
10	0,5	2,328



Gambar 7. Kurva Kalibrasi N-asetilglukosamin

Nilai absorbansi yang dihasilkan pada masing masing konsentrasi *stock solution* N-asetilglukosamin mengalami peningkatan, hal ini sesuai dengan peningkatan nilai konsentrasi yang diuji. Konsentrasi 0 NAG/mL; 1; 1,5; 2; 2,5; 3; 3,5; 4; 4,5; 5 NAG/ml, menghasilkan nilai absorbansi sebesar 0; 0,006; 0,168; 0,387; 0,874; 0,922; 1,445; 1,709; 1,945; 2,328. Nilai absorbansi yang dihasilkan selanjutnya disusun dalam kurva kalibrasi N-asetilglukosamin sehingga menghasilkan persamaan kurva standar $y=5,9453x-0,6965$ dengan koefisien korelasi sebesar 0,9938.

4.1.3.2. Aktivitas Enzim Kitinase Ekstrak Kasar

Aktivitas enzim dihitung berdasarkan jumlah gula pereduksi yang dihasilkan dengan metode Miller (1959) termodifikasi menggunakan kurva standar N-asetilglukosamin. Satu unit aktivitas kitinase adalah jumlah enzim yang menghasilkan $1\mu\text{mol}$ N-asetilglukosamin permenit (Wen *et al.* 2002). Metode Miller (1959) termodifikasi menggunakan metode DNS (3,5-Dinitrosalicylic acid). Enzim kitinase akan menghidrolisis koloidal kitin dan menghasilkan gula pereduksi berupa N-asetilglukosamin. Reaksi dihentikan dengan penambahan DNS. Gula pereduksi (N-asetilglukosamin) akan bereaksi dengan DNS dan menghasilkan warna kuning kecoklatan.

Tabel 3. Hasil uji aktivitas enzim

Absorbansi sampel	Rata – Rata			Blanko	Koreksi	Gula pereduksi	Aktivitas (U/mL)
	1	2	3				

	0,402	0,401	0,402	0,402	0,14	0,258	0,055	0,0276
Enzim kasar								
Fraksi 20%	0,669	0,669	0,669	0,669	0,01	0,659	0,123	0,0616
Fraksi 40%	0,625	0,62	0,623	0,623	0,01	0,613	0,115	0,0577
Fraksi 60%	0,62	0,618	0,62	0,619	0,02	0,599	0,113	0,0565
Fraksi 80%	0,62	0,622	0,623	0,622	0,01	0,612	0,115	0,0576

Pengujian aktivitas kitinase dilakukan dalam 3 kali pengulangan. Dari 3 ulangan tersebut menghasilkan rata rata absorbansi masing masing fraksi hasil pemurnian yang mengalami peningkatan jika dibandingkan dengan nilai absorbansi yang dihasilkan enzim kasar. Pada enzim fraksi 20% ammonium sulfat menghasilkan absorbansi hasil sebesar 0,669 dan memiliki nilai absorbansi blanko sebesar 0,01 sehingga dihasilkan nilai absorbansi yang sudah terkoreksi sebesar 0,2577. Nilai tersebut dihitung gula pereduksinya berdasarkan persamaan kurva standar N-asetilglukosamin adalah $y = 5,9453x - 0,6965$ dengan koefisien korelasi 0,9938. Sehingga dihasilkan jumlah gula pereduksi sebesar 0,1225 mg/ml dan didapatkan aktivitas enzim sebesar 0,06155 U/ml.

Pada fraksi 40% mengalami penurunan nilai absorbansi jika dibandingkan dengan fraksi 20% yaitu sebesar 0,6127 dengan nilai absorbansi blanko yang sama dengan fraksi 20%. Penurunan nilai absorbansi sampel ini juga akan mempengaruhi jumlah gula pereduksi yang dihasilkan serta nilai aktivitas enzim. Jumlah gula pereduksi pada fraksi 40% yaitu sebesar 0,1147 mg/ml dengan nilai aktivitas enzim sebesar 0,05764 U/ml. Fraksi 60% juga mengalami penurunan jika nilai absorbansinya dibandingkan dengan fraksi 20% dan 40% yaitu sebesar 0,5993 sehingga didapatkan jumlah gula pereduksi sebesar 0,112t mg/ml dan aktivitas enzim sebesar 0,05651 U/ml. Pada fraksi 80% didapatkan nilai absorbansi sampel rata rata 3 ulangan sebesar 0,6217 dan nilai absorbansi blanko sebesar 0,01 sehingga dihasilkan absorbansi terkoreksi sebesar 0,6117. Berdasarkan nilai absorbansi tersebut didapatkan jumlah gula pereduksi sebesar 0,1146 mg/ml serta aktivitas enzim sebesar 0,05755 U/ml.

4.1.4. Perhitungan Kadar Protein Enzim Kitinase Ekstrak Kasar

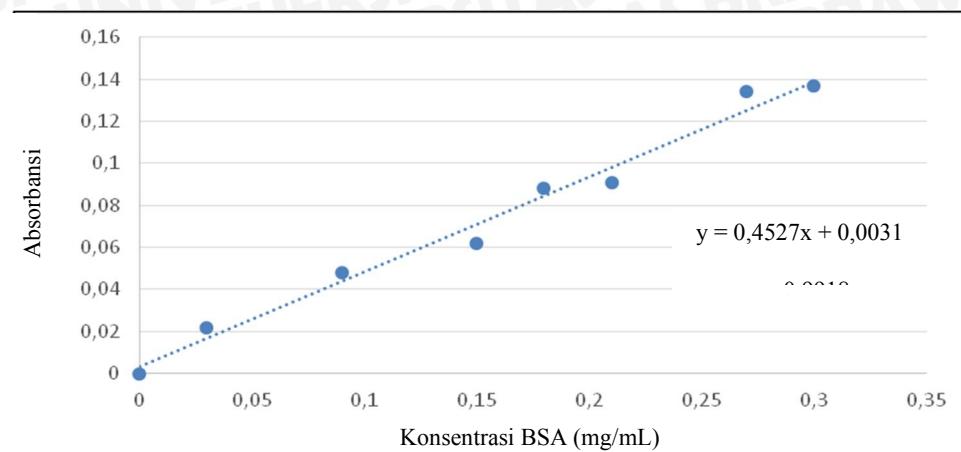
4.1.4.1. Pembuatan Kurva Standar Bovine Serum Albumin (BSA)

Kadar protein dihitung berdasarkan jumlah BSA yang dihasilkan dengan menggunakan kurva standar BSA. Pembuatan kurva standar didasarkan pada hasil absorbansi stock solution Bovine Serum Albumin pada beberapa konsentrasi. Kurva kalibrasi dibuat dari beberapa variasi konsentrasi Bovine Serum Albumin yang diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 595nm. Konsentrasi yang digunakan ialah 0 BSA/mL; 0,03; 0,09; 0,15; 0,21; 0,27; dan 0,3 BSA/ml.

