

BAB I PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

Bakteri sebagai agen biokontrol dapat menghasilkan enzim hidrolitik yang berfungsi sebagai penghambat tumbuhnya jamur patogen tanaman melalui mekanisme antibiosis. Adapun beberapa enzim hidrolitik tersebut adalah protease, selulase, kitinase, dan glukanase (Ann, 2012). Protease merupakan salah satu enzim hidrolitik yang efektif untuk digunakan sebagai biofungisida untuk pengendalian penyakit tanaman. Enzim protease berfungsi untuk mendegradasi membran sel atau plasmalemma pada jamur yang tersusun atas molekul protein (Durán dan Nombela, 2004). Protease terbagi atas dua macam, yaitu eksoprotease dan endoprotease tergantung pada mekanisme katalisisnya. Endoprotease terbagi menjadi *aspartic protease*, *cysteine protease*, *metalloprotease*, *serine protease*, dan *threonine protease* (Barrett, 2001).

Metalloprotease adalah protease yang mengandung satu atau dua ion metal pada sisi aktifnya. Sebagian besar *metalloprotease* mengandung Zn^{2+} , sementara beberapa *metalloprotease* mengandung Mg^{2+} , Ni^{2+} , atau Cu^{2+} . Adapun peran dari ion metal pada *metalloprotease* adalah untuk mengaktifkan molekul air, yang berperan sebagai nukleofil dalam proses katalisisnya (Rawlings dan Barrett, 2004). *Metalloprotease* ditemukan pada beberapa bakteri yang berperan sebagai agen biokontrol, sebuah protein insektisida baru (Pr596) yang diproduksi oleh bakteri *Serratia marcescens* HR_3 diketahui sebagai *metalloprotease* yang bersifat insektisida terhadap belalang (Tao *et al.*, 2007). Selain itu, bakteri *Xenorhabdus indica* juga memproduksi *metalloprotease* ekstraseluler yang mampu mengendalikan hama *Helicoverpa armigera* yang menyerang tanaman kapas. Enzim ini diketahui mampu membunuh serangga *H. armigera* hingga 67,9 % selama tujuh hari. Maka dapat dikatakan bahwa jenis protease tersebut memiliki potensi yang besar untuk digunakan sebagai insektisida alami (Pranaw *et al.*, 2013). Potensi *metalloprotease* sebagai biofungisida masih sangat sedikit pengujiannya, oleh karena itu topik tersebut menjadi sangat menarik untuk dipelajari.

Menurut Pal dan Gardener (2006), penyakit tanaman perlu dikontrol untuk mempertahankan kualitas dan kelimpahan makanan, pakan dan serat yang diproduksi oleh petani di seluruh dunia. Pendekatan yang berbeda dapat digunakan untuk mencegah, mengurangi atau mengendalikan penyakit tanaman. Petani sangat bergantung pada pupuk dan pestisida kimia, namun akibat penggunaan yang berlebihan menyebabkan pencemaran lingkungan. Beberapa peneliti pengelolaan hama memfokuskan upaya mereka pada pengembangan input alternatif kimia sintesis. Alternatif-alternatif tersebut memiliki kontrol biologis yang tersedia untuk digunakan, tetapi pengembangan lebih dan adopsi yang efektif akan membutuhkan pemahaman yang lebih besar tentang interaksi kompleks di antara tumbuhan, manusia dan lingkungan.

Berdasarkan hasil penelitian Aisyah *et al.* (2017), isolat bakteri filoplan UBCF_13 yang teridentifikasi sebagai *Serratia plymuthica* menunjukkan aktivitas penekanan jamur yang tinggi terhadap *Colletotrichum gloeosporioides* dibandingkan dengan *Fusarium oxysporum* dan *Sclerotium rolfsii*. Spesies *Serratia plymuthica* adalah bakteri yang dapat ditemukan di berbagai tipe habitat, baik sebagai organisme yang hidup bebas maupun endofitik. Beberapa strain spesifik dari *S. plymuthica* menghasilkan senyawa antimikroba dan memiliki potensi yang besar sebagai biokontrol yang efektif terhadap berbagai macam penyakit tanaman (De Vleeschauwer dan Höfte, 2003).

