



KONVERSI KHITIN DARI KULIT KEPITING (*Scylla serrata*) MENJADI KHITOSAN DENGAN ENZIM KHITIN DEASETILASE

Hasnah Natsir, Alfian Noor, dan Novita Asfari

Jurusan Kimia FMIPA Universitas Hasanuddin Kampus Tamalanrea Makassar 90245

Telp/Faks. (0411) 586498 Email: kimiauh@indosat.net.id

ABSTRACT

Chitin from crab shell (*Scylla serrata*) can be converted into chitosan using the enzyme of chitin deacetylase isolated from thermophilic microbe. Conversion process initiated with microbe rejuvenation, grown in solid medium at temperature 55 °C and pH 7,0. Next optimum time determination producing the enzyme, fractionation of enzyme and producing the chitosan and finally analysed Infra Red spectrophotometry. Thermophilic microbe can yield the enzyme with optimum activity in three to four days and fractionated with the ammonium sulfate 40 % (w/v). Infra red spectrogram data, chitosan was obtained with the deacetylated degree between 66.53 – 78.9 %, water content 5.75 – 7.56 % and ash content between 33.26 – 34.25 %.

Keywords : Thermofilik microbe, crab shell, chitin and chitin deacetylase

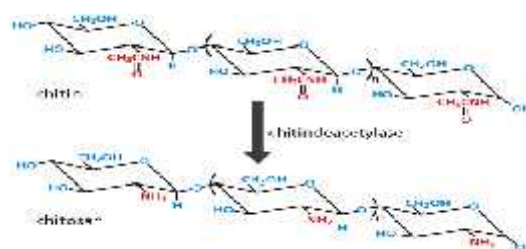
PENDAHULUAN

Latar Belakang

Khitin merupakan homopolimer dari N-asetil D-glukosamin yang tersusun oleh 2000 – 3000 satuan monomernya dengan ikatan 1,4-β glikosidik. Khitin di alam melimpah kedua setelah selulosa, terutama pada invertebrata laut yang berfungsi sebagai matriks penyusun eksoskeleton. Limbah khitin merupakan pemasok bahan mentah keperluan produksi khitosan. Khitosan adalah polisakarida yang diperoleh dengan deasetilasi khitin, yang prosesnya dapat dilakukan secara kimia maupun secara enzimatik. Cara enzimatik tersebut memberikan keuntungan diantaranya memberikan proses deasetilasi yang lebih merata dan dapat mengurangi sekecil mungkin pemutusan rantai polimer khitosan yang dihasilkan (Permadi, 1999).

Pemicu utama pengembangan aplikasi baru khitosan terletak pada kenyataan bahwa polisakarida ini tidak hanya tersebar di alam, tetapi juga nontoksik, biodegradabel dan memiliki banyak manfaat. Salah satu sifat yang paling bermanfaat dari khitosan adalah sebagai pengkhelet logam, penghambat sel tumor, sebagai anti jamur dan dapat mempercepat penyembuhan luka serta menstimulasi sistem imun (Dunn, 1992). Tantangan terbesar bagi Indonesia adalah bagaimana mengembangkan teknik pengelolaan sumber daya wilayah pesisir yang secara simultan merangsang pertumbuhan ekonomi, seraya melakukan upaya konservasi terhadap sumber daya lingkungan. Oleh sebab itu, pada penelitian ini dilakukan usaha pemanfaatan limbah kepiting menjadi suatu produk yang lebih berguna seperti khitosan

dengan menggunakan enzim khitin deasetilase. Enzim khitin deasetilase tersebut dapat mengkonversi khitin menjadi khitosan dengan melakukan proses deasetilasi khitin seperti terlihat pada Gambar 1 berikut.



Gambar 1
Proses Deasetilasi Khitin Menjadi Khitosan
dengan Khitin Deasetilase

Penelitian ini bertujuan untuk mengkonversi khitin dari kulit kepiting (*Scylla serrata*) menjadi khitosan menggunakan enzim khitin deasetilase, dan untuk mengetahui beberapa sifat fisika-kimia dari khitosan.

METODE PENELITIAN

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah : Serbuk khitin dari kulit kepiting, mikroba termofilik (55 °C) yaitu isolat M-1, HCl pekat, HCl 0,5 %, bacto agar, yeast ekstrak, NaCl, (NH₄)₂SO₄, K₂HPO₄, MgSO₄.7H₂O, CaCl₂, buffer sitrat-fosfat pH 7, glikol khitosan, glukosamin, NaOH, asam asetat 33 %, metanol, asetat anhidrat, sodium azide,

sodium nitrit 5 %, amonium sulfamat 12,5 %, larutan indole 1 % dalam etanol 95 %, larutan Biuret, Bovine Serum Albumin (BSA).

Konversi khitin dari cangkang kepiting (*Scylla serrata*) menjadi khitosan menggunakan enzim khitin deasetilase melalui beberapa tahapan. Koleksi mikroba penghasil enzim kitinolitik diremajakan pada medium padat dengan komposisi: Bakto agar 1,5 %, Yeast ekstrak 0,05 %, NaCl 0,1 %, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,7 %, K_2HPO_4 0,1 %, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,01 %, CaCl_2 0,025 %, koloidal khitin 2,0 %. Inkubasi dilakukan pada suhu 55 °C selama 4–5 hari, kemudian mikroba tersebut ditumbuhkan dalam medium cair pada kondisi 55 °C, 170 rpm selama enam hari dengan komposisi medium adalah : Yeast ekstrak 0,05 %, NaCl 0,1%, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,7 %, K_2HPO_4 0,1 %, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,01 %, CaCl_2 0,025 % dan koloidal khitin 0,5 %. Kemudian dilakukan fermentasi dan sampling setiap 12 jam. Sampel yang diambil diukur OD-nya pada λ 660 nm dan pengujian aktivitas enzim khitin deasetilase serta analisis kadar protein dengan metode Biuret yang diukur pada daerah λ maksimum 544 nm.

Pengujian Aktifitas enzim khitin deasetilase (Tokuyashu, et al 1996)

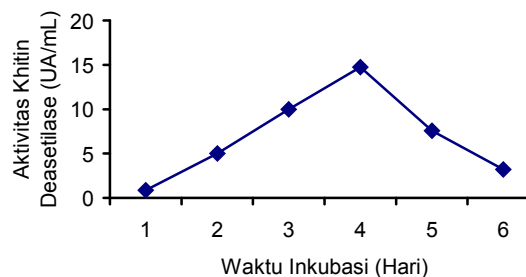
Glikol khitin sebanyak 0,1 mL; bufer sitrat-fosfat 0,3 mL pH 7 dan 0,1 mL larutan enzim dicampur dengan vortex. Larutan campuran tersebut diinkubasi pada suhu 55 °C, 170 rpm selama 20 menit. Kemudian ditambahkan 1,0 ml asam asetat 33 % sebagai penghenti reaksi, kemudian ditambahkan 2,0 mL sodium nitrit 5 % sebagai larutan pengoksidasi dan ditambahkan lagi 2,0 mL asam asetat 33 %, lalu dibiarkan 10 menit pada suhu ruang. Selanjutnya ditambahkan 2,0 mL amonium sulfamat 12,5 % dan 10 mL HCl 0,5 % serta 2,0 mL larutan indol 1 % dalam etanol 95 %, kemudian dimasukkan dalam air mendidih selama 1-2 menit dan diukur absorbansinya pada panjang gelombang 492 nm dengan menggunakan glukosamin sebagai standar.

Konversi khitin menjadi khitosan menggunakan enzim khitin daesetilase

Enzim yang telah diperoleh diinkubasikan dengan koloidal khitin sebagai substratnya dengan perbandingan koloidal khitin : enzim (2 : 1), yang dilakukan variasi waktu inkubasi yaitu 1 jam, 2 jam, 3 jam dan 4 jam pada kondisi suhu 55 °C, 175 rpm. Setelah diinkubasi campuran tersebut disentrifugasi selama 30 menit 170 rpm. Endapan (khitosan) diambil dan ditimbang kemudian disimpan dalam suhu 4 °C untuk analisis selanjