

KARAKTERISASI KITINASE ISOLAT BAKTERI RHIZOSFIR ASAL CIANJUR DAN AKTIVITASNYA TERHADAP PATOGEN *Colletotrichum sp.*

Yadi Suryadi¹⁾, Dwiningsih Susilowati¹⁾, I Made Samudra¹⁾, Mustika Permatasari²⁾, dan Laksmi Ambarsari²⁾

¹Departemen Biokimia dan Mikrobiologi, BB Biogen Bogor
Jl. Tentara Pelajar 3 A Bogor, 16111
email: yshid@yahoo.co.uk

²Departemen Biokimia FMIPA IPB, Bogor, 16116
Jl Agatis Bogor

CHARACTERIZATION OF CIANJUR RHIZOSFIR BACTERIA ISOLATE AND ITS ACTIVITIES ON *Colletotrichum sp.* PATHOGEN

ABSTRACT

Chitinase is capable of hydrolyzing chitin and it is potential used as biocontrol agent. The purpose of this study is to purify and characterize chitinolytic activity of the selected bacteria, and to determine the inhibitory ability against *Colletotrichum sp.* The chitinase activity was determined by Spindler method, whilst protein concentration by Bradford method. The chitinase production of rhizobacteria isolate (C5C isolate) showed the highest specific enzyme activity of 0.0489 U/mg using 70% NH₄SO₄ partial purification, and increase the enzyme purity of 13.97 times compared with crude extracts. Chitinolytic characterization of C5C isolate showed that the enzyme is active at optimal temperature of 55 °C, pH 7, incubation time of 120 min, and had K_m of 1.300 x 10³ mg/L and V_{maks} of 0.0294 mg L⁻¹sec⁻¹. Antifungal activity under *in vitro* assay showed that chitinolytic C5C isolate, could inhibited the growth of *Colletotrichum sp.*

Key words: biocontrol, chitinase, *Colletotrichum sp.*, rhizobacteria

ABSTRAK

Kitinase mampu menghidrolisis kitin dan berpotensi sebagai agen biokontrol. Tujuan penelitian adalah memurnikan dan mengkarakterisasi kitinase dari isolat terpilih, serta menentukan kemampuan kitinolitiknya dalam penghambatan jamur *Colletotrichum sp.* Aktivitas kitinase ditentukan dengan metode Spindler, sementara kadar protein ditentukan dengan metode Bradford. Produksi kitinase isolat rizobakteri (isolat C5C) menunjukkan aktivitas enzim spesifik tertinggi sebesar 0.0489 U/mg melalui pemurnian parsial NH₄SO₄ 70%, serta dapat meningkatkan kemurnian 13.97 kali dibandingkan ekstrak kasar. Karakterisasi kitinase isolat C5C menunjukkan bahwa enzim aktif optimal pada suhu 55°C, pH 7, waktu inkubasi 120 menit, serta memiliki nilai K_m sebesar 1.300 x 10³ mg/L dan V_{maks} sebesar 0.0294 mgL⁻¹detik⁻¹. Aktivitas antifungi pada uji *in vitro* menunjukkan bahwa isolat C5C dapat menghambat pertumbuhan *Colletotrichum sp.*

Kata kunci: biokontrol, *Colletotrichum sp.*, kitinase, rizobakteri

PENDAHULUAN

Pemanfaatan rizobakteri merupakan salah satu alternatif yang dapat digunakan sebagai pengganti pupuk kimia dalam meningkatkan pertumbuhan tanaman (Iqbal & Hasnain, 2013). Selain itu, terdapat rizobakteri penghasil enzim pendegradasi dinding sel diantaranya kitinase (EC 3.2.1.14) yang bisa mendegradasi kitin menjadi N-asetil-D-glukosamin. Kitinase tersedia melimpah di alam (ke dua setelah selulase) dan bisa diperoleh dari berbagai mikroorganisme seperti bakteri dan jamur. Bakteri penghasil kitinase diantaranya *Aeromonas*, *Serratia*, *Vibrio*, *Streptomyces*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Arthrobacter*, *B. alvei*, *B. cereus*, *Serratia* sp. (Sutariati et al, 2006), sedangkan jamur penghasil kitinase diantaranya *Trichoderma viridae*, *Aspergillus* sp., *Mortierella* sp., *Mucor subtilisimul*, *Aspergillus fumigatus* (Mostafiz et al. 2012).

Kitinase telah menarik perhatian dalam bidang pertanian, farmakologi, dan bioteknologi (Kuzu et al. 2012). Dibandingkan senyawa kimia yang sulit terurai secara alami, dan bersifat toksik bagi makhluk hidup serta berbahaya bagi kesehatan manusia, kitinase dapat digunakan sebagai biopestisida yang aman dan ramah lingkungan. Peranan kitinase dalam bidang pertanian yaitu sebagai agen pengendali hayati untuk mengendalikan organisme pengganggu tumbuhan seperti jamur maupun serangga hama.

Alternatif untuk mengurangi penggunaan pestisida kimia diantaranya dengan pemanfaatan bakteri plant growth promoting rhizobacteria (PGPR). Beberapa strain bakteri PGPR dapat dipromosikan sebagai agen pengendali hayati yang efektif dalam menghambat pertumbuhan fungi patogen tanaman. Penelitian terdahulu juga melaporkan beberapa isolat bakteri rizosfer serta endofit dapat digunakan sebagai mikroba antagonis yang mampu mengendalikan penyakit yang disebabkan oleh jamur patogen (Suryadi et al., 2013).

