



## Pengaruh Penambahan Biotin terhadap Produksi Kitinase dari *Trichoderma Viride* FNCC 6013

Dharma Pebruariawan Putra<sup>a</sup>, Wuryanti<sup>a\*</sup>, Sriatun<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Chemistry Department, Faculty of Sciences and Mathematics, Diponegoro University, Jalan Prof. Soedarto, Tembalang, Semarang

\* Corresponding author: [wuryanti@live.undip.ac.id](mailto:wuryanti@live.undip.ac.id)

### Article Info

Keywords:  
chitinases, biotin,  
*Trichoderma viride*  
FNCC 6013

Kata Kunci:  
kitinase, biotin,  
*Trichoderma viride*  
FNCC 6013

### Abstract

Research on the effect of biotin addition on chitinase production isolated from *Trichoderma viride* FNCC 6013 was performed. Chitinase is an enzyme that hydrolyzes chitin into simple sugars like N-acetylglucosamine. The aim of this study was to obtain chitinase isolated from *Trichoderma viride* FNCC 6013, studying the effect of biotin addition on growth of *Trichoderma viride* FNCC 6013 and chitinase production, obtaining isolated chitinase character information. The media for the growth curve of *Trichoderma viride* FNCC 6013 and chitinase production were varied with variations in biotin addition of 0.1 mg/mL and 0.3 mg/mL and without addition of biotin. Furthermore, chitinase was purified by fractionation of ammonium sulfate and dialysis was then tested for its activity and character. *Trichoderma viride* FNCC 6013 growth and chitinase production increased with biotin but not significant. The pH and the optimum temperature of chitinase produced from the medium without the addition of biotin, with addition of 0.1 mg/mL biotin and 0.3 mg/mL were pH = 3.6; 4.2 and 4.2 and temperature of 27.5°C, 29°C and 29°C.

### Abstrak

Telah dilakukan penelitian tentang pengaruh penambahan biotin terhadap produksi kitinase yang diisolasi dari *Trichoderma viride* FNCC 6013. Kitinase merupakan enzim yang menghidrolisis kitin menjadi gula sederhana seperti N-asetilglukosamin. Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan kitinase yang diisolasi dari *Trichoderma viride* FNCC 6013, mengkaji pengaruh penambahan biotin terhadap pertumbuhan *Trichoderma viride* FNCC 6013 dan produksi kitinase, mendapatkan informasi karakter kitinase hasil isolasi. Media untuk kurva pertumbuhan *Trichoderma viride* FNCC 6013 dan produksi kitinase dibuat variasi dengan variasi penambahan biotin 0,1 mg/mL dan 0,3 mg/mL serta tanpa penambahan biotin. Selanjutnya kitinase dimurnikan dengan fraksinasi amonium sulfat dan dialisis kemudian diuji aktivitas dan karakternya. Pertumbuhan *Trichoderma viride* FNCC 6013 dan produksi kitinase meningkat dengan adanya biotin namun tidak signifikan. pH dan suhu optimum kitinase yang diproduksi dari media tanpa penambahan biotin, dengan penambahan biotin 0,1 mg/mL dan 0,3 mg/mL berturut-turut adalah pada pH = 3,6; 4,2 dan 4,2 serta suhu 27,5°C, 29°C dan 29°C.

### 1. Pendahuluan

Kitinase (EC 3.2.1.14) adalah enzim golongan glikosil hidrolase yang mengkonversi kitin menjadi monomernya yakni N-asetil glukosamin yang dapat digunakan sebagai substrat dalam berbagai aplikasi industri [1, 2]. Kitinase dikelompokkan menjadi dua,

yaitu endokitinase dan eksokitinase. Endokitinase menghidrolisis kitin secara acak dari bagian dalam menghasilkan kitooligomer. Eksokitinase terdiri dari kitobiohidrolase yang menghidrolisis kitin secara berurutan dari ujung nonreduksi menghasilkan kitobiosa sebagai produk akhir dan β-N-asetilheksosaminidase yang menghidrolisis kitin secara berurutan dari ujung

nonreduksi menghasilkan senyawa N-asetilglukosamin [3]. Saat ini, kitinase banyak diaplikasikan dalam bidang pertanian dan bioteknologi sebagai agen biokontrol kapang patogen tanaman, sebagai inhibitor untuk kapang pembusuk makanan dan insektisida. Selain itu, kitinase diaplikasikan untuk mendegradasi limbah kulit crustacea seperti kepiting, udang dan lobster karena memiliki dinding sel yang tersusun atas kitin [4].