Efektivitas antijamur dari senyawa ekstraseluler bakteri *S. plymuthica* UBCF_13/-R_36 diuji dengan penambahan lima jenis ion logam (Mg^{2+} , Mn^{2+} , Fe^{2+} , Ca^{2+} dan Zn^{2+}) dengan konsentrasi 1 mM. Hasil dari pengujian aktivitas antijamur dari bakteri *Serratia plymuthica* UBCF_13/-R_36 dengan menggunakan ion logam terhadap tiga spesies jamur patogen yang telah dilakukan oleh Suryati (2018) memperlihatkan pengaruh yang berbeda. Pertumbuhan dari tiga spesies jamur tersebut dapat dihambat dengan penambahan ion logam, di antaranya *Colletotrichum gloeosporioides* (Mn^{2+}), *Sclerotium rolfsii* (Fe^{2+}), dan *Fusarium oxysporum* (Ca^{2+}).

Rahmi (2018) berhasil mengisolasi gen *metalloprotease* dari bakteri *Serratia plymuthica* UBCF_13/-R_36 dengan panjang nukleotida 1.059 bp. Selain itu, gen *metalloprotease* dari bakteri *Serratia plymuthica* UBCF_13/-R_36

tersebut berhasil ditransformasi ke dalam bakteri *E. coli* DH5 α dengan menggunakan plasmid *pGEM T-easy* dan panjang nukleotida yang diperoleh sesuai dengan estimasi yaitu 1.200 bp. Sekuens gen *metalloprotease* dari penelitian ini memiliki persentase kemiripan yang tinggi dengan *metalloprotease* dari spesies *S. plymuthica*. Persentase tertinggi adalah dengan *Serratia plymuthica* strain 3Re4-18 sebesar 94,33 %. Hasil ini menunjukkan bahwa gen yang berhasil dikloning dalam penelitian tersebut adalah gen *metalloprotease*.

Tahapan selanjutnya setelah gen target dikloning adalah pengujian ekspresi gen tersebut. Pengujian ini berfungsi untuk mensintesis protein yang dihasilkan dari gen target, sehingga protein tersebut dapat digunakan untuk pengujian selanjutnya seperti identifikasi dan aktivitas protein. Uraian diatas melatarbelakangi penelitian yang berjudul **“Induksi Ekspresi Gen *Metalloprotease* Bakteri *Serratia plymuthica* UBCF_13/-R_36 Menggunakan Berbagai Jenis Ion Logam”**.

B. Tujuan

Adapun tujuan dilakukannya penelitian ini adalah untuk mendapatkan jenis ion logam yang tepat untuk menginduksi ekspresi gen *metalloprotease* bakteri *Serratia plymuthica* UBCF_13/-R_36 secara optimal.

C. Manfaat

Adapun manfaat penelitian ini dari aspek keilmuan adalah dapat dijadikan sebagai sumber literatur bagi pemanfaatan studi genomik terutama induksi ekspresi gen. Sedangkan manfaat dari aspek aplikasinya adalah diharapkan hasil dari penelitian ini dapat dijadikan sebagai bahan dasar untuk melanjutkan pengujian aktivitas antijamur dari *metalloprotease* sehingga nantinya dapat dikembangkan sebagai biofungisida.

BAB II TINJAUAN PUSTAKA

A. Aktivitas *Metalloprotease* pada Bakteri *Serratia*

Genus *Serratia* termasuk dalam famili *Enterobacteriaceae* dan kelas *Gammaproteobacteria*, bakteri tersebut tersebar luas di alam dan umumnya ditemukan di tanah, air, tanaman, serangga, dan manusia. *Serratia marcescens* memproduksi berbagai enzim ekstraseluler, yaitu *chitosanase*, *nuclease*, *lipase*, *hemolysin*, *serine*, *thiol proteases*, dan *metalloproteinase*. Gen protease dari *S. marcescens* MH6 telah dikloning menggunakan analisis dari sekuen fragmen yang dimilikinya. Analisis BLAST terhadap gen protease tersebut mengungkapkan bahwa sekuen asam aminonya serupa dengan *zinc metalloproteinase* dari *S. marcescens* dengan perbedaan hanya di empat asam amino (Wan *et al.*, 2010).