Colletotrichum sp. merupakan jamur patogen penyebab penyakit antraknosa yang dapat menimbulkan kematian tanaman, ditandai dengan gejala awal berupa bercak bulat berwarna coklat kehitaman yang dibatasi lingkaran berwarna kuning pada permukaan daun (Leksono, 2010). Bakteri yang mampu menghambat

pertumbuhan jamur *Colletotrichum* sp. diantaranya dilaporkan terdiri atas genus *Bacillus* dan *Streptomyces* (Sriyanti et al, 2015). Kajian sebelumnya dilaporkan sebanyak 31 isolat bakteri (rizobakteri) telah berhasil diisolasi tanah asal Pacet Cianjur, Jawa Barat yang mempunyai karakteristik kemampuan menghasilkan hormon indol acetic acid (IAA) dan kitinase (Suryadi, data tidak dipublikasi). Terdapat enam isolat bakteri yang menghasilkan hormon IAA dan kitinase yang cukup baik, sehingga diperlukan adanya analisis lebih lanjut dari enam isolat bakteri tersebut. Hasil evaluasi terhadap efektivitas penghambatan bakteri terhadap patogen masih bervariasi. Kitinase diduga dapat dihasilkan oleh isolat bakteri tanah dalam kondisi pH, suhu, dan waktu inkubasi yang optimum agar dapat menghambat pertumbuhan patogen jamur lainnya.

Tujuan penelitian ini adalah memurnikan dan mengkarakterisasi kitinase dari isolat terpilih, serta mengukur kemampuan bakteri kitinolitik dalam menghambat pertumbuhan jamur *Colletotrichum* sp. Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi mengenai potensi isolat rizobakteri sebagai penghasil kitinase yang dapat dimanfaatkan dalam bidang pertanian maupun industri, agar dapat dikembangkan sebagai agen hayati penghambat pertumbuhan patogen.

MATERIAL DAN METODE

Isolasi dan Seleksi Bakteri Kitinolitik

Bakteri kitinolitik yang diuji terdiri atas isolat C2B, C3C, C3D, C4A, C5C, dan S2D asal tanah Cianjur, Jabar. Masing-masing isolat dibiakkan dalam media NB cair dan diinkubasi pada inkubator bergoyang selama 24 jam. Biakan diambil sebanyak 5 µL, dan ditumbuhkan ke dalam media kitin padat yang mengandung 0.3% koloidal kitin. Media yang berisi isolat disimpan dan diinkubasi kembali selama 4-6 hari pada suhu 28-30°C (Gohel et al., 2006). Cawan Petri disimpan di suhu ruangan selama 24 jam, dan dilakukan pengukuran indeks kitinolitik berdasarkan diameter zona bening yang terbentuk di sekitar koloni bakteri

terhadap diameter koloni, yang diamati setelah pewarnaan *congo red* dan pembilasan menggunakan NaCl 0.1%.

Aktivitas Enzim dan Pemurnian Parsial Kitinase

Ekstraksi ekstraseluler kitinase dilakukan menurut modifikasi (Gohel et al., 2006). Kultur isolat bakteri diambil sebanyak 1 ose dan dilarutkan dalam 10 mL media kitin cair. Kultur yang telah diinkubasi di inkubator bergoyang selama 48 jam pada kecepatan 120 rpm, disentrifugasi pada kecepatan 10.000 rpm selama 10 menit pada suhu 4°C. Supernatan yang dihasilkan sebagai ekstrak enzim kasar dipisahkan dan diuji aktivitasnya menurut prosedur (Kumar, 2007) dan kadar proteinnya ditentukan dengan metode (Bradford, 1976).

Pemurnian parsial dilakukan dengan pengendapan amonium sulfat (NH₄SO₄) (modifikasi Gomes et al. 2001). Ekstrak enzim kasar dipresipitasi dengan beberapa tingkat kejenuhan NH₄SO₄ (konsentrasi 10%, 30%, 50%, 70%) sambil diaduk perlahan dengan magnetic stirrer. Supernatan disimpan selama 24 jam pada suhu 4°C. Protein yang telah mengendap dipisahkan dari supernatan dengan disentrifugasi pada 10.000 rpm selama 10 menit pada suhu 4°C. Pelet disuspensikan ke dalam 3 mL PBS serta diuji aktivitasnya menurut petunjuk Kumar, (2007) dan ditentukan kadar proteinnya dengan metode (Bradford, 1976).

Campuran sebanyak 150 µL sampel enzim, 150 µL phosphate buffered saline (PBS) pH 6.8, dan 300 µL koloid kitin diinkubasi pada suhu 37°C selama 30 menit dan disentrifugasi dengan kecepatan 5000 rpm selama 5 menit pada suhu 4°C. Supernatan yang diperoleh diambil sebanyak 500 µL, ditambahkan 500 µL akuades dan 1000 µL pereaksi Schales (0.05 g K₃Fe(CN)₆ dan 0.5 M Na₂CO₃). Campuran divorteks dan dididihkan pada suhu 100°C selama 10 menit untuk menghentikan aktivitas enzim dan setelah dingin diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 420 nm. Satu unit aktivitas kitinase didefinisikan sebagai jumlah enzim yang dapat membebaskan N-asetil-D-glukosamin sebesar satu µmol per menit dalam keadaan optimal (Kumar, 2007).

Karakterisasi Kitinase Isolat C5C dan Kinetika Enzim

Optimasi enzim dilakukan terhadap kondisi pH, suhu dan waktu inkubasi (Margino et al, 2012). Uji pengaruh pH, suhu, dan waktu inkubasi terhadap aktivitas enzim dilakukan dengan mereaksikan enzim 150 µL, 150 µL bufer pH uji dan 300 µL koloid kitin 0.3%, dan kemudian campuran diinkubasi pada suhu 37°C selama 30 menit. Penentuan pH yang diuji dalam penelitian ini adalah pH 3-10 dengan menggunakan bufer tri-natrium sitrat (pH 4-6), bufer natrium fosfat (pH 6-8), dan bufer gylisin-NaOH (pH 8-10) dengan konsentrasi bufer 50 mM, sedangkan suhu yang digunakan pada rentang 30-65°C dengan interval 5°C, dan waktu inkubasi yang digunakan pada penelitian ini adalah 30-180 menit.