Dilaporkan Sharaf *dkk.* [4] bahwa diantara 8 kapang kitinolitik yang diteliti yakni *Trichoderma viride*, *Fusarium poae*, *Fusarium bulbigenum* var. *Lycopersici*, *Fusarium moniliform*, *Fusarium chlamyosporum*, *Cephalosporium curtipes*, *Aspergillus fumigatus* dan *Chaetomium globosum*, yang mampu menghasilkan enzim kitinase dengan aktivitas tertinggi ialah *Trichoderma viride*. Ekstrak kasar kitinase dari *Trichoderma viride* tersebut diuji aktivitas antijamurnya dan hasilnya ekstrak kasar kitinase mampu menghambat pertumbuhan kapang perusak makanan seperti *Alternaria solani*, *Penicillium italicum*, *Penicillium oxalicum* dan *Botrytis cinerea*.

Produksi enzim dapat ditingkatkan dengan cara memperkaya nutrisi kedalam media produksi enzim, misalnya biotin (vitamin H). Wuryanti [5] melakukan penelitian pengaruh penambahan biotin pada media pertumbuhan terhadap produksi sel *Aspergillus niger* dan diperoleh hasil penambahan biotin 0,1 mg/mL dapat meningkatkan produksi biomassa *Aspergillus niger* sampai 40,17%.

Dalam penelitian ini kitinase yang diuji aktivitas dan karakterisasinya diisolasi dari kapang *Trichoderma viride* FNCC 6013 dan dilakukan penambahan biotin pada media pertumbuhan agar meningkatkan pertumbuhan *Trichoderma viride* FNCC 6013. Semakin banyak biomassa sel *Trichoderma viride* FNCC 6013 maka semakin banyak kitinase yang diekskresikan keluar sel sehingga produksi kitinase dapat meningkat.

Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan kitinase yang diisolasi dari *Trichoderma viride* FNCC 6013, memperoleh data pengaruh penambahan biotin terhadap pertumbuhan *Trichoderma viride* FNCC 6013 dan produksi kitinase serta mendapatkan informasi karakteristik kitinase hasil isolasi yang meliputi pH dan suhu optimum.

## 2. Metode Penelitian

### Alat & Bahan

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini adalah peralatan gelas laboratorium kimia, autoklaf (Napco Model 8000-DSE), mikropipet (Nichiryo Model 5000F), sentrifus (Centrifuc-228), Spektrofotometer UV-Vis (T60u Spectrometer), Shaker incubator (ES-20 Giant), neraca analitik (Kern), oven (LG). Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah biakan murni kapang *Trichoderma viride* FNCC 6013 koleksi Laboratorium Pangan dan Gizi Pasca Sarjana UGM, koloidal kitin, biotin, media PDA (Potato Dextrose Agar),  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{MgSO}_4$ , KCl,  $\text{FeSO}_4$ , pepton, yeast extract,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ .

### Peremajaan dan Pengadaptasian *Trichoderma viride* FNCC 6013:

*Trichoderma viride* FNCC 6013 yang berasal dari isolat murni diambil sebanyak satu kawat ose dan diinokulasikan pada media agar miring PDA (*Potato Dextrose Agar*) secara berulang sampai tiga kali. Setelah itu dilakukan pemindahan inokulum secara aseptik pada erlenmeyer yang berisi media fermentasi cair. Selanjutnya media fermentasi tersebut diinkubasi pada *shaker incubator* sampai tumbuh spora *Trichoderma viride* FNCC 6013. Berikut adalah komposisi media fermentasi cair yang digunakan.

Tabel 1: Komposisi media fermentasi cair

Bahan	gram %
Koloidal kitin	1,5
$\text{NaNO}_3$	0,2
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	0,1
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,05
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,05
KCl	0,05
<i>Yeast extract</i>	0,25
Pepton	0,25

### Pembuatan Kurva Pertumbuhan

Media fermentasi cair untuk kurva pertumbuhan dibuat variasi yakni tanpa penambahan biotin, dengan penambahan biotin 0,1 mg/mL dan 0,3 mg/mL. Masing-masing variasi dibuat sebanyak 100 mL lalu disterilkan dengan autoklaf. Selanjutnya sebanyak 10 botol diisi media fermentasi cair dari setiap variasi sebanyak 10 mL. Masing-masing botol diinokulasikan 1 mL inokulum kapang *Trichoderma viride* FNCC 6013 (sebagai sampel) secara aseptik dan 1 buah botol yang lain dijadikan sebagai kontrol. Kemudian botol-botol tersebut dimasukkan dalam *shaker incubator* pada suhu ruang, selanjutnya sebanyak satu botol sampel diambil tiap 24 jam sekali selama kurun waktu 240 jam untuk diukur berat keringnya. Penentuan pertumbuhan kapang *Trichoderma viride* FNCC 6013 dilakukan menggunakan metode pengukuran berat kering.