Tabel 4. Nilai Absorbansi Beberapa Konsentrasi

No.	BSA	
	Konsentrasi BSA (mg/ml)	Absorbansi
1	0	0
2	0,03	0,022
3	0,09	0,048
4	0,15	0,062
5	0,18	0,088
6	0,21	0,091
7	0,27	0,134
8	0,3	0,137





Gambar 8. Kurva kalibrasi Bovine Serum Albumin (BSA)

Nilai absorbansi yang dihasilkan pada masing masing konsentrasi stock solution N-asetilglukosamin mengalami peningkatan, hal ini sesuai dengan peningkatan nilai konsentrasi yang diuji. Konsentrasi 0 BSA/mL; 0,03; 0,09; 0,15; 0,21; 0,27; dan 0,3 BSA/ml, menghasilkan nilai absorbansi sebesar 0; 0,022; 0,048; 0,062; 0,088; 0,091; 0,134; 0,137. Nilai absorbansi yang dihasilkan selanjutnya disusun dalam kurva kalibrasi Bovine Serum Albumin sehingga menghasilkan persamaan kurva kalibrasi $y=0,4527x + 0,0031$ dengan koefisien korelasi sebesar 0,9918.

4.1.4.2. Kadar Protein Enzim Kitinase Ekstrak Kasar

Penentuan kadar protein dihitung berdasarkan jumlah Bovine Serum Albumin dengan menggunakan metode Lowry menggunakan kurva standar Bovine Serum Albumin.

Tabel 5. Kadar protein enzim kitinase kasar dan hasil pemurnian

	Absorbansi sampel			Rata – Rata	Faktor pengenceran	Kadar Protein (mg/mL)	Total Protein (mg/mL)
	1	2	3				
Enzim kasar	0,093	0,093	0,093	0,0930	1	0,0906	0,0906
Fraksi	0,195	0,195	0,196	0,1953	1	0,1938	0,1938

Fraksi 20%	0,092	0,093	0,093	0,0927	2	0,0903	0,1806
Fraksi 40%	0,139	0,137	0,139	0,1383	2	0,1364	0,2727
Fraksi 60%	0,162	0,162	0,162	0,1620	2	0,1602	0,3204
Fraksi 80%							

Penentuan kadar protein dilakukan dengan 3 ulangan dan menghasilkan rata rata absorbansi yang mengalami peningkatan dari besar absorbansi enzim kasar. Pada ke-4 fraksi pemurnian ammonium sulfat didapatkan hasil kadar protein tertinggi pada fraksi 80% yaitu sebesar 0,3204 mg/ml dengan nilai absorbansi sebesar 0,1620. Nilai absorbansi tersebut kemudian dimasukkan pada persamaan kuva kalibrasi BSA sehingga dihasilkan nilai kadar protein sebesar 0,1602 mg/ml. Nilai kadar protein lalu dikalikan dengan jumlah faktor pengenceran untuk mendapatkan nilai total protein yang terkandung dalam enzim kitinase.

4.1.4.3. Kemurnian Enzim Kitinase Ekstrak Kasar

Ekstrak kasar enzim kitinase diperoleh dari isolat BPPT CC 2 setelah difermentasi selama 3 hari pada media M9 termodifikasi yang mengandung 1% kitin flakes (Manggadani, 2012). Data hasil perhitungan aktivitas kitinase pada berbagai perlakuan menunjukkan perbedaan aktivitas spesifik. Aktivitas spesifik tertinggi diperoleh pada perlakuan presipitasi ammonium sulfat 40% sebesar 0,3191 U/mg dengan kemurnian 5,54 kali dan hasil terendah pada perlakuan presipitasi 80% sebesar 0,1796 U/mg dengan kemurnian 3,12 kali.

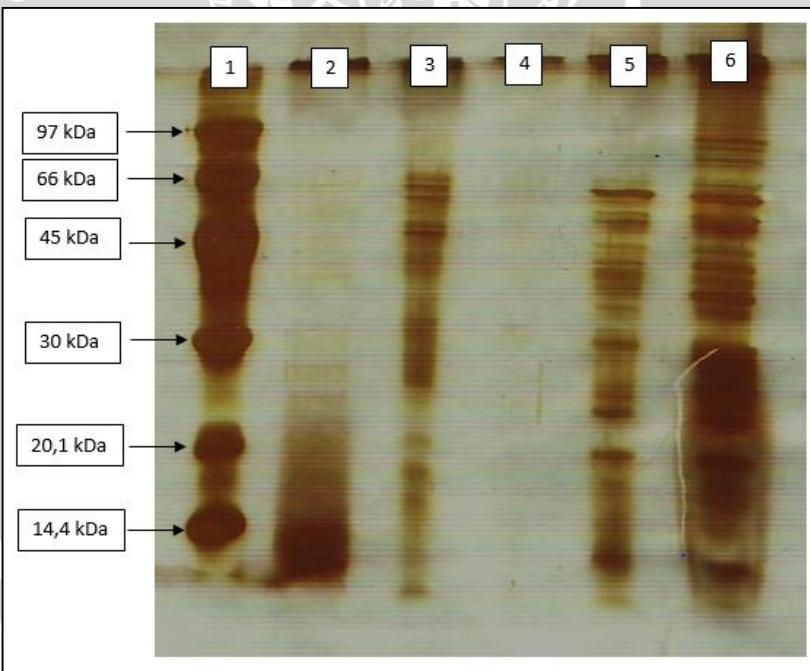
Tabel 6. Hasil Uji Aktivitas Spesifik Enzim Kasar dan Hasil Pemurnian Parsial

Sampel	Aktivitas kitinase (U/mL)	Kadar protein (mg/mL)	Aktivitas spesifik (U/mg)	Kemurnian

Enzim kasar	0,02764	0,0906	0,3050	11,03 kali
Presipitasi 20%	0,06155	0,1938	0,3176	5,16 kali
Presipitasi 40%	0,05764	0,1806	0,3191	5,54 kali
Presipitasi 60%	0,05651	0,2727	0,2072	3,67 kali
Presipitasi 80%	0,05755	0,3204	0,1796	3,12 kali

4.1.5. Karakterisasi Kitinase Hasil Pemurnian

Enzim kasar dan hasil pemurnian dan juga berat molekulnya dengan elektroforesis SDS-PAGE dan dikonfirmasi aktivitas enzimatisnya dengan zimografi. Hasil elektroforesis dan zimografi menunjukkan hasil purifikasi parsial kitinase belum menghasilkan kemurnian yang baik.p