Larutan stok koloidal kitin 0.3% diencerkan menjadi 0.02% sampai dengan 0.14%. Sebanyak 300 µL koloid kitin variasi konsentrasi dicampur dengan 150µL sampel enzim dan 150µL bufer PBS. Campuran dihomogenkan dengan vorteks dan diinkubasi selama 30 menit pada suhu 37°C. Aktivitas kitinase dilakukan dengan menentukan konsentrasi N-asetil-D-glukosamin (Kumar, 2007). Nilai kinetika K_m dan V_{maks} ditentukan berdasarkan persamaan Lineweaver-Burk yang merupakan grafik hubungan antara $1/[S]$ dan $1/V$ (Rabeeth et al., 2011).

Aktivitas Kitinolitik Isolat C5C terhadap Jamur Colletotrichum sp.

Pengaruh isolat C5C terhadap jamur *Colletotrichum* sp. diuji secara *in vitro* menggunakan media *potato dextrose agar* (PDA). Aktivitas antagonis yang diuji yaitu ekstrak kitinase kasar dan enzim hasil pemurnian parsial (NH_4SO_4 70%) dengan metode difusi agar (Asril et al, 2014). Sampel dimasukkan kedalam sumur sebanyak 20 µl pada jarak minimal 3 cm dari tempat jamur ditempatkan pada cawan petri. Persentase penghambatan diukur setelah dinkubasi selama 7 hari pada suhu 28-30°C. Persentase penghambatan pertumbuhan dapat ditentukan dengan persamaan berikut: $DP = \frac{LK - LP}{LK} \times 100\%$, dimana: DP = daya penghambatan, LK = luas koloni pada kontrol, LP = luas koloni pada perlakuan.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Indeks Kitinolitik Isolat Rizobakteri

Aktivitas kitinase hasil uji kualitatif dilihat dari hasil degradasi kitin pada media sehingga terbentuk warna bening di sekitar koloni bakteri. Zona bening menunjukkan bahwa kitin telah terdegradasi oleh kitinase ekstraseluler yang dihasilkan oleh bakteri rizosfer. Hasil pengujian indeks kitinolitik yang tertinggi dimiliki oleh isolat bakteri C3D dengan nilai 1.43, sedangkan isolat bakteri C2B, C3C, C4A, C5C, dan S2D memiliki indeks kitinolitik berturut-turut sebesar 1.28, 1.29, 1.28, 1.23, dan 1.14 (data tidak ditampilkan). Indeks kitinolitik yang dihasilkan oleh setiap isolat mempunyai aktivitas kitinolitik yang berbeda-beda bergantung pada besarnya monomer N-asetil-D-glukosamin yang dihasilkan. Semakin besar monomer N-asetil-D-glukosamin yang dihasilkan maka zona bening yang terbentuk disekitar koloni akan semakin besar (Muharni & Widjajanti, 2011).

Aktivitas Enzim dan Pemurnian Parsial Kitinase

Seleksi enam bakteri yang memiliki aktivitas kitinase terbaik juga dilihat berdasarkan hasil pengukuran aktivitas spesifik enzim dari masing-masing ekstrak kasar dan hasil pemurnian parsialnya. Aktivitas spesifik enzim yang dihasilkan pada isolat S2D, C4A, C3D, C3C dan C2B berturut-turut sebesar 0.0426 U/mg, 0.0411 U/mg, 0.0392 U/mg, 0.0306 U/mg dan 0.0282 U/mg (data tidak ditampilkan). Isolat C5C hasil pemurnian NH_4SO_4 70% menunjukkan aktivitas spesifik kitinase paling tinggi (0.0489 U/mg) (Tabel 1). Aktivitas spesifik enzim kasar isolat C5C yang diperoleh pada penelitian ini sebesar 0.0035 U/mg, dan mengalami peningkatan setelah dilakukan tahap pemurnian parsial NH_4SO_4 menjadi 0.0489 U/mg. Hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa pemurnian parsial dapat meningkatkan kemurnian 13.97 kali dengan *yield* sebesar 46.38%. Penambahan NH_4SO_4 menyebabkan pengendapan protein dan mengurangi kelarutannya (Margino et al, 2012).

Tabel 1. Pemurnian kitinase asal isolat C5C

Fraksi	Volume enzim (mL)	Total aktivitas (U)	Total Protein (mg)	Aktivitas Spesifik (U/mg)	Yield (%)	Kemurnian (kali)
Ekstrak kasar	100	0.0800	23.6000	0.0035	100.00	1.00
NH ₄ SO ₄ 10%	3.3	0.0067	0.8199	0.0082	8.38	2.34
NH ₄ SO ₄ 30%	3.5	0.0183	0.8608	0.0213	22.88	6.08
NH ₄ SO ₄ 50%	3.5	0.0276	0.9132	0.0302	34.50	8.63
NH ₄ SO ₄ 70%	4	0.0371	0.7593	0.0489	46.38	13.97

Pengendapan enzim dengan NH₄SO₄ menunjukkan kecenderungan menaikkan total aktivitas kitinase dan aktivitas spesifik seiring meningkatnya konsentrasi NH₄SO₄. Hasil pengukuran aktivitas total kitinase dan aktivitas spesifik enzim pada pemurnian NH₄SO₄ 70% memiliki aktivitas enzim yang paling tinggi dibandingkan dengan ekstrak kasarnya. Hal ini mengindikasikan bahwa pemekatan NH₄SO₄ 70% memiliki kemampuan yang baik dalam mengendapkan protein dibandingkan dengan ekstrak kasar enzim dan fraksi lainnya (Tabel 1).