### Produksi Kitinase

Produksi kitinase diawali dengan membuat media *starter* sebanyak 50 mL dengan langkah sama seperti tahap pengadaptasian *Trichoderma viride* FNCC 6013 pada media cair. Sebanyak 20 mL *starter Trichoderma viride* FNCC 6013 dipindahkan secara aseptik kedalam media produksi 500 mL (4% *starter*). Komposisi media produksi sama dengan komposisi media *starter*. Media produksi dibuat tiga variasi, yakni media I (tanpa penambahan biotin), media II (media dengan penambahan biotin 0,1 mg/mL) dan media III (dengan penambahan biotin 0,3 mg/mL). Media produksi diinkubasi pada *shaker incubator*. Setelah mencapai waktu sesuai fase log, media produksi disaring menggunakan kertas saring untuk memisahkan sel kapang *Trichoderma viride* FNCC 6013 dari media produksi. Media produksi selanjutnya disentrifugasi dengan kecepatan 5000 rpm pada suhu 5°C

selama 30 menit untuk memisahkan filtrat (ekstrak kasar kitinase) dan endapan.

#### Fraksinasi Kitinase dengan Amonium Sulfat :

Amonium sulfat ditambahkan kedalam ekstrak kasar enzim sambil diaduk dengan *magnetic stirrer* dengan kecepatan lambat sampai padatan amonium sulfat larut sempurna. Tingkat kejenuhan amonium sulfat 0-20% dikelompokkan menjadi fraksi 1 (F1), 20-40% fraksi 2 (F2), 40-60% fraksi 3 (F3), 60-80% fraksi 4 (F4) dan 80-100% fraksi 5 (F5). Campuran tersebut didiamkan selama satu malam dalam keadaan dingin. Selanjutnya campuran disentrifugasi dengan kecepatan 5000 rpm selama 20 menit pada suhu 5°C. Hasil sentrifugasi akan diperoleh endapan yang terpisah dari filtratnya. Endapan diambil dan disuspensikan dengan bufer asetat 0,2 M pH 5. Filtrat yang diperoleh kemudian dilanjutkan dengan perlakuan yang sama untuk fraksi berikutnya.

#### Dialisis Kitinase :

Proses dialisis dilakukan dengan memasukkan masing-masing fraksi kedalam membran selofan dan merendamnya dalam bufer asetat 0,0002 M dan diaduk dengan *magnetic stirrer* pada suhu dingin. Bufer asetat diganti tiap dua jam sekali hingga semua fraksi bebas amonium sulfat. Hal ini diketahui dengan menguji keberadaan amonium sulfat di dalam bufer perendam dengan cara bufer perendam diambil 3 mL lalu ditambahkan larutan BaCl<sub>2</sub> 0,1 M.

#### Penentuan Aktivitas Kitinase

Aktivitas enzim kitinase diuji menurut metode Veda dan Arai [6] dengan substrat koloidal kitin. Sebanyak 1,0 mL koloidal kitin 0,3 %, 2,0 mL bufer asetat 0,2 M pH 5 dan 1,0 mL filtrat enzim dimasukkan kedalam tabung reaksi dan diinkubasi pada suhu ruang selama waktu tertentu. Kemudian campuran tersebut dipanaskan dalam air mendidih selama 20 menit untuk menghentikan reaksi enzimatis dalam campuran tersebut lalu didinginkan. Aktivitas enzim dalam campuran tersebut ditentukan secara spektrofotometri pada  $\lambda = 660$  nm.

$$\text{Unit aktivitas} = \frac{x-y}{0,001} \times \frac{1}{\text{waktu inkubasi (menit)}}$$

Keterangan: x = serapan kontrol

y = serapan sampel

#### Penentuan Kadar Protein

Penentuan kadar protein diawali dengan penentuan panjang gelombang larutan standar BSA dan pembuatan kurva standar BSA. Penentuan panjang gelombang maksimum larutan standar BSA dilakukan dengan mereaksikan 0,5 mL larutan BSA 0,1 mg/mL dengan reagensia Lowry kemudian diukur serapannya dengan spektrofotometer UV-Vis pada rentang panjang gelombang sebesar 200-900 nm. Pembuatan kurva standar BSA dilakukan serupa dengan penentuan panjang gelombang maksimum dimana pembuatan kurva standar dilakukan dengan membuat variasi konsentrasi larutan

BSA antara 0,02-0,30 mg/mL dengan rentang 0,04 mg/mL dan diukur serapannya pada panjang gelombang maksimum. Penentuan kadar protein dilakukan dengan mereaksikan 0,5 mL kitinase dengan reagensia Lowry dan diukur serapannya pada panjang gelombang maksimum.