Menurut Stancu (2016), sel *S. marcescens* IBBPo15 menghasilkan protein dengan berat molekul ± 50 kDa yang diprediksi sebagai *metalloprotease* ekstraseluler dimana produksinya dipengaruhi oleh paparan pelarut organik dalam sel. *Metalloprotease* ekstraseluler ini diketahui berada dalam superfamili *serralysin* yang juga diketahui sebagai *serratiopeptidase*, *serratia peptidase*, *serralysin*, dan *metalloproteinase*. Jenis *metalloprotease* ini berperan dalam penyerapan nutrisi, namun enzim tersebut juga terlibat dalam patogenesis *S. marcescens* (Kim *et al.*, 2007; Wan *et al.*, 2010).

Dalam studi lainnya, bakteri *S. marcescens* RSPB11 menghasilkan protein fibrinolitik dan fibrinogenolitik yang juga masih tergolong sebagai bagian dari famili *metalloprotease* dan kategori *serralysin*. Pemurnian dan karakterisasi terhadap senyawa protease ini memperlihatkan beberapa karakteristik yang penting bagi aplikasi di tingkat industri, seperti sifat alkalin dan termotabil. Ion metal seperti Ca^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , K^+ , Mg^{2+} , Na^+ , dan Zn^{2+} pada reaksi *serralysin* memperlihatkan pengaruh yang positif terhadap aktivitas katalitik dari enzim tersebut (Bhargavi dan Prakasham, 2013).

Jenis senyawa *metalloprotease* lain, yakni *arazyme* juga dihasilkan oleh genus *Serratia*, tepatnya spesies *Serratia proteamaculans* yang bersimbiosis dengan laba-laba *Nephila clavata* (Lee *et al.*, 2004). Berdasarkan hasil uji aktivitasnya, enzim ini memiliki keterkaitan yang dekat dengan *serralysin*

(Baumann, 2004). Sejumlah spesies bakteri telah banyak dilaporkan sebagai penghasil *serralysin* dan *metallopeptidase* diantaranya *Serratia*, *Pseudomonas* dan *Erwinia*. Fungsi senyawa *metalloprotease* ini bagi *Serratia* atau *Pseudomonas* dianggap sebagai salah satu faktor virulensi yang dihasilkan selama infeksi pada organisme inang, meskipun efeknya tidak terlalu penting jika dibandingkan jenis senyawa virulensi yang lainnya. Sementara itu, fungsi fisiologis *serralysin* masih belum diketahui secara jelas, tetapi enzim tersebut diduga berperan dalam proses penyerapan nutrisi oleh bakteri (Supuran *et al.*, 2002).

Demidyuk *et al.* (2006) melaporkan jenis *metalloproteinase* lain yang dihasilkan oleh *Serratia proteamaculans* strain 94 yang dinamakan dengan *protealysin*. Protein ini dikode oleh 341 asam amino dan terbukti memiliki homologi yang cukup tinggi dengan *thermolysin-like proteinases* (TLPs). *Protealysin* memiliki struktur dan karakteristik yang menyerupai anggota famili protein peptidase M4. Famili peptidase M4 ini dihasilkan oleh sekitar 70 spesies bakteri dari filum *Firmicutes*, *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Cyanobacteria*, dan *Bacteroidetes*. Selain itu, TLPs yang juga bagian dari famili peptidase M4 ini juga dihasilkan oleh jamur dan spesies *Methanosarcina acetivorans* (Rawlings *et al.*, 2004). Pada penelitian sebelumnya, Jackson *et al.* (2001) melaporkan kemampuan *S. proteamaculans* sebagai biokontrol bagi serangga hama *Costelytra zealandica*.