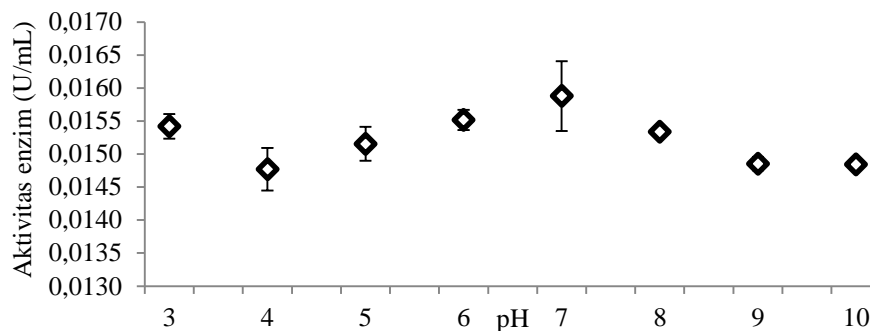
Persentase kejenuhan NH₄SO₄ untuk setiap kitinase dari berbagai isolat yang berbeda memiliki tingkat pengendapan yang berbeda-beda (Revathi, 2012). Pemurnian enzim asal bakteri 11UJ menggunakan garam NH₄SO₄ dan dialisis dilaporkan dapat meningkatkan faktor kemurnian enzim sebesar 2-6 kali dibanding ekstrak kasar enzimnya (Suryadi et al., 2013). Kitinase asal *Beauveria bassiana* hasil pemurnian NH₄SO₄ memiliki faktor kemurnian 1.2 kali (Suryadi et al., 2014). Pandya et al., 2014) menguji kitinase bakteri *B.subtilis* (MBCU4) dengan tahap pemurnian NH₄SO₄ 80% dan melaporkan faktor kemurnian 1.17 kali dengan yield 87.61%.

Aktivitas spesifik adalah suatu ukuran kemurnian enzim yang nilainya akan meningkat selama pemurnian suatu enzim, dan menjadi maksimum dan tetap jika enzim sudah berada pada keadaan murni (Biswanger, 2554). Nilai aktivitas spesifik kitinase asal isolat C5C lebih tinggi dibandingkan dengan kitinase asal isolat 11 UJ yang diisolasi dari tanah untuk tahapan dialisis sebesar 0.00105 U/mg

(Suryadi et al., 2013), tetapi lebih rendah dibandingkan dengan *Bacillus subtilis* MBCU4 (0.14 U/mg) pada presipitasi NH_4SO_4 80% (Pandya et al., 2014). Aktivitas spesifik semakin tinggi menunjukkan enzim yang diperoleh semakin murni. Penelitian ini menunjukkan bahwa isolat bakteri C5C adalah bakteri yang dapat memproduksi kitinase dengan baik. Pemurnian enzim dengan garam NH_4SO_4 70% dapat meningkatkan aktivitas spesifik dengan faktor pemurnian 13.97 kali dan *yield* 46.38%.

Karakterisasi Kitinase Isolat C5C dan Kinetika Enzim

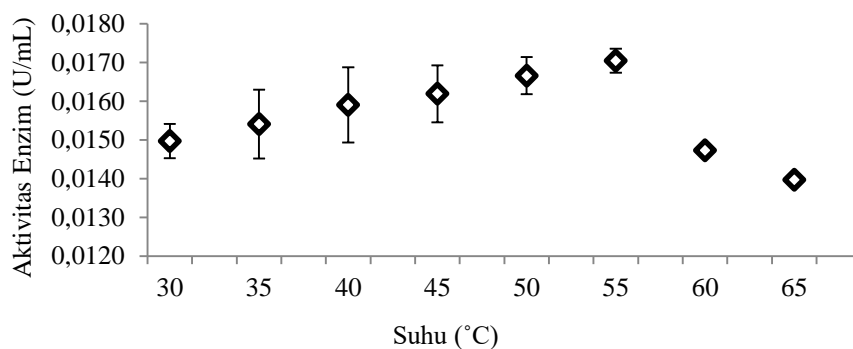
Kitinase asal isolat C5C aktif pada berbagai pH (3-10), tetapi aktivitas optimum terlihat pada pH netral (7) menggunakan bufer natrium fosfat dengan nilai aktivitas enzim yang diperoleh sebesar 0.0159 U/mL (Gambar 1).



Gambar 1. Pengaruh pH terhadap aktivitas kitinase pada bufer tri-natrium sitrat (pH 3-5), bufer natrium fosfat (pH 6-7), dan bufer glisin-NaOH (pH 8-10).

Aktivitas kitinase isolat C5C dalam rentang suhu 30 - 60°C aktif pada suhu optimum 55°C dengan nilai 0.0170 U/mL (Gambar 2). Aktivitas enzim yang telah mencapai keadaan optimum akan mengalami penurunan seiring bertambahnya suhu. Pengaruh suhu terhadap aktivitas kitinase diuji pada kondisi pH optimum (pH 7). Isolat C5C yang dianalisis aktivitas kitinasenya mempunyai aktivitas tertinggi sebesar 0.0159 U/mL pada pH 7. Hasil ini sama dengan yang dihasilkan isolat rizobakteri asal rizosfer cabai (Nurdebyandaru *et al.*, 2012) dan bakteri *B. thuringiensis* SAHA 12.08 (Asril et al., 2014) yang mempunyai aktivitas optimum pada pH 7. Penelitian sebelumnya juga melaporkan aktivitas optimum *S.malthophilia* pada pH 5.5 (Hamid *et al.*, 2016), Isolat *Enterobacter sp.*NRG4

optimum pada pH 5.5 dan *Sphingomonas* sp. CJ-5 optimum pada pH 7 (Herdyastuti et al, 2009). Terjadinya pH optimum menunjukkan adanya interaksi yang optimum antara enzim dengan substrat yang disebabkan adanya ionisasi asam-asam amino pada sisi aktif enzim. Enzim pendegradasi kitin yang baik optimum pada pH asam hingga netral. Kadar pH yang terlalu tinggi atau terlalu rendah akan menyebabkan ketidakstabilan pada konformasi enzim sehingga menyebabkan struktur enzim rusak. pH optimum aktivitas enzim tidak harus sama dengan pH lingkungan (Margino et al., 2012). Pengaruh pH pada aktivitas enzim tidak hanya tergantung pada satu sistem bufer, tetapi juga tergantung berbagai tipe buffer. Selain itu, produksi enzim dipengaruhi oleh derajat keasaman (pH) media, tetapi pH optimum enzim tidak perlu sama dengan pH lingkungan normalnya, dengan pH yang mungkin sedikit berbeda di atas atau dibawah pH optimum (Biswanger, 2004).