#### Penentuan Aktivitas Spesifik Kitinase

Aktivitas spesifik kitinase ditentukan dengan menghitung unit aktivitas kitinase dibagi dengan kadar protein kitinase.

#### Karakterisasi Kitinase

Penentuan pH optimum dilakukan dengan mereaksikan 1 mL kitinase hasil fraksinasi ditambah 1 mL substrat koloidal kitin 0,3% yang telah dilarutkan dalam variasi bufer asetat 0,2 M pH 3,6; 3,8; 4,0; 4,2; 4,4 sebanyak 2 mL, kemudian diinkubasi pada suhu ruang selama 90 menit. Hasil inkubasi kemudian dipanaskan dalam air mendidih selama 20 menit. Aktivitas enzim dalam campuran tersebut ditentukan secara spektrofotometri pada  $\lambda = 660$  nm.

Setelah diperoleh hasil pH optimum, dilakukan penentuan suhu optimum. Sebanyak 1 mL kitinase hasil fraksinasi ditambah 1 mL substrat koloidal kitin 0,3% yang telah dilarutkan dalam 2 mL bufer asetat 0,2 M pada kondisi pH optimum yang telah ditentukan sebelumnya, kemudian diinkubasi selama 90 menit dengan variasi suhu inkubasi 27°C, 27,5°C, 28°C, 28,5°C, 29°C dan 29,5°C. Hasil inkubasi kemudian dipanaskan dalam air mendidih selama 20 menit. Aktivitas enzim dalam campuran tersebut ditentukan secara spektrofotometri pada  $\lambda = 660$  nm.

### 3. Hasil dan Pembahasan

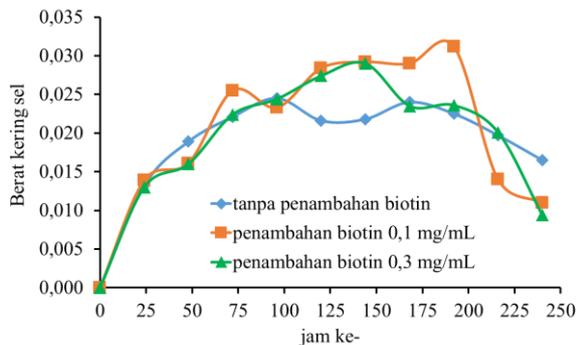
#### Peremajaan dan Pangadaptasian *Trichoderma viride* FNCC 6013

Peremajaan *Trichoderma viride* FNCC 6013 dilakukan pada media PDA (Potato Dextrose Agar) secara aseptik dan berulang dengan tujuan agar isolat yang diremajakan memiliki sifat yang sama dengan sifat isolat murninya serta menghindari kontaminasi atau mutasi. Isolat *Trichoderma viride* FNCC 6013 tumbuh setelah hari kelima peremajaan. Selanjutnya isolat tersebut dipindahkan ke media fermentasi cair agar diperoleh isolat yang aktif dan siap untuk digunakan sebagai starter dalam proses produksi kitinase. Pada media fermentasi cair, ditambahkan substrat kitin koloidal sebagai sumber karbon dan inducer supaya *Trichoderma viride* FNCC 6013 menghasilkan kitinase.

#### Pembuatan Kurva Pertumbuhan *Trichoderma viride* FNCC 6013

Kurva pertumbuhan merupakan kurva yang menggambarkan fase pertumbuhan mikroorganisme. Tujuan dari pembuatan kurva pertumbuhan adalah untuk mengetahui waktu isolasi enzim dari media pertumbuhan. Pembuatan kurva pertumbuhan dilakukan berdasarkan berat kering sel yaitu dengan menghitung pertambahan massa sel dari *Trichoderma viride* FNCC 6013 selama 240 jam. Hal ini dilakukan karena kapang

*Trichoderma viride* FNCC 6013 tidak homogen dalam media kurva pertumbuhan sehingga pengukuran pertumbuhan dengan spektroskopi UV-Vis tidak menggambarkan pertumbuhan yang sesungguhnya. *Trichoderma viride* FNCC 6013 dalam media cair diambil setiap 24 jam kemudian disaring, dikeringkan dengan oven dan disimpan dalam desikator secara berulang sampai massa sel konstan, kemudian ditimbang massanya. Berikut adalah kurva pertumbuhan yang diperoleh.