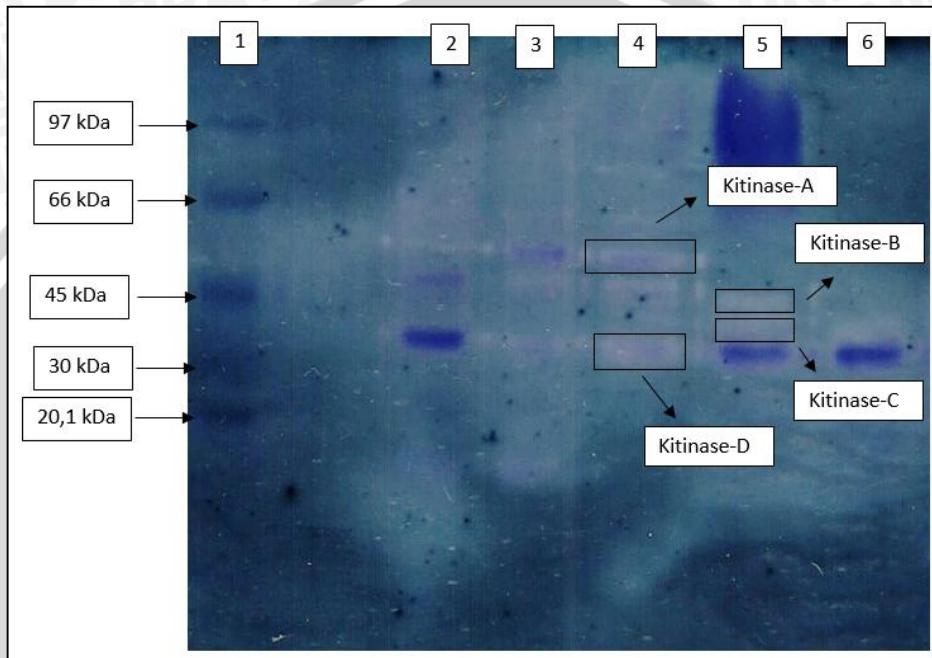


Gambar 10. Hasil SDS-PAGE enzim kitinase hasil purifikasi parsial dengan *silver staining*

Keterangan : Lane 1 – 6 berturut-turut adalah *marker*, ekstrak enzim kasar, fraksi 0-20%, fraksi 20-40%,fraksi 40- 60%, fraksi 60-80%.

Pada hasil karakterisasi dengan SDS-PAGE enzim yang diperoleh masih belum murni/terdapat kontaminan karena masih terlihat banyak sekali pita-pita

pengotor pada semua fraksi presipitasi dengan ammonium sulfat seperti yang ditunjukkan pada gambar 8 Selain itu pola fraksinasi yang diharapkan tidak muncul pada hasil SDS-PAGE sehingga masih banyak terlihat pita berulang pada keempat fraksi hasil purifikasi. Hal ini mungkin disebabkan karena kemampuan ammonium sulfat dalam menggeser ikatan protein dengan air tidak begitu spesifik sehingga masih banyak pita berulang yang muncul.



Gambar 11. Hasil zimografi enzim kitinase hasil purifikasi parsial .

Keterangan : Lane 1 – 6 berturut-turut adalah *marker*, ekstrak enzim kasar, fraksi 0 20%,fraksi 2 0-40%, fraksi 40-60%, fraksi 60-80%. A : Kitinase-A; B :Kitinase-B; C : Kitinase-C; D : Kitinase-D

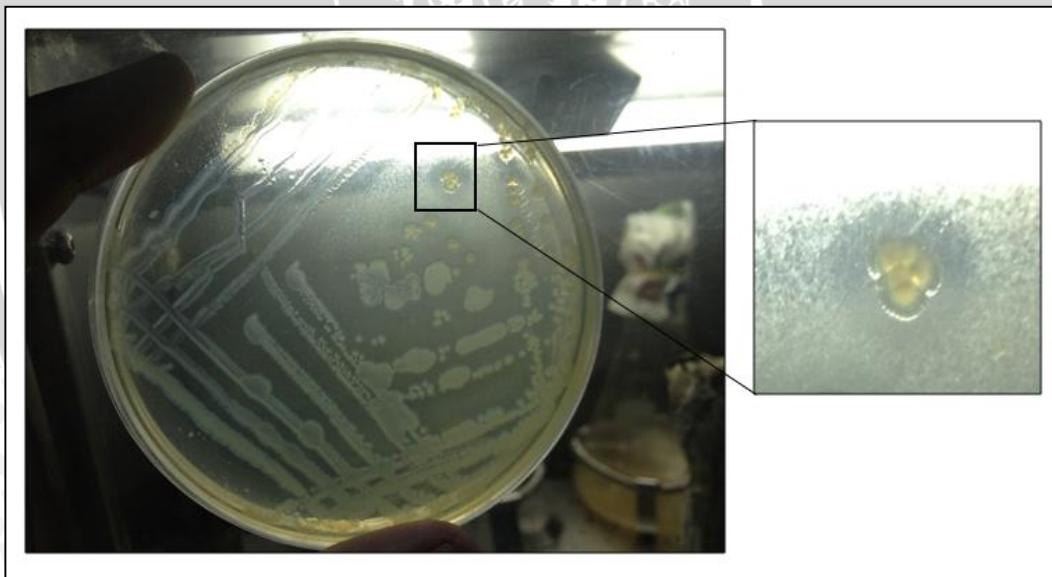
Hasil pada zimografi menunjukkan adanya aktivitas kitinase pada 4 pita yang berbeda seperti yang ditunjukkan pada gambar 9. Hampir pada setiap sampel yang dilakukan zimografi memiliki 3 pita yang menghasilkan warna bening. Pita bening paling terlihat pada fraksi 40%. Pada hasil zimografi ini dapat terlihat 4 pita bening yang menunjukkan aktivitas kitinolitik dengan perkiraan berat molekul 57,6 (Kitinase-A); 49,5 (Kitinase-B) ; 42,9 (Kitinase-C) dan 35,6kDa (Kitinase-D).

4.2. Pembahasan

4.2.1. Konfirmasi Isolat Potensial

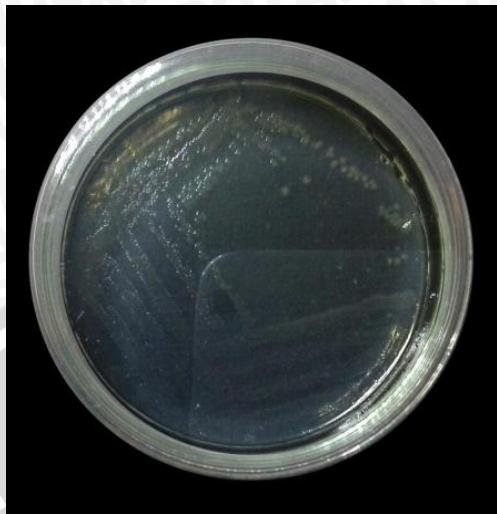
Proses seleksi bertujuan untuk mendapatkan isolat terbaik yang dapat menghasilkan kitinase dengan aktivitas tertinggi dan dapat menghidrolisis kitin untuk menghasilkan N-asetilglukosamin dengan rendemen yang tinggi. Tahapan yang dilakukan untuk memilih isolat terbaik dengan mendapatkan data zona bening, selanjutnya bakteri yang dapat menimbulkan zona bening diseleksi dan digunakan untuk produksi kitinase. Pembentukan serta pengujian zona bening dilakukan pada media LB yang mengandung kolloidal kitin 3%.

Uji pembentukan zona bening digunakan pada awal skrining untuk melakukan seleksi terhadap bakteri penghasil kitinase. Metode ini mudah diaplikasikan dan memberikan hasil seleksi awal yang baik. Zona bening terbentuk mulai hari kedua dan makin lama akan semakin melebar diameternya sampai seluruh substrat koloidal kitin habis didegradasi oleh bakteri sehingga menjadi bening seluruhnya.



Gambar 12. Zona bening yang terbentuk oleh Bakteri *Bacillus* sp

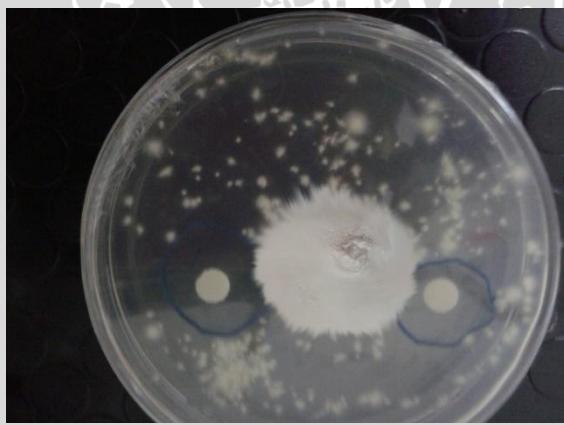
Dari zona bening yang terbentuk pada medium yang mengandung kitin, dapat disimpulkan bahwa isolat BPPT CC 2 tersebut mensekresi enzim kitinolitik keluar. Artinya kitinase yang terbentuk ini merupakan enzim ekstraselular yang disintesis dalam sel bakteri dan disekresikan keluar dengan tujuan tertentu, dalam hal ini untuk mendegradasi kitin.



Gambar 13. Isolat bakteri *Bacillus* sp. BPPTCC 2 potensial

4.2.2. Uji Antagonis Bakteri BPPT CC 2 terhadap *G.boninense*

Hasil uji antagonis bakteri BPPT CC2 pada jamur patogen *G.boninense* menunjukkan bahwa isolat bakteri tersebut mampu menghambat pertumbuhan *G.boninense*. Mekanisme penghambatan yang terjadi pada uji antagonisme dapat diamati dengan terbentuknya zona bening sebagai zona penghambatan oleh bakteri kitinolitik BPPT CC2.



Gambar 14. Penghambatan bakteri *Bacillus* sp. terhadap *Ganoderma boninense*

Adanya aktivitas kitinase ditandai dengan terbentuknya zona bening di sekitar koloni bakteri pada medium PDA. Zona bening terbentuk karena adanya pemutusan ikatan β -1,4 homopolimer N-asetilglukosamin pada kitin oleh kitinase menjadi monomer N-asetilglukosamin. Susi (2002) menyatakan besarnya zona bening yang dihasilkan tergantung pada jumlah monomer N-asetilglukosamin yang dihasilkan dari proses hidrolisis kitin dengan memutus ikatan β -1,4 homopolimer N-asetilglukosamin. Semakin besar jumlah monomer N-

asetilglukosamin yang dihasilkan maka akan semakin besar zona bening yang terbentuk disekitar koloni.

Rata rata zona hambat yang dihasilkan memiliki perbedaan yang nyata. Hal ini juga menunjukkan bahwa isolat bakteri kitinolitik BPPT CC 2 dapat menghambat pertumbuhan bakteri *G.boninense*. Hasil tertinggi zona penghambatan sebesar 7,96 mm pada hari kesepuluh, hasil yang dihasilkan lebih kecil jika dibandingkan dengan Risky (2011) yang memperoleh hasil tertinggi pada zona penghambatan bakteri kitinolitik terhadap *G.boninense* sebesar 12,63 mm. Hal ini dapat disebabkan karena kecilnya aktivitas kitinase yang dihasilkan bakteri BPPT CC 2 dalam mendegradasi dinding sel fungi. Efek penghambatan isolat kitinolitik BPPT CC 2 terhadap *G.boninense* dipengaruhi oleh adanya senyawa kitin pada sel fungi. Menurut muharni (2009) kitinase merupakan enzim yang mendegradasi kitin menjadi N-asetilglukosamin, degradasi kitin dapat dilakukan oleh organisme kitinolitik dengan melibatkan enzim kitinase.

Menurut El-Katatny *et al.* (2000) satu kelompok organisme yang memiliki potensi sebagai agen pengendali hayati fungi berasal dari kelompok mikroba penghasil kitinase. Pengendalian hayati fungi dengan menggunakan mikroba kitinolitik didasarkan pada kemampuan mikroba menghasilkan kitinase dan β -1,3-glukanase yang dapat melisiskan sel fungi. Bakteri lain yang juga digunakan sebagai pengendali hayati komersial seperti *Pseudomonas syringae*, *Burkholderia cepacia*, *B.subtilis*, *Agrobacterium radiobacter*, *Enterobacter cloacae*, dan *Streptomyces griseoviridis* (Fravel *et al.* 1998). Bakteri kitinolitik seperti *Agrobacterium hydrophila*, *A. caviae*, *Pseudomonas maltophilia*, *B. licheniformis*, *B. circulans*, *Vibrio furnisii*, *Xanthomonas spp.*, dan *Serratia marcescens* memainkan peran penting dalam pengendalian hayati pathogen tanaman (Gohel *et al.* 2003).