Gambar 2. Pengaruh suhu terhadap aktivitas enzim

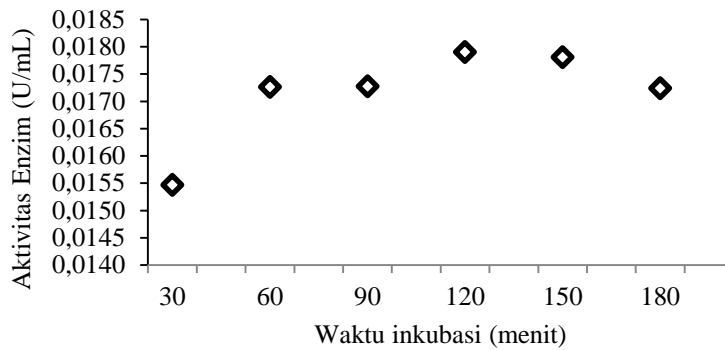
Enzim sangat sensitif terhadap perubahan suhu, dan suhu optimum untuk kitinase dari berbagai mikroba pada umumnya berada pada rentang suhu 40°C – 75°C (Haliza & Suhartono, 2012). Hasil penelitian menunjukkan bahwa aktivitas kitinase isolat C5C tertinggi berada pada suhu 55°C dengan nilai sebesar 0.0170 U/mL. Hasil penelitian ini sama dengan kitinase isolat rizobakteri dari rizosfer cabai 11.14 dan bakteri *Bacillus* sp.yang memiliki aktivitas optimum pada suhu 55°C (Nurdebyandaru et al., 2012). Hasil penelitian (Mahata et al., 2010) melaporkan suhu optimum kitinase dari isolat 99 adalah 50°C dan *Enterobacter*

sp. G-1 (40°C), sedangkan suhu optimum kitinase asal *B. cereus* pada suhu 35°C. (Revathi *et al.* 2012) menemukan kitinase dari genus *Vibrio* optimum pada suhu 45°C.

Kenaikan suhu akan meningkatkan energi molekul substrat dan pada akhirnya akan meningkatkan laju reaksi enzim. Suhu yang lebih tinggi dari suhu optimum akan menyebabkan enzim kehilangan aktivitas katalitiknya. Suhu optimum yang dicapai menunjukkan terjadinya reaksi antara enzim dan substrat sangat efektif, sehingga pembentukan ikatan kompleks enzim-substrat makin mudah dan produk yang terbentuk meningkat. Peningkatan suhu lebih lanjut menyebabkan aktivitas enzim mengalami penurunan. Hal ini disebabkan karena struktur enzim telah mengalami denaturasi akibat panas dan terjadi perubahan konformasi enzim, sehingga kinerja enzim dalam menghidrolisis substrat mengalami penurunan (Kosim & Putra, 2010).

Berdasarkan penelitian yang diperoleh menunjukkan bahwa bakteri mesofilik yang diisolasi pada suhu 37°C dapat menghasilkan enzim termostabil pada suhu 55°C. Hasil ini sama dengan bakteri *Bacillus* sp. yang diisolasi dari rizosfer cabai oleh (Nurdebyandaru *et al.*, 2012) dapat menghasilkan enzim termostabil pada suhu 55°C walaupun proses isolasi bakterinya pada suhu 37°C. Enzim termostabil adalah enzim yang suhu aktivitas maksimumnya di atas suhu pertumbuhan mikroorganisme penghasilnya. Bakteri yang dapat menghasilkan enzim termostabil menunjukkan bahwa enzim tersebut sedikit berbeda dalam urutan asam amino.

Aktivitas kitinase isolat C5C menunjukkan fase logaritmik (optimum) sampai dengan menit ke-120, dengan nilai aktivitas 0.0179 U/mL, selanjutnya mengalami penurunan aktivitas enzim sampai dengan akhir pengamatan (Gambar 3).



Gambar 3. Pengaruh waktu inkubasi terhadap aktivitas enzim

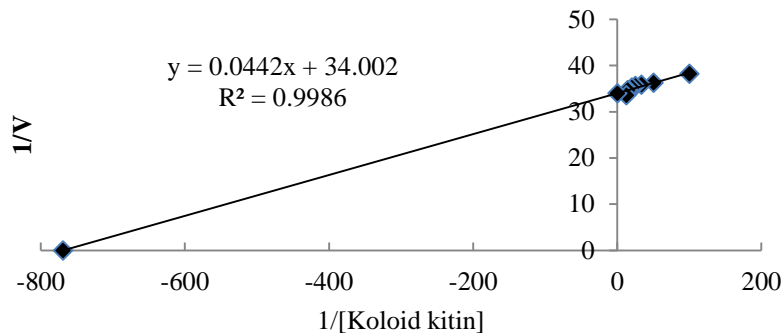
Waktu inkubasi merupakan waktu yang diperlukan oleh enzim untuk menghidrolisis substrat menjadi produk. Pengaruh waktu inkubasi terhadap aktivitas optimum enzim pada isolat C5C terjadi setelah waktu inkubasi 120 menit meskipun enzim sudah mulai aktif sejak waktu 30 menit, namun reaksi warna yang terbentuk masih pudar. Aktivitas enzim terus mengalami peningkatan dari sejak 30 menit hingga mencapai 120 menit, setelah itu mengalami penurunan. Hal ini menunjukkan semakin lama waktu inkubasi, maka laju peningkatan absorbansi akan semakin kecil dan terjadinya penurunan laju perubahan substrat sehingga produk yang dihasilkan menurun (Suhandana *et al.*, 2013).