Gambar 1. Kurva Pertumbuhan *Trichoderma viride* FNCC6013

Dari kurva pertumbuhan tersebut, diperoleh titik untuk produksi enzim adalah jam ke-96 untuk media tanpa penambahan biotin dan jam ke-120 pada media kurva pertumbuhan yang ditambahkan biotin 0,1 mg/mL dan 0,3 mg/mL. Penambahan biotin dapat meningkatkan pertumbuhan *Trichoderma viride* FNCC 6013 namun peningkatannya tidak signifikan. Hasil yang sama juga didapatkan oleh Kalsum *dkk.* [7] yang melakukan penelitian tentang pengaruh pemberian air leri (air cucian beras) sebagai nutrisi tambahan pada pertumbuhan jamur tiram putih (*Pleurotus ostreatus*). Pada penelitian tersebut diperoleh hasil pemberian air leri tidak berpengaruh secara signifikan terhadap variabel berat total jamur tiram putih (*Pleurotus ostreatus*) yakni berat total dari media tanpa penambahan air leri, dengan penambahan air leri 20 mL, 40 mL dan 60 mL berturut-turut sebesar 189,96 gram, 185,90 gram, 234,63 gram dan 190,83 gram.

### Produksi Kitinase

Produksi kitinase diawali dengan pembuatan starter yang digunakan sebagai sumber mikroba yang akan mengawali fermentasi dalam proses produksi kitinase. Sebanyak 20 mL starter *Trichoderma viride* FNCC 6013 dipindahkan secara aseptik kedalam media produksi 500 mL (4% starter). Media produksi kitinase dibuat tiga variasi yakni media I (tanpa penambahan biotin), media II (penambahan biotin 0,1 mg/mL) dan media III (penambahan biotin 0,3 mg/mL). Media produksi diinkubasi pada shaker incubator sesuai dengan kurva pertumbuhan. Pada hari ketiga, terdapat spora berwarna putih kehijauan, berbentuk bulat dan terapung di atas media. Setelah mencapai jam ke-96 (untuk media I) dan jam ke-120 (untuk media II dan III), media produksi disaring menggunakan kertas saring dan diperoleh filtrat media produksi. Filtrat media produksi kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 5000 rpm pada suhu 5°C

selama 20 menit untuk memisahkan reagen yang tidak larut dalam media produksi. Filtrat yang diperoleh merupakan ekstrak kasar kitinase ekstraseluler yang selanjutnya disebut EK.

### Fraksinasi dengan Amonium Sulfat

Ekstrak kasar kitinase diendapkan dengan menambahkan garam amonium sulfat pada berbagai tingkat kejenuhan. Amonium sulfat banyak digunakan untuk mengendapkan protein (termasuk enzim) karena kelarutannya tinggi, harga murah, dan umumnya tidak mempengaruhi struktur protein [8]. Kelarutan protein dipengaruhi oleh konsentrasi garam amonium sulfat yang ditambahkan dan kekuatan ion yang ditimbulkan dari penambahan garam amonium sulfat. Semakin besar konsentrasi garam yang ditambahkan, maka terjadi peningkatan muatan listrik di sekitar protein yang akan menarik molekul air dari protein. Interaksi hidrofobik antara sesama molekul protein pada suasana ionik tinggi akan menurunkan kelarutan protein. Peristiwa ini disebut "salting out" dan dapat digunakan untuk memisahkan protein dari komponen terlarut lainnya [9]. Setelah itu dilakukan sentrifugasi pada suhu 5°C dengan kecepatan 5000 rpm selama 20 menit untuk memisahkan protein yang terendapkan pada tingkat kejenuhan sebelumnya.