B. Modifikasi Genetik terhadap Aktivitas Antijamur pada Bakteri

Bakteri *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 dilaporkan oleh Koumoutsi *et al.* (2004) dapat menghasilkan tiga famili lipopeptida, yaitu *surfactins*, *bacillomycins D*, dan *fengycins* yang diketahui sebagai metabolit sekunder dengan aktivitas utamanya sebagai antijamur. Analisis MALDI-TOF MS dengan menggunakan ekstrak filtrat kultur dan seluruh sel organisme digunakan untuk mengkarakterisasi secara fungsional kluster gen yang terlibat dalam sintesis lipopeptida yang diproduksi oleh bakteri *B. amyloliquefaciens* FZB42. Spektrum dari kedua metode tersebut bersifat identik dan ditemukan 3 kelompok puncak, yang diidentifikasi sebagai jenis lipopeptida yaitu *surfactins*, *fengycins*, dan *bacillomycins D*. Bakteri *B. amyloliquefaciens* FZB42 mampu menghambat pertumbuhan jamur fitopatogen seperti *Fusarium oxysporum*. Salah satu

lipopetida yang efektif sebagai antijamur dari bakteri *B. amyloliquefaciens* FZB42 yang dapat menekan pertumbuhan jamur seperti *Fusarium oxysporum* adalah *bacillomycins D*.

Selain itu, tiga kluster gen besar yang memiliki gen-gen yang homologi dengan gen *polyketide synthase* (PKS) dari bakteri *B. amyloliquefaciens* telah diidentifikasi namun belum diketahui perannya secara fungsional. Data sekuens DNA dari bakteri *B. amyloliquefaciens* strain FZB42 menunjukkan bahwa strain tersebut memiliki proses biosintetik untuk memproduksi setidaknya tiga jenis poliketida yang berbeda, yaitu *pks1*, *pks2*, dan *pks3*. Pembentukan poliketida oleh strain FZB42 diidentifikasi dengan metode MALDI-TOF MS dan HPLC-ESI MS, yang memberikan hasil yang bersifat komplementer. Data MS yang diperoleh dari metode MALDI-TOF MS dan HPLC-ESI MS dan *bioautographs* yang dilakukan dengan menggunakan filtrat kultur dari FZB42 tipe liar menunjukkan bahwa *difficidin* atau *oxydifficidin* mewakili senyawa antibakteri dari strain ini. Chen *et al.* (2006) menyatakan bahwa kapasitas biosintetik dari strain FZB42 untuk memproduksi poliketida dan lipopeptida yang bekerja secara antagonis memungkinkan FZB42 untuk mengatasi bakteri fitopatogenik dan jamur di dalam lingkungan alaminya.

Serratia liquefaciens MG1 berada dibawah kontrol transkripsi *N-butyryl-L-homoserine lactone* (C4-HSL) yang menyebabkan produksi aktivitas protease ekstraseluler secara tidak langsung dibawah kendali *quorum sensing* (Huber *et al.*, 2001). Penelitian selanjutnya oleh Christensen *et al.* (2003) telah menganalisis regulasi *quorum sensing* ekspresi protein pada bakteri *S. proteamaculans* dan membuktikan bahwa aktivitas beberapa *exoenzymes* dipengaruhi oleh *3-oxo-C6-HSL*. Selain itu, aktivitas fenotipe yang berhubungan dengan kualitas makanan (ekspresi lipase dan protease) juga dipengaruhi oleh *3-oxo-C6-HSL*, sehingga dapat disimpulkan bahwa *quorum sensing* terlibat dalam pengendalian proses pembusukan makanan. Uji enzimatik secara kuantitatif dilakukan dengan metode *zymogram* untuk menguji aktivitas kitinolitik, hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa aktivitas kitinolitik yang sama dari mutan *sprI* (AC1) dan mutan ganda *sprI lipB* (AC2), hal ini mengindikasikan bahwa kitinase tidak diproduksi dari transporter *lipB*. Oleh karena itu, hasil pengamatan yang menunjukkan bahwa

aktivitas kitinolitik diinduksi dua kali lipat pada penambahan *3-oxo-C6-HSL* menunjukkan bahwa sistem *quorum sensing* mengendalikan transkripsi gen kitinase secara langsung. Kitinase termasuk salah satu enzim yang berfungsi sebagai biokontrol untuk menghambat pertumbuhan dan perkembangan serangga tertentu, nematoda dan jamur.