Sifat katilitik enzim biasanya dianalisis dengan mengukur dan menganalisis laju reaksi. Analisis terhadap waktu inkubasi dapat memberikan informasi tambahan tentang sifat-sifat enzim. Penentuan waktu inkubasi menunjukkan bahwa konsentrasi substrat dan produk berubah secara substansial dan enzim mengalami kejenuhan ketika waktu inkubasi terlalu lama (Duggleby, 2001). Lama inkubasi bakteri isolat C5C lebih rendah dibandingkan dengan hasil penelitian (Asril *et al.*, 2014) (bakteri *B. thuringiensis* SAHA 12.08) dimana aktivitas kitinase optimal pada waktu inkubasi 180 menit, sedangkan hasil penelitian aktivitas enzim isolat *Beauveria bassiana* memiliki waktu inkubasi optimal 90 menit (Suryadi *et al.*, 2014).

Konsentrasi substrat koloidal kitin untuk pengukuran enzim murni berada pada kisaran antara 0.02 - 0.14%. Peningkatan konsentrasi substrat mempengaruhi kecepatan enzim dalam mengkatalisis reaksi. Persamaan Michaelis-Menten

merupakan hubungan antara konsentrasi substrat dengan kecepatan reaksi enzimatik. diperoleh dari reaksi enzim *irreversible*, yaitu substrat diubah menjadi produk, tetapi produk tidak dapat diubah menjadi substrat (Biswanger, 2008) Aktivitas kitinase meningkat secara linear terhadap konsentrasi substrat, namun kecepatan mengalami penurunan secara progresif setelah mencapai keadaan stabil. Konsentrasi substrat yang rendah menyebabkan reaksi rendah namun kecepatan reaksi akan berkurang, dan akan mencapai titik batas (enzim menjadi jenuh). Persamaan Michaelis-Menten adalah K_m yang bersifat khas bagi enzim tertentu, dengan substrat spesifik pada kondisi pH dan suhu tertentu. Namun persamaan ini sulit digunakan untuk menentukan V_{maks} dengan tepat, karena V_{maks} hanya diduga dan tidak pernah dapat diketahui nilai sebenarnya. Nilai K_m yang lebih tepat dapat diperoleh dengan memetakan data yang sama dengan cara yang berbeda yaitu dengan persamaan Lineweaver-Burk. Kecepatan maksimum (V_{maks}) merupakan suatu kondisi saat kecepatan tidak dapat bertambah lagi dengan bertambahnya konsentrasi substrat. Nilai K_m merupakan ukuran afinitas suatu enzim dalam menghidrolisis substrat yang menunjukkan indikator kekuatan kompleks enzim substrat.

Persamaan linier dari kurva Lineweaver-Burk yang diperoleh dari plot invers deret substrat koloid kitin [$1/S$] dengan invers kecepatan reaksi kitinase ($1/V$) adalah $y = 0.0442x + 34.002$ dan mempunyai nilai korelasi $r = 0.9986$. Berdasarkan persamaan tersebut, diperoleh nilai V_{maks} sebesar $0.0294 \text{ mgL}^{-1} \text{ detik}^{-1}$ dan K_m sebesar $1.300 \times 10^{-3} \text{ mg/L}$. Kemiringan yang dihasilkan dari perbandingan K_m/V_{maks} yaitu 0.0442 dengan intersep pada kurva (0, 34.002) dan (769.2986, 0) (Gambar 4).



Gambar 4. Kurva *double reciprocal* Lineweaver-Burk

Untuk mencapai setengah dari kecepatan maksimum dibutuhkan substrat dengan konsentrasi 1.300×10^{-3} mg/L. Nilai K_m lebih kecil dibandingkan dengan Nilai V_{maks} mengindikasikan bahwa afinitas enzim dengan substrat tinggi. Nilai K_m dari kitinase isolat C5C lebih kecil jika dibandingkan dengan nilai K_m enzim *Bacillus* sp. BPPT CC 2 sebesar 0.6959 mg/L (Sugiarto, 2013). Nilai K_m yang kecil menunjukkan bahwa afinitas substrat dengan enzim semakin tinggi dan produk yang dihasilkan semakin cepat.

Aktivitas Antifungi Isolat Kitinolitik C5C terhadap Jamur *Colletotrichum* sp.

Aktivitas antagonis isolat bakteri kitinolitik C5C terhadap *Colletotrichum* sp. menunjukkan bahwa isolat C5C mampu menghambat pertumbuhan *Colletotrichum* sp. secara *in vitro*. Mekanisme penghambatan dari uji antagonisme dapat diamati dengan melihat terhambatnya pertumbuhan jamur patogen di sekitar koloni bakteri kitinolitik. Daya hambat kitinase isolat C5C hasil pemurnian parsial enzim terhadap *Colletotrichum* sp. menghambat pertumbuhan *Colletotrichum* sp. sebesar 55.5% lebih baik dibandingkan dengan ekstrak kasarnya (49.8 %).