Sahidi (1998) mengatakan bahwa kitin merupakan polimer alami kedua yang paling banyak tersedia dialam setelah selulosa, merupakan polimer aminoglukan dari N-asetilglukosamin yang tidak larut dalam air. Mikroorganisme kitinolitik mempunyai aktivitas antagonisme yang kuat terhadap fungi patogen dengan mekanisme hiperparasitismenya dan antibiotiknya sehingga efektif dalam menghambat pertumbuhan fungi pathogen tanaman dengan mendegradasi dinding selnya. Beberapa enzim kitinolitik toksik pada fungi patogen tanaman budidaya tetapi tidak pada mikroorganisme lain dalam tanah dan tumbuhan inang (Kloepper,1989). Menurut Oku (1994), peranan kitinase dalam pertahanan tanaman terhadap serangan patogen terjadi melalui dua cara, yaitu menghambat pertumbuhan fungi dengan secara langsung menghidrolisis dinding miselia dan melalui pelepasan elisitor endogen oleh aktivitas kitinase yang kemudian memicu reaksi ketahanan sistemik inang.



4.2.3. Aktivitas dan Kemurnian Enzim Kasar Kitinase

4.2.3.1. Aktivitas Enzim Kasar Kitinase

Produksi kitinase dilakukan pada media M9 yang mengandung 3% kitin flakes. Pemanenan dilakukan dengan cara sentrifugasi dengan kecepatan 6000 rpm selama 20 menit pada suhu 4°C. Aktivitas enzim dihitung berdasarkan jumlah gula pereduksi yang dihasilkan dengan metode Miller (1959) termodifikasi menggunakan kurva standar N-asetilglukosamin. Satu unit aktivitas kitinase adalah jumlah enzim yang menghasilkan $1\mu\text{mol}$ N-asetilglukosamin permenit (Wen *et al.* 2002). Metode Miller (1959) termodifikasi menggunakan metode DNS (3,5-Dinitrosalicylic acid). Enzim kitinase akan menghidrolisis koloidal kitin dan menghasilkan gula pereduksi berupa N-asetilglukosamin. Reaksi dihentikan dengan penambahan DNS. Gula pereduksi (N-asetilglukosamin) akan bereaksi dengan DNS dan menghasilkan warna kuning kecoklatan.

Kurva kalibrasi dibuat dari beberapa variasi konsentrasi baku pembanding N-asetilglukosamin yang diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 540nm. Persamaan kurva standar N-asetilgluksamin adalah $y = 5,9453x - 0,6965$ dengan koefisien korelasi 0,9938. Berdasarkan nilai koefisien korelasi tersebut dapat diketahui bahwa besar nilai y mempengaruhi nilai x sebesar 99,38%, sehingga semakin tinggi nilai y maka semakin tinggi juga nilai x . Sedangkan nilai regresi yang baik adalah mendekati 1 karena kesalahan inilah yang menyebabkan garis kurva kalibrasi tidak linear(garis lurus). Namun hasil ini tidak terlalu jauh dari literatur yang ada sehingga masih dapat digunakan sebagai acuan.

Setelah enzim kasar diperoleh, proses purifikasi selanjutnya dengan pengendapan ammonium sulfat dengan 4 fraksinasi yaitu 20%, 40%, 60% dan 80%. Tahap ini berfungsi untuk meningkatkan konsentrasi protein enzim, mereduksi volume larutan enzim, dan memisahkan protein target dari sebagian kontaminan. Kitinase diperoleh dengan cara sentrifugasi karena enzim akan mengendap. Pelet yang diperoleh dilarutkan pada buffer L-Histidine pH 5,58 untuk menjaga kestabilan enzim. Buffer L-Histidin dipilih karena kemampuan L-Histidin yang dapat menjaga rentang pH di sekitar pH 6. pH 6 merupakan pH optimum kitinase untuk memproduksi *N*-Asetil-D-Glukosamin (Maggadani, 2012).

Tahap pemurnian selanjutnya adalah dialisis yang memiliki prinsip untuk memisahkan molekul berdasarkan ukuran molekul melalui membrane semi permeabel. Membrane dialisis yang digunakan adalah membrane tubing selulosa dengan MWCO (molecular weight cut off) 12,4 kDa. Penggunaan membrane



tubing selulosa ini diharapkan molekul yang berukuran diatas 12,4 kDa tetap berada dalam membran dialisis sedangkan kontaminan yang berukuran dibawah 12,4 kDa akan keluar dari membrane dialisis. Enzim kitinase memiliki bobot molekul berkisar antara 60-168 kDa (Anindiyaputri, 2010).

Ekstrak kasar enzim kitinase kemudian diujikan aktivitas, total protein, aktivitas spesifik enzim sebagai data awal untuk melakukan purifikasi. Nilai aktivitas tertinggi didapatkan pada fraksi 20% pengendapan ammonium sulfat sebesar 0,0616 U/mL. Aktivitas ini termasuk aktivitas yang kecil jika dibandingkan dengan penelitian sebelumnya yang memiliki nilai aktivitas sebesar 0,1780 U/ml (Manggadani, 2012). Kecilnya aktivitas enzim yang dihasilkan dapat disebabkan karena berubahnya sifat dari isolat seiring dengan peremajaan yang berulang-ulang dan kondisi pertumbuhan yang berubah-ubah. Kecilnya aktivitas enzim juga dapat disebabkan karena kurang optimalnya media dan kondisi saat melakukan proses produksi enzim kitinase oleh BPPTCC 2.

4.2.3.2. Kemurnian Enzim Kasar Kitinase

Aktivitas spesifik dapat menggambarkan kemurnian suatu enzim. Makin tinggi aktivitas spesifik, maka enzim tersebut makin murni. Aktivitas spesifik enzim kitinase didefinisikan jumlah (unit) enzim kitinase tiap mg protein. Menurut Sana dkk. (2004), aktivitas spesifik enzim merupakan jumlah unit enzim dalam setiap mg protein dalam enzim tersebut. Suatu enzim dengan aktivitas (unit) yang sama, makin rendah kadar proteinnya maka aktivitas spesifiknya makin tinggi atau enzim semakin murni.

Hasil aktivitas spesifik ekstrak kasar kitinase terbaik dari beberapa kali percobaan didapatkan sebesar 0,3050 U/mg seperti yang ditunjukkan pada tabel 3, aktivitas spesifik yang dihasilkan tergolong kecil karena pada Manggadani (2012) aktivitas enzim ekstrak kasar kitinase BPPTCC 2 mencapai 0,1780 U/ml dengan aktivitas spesifik sebesar 1,965 U/mg. Aktivitas yang sangat kecil dapat disebabkan oleh media dan parameter kondisi produksi yang masih belum maksimal, saat produksi enzim kitinase juga bersamaan dengan proses produksi enzim protease yang dapat memotong enzim kitinase yang diinginkan, serta potensi dan kemurnian isolat yang kurang baik.