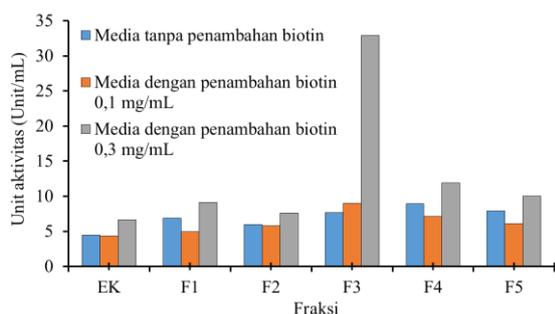
### Dialisis Kitinase

Proses dialisis dilakukan untuk membebaskan kitinase dari garam amonium sulfat karena dengan adanya amonium sulfat dalam protein enzim akan menghambat kerja katalisis enzim. Prinsip dialisis adalah difusi, yakni terjadinya aliran zat terlarut dari konsentrasi tinggi (bufer pensuspensi enzim, yakni bufer asetat 0,2 M) ke konsentrasi rendah (bufer perendam, yakni bufer asetat 0,0002 M) melalui membran semi permeabel (membran selofan). Membran selofan memiliki ukuran tertentu yang hanya akan melewatkan ion-ion berukuran kecil seperti ion amonium dan sulfat tetapi protein yang memiliki ukuran besar akan tertahan didalam membran. Proses difusi ini akan mencapai kesetimbangan saat laju aliran amonium sulfat keluar membran sama dengan laju kembalinya amonium sulfat kedalam membran. Saat mencapai kestimbangan, bufer yang digunakan sebagai pelarut harus diganti agar proses dialisis tetap berjalan sampai semua amonium sulfat yang ada dalam suspensi protein dapat keluar. Identifikasi bebasnya amonium sulfat dilakukan dengan menambahkan larutan BaCl<sub>2</sub> ke dalam bufer yang digunakan. Proses ini dihentikan sampai tidak terbentuk endapan putih pada saat penambahan BaCl<sub>2</sub>.

### Uji Aktivitas Kitinase

Aktivitas kitinase yang diuji pada penelitian ini adalah aktivitas kitinase total atau non-spesifik, yakni meliputi aktivitas endokitinase maupun eksokitinase [10]. Produk yang dihasilkan adalah kitooligosakarida dan N-asetilglukosamin. Aktivitas kitinase diuji dengan metode Veda dan Arai [6] berdasarkan pengurangan substrat koloidal kitin. Unit aktivitas dalam penelitian ini didefinisikan sebagai sejumlah enzim yang

menyebabkan pengurangan serapan sebesar 0,001 campuran reaksi per menit.

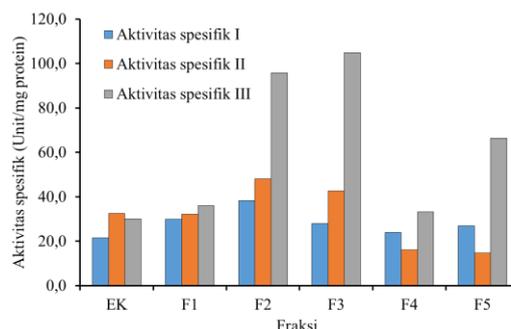


Gambar 2. Diagram Aktivitas Kitinase

Aktivitas kitinase tidak berubah secara signifikan dengan adanya penambahan biotin 0,1 mg/mL dan 0,3 mg/mL. Aktivitas kitinase yang tinggi dapat diperoleh dengan penambahan biotin 0,3 mg/mL jika dibandingkan dengan pemberian biotin sebesar 0,1 mg/mL karena pada ekstrak kasar dan semua fraksi menunjukkan aktivitas kitinase dari media produksi dengan penambahan biotin 0,3 mg/mL lebih tinggi daripada dengan penambahan biotin sebesar 0,1 mg/mL. Hal ini dipengaruhi oleh jumlah sel *Trichoderma viride* FNCC 6013 yang tumbuh pada media produksi. Penambahan biotin 0,3 mg/mL menyebabkan pertumbuhan sel lebih banyak dibanding penambahan biotin 0,1 mg/mL meskipun tidak berbeda jauh, sehingga kitinase yang dieksresikan lebih banyak. Hasil yang mencolok ditunjukkan F3 dari media produksi dengan penambahan biotin 0,3 mg/mL. Kemungkinan pengukuran aktivitas pada fraksi tersebut kurang tepat karena terdapat kelemahan dari metode yang digunakan yakni metode Ueda-Arai. Pengukuran aktivitas kitinase dengan metode Ueda-Arai menjadi kurang tepat karena kemungkinan besar substrat kitin koloid yang tidak larut dalam bufer asetat menghalangi serapan cahaya UV-Vis dari spektrofotometer sehingga data serapan yang diperoleh tidak tepat.

Kadar protein diuji dengan metode Lowry *dkk.* [11] yakni menambahkan reagen Lowry ke dalam fraksi kitinase kemudian warna biru yang terbentuk ditentukan nilai serapannya menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang optimum larutan BSA yang sebelumnya telah diukur, yakni pada panjang gelombang 733 nm.