Produksi kitinase dapat dianggap sebagai kriteria untuk pemilihan agen pengendali hayati terhadap jamur patogen, karena pada umumnya dinding sel jamur penyebab antraknosa mengandung kitin. Aktivitas antijamur ditentukan dengan metode difusi agar karena metode ini dianggap praktis, cepat, mudah, dan cocok untuk seleksi secara cepat. Pertumbuhan jamur tanpa perlakuan rizobakteri (kontrol) tumbuh dengan baik pada media PDA. Berbeda dengan dua perlakuan

kitinase asal isolat C5C yang diuji mampu menghambat pertumbuhan jamur patogen secara *in vitro*. Hasil ini diduga disebabkan oleh adanya aktivitas kitinase isolat C5C yang menyebabkan pembengkakan miselium jamur, pembentukan vakuola dan degradasi dinding sel hifa serta pelepasan komponen intraseluler ke medium yang mengakibatkan terjadinya penghambatan pertumbuhan jamur *Colletotrichum* sp.

Perbedaan kemampuan penghambatan bakteri terhadap pertumbuhan jamur patogen kemungkinan disebabkan oleh perbedaan konsentrasi enzim hidrolitik dan metabolit sekunder yang dihasilkan oleh ekstrak kasar dan pemurnian parsial (Prapagdee *et al.*, 2008). Kemampuan bakteri dalam mensekresikan senyawa antijamur tergantung pada jenis tanaman dan sumber karbon yang ditambahkan ke dalam media berdasarkan produksi antibiotik optimal (Heng *et al.*, 2011).

Manfaat mikroba terutama bakteri sebagai agen pengendali hayati telah banyak dilakukan pada golongan bakteri *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Serratia*., dan isolat rizobakteri tersebut berpotensi dapat digunakan sebagai bakteri antagonis terhadap jamur *Colletotrichum* sp. serta memacu pertumbuhan bibit cabai (Sutariati *et al.* 2006). Bakteri kitinolitik lainnya yaitu *B. thuringiensis* SAHA 12.08 juga berpotensi sebagai agen hayati karena mampu menghambat pertumbuhan *C. affinis* dan *C. gloeosporioides* (Asril *et al.*, 2014), sedangkan *Streptomyces hygroscopicus* mampu menghambat pertumbuhan *C. gloeosporioides* (Prapagdee *et al.*, 2008).

Persentase penghambatan bakteri kitinolitik isolat C5C menunjukkan bahwa isolat ini juga efektif mencegah pertumbuhan lebih lanjut patogen jamur *Colletotrichum* sp. serta berpotensi dimanfaatkan sebagai agen pengendali hayati. Perlunya penambahan waktu inkubasi yang lebih lama (sekitar 60 menit) perlu dikaji untuk mendapatkan warna reaksi yang lebih baik sehingga aktivitas enzim lebih meningkat. Selain itu, perlu dilakukan pengujian secara *in vivo* untuk mengetahui keefektifan kitinase isolat C5C dalam menghambat pertumbuhan jamur *Colletotrichum* sp. penyebab penyakit antraknosa pada tanaman.

KESIMPULAN

Seleksi pemurnian parsial kitinase dari isolat bakteri tanah asal Cianjur diperoleh isolat C5C yang memiliki aktivitas kitinase tertinggi hasil pengendapan NH_4SO_4 70%. Karakterisasi terhadap isolat C5C menghasilkan aktivitas spesifik kitinase sebesar 0.0489 U/mg. Kitinase ini optimal pada suhu 55°C, pH 7 (bufer natrium fosfat) serta waktu inkubasi 120 menit, dengan nilai K_m sebesar 1.300×10^3 mg/L dan V_{maks} sebesar 0.0294 mg L⁻¹ detik⁻¹. Kitinase ini juga memiliki kemampuan antagonistik dalam menghambat pertumbuhan jamur patogen *Colletotrichum* sp. secara *in vitro*.

DAFTAR PUSTAKA

- Asril, M., Mubarik, N. R., & Wahyudi, A. T. (2014). Partial purification of bacterial chitinase as biocontrol of leaf blight disease on oil palm. *Res. J. of Microbiology*. <https://doi.org/10.3923/jm.2014.265.277>
- Biswanger. (2554). *Practical enzymology*. Weinheim Germany (Ed): Willey-VCH Verlag GmbH & Co.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 12: 248-254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Duggleby, R. G. (2001). Quantitative analysis of the time courses of enzyme-catalyzed reactions. *Methods*, 24(2), 168–174. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1177>
- Gohel, V., Singh, A., Vimal, M., & Ashwini, P. (2006). Bioprospecting and antifungal potential of chitinolytic microorganisms. *African Journal of Biotechnology*, 5(2), 54–72.
- Gomes, R. C., Sêmedo, L. T. A. S., & Soares, R. M. A. (2001). Purification of a thermostable endochitinase from *Streptomyces* RC1071 isolated from a cerrado soil and its antagonism against phytopathogenic fungi. *J. of Applied Microbiology*, 90(4), 653–661. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2001.01294.x>
- Haliza, W., & Suhartono, M. T. (2012). Karakteristik kitinase dari mikrobial. *Buletin Teknologi Pascapanenan Pertanian*, 8(1), 1–14.