Dari hasil penentuan aktivitas kitinase ini juga diketahui bahwa metode presipitasi dengan menggunakan garam ammonium sulfat tidak berhasil untuk memfraksinasi protein yang diinginkan, dalam hal ini enzim kitinase. Hal ini terlihat dari aktivitas keempat fraksi yang kurang lebih memiliki nilai aktivitas spesifik yang sama padahal yang diinginkan adalah enzim kitinase berhasil difraksinasi pada fraksi presipitat tertentu saja. Hasil uji aktivitas spesifik tertinggi



yang sebesar 0,3191 U/mg pada fraksi 40% juga memiliki nilai kemurnian hanya sebesar 5,54 kali sedangkan pada Sugiarto (2013) menghasilkan aktivitas spesifik enzim kitinase BPPTCC2 setelah proses presipitasi dan dialisis sebesar 0,924 U/mg dengan nilai kemurnian yang mencapai 6,58 kali. Fraksi 40% memiliki aktivitas spesifik paling tinggi dari pada fraksi lainnya. Hal ini karena pada fraksi tersebut, pemberian ammonium sulfat banyak mengendapkan protein yang berupa enzim kitinase. Sedangkan protein yang bukan enzim sudah mengendap pada fraksi sebelumnya yaitu fraksi 20%. Dengan demikian, enzim yang diperoleh pada fraksi 30-45% sebagian besar merupakan enzim kitinase sehingga aktivitas spesifiknya tinggi.

Potensi isolat yang kurang baik dapat terlihat dari gambar 2 dimana koloni terpilih hanya menghasilkan zona bening dengan diameter yang sempit. Zona bening yang sempit ini menunjukkan bahwa produksi enzim kitinase dari isolat kurang baik dan rentan sekali hilang aktivitasnya karena gen pengkode enzim kitinase pada *Bacillus* berada pada plasmid yang mudah lepas dalam berbagai perubahan media pertumbuhan maupun produksi.

Penyebab kecilnya aktivitas enzim kitinase dapat juga dikarenakan adanya aktivitas proteolitik mendegradasi enzim kitinase yang diinginkan. Aktivitas proteolitik ini dapat berasal dari enzim proteolitik yang dapat muncul dari hasil kematian sel-sel bakteri sebagai bagian dari aktivitas biologis normalnya maupun dari kompartemen dimana enzim disimpan. Meskipun begitu, perlu dilakukan uji aktivitas proteolitik terhadap sampel untuk memastikan bahwa aktivitas spesifik yang kecil disebabkan dari hasil aktivitas proteolitik.

Hasil perhitungan aktivitas spesifik yang kecil juga dapat disebabkan karena enzim N-Asetilglukosamine yang disekresikan tidak begitu banyak dibandingkan dengan enzim kitinolitik lainnya. Enzim kitinase memang banyak sekali terdapat dalam bentuk isomer lainnya dan memotong spesifik bagian-bagian tertentu dari polimer GlcNAc. Sementara itu metode penetapan aktivitas kitinase yang digunakan hanya spesifik menghitung jumlah N-Asetilglukosamin saja, sehingga menjadi wajar jika aktivitas kitinase yang diperoleh kecil. Metode pengukuran aktivitas kitinase lain secara kolorimetri yang dapat dipergunakan diantaranya menggunakan berbagai substrat, diantaranya adalah kitin azure, yaitu kitin yang direaksikan dengan pewarna *Remazol Brilliant Violet 5R* dan kemudian diukur serapannya pada panjang gelombang 420 nm (Harighi *et al.* 2007). Kemudian pengukuran aktivitas eksokitinase juga dapat diukur dengan menggunakan substrat p-nitrofenil-N-asetil-D-glukosamin (Svitil *et al.* 1997). Substrat dengan senyawa kromogen seperti 4-Nitrofenil- β -D-N-N'-diasetilkotobiosa dan 4-Nitrofenil- β -D-N-N'-N"-triasetilkototriosa yang disiapkan dalam larutan stok



dimetilsulfoksida (DMSO) juga dapat digunakan untuk pengukuran aktivitas kitinase dengan menentukan serapannya pada panjang gelombang 410 nm (Watanabe *et al.* 1992).

Namun, dari hasil seleksi isolat potensial dengan menggunakan zona bening dan juga zimografi menandakan bahwa isolat *Bacillus* sp. BPPTCC-2 merupakan penghasil enzim kitinolitik, meskipun perlu diketahui lebih lanjut secara lebih spesifik mengenai enzim-enzim kitinolitik apa saja yang diproduksi, substrat yang dihidrolisis, dan juga produk yang dihasilkan agar dapat ditentukan metode penetapan aktivitas kitinase total yang lebih representatif.

4.2.4. Karakterisasi Kitinase Hasil Pemurnian

Sampel enzim fraksi dialisis dan ekstrak kasar dianalisis dengan teknik SDS PAGE. Konsentrasi *stacking gel* yang digunakan yaitu 5% sedangkan konsentrasi *separating gel* yang digunakan sebesar 12%. Gel akrilamid terbentuk akibat terjadinya proses polimerisasi akrilamida dengan metilenbisakrilamida dan amonium persulfat sebagai katalisator (Janson dan Ryden 1998). Fungsi penambahan SDS pada pembuatan gel yaitu untuk mengikat bagian hidrofobik pada protein, sehingga molekul terurai dari lipatannya dan muatan protein tersebut sama. Muatan yang sama bertujuan agar protein terpisah berdasarkan perbedaan bobot molekul (Lawati 2013). Pita protein yang dihasilkan pada enzim kasar masih banyak terdapat kontaminan. Namun setelah proses dialisis, diperoleh sebanyak 4 pita bening yang menunjukkan aktivitas kitinolitik dengan perkiraan berat molekul 57,6 (Kitinase-A); 49,5 (Kitinase-B) ; 42,9 (Kitinase-C) dan 35,6kDa (Kitinase-D). Bobot molekul enzim yang dihasilkan BPPTCC2 bebeda dengan beberapa penelitian sebelumnya menunjukkan enzim kitinase memiliki bobot molekul sebesar 103 kDa. Pada Sugiarto (2013) bobot molekul pita protein BPPTCC 2 yang dihasilkan pada enzim kasar masih banyak karena terdapat kontaminan. Namun setelah proses dialisis, diperoleh sebanyak 7 pita dengan bobot molekul 103 kDa, 43 kDa, 40.2 kDa, 37.8 kDa, 30.3 kDa, 25.4 kDa, dan 23.6 kDa. Enzim kitinase yang diperoleh diprediksi memiliki bobot molekul sebesar 103 kDa. Hal ini dapat dibuktikan dengan hasil zimogram. Perbedaan bobot molekul yang dihasilkan dikarenakan proses pemurnian dengan ammonium sulfat tidak maksimal dalam memurnikan enzim kitinase karena proses pemurnian enzim dengan menggunakan ammonium sulfat tidak dapat mengendapkan seluruh protein yang telah larut (Scopes, 1994).