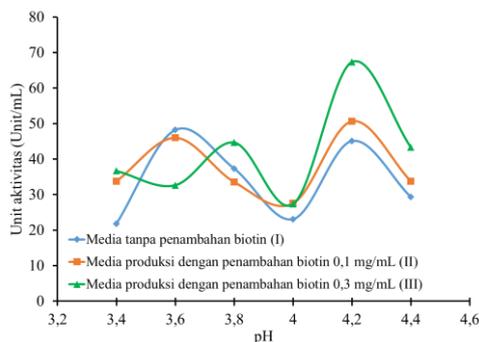
Nilai unit aktivitas dan kadar protein yang telah diketahui digunakan untuk menentukan nilai aktivitas spesifik kitinase. Fraksi dengan nilai aktivitas spesifik tertinggi merupakan fraksi dengan jumlah enzim paling banyak dibandingkan dengan fraksi lainnya sehingga kemungkinan menemukan enzim lebih besar dimana aktivitas spesifik merupakan rasio antara unit aktivitas enzim dengan protein dalam miligram. Fraksi dengan aktivitas spesifik tertinggi selanjutnya dikarakterisasi pH dan suhu optimumnya.



Gambar 3. Diagram aktivitas spesifik kitinase

**Karakterisasi Kitinase**

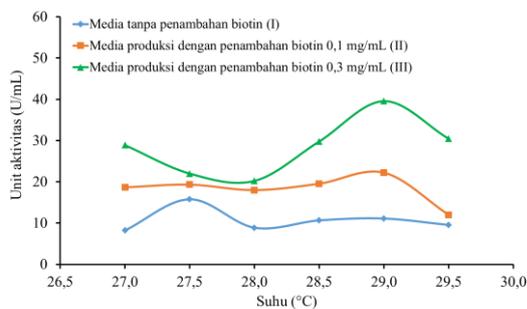
pH Optimum : Penentuan pH optimum dalam penelitian ini dilakukan terhadap fraksi enzim hasil penurnian awal dengan aktivitas spesifik tertinggi pada setiap variasi penambahan biotin dalam media produksi. Variasi pH dilakukan pada suhu optimum berdasarkan penelitian Sharaf *dkk.* [4] dimana suhu optimum kitinase dari *Trichoderma viride* adalah 28°C. Berikut adalah grafik aktivitas pada variasi pH optimum kitinase.



Gambar 4. Grafik pH optimum

Dari hasil karakterisasi pH optimum kitinase, diperoleh pH optimum kitinase pada media produksi tanpa penambahan biotin adalah pH 3,6 dengan unit aktivitas 48,222 Unit/mL. Kitinase pada media produksi dengan penambahan biotin 0,1 mg/mL memiliki karakteristik pH optimum pada pH 4,2 dengan unit aktivitas 50,667 Unit/mL. Hasil karakterisasi yang sama juga ditunjukkan kitinase pada media produksi dengan penambahan biotin 0,3 mg/mL yakni pH optimum pada pH 4,2 dengan unit aktivitas 67,333 Unit/mL. Penambahan biotin pada media produksi kitinase menyebabkan perubahan pH optimum aktivitas kitinase karena dimungkinkan bahwa biotin dalam sel kapang *Trichoderma viride* FNCC 6013 memicu ekskresi berlebih salah satu kelompok kitinase yang memiliki pH optimum yang lebih tinggi. Hal ini seperti penelitian Harman *dkk.* [12] yang melaporkan bahwa dari dua kelompok kitinase yang diisolasi dari *Trichoderma harzianum*, kitobiosidase (termasuk kelompok eksokitinase) memiliki pH yang lebih tinggi (dikisaran pH 6) dibandingkan endokitinase yang memiliki pH optimum dikisaran pH 4. kitinase dari *Trichoderma viride* adalah 28°C. Berikut adalah grafik aktivitas pada variasi pH optimum kitinase

Suhu Optimum: Suhu berperan dalam meningkatkan interaksi antara enzim dan substrat dalam reaksi enzimatik. Perubahan suhu mempengaruhi ikatan hidrogen atau interaksi hidrofobik yang berperan dalam menjaga konformasi molekul enzim [13]. Perubahan konformasi akan mempengaruhi ikatan sisi aktif enzim, kondisi panas tertentu menyebabkan mudahnya pemutusan ikatan hidrogen selanjutnya dalam rantai polipeptida tersebut sehingga protein enzim mengalami denaturasi [14]. Berikut adalah grafik unit aktivitas enzim terhadap perubahan suhu.



Gambar 5. Grafik suhu optimum

Hasil karakterisasi menunjukkan bahwa suhu optimum kitinase pada media produksi tanpa penambahan biotin adalah 27,5°C. Hasil ini mendekati suhu optimum kitinase yang diisolasi dari *Trichoderma viride* oleh Sharaf *dkk.* [4] yakni pada suhu 28°C. Pada media produksi dengan penambahan biotin sebanyak 0,1 mg/mL dan 0,3 mg/mL menunjukkan hasil yang sama yakni suhu optimum aktivitas kitinase pada 29°C. Penambahan biotin menyebabkan perubahan suhu optimum aktivitas kitinase. Sama seperti pada penentuan pH optimum, biotin yang ditambahkan pada media produksi kitinase dimungkinkan menyebabkan ekskresi berlebih salah satu kelompok kitinase yang memiliki suhu optimum yang lebih tinggi.