Gen-gen homolog bakteri *Serratia plymuthica* strain IC1270 yang mengkodekan dua komponen sistem regulasi global, yaitu *GacA/GacS* dan faktor transkripsi 38 (*RpoS*) dikloning dan dikarakterisasi oleh Ovadis *et al.* (2004). Untuk mengidentifikasi fungsi spesifiknya, masing-masing gen *GrrA*, *GrrS*, dan *RpoS* dari strain IC1270 tidak diaktifkan dengan memasukkan vektor *suicide* ke dalam kromosom bakteri dengan rekombinasi homolog menggunakan strategi berbasis *sac-B*. Mutan *GrrA*, *GrrS*, dan *RpoS* dari strain IC1270 mengalami penurunan produksi senyawa antijamur seperti *pyrrolnitrin*, *exoprotease*, dan *endochitinase ChiA*. Selain itu, diketahui bahwa produksi sinyal *acyl-HSL quorum sensing* oleh strain IC1270 dipengaruhi oleh regulator *GrrA/GrrS* dan *RpoS*. *Pyrrolnitrin* strain IC1270 tampaknya menjadi senyawa antibiotik utama, oleh karena itu kurangnya produksi *pyrrolnitrin* pada mutan *GrrA*, *GrrS*, dan *RpoS* menimbulkan turunya penekanan terhadap pertumbuhan jamur *Pythium aphanidermatum*.

LuxRI-type quorum sensing (QS) adalah mekanisme yang digunakan oleh bakteri untuk meregulasi pembentukan senyawa antimikroba dengan memanfaatkan produksi sinyal *N-acyl homoserin lactone* (AHL). Penelitian yang dilakukan oleh Liu *et al.* (2007) menunjukkan bahwa *phenazine* bukan satu-satunya kelompok biokontrol yang produksinya diatur oleh sistem QS. *Serratia plymuthica* strain HRO-C48 diisolasi dari rizosfer tanaman rapa (*Brassica napus*) dan digambarkan sebagai bakteri kitinolitik, yang melindungi tanaman dari penyakit layu yang disebabkan oleh jamur *Verticillium* dan juga dapat memproduksi antibiotik *pyrrolnitrin* dalam skala besar dan beberapa AHLs, termasuk *N-butanoyl-HSL*, *N-hexanoyl-HSL*, dan *N-3-oxo-hexanoyl-HSL* (OHHL). Gen-gen *splI* dan *splR*, yang merupakan analog dari gen-gen *luxI* dan *luxR* dari bakteri gram negatif lainnya dikloning dan disekuensing. Mutan AHL-4 (*splI::miniTn5*) secara serempak menyebabkan penurunan pada produksi AHLs

dan *pyrrolnitrin*, maupun kemampuan untuk menekan pertumbuhan beberapa jamur patogen tanaman. Namun, produksi *pyrrolnitrin* dapat dipulihkan pada mutan ini dengan mengintroduksi klon gen *splIR* ke dalam plasmid atau dengan penambahan media tertentu yang sesuai untuk strain C48 atau OHHL untuk dijadikan sebagai media pertumbuhan.

Vimelysin adalah *metalloproteinase* unik dari *Vibrio sp.* T1800 yang menunjukkan aktivitas yang tinggi pada suhu rendah dan stabilitas tinggi dalam pelarut organik seperti etanol. ORF gen *vimelysin* dengan ukuran 1.821 bp mengkode 607 residu asam amino yang terdiri dari daerah ujung N, *mature enzyme*, dan daerah ujung C. Daerah *mature enzyme* menunjukkan 80, 57, dan 35 % identitas sekuens dengan *vibriolysin* dari bakteri *V. vulnificus*, *pseudolysin* bakteri *Pseudomonas aeruginosa*, dan *thermolysin* bakteri *Bacillus thermoproteolyticus*. Residu katalitik dan motif pengikatan *zinc metalloproteinase* terkonservasi dengan baik di *vimelysin*. Gen *vimelysin* diekspresikan ke dalam sel *E. coli* JM109 dan enzim rekombinannya dipurifikasi sebagai 38 kDa polipeptida dalam bentuk enzim matang. Enzim rekombinan yang dipurifikasi tidak dapat dibedakan dari enzim yang dipurifikasi langsung dari *Vibrio*. Untuk meningkatkan stabilitas *vimelysin* dalam pelarut organik, mutasi acak diintroduksi ke dalam gen *vimelysin* menggunakan metode *error-prone PCR*. Setelah perlakuan dengan 50 % etanol pada suhu 37 °C selama 3 jam, maka hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa mutan yang paling stabil dalam pelarut organik adalah mutan N123D, dengan aktivitas residu yang lebih tinggi (57 %) dibanding enzim tipe liar (22 %). Perbedaan sekuens nukleotida dari enzim mutan dan enzim tipe liar adalah Asn (AAT) pada posisi 123 dari daerah *mature enzyme* diganti dengan Asp (GAT). Penggantian Asn 123 oleh Asp dalam *vimelysin* diduga menyebabkan meningkatnya stabilitas enzim dalam pelarut organik. Selain itu, perubahan dalam ikatan hidrogen dan interaksi elektrostatik yang menyertai mutasi ini juga menjadi salah satu penyebab bagaimana mutasi ini dapat meningkatkan stabilitas enzim (Takahashi *et al.*, 2005).