Banyak organisme penghasil enzim kitinolitik yang memproduksi beberapa bentuk isomer dari kitinase. Hal ini disebabkan dari proses pasca-translasi dari *single-gene product* atau hasil dari beberapa gen yang berbeda.



Heterogenitas dari kitinase yang diproduksi terkait juga terhadap hasil modifikasi pascatranslasi karena perbedaan proses glikosilasi dan proteolisis (Dahiya et al, 2006)

Beberapa enzim kitinolitik yang dihasilkan oleh satu spesies beberapa kali dilaporkan seperti pada *S. marcescens* (Suzuki et al., 2002), *Aeromonas sp* No. 10S-24 (Ueda et al., 1995), *Pseudomonas aeruginosa* K-187 (Wang dan Chang, 1997), *Bacillus cirulans* WL-12 (Mitsutomi et al., 1998), *Bacillus licheniformis* X-74 (Takayanagi et al., 1991), *Streptomyces* sp. J. 13-3 (Okazaki et al., 1995), dan *Streptomyces griseus* HUT 6037 (Itoh et al, 2002).



5. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa:

1. Isolat *Bacillus* sp. BPPT CC 2 merupakan bakteri penghasil enzim kitinase.
2. Hasil aktivitas enzim terbesar yaitu sebesar 0,0616 U/mg pada fraksi 20%.
3. Hasil kadar protein terbesar yaitu sebesar 0,3204 mg/ml pada fraksi 80%.
4. Isolat *Bacillus* sp. BPPTCC 2 dapat menghambat pertumbuhan *G.boninense*
5. Hasil aktivitas enzim spesifik terbesar yaitu sebesar 0,3191 U/mg dengan tingkat kemurnian sebesar 5,54 kali pada fraksi 40%.
6. Terdapat 4 jenis kitinase yang dikresikan oleh isolat bakteri *Bacillus* sp. BPPTCC-2 yaitu kitinase-A, kitinase-B, kitinase-C dan kitinase-D dengan berat molekul masing-masing berturut-turut adalah 57,6 kDa, 49,5 kDa dan 35,6 kDa.

5.2 Saran

Perlu dilakukan pengujian ulang optimasi produksi enzim kitinase oleh bakteri BPPT CC 2, karena isolat tersebut belum menghasilkan enzim kitinase secara optimal. Sehingga sulit untuk dilanjutkan pada tahap pemurnian serta karakterisasi. Dan diperlukan adanya peremajaan rutin terhadap isolat bakteri ini agar isolat bakteri tidak rusak dan dapat digunakan kembali pada penelitian selanjutnya.



DAFTAR PUSTAKA

- Abadi, A.L. 1987. Biologi *Ganoderma boninense* pat pada kelapa sawit (*Elaeisguineensis* Jacq.) Dan pengaruh beberapa mikroba antagonistik terhadap pertumbuhan. Disertasi. PPS IPB.
- Agrios, G. 1996. Ilmu Penyakit Tanaman Gadjah Mada University Press, Yogyakarta.
- Anindyaputri, A. 2010. Identifikasi Molekuler Bakteri Pengurai Kitin Serangga dan Karakterisasi Enzim Kitinasenya [skripsi]. Bogor (ID): Institut Pertanian Bogor.
- Baldwin, E. 1973. Dynamyc Aspects of Biochemistry, University Press, Cambridge.
- Bielka, H., H. B. F. Dixon, P. Karlson, C. Liebeeg, N. Sharon, F. J. Van Lenten, S. F. Velix, J. F. G. Vliegenhart and E. C. Webb. 1984. *Enzyme Nomenclature*. Academic Press, Inc. Newyork
- Bradford, M.M. (1976). A Rapid and Sensitive Method for the Quantification of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-dye Binding. *Anal. Biochem.*
- Budiyanto *et al.* (2005), Kajian perbedaan TBS yang dihasilkan perkebunan rakyat dan perkebunan besar: Rendemen CPO dan Inti Sawit pada TBS varietas Tenera dan Dura di PT BNT dan Perkebunan Rakyat, *Jurnal Akta Agrosia*.
- Chernin, L.S., Michael, K.W. Jacquelyn, M.T. Shoshan, H. Barrie, W.B. Cheat, W and Gordon, S.A.B, Stewart. 1998. Chitinolytic Activity in *Chromobacterium violaceum*: J. Bacteriol.
- Cohen-Kupiec, R., And Chet, I. 1998. The Molecular Biology of Chitin Digestion, Curr. Opinion Biothecnol.
- Crawford, D.L., and Mahadevan, B. 1997. Properties of The Chitinase of the Antifungal Biocontrol Agent *Streptomyces lydicus* WYEC-108. *Enzyme Microb. Technol.*
- Darwis, A.A., dan Sunarti, T.C. 1992. Teknologi Mikrobial. Institut Pertanian Bogor.
- Girindra, A. 1993. Biokimia I, Cetakan 3, Gramedia, Jakarta.

- Gohel, V., Singh A, Vimal M. Ashwini P. Chattpar HS. 2006. Bioprospecting and antifungal potential of chitinolytic microorganisms. *Afr J Biotechnol.*
- Haran, S., And Chet, I. 1995. New Components of the Chitinolytic System of *Thrichoderma harzianum*, *Mycol Rev.*
- Harighi, M.J., Zamani M.R. dan Motallebi M. (2007). Evaluation of Antifungal Activity of Purified Chitinase 42 from *Trichoderma atroviride* PTCC5220. *Biotechnology.*
- Harman, G.E., Hayes, C.K. Lorito, M. Broadway, R.M. Di Pietro, A. Peterbauer, C. And Tronsmo A. 1993. Chitinolytic Enzyme of *Trichoderma caviae* Purification of Chitobiosidase & Endochitinase. *Phytopathology.*
- Idris, A.S, arifin, D., watt, T.A, & swinburne, T.R. 2001. Distribution of species of ganoderma basal stem rot of oil palm in relation to the environmental conditions in peninsular malaysia. *Proc. PIPOC 2001.*
- Inbar, J., And I. Chet. 1991. Evidence That Chitinase Produced by *Aeromonas caviae* is Involved in The Biological Control of Soil-Borne. Plant Pathogens by The Bacterium *Soil Biol. Biochem.* 23: 973-978.
- Itoh, Y., Kawase T, Nikajdou N, Fukada H, Mitsutomi M, Watanabe T, Itoh Y (2002) Functional analysis of the chitin binding domain of a family 19 chitinase from *Streptomyces griseus* HUT6037: substrate-binding affinity and cis-dominant increase of antifungal function. *Biosci Biotechnol Biochem.*
- Jeaniaux, C. 1966. Chitinase, Dalam E, F. Neufeld & V. Ginburg (Eds.) Complex Carbohydrates. Methods in Enzymology. Academic Press, New York.
- Khairudin, H. 1990. Basal stem rot of oil palm: incidence, etiology, and control. Master of agriculture science thesis. UPM. Malaysia.
- Lehninger, A.L. 1997. Dasar-dasar Bioimia, alih Bahasa Maggy Thenawijaya, Jilid 1, Erlangga, Jakarta.
- Lloyd, A. B., R. L. Noveroske and J. L. Lockwood. 1965. Lysis of Fungal Mycelium by *Streptomyces* spp. and Their Chitinase System. *Phytopathology.*
- Owry, O.H., Roserbough N.J, Farr A.L, Randall R.J. 1951. Protein measurement with folin phenol reagen. *J Biol Chem.*