#### 4. Kesimpulan

Hasil penelitian menunjukkan bahwa kitinase dapat diisolasi dari kapang *Trichoderma viride* FNCC 6013 dengan kitin koloid sebagai induser. Pertumbuhan biomassa sel *Trichoderma viride* FNCC 6013 dan produksi kitinase mengalami peningkatan dengan adanya penambahan biotin meskipun tidak signifikan. Kondisi pH optimum pada reaksi enzimatik kitinase dari media produksi tanpa penambahan biotin, dengan penambahan biotin sebesar 0,1 mg/mL dan 0,3 mg/mL berturut-turut pada pH 3,6; 4,2; dan 4,2. Kondisi suhu optimum pada reaksi enzimatik kitinase dari media produksi tanpa penambahan biotin, dengan penambahan biotin 0,1 mg/mL dan 0,3 mg/mL berturut-turut pada suhu 27,5°C, 29°C dan 29°C.

#### 5. Daftar Pustaka

[1] Gemma Reguera, Susan B Leschine, Biochemical and genetic characterization of ChiA, the major enzyme component for the solubilization of chitin by *Cellulomonas uda*, *Archives of microbiology*, 180, 6, (2003) 434-443 <http://dx.doi.org/10.1007/s00203-003-0611-y>

[2] Magdalena A Gutowska, Jeffrey C Drazen, Bruce H Robison, Digestive chitinolytic activity in marine fishes of Monterey Bay, California, *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 139, 3, (2004) 351-358 <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpb.2004.09.020>

[3] Phakapob Setthakaset, Rath Pichyangkura, Anawat Ajavakom, Mongkol Sukwattanasinitt, Preparation of N-acetyl-D-glucosamine using enzyme from *Aspergillus sp.*, *J Metals, Materials and Minerals*, 18, (2008) 53-57

[4] Eman Fathi Sharaf, Abd El-Aziz Qablan El-Sarrany, Mai El-Deeb, Biorecycling of shrimp shell by *Trichoderma viride* for production of antifungal chitinase, *African Journal of Microbiology Research*, 6, 21, (2012) 4538-4545 <http://dx.doi.org/10.5897/AJMR12.148>

[5] Wuryanti, Pengaruh Penambahan Biotin Pada Media Pertumbuhan Terhadap Produksi Sel *Aspergillus niger*, *BIOMA*, Vol.10 No. 2, (2008) 6-50

[6] Mitsuhiro Veda, Motoo Arai, Purification and some properties of chitinases from *Aeromonas sp.* No. 10S-24, *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 56, 3, (1992) 460-464

[7] Ummu Kalsum, Siti Fatimah, Catur Wasonowati, Efektivitas Pemberian Air Leri Terhadap Pertumbuhan dan Hasil Jamur Tiram Putih (*Pleurotus ostreatus*), *Agrovigor*, 4, 2, (2011) 86-92

[8] Maggy T Suhartono, Enzim dan bioteknologi, *PAU Bioteknologi IPB, Bogor*, (1989)

[9] Aulanni'am, Protein dan Analisisnya, Citra Mentari Group, Malang, 2005.

[10] H Bielka, HBF Dixon, P Karlson, C Liebecq, N Sharon, EJ Van Lenten, SF Velick, JFG Vlienghart, EC Webb, A Cornish-Brown, Enzyme nomenclature, in, Academic Press, New York, 1984.

[11] Oliver H Lowry, Nira J Rosebrough, A Lewis Farr, Rose J Randall, Protein measurement with the Folin phenol reagent, *The Journal of biological chemistry*, 193, 1, (1951) 265-275

[12] GE Harman, CK Hayes, M Lorito, RM Broadway, A Di Pietro, C Peterbauer, A Tronsmo, Chitinolytic enzymes of *Trichoderma harzianum*: purification of chitobiosidase and endochitinase, *Phytopathology*, 83, 3, (1993) 313-318

[13] Rudy Wijaya, Karakteristik Enzim serupa Tripsin dari Cacing Tanah, Teknologi Pertanian, IPB, Bogor

[14] Anna Poedjiadi, FM Titin Supriyanti, Dasar-dasar biokimia, Jakarta: Universitas Indonesia, (1994)