Vibrio anguillarum memiliki dua sirkuit *N-acylhomoserine lactone* (AHL) *quorum sensing*, salah satunya terkait dengan sistem *luxMN* pada *Vibrio harveyi*. Croxatto *et al.* (2002) dalam penelitian ini telah mengkloning gen tambahan dari

sirkuit ini, yaitu VanT yang mengkode regulator transkripsi *LuxR* dari bakteri *V. harveyi*. Bakteri *V. anguillarum* tanpa mutasi VanT mengakibatkan penurunan signifikan dalam aktivitas protease, karena *EmpA metalloprotease* tidak berekspresi tetapi tidak ada perubahan baik dalam produksi AHL maupun virulensi. Pengujian ini dilakukan dengan menyatukan promotor *EmpA* ke dalam *E. coli* tanpa promotor gen *lacZ* untuk menghasilkan fusi transkripsi pada plasmid *Pdm8-EmpA*. Plasmid tersebut dikonjugasi ke dalam bakteri *V. anguillarum* tipe liar dan strain mutan *VanT* (AC10). Untuk menentukan fungsi gen *VanT*, dilakukan mutasi dengan menghapus seluruh gen *VanT* dan hanya menyisakan kodon asam amino pertama dan terakhir. Pada mutan *VanT*, promotor *EmpA* hampir tidak aktif dibandingkan dengan tipe liar, hal ini menunjukkan bahwa gen *VanT* sangat penting untuk ekspresi *EmpA*.

C. Pengaruh Ion Logam terhadap Aktivitas Enzim yang Bersifat Antijamur

Keberadaan unsur logam berat berperan sebagai nutrisi non-esensial (mikronutrien) dimana sebagian besar organisme hanya membutuhkan ketersediaan unsur ini dalam jumlah yang relatif sedikit. Meski dibutuhkan hanya dalam jumlah yang kecil, peranan unsur ini dapat mempengaruhi fungsi seluler tertentu secara spesifik dan tidak dapat digantikan oleh unsur organik lainnya (Lemire *et al.*, 2013). Keberadaan unsur ini dalam jumlah yang melebihi kebutuhan sel akan menimbulkan efek racun bagi sel itu sendiri (Bruins *et al.*, 2000; Baek dan An, 2011; Baldrian, 2003). Unsur logam diketahui berperan dalam berbagai proses seluler, salah satunya biosintesis dan regulasi aktivitas enzim (Bruins *et al.*, 2000). Salah satu kelompok enzim yang dikenal memiliki ketergantungan yang tinggi terhadap unsur logam adalah protease, terutama *metalloprotease* (Miyoshi dan Shinoda, 2000).

Penambahan 1 mM berbagai jenis ion logam (Ni^{2+} , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} , dan Ba^{2+}) dilaporkan mampu merangsang aktivitas protease dari bakteri *S. marcescens* strain MH6. Bahkan penambahan logam nikel berhasil meningkatkan aktivitas enzimatisnya hingga 16 %. Hasil ini menunjukkan bahwa protease strain bakteri ini tergolong kepada famili *metalloproteinase*. Penambahan ion logam seperti Ni^{2+} , Mg^{2+} , dan Ca^{2+} memperlihatkan efek aktivator yang cukup baik

terhadap aktivitas proteasenya, namun pemberian ion logam Zn^{2+} 1 mM dan 5 mM justru secara signifikan menghambat aktivitas enzim tersebut (Wan *et al.*, 2010). Sebaliknya, aktivitas protease dari *S. marcescens* strain ATCC 25419 meningkat 8 kali lipat dengan adanya Zn^{2+} (Romero *et al.*, 2001). Kondisi ini diduga terjadi karena adanya perbedaan sifat *metal-chelation* yang mungkin berhubungan dengan residu asam amino disekitar sisi aktif protease. Perbedaan tersebut dapat diakibatkan oleh tingkat homogenitas gen pengkode protease di masing-masing strain *S. marcescens* (Wan *et al.*, 2010).

Aktivitas *keratinolytic metalloproteinase* yang diisolasi dari bakteri *Microbacterium* sp. strain KR10 memperlihatkan peningkatan dengan penambahan ion logam Mg^{2+} , sedangkan penambahan ion logam seperti Hg^{2+} , Cu^{2+} , dan Sn^{2+} menghambat aktivitas dari enzim tersebut (Thys dan Brandelli, 2006). Aktivitas enzim *metalloproteinase* lainnya diuji oleh Kuddus dan Ramteke (2008), *metalloproteinase* ekstraseluler yang diisolasi dari bakteri *Curtobacterium luteum* MTCC 7529 memperlihatkan aktivitas enzim yang meningkat dengan penambahan ion logam Mn^{2+} , sementara itu ion logam lain yang telah diujikan terhadap enzim tersebut seperti Ca^{2+} , K^+ , Ba^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} , Cd^{2+} , Hg^{2+} , dan Mg^{2+} menghambat aktivitas dari enzim *metalloproteinase*.

Thakur *et al.* (2016) melaporkan bahwa aktivitas protease bakteri *S. marcescens* PBB-26 meningkat saat diproduksi di media dengan penambahan 1 mM $CaCl_2$, namun justru terhambat pada media yang mengandung $MnCl_2$ dan $MnSO_4$. Aktivitas enzim hidrolitik lainnya, yakni kitinase juga dipengaruhi oleh keberadaan ion logam tertentu. Aktivitas kitinase bakteri *Streptomyces* sp. DA11 dapat ditingkatkan dengan penambahan ion logam Mn^{2+} , Mg^{2+} , dan Cu^{2+} (Han *et al.*, 2009). Sejalan dengan studi ini, aktivitas kitinase dari bakteri *Bacillus* sp. DAU101 juga meningkat pasca penambahan ion logam Mg^{2+} dan Co^{2+} (Lee *et al.*, 2007).

Aktivitas kitinase dua spesies *Bacillus*, yakni *B. thuringiensis* NM101-19 dan *B. licheniformis* NM120-17 meningkat pasca penambahan ion logam Na^{2+} , Mg^{2+} , Cu^{2+} , dan Ca^{2+} (Gomaa, 2012). Berbagai penelitian terhadap efek ion logam pada kitinase dari bakteri *Bacillus* memperlihatkan beragam hasil. Pada penelitian Dai *et al.* (2011), aktivitas kitinase ekstraseluler dari bakteri termofilik *Bacillus*

sp. Hu1 ditemukan dapat meningkat dengan penambahan 4,0 mM ion logam Mg^{2+} , Ca^{2+} , dan Zn^{2+} , dimana aktivitas relatifnya masing-masing adalah 111,5, 126, dan 125,2 %.

Bakteri *Micrococcus* sp. AG84 yang diisolasi dari laut, dapat memproduksi enzim kitinase. Annamalai *et al.* (2010) melakukan pengujian untuk melihat aktivitas kitinase setelah diberikan penambahan ion logam. Berdasarkan pengujian yang telah dilakukan, penambahan logam-logam seperti Fe^{2+} , Ca^{2+} , Ni^{2+} , dan Mn^{2+} mampu meningkatkan aktivitas enzim kitinase, sedangkan sejumlah logam lainnya, seperti Co^{2+} , Cu^{2+} , dan Hg^{2+} justru menghambat aktivitas enzim kitinase *Micrococcus* sp. AG84.