- Maggadani, B.P. (2012). Optimasi Produksi N-Asetilglukosamin dari Kitin Menggunakan Kitinase Hasil Isolasi Bakteri. Tesis Program Pasca Sarjana. Universitas Indonesia, Depok.
- Mitsutomi, O., Isono M, Uchiyama A, Nikaidov N, Ikegami T, Watanabe T. (1998) Chitosanase activity of the enzyme previously reported as β -1,3-1,4-glucanase from *Bacillus circulans* WL 12. *Biosci Biotechnol Biochem*.
- Miller, G.L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.*
- Nugroho, T.T. Ginting, C. Ali, M. Dahliaty, A. Wahyuningsih, Devi, S. Dan Sukmarisa, Y. 2003 Isolasi dan Karakterisasi Sebagian Kitinase *Trichoderma viride*, *J. Natur Indonesia*.
- Okazaki, K., Kato F, Watanabe N, Yasuda S, Masui Y, Hayakawa S. (1995) Purification and properties of two chitinases from *Streptomyces sp.* J-13-3. *Biosci Biotechnol Biochem*
- Paulitz, T.C., And Belanger, R. R. 2001. Biological Control In Greenhouse System Annu. Rev. Phytopathol.
- Priyanto, T., P. Sudjono, M. S. Y. Chaerani, Suryadi, dan Sudjadi, M. 2000. Tehnik Produksi dan Formulasi Bakteri Kinolitik Untuk Pengendalian Penyakit Karat Kedelai. *J. Natur Indonesia*.
- Risza, S. 1994. Kelapa Sawit. Penerbit Kanisius. Yogyakarta
- Sahai, A.S., and M.S. Manocha. 1993. Chitinases of Fungi & Palants: Their Involvement in Morphogenesis & Host-Parasite Interaction. *FEMS Microbiol.Rev.*
- Savery, J. R., Dan Duffy, T. M. 1995. "Problem Based Learning: An Instructional Model and its Constructivist Framework", *Educational Technology*.
- Scopes, R.K. 1994. Protein Purification, Principle & Practice. Third Edition. Springer-Verlag, New York.
- Semangun, H. 1991. Penyakit-Penyakit Penting Tanaman Pangan di Indonesia. Gadjah Mada University Press. Yogyakarta.
- Shakhbazau, A.V.,& Kartel N.A. (2008). Chitinases in bioengineering research. *Russian Journal of Genetics*.



- Singh, P. P., Y. C. Shin, C. S. Park & Y.R. Chung, 1999. Biological Control of Fusarium Wilt of Cucumber By Chitinolytic Bacteri. *Phytopathol.*
- Susanto, A, Sudharto PS, Purba RY. 2007. Enhancing biological control of basal stem rot disease (*Ganoderma boninense*) in oil palm plantation. *Mycopath.* 159 (1): 153-157.
- Suzuki, K., Sugawara N., Suzuki M., Uchiyama T., Katouno F., Nikaidou N. & Watanabe T. (2002). Chitinase, A, B, and C1 of *Serratia marcescens* 2170 produced by recombinant *E. Coli*: enzymatic properties and synergism on chitin degradation. *Biosci Biotechnol Biochem.*
- Svitil, A.L., Chadhain S.M.N., Moore J.A. & Kirchman D.L. (1997). Chitin Degradation Protein Produced by The Marine Bacterium *Vibrio harveyi* Grwoing on Different Form of Chitin. *Appl. Environ. Microbiol.*
- Takayanagi, T., Ajisaka K, Takiguchi Y, Shimahara K (1991) Isolation and characterization of thermostable chitinases from *Bacillus licheniformis* X-74. *Biochim Biophys Acta.*
- Tanaka, T., Fujiwara S., Nishikori S., Fukui T., Takagi M. dan Imanaka T. (1999). A Unique Chitinase with Dual Active Sites and Triple Substrat Binding Sites from The Hyperthermophilic Archaeon *Pyrococcus kodakaraensis* KOD-1. *Appl. Environ. Microbiol.*
- Tjitosoepomo, G. 2002. *Taksonomi Tumbuhan (Spermatophyta)*. Cetakan VII. Gajah Mada University Press. Yogyakarta
- Tronsmo, A., And Harman, G.E. 1993. Detection & Quantification of N-acetyl-Beta-D-Glucosaminidase, Chitobiosidase, & Endochitinase in Solution & On Gels. *Anal. Biochem.*
- Turner, P.D. 1981. Oil palm diseases and disorders. Oxford university press. Oxford.
- Ueda, M., Fujiwara A., Kawaguchi T. & Arai M. (1995). Purification and some properties of six chitinases from *Aeromonas* sp. No. 10S-24. *Biosci Biotechnol Biochem.*
- Venkatarayan, S. V. (1937) Report of work donein Mycologycal Section during the year 1935-1936. *Administration Report. Department of Agriculture, Mysore.*
- Wang, S.L., Chang, W.T. (1997). Purification and characterization of two bifunctional chitinases/lysozymes extracellularly produced by



Pseudomonas aeruginosa K-187 in shrimp and crab shell powder medium. *Appl Environ Microbiol.*

Wang, S.L., Chang, W.T. 1997. Purification and characterization of two bifunctional chitinase/lysozyme extracellularly produced by pseudomonas aeruginosa K-187. *Applied and environmental microbiology.*

Watanabe, T., Yamada T., Oyanagi W., Suzuki K. & Tanaka H. (1992). Purification and Some Properties of Chitinase B1 from *Bacillus cirulans* WL-12. *Biosci. Biotech. Biochem.*

Wen, C.M., tseng C.S, Li Y.K. 2002. Purification, characterization, and cloning a chitinase from Bacillus sp. NCTU2. *Biotechnol Appl Bichem.*

Wu, M., Y.C. Chuang, J.P. Chen, C.S. Chen and M.C. Chang. 2001. Identification & charcterization of Three binding Domains Within the Multidomain Chitinase Chi 92 from Aeromonas hydrophilla jp 101.*Appl Environment Microbiol.*