- Hamid, R., Ahmad, M., Ahmad, M. M., Abdin, Z., & Javed, S. (2016). Purification and characterization of thermostable chitinase from a novel *S. maltophilia* strain. *Malaysian Journal of Microbiology*, (May 2014). <https://doi.org/10.21161/mjm.44612>
- Heng JLS, Umi KS, & Halizah H. (2011). Isolation, characterization and identification of potential actinobacteria with antifungal activities towards chilli anthracnose. *African Journal of Biotechnology*, 10(32), 5979–5987.
- Herdyastuti, Nuniek, T. J. R., & Matsjeh, M.S. (2009). Kitinase dan mikroorganisme kitinolitik: Isolasi, karakterisasi dan manfaatnya. *Indonesian Journal Chemistry*, 9(1), 37–47.
- Iqbal, A., & Hasnain, S. (2013). Auxin producing pseudomonas strains: biological candidates to modulate the growth of *Triticum aestivum* benevicially. *American Journal of Plant Sciences*, 04(09), 1693–1700. <https://doi.org/10.4236/ajps.2013.49206>.
- Kosim, M., & Putra, R. S. (2010). Pengaruh suhu pada protease dari *Bacillus subtilis*. *Prosiding Skripsi Semester Genap*. Retrieved from <http://digilib.its.ac.id/public/ITS-Undergraduate-12616-Paper.pdf>
- Kumar. (2007). *Biochemical Characterization Of An Aspartic Protease Inhibitor From Bacillus Licheniformis: Interactions With Hydrolytic Enzymes*. Thesis, Pune India.
- Kuzu, S. B., Güvenmez, H. K., & Denizci, A. A. (2012). Production of a Thermostable and Alkaline Chitinase by *Bacillus thuringiensis* subsp. kurstaki Strain HBK-51. *Biotechnology Research International*, 2012, 1–6. <https://doi.org/10.1155/2012/135498>
- Leksono KD, Nasahi C, & Susniahti N. 2010. Inventarisasi penyakit pada tanaman Jarak Pagar (*Jatpropha curcas* L.) pada tiga daerah di Jawa Barat. *J Agrikultura*. 21(1):31-38.
- Mahata E, Dharma MA., Ryanto, I., & Rizal, Y. (2010). Characterization of Extracellular chitinase from bacterial isolate 99 and *Enterobacter* sp. G-1 from Matsue City, Japan. *J. Microbiology Indonesia*, 2(1), 34–38. <https://doi.org/10.5454/mi.2.1.7>
- Margino, S., Behar C, & Asmara W. (2012). Isolation and purification of chitinase *Bacillus* sp. D2 isolated from potato rhizosfer. *Indonesian J Biotech*. 17(1):69-78.
- Mosttafiz S, Rahman M, Rahman M. 2012. Biotechnology: Rule of microbes in sustainable agriculture and environmental health. *Internat. J. Microbiol*. 10(1):1-5.

- Muharni, & Widjajanti, H. (2011). Skrining bakteri kitinolitik antagonis terhadap pertumbuhan jamur akar putih (*Rigidoporus lignosus*) dari rizosfir tanaman karet. *Jurnal Penelitian Sains*, 14(1): 51–56.
- Nurdebyandaru, N., Rachmania Mubarik, N., & Sri Prawasti, T. (2012). Chitinolytic bacteria isolated from chili rhizosphere: chitinase characterization and application as biocontrol for *Aphis gossypii*. *J. Microbiology Indonesia*, 4(3), 103–107. <https://doi.org/10.5454/mi.4.3.1>
- Pandya, U., Sudhir, A., Gohel, H., Subramanian, R. B., & Saraf, M. (2014). Zymographic identification and biochemical characterization of chitinase against phytofungus pathogens. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 4(1), 44–47. <https://doi.org/10.15414/jmbfs.2014.4.1.44-47>
- Prapagdee, B., Kuekulvong, C., & Mongkolsuk, S. (2008). Antifungal potential of extracellular metabolites produced by *Streptomyces hygroscopicus* against phytopathogenic fungi. *International Journal of Biological Sciences*, 4(5), 330–337. <https://doi.org/10.7150/ijbs.4.330>.
- Rabeeth, M., Anitha, A., & Srikanth, G. (2011). Purification of an antifungal endochitinase from a potential biocontrol agent *Streptomyces griseus*. *Pakistan Journal of Biological Sciences*. <https://doi.org/10.3923/pjbs.2011.788.797>
- Revathi, M. (2012). Production and characterization of chitinase from *Vibrio* species, a head waste of shrimp *Metapenaeus dobsonii* (Miers, 1878) and chitin of *Sepiella inermis* Orbigny, 1848. *Advances in Bioscience and Biotechnology*, 03(04), 392–397. <https://doi.org/10.4236/abb.2012.34056>
- Sriyanti, N. L. G., Suprpta, D. N., & Suada, I. K. (2015). Uji keefektifan rizobakteri dalam menghambat pertumbuhan jamur *Colletotrichum* spp. penyebab Antraknosa pada cabai merah (*Capsicum annum* L.). *E-Jurnal Agroekoteknologi Tropika*, 4(1), 53–65.
- Sugiarto OK. 2013. *Isolasi, pemurnian parsial, dan karakterisasi enzim kitinase dari Bacillus sp. Bppt cc 2* [skripsi]. Bogor(ID): Institut Pertanian Bogor.
- Suhandana, M., Nurhayati, T., & Ambarsari, L. (2013). Karakterisasi ekstrak kasar enzim polyphenoloxidase dari udang windu (*Penaeus monodon*). *Jurnal Ilmu Dan Teknologi Kelautan Tropis*, 5(2), 353–364.
- Suryadi, Y., Priyatno, T. P., Samudra, I. M., Susilowati, D. N., Lawati, N., & Kustaman, E. (2014). Pemurnian parsial dan karakterisasi kitinase asal jamur entomopatogen *Beauveria bassiana* isolat BB200109. *Jurnal AgroBiogen*, 9(2), 77. <https://doi.org/10.21082/jbio.v9n2.2013.p77-84>

Suryadi, Y., Priyatno, T. P., Susilowati, D. N., Samudra, I. M., Yudhistira, N., & Purwakusumah, E. D. (2013). Isolasi dan karakterisasi kitinase asal *Bacillus cereus* 11 UJ. *Jurnal Biologi Indonesia*, 9(1), 51–62.

Sutariati, & Ilyas, S. (2006). Karakter fisiologis dan keefektifan isolat rizobakteri sebagai agens antagonis *Colletotrichum capsici* dan rizobakteri pemacu pertumbuhan tanaman cabai. *Jurnal Ilmiah Pertanian Kultura*. 41(1):28-34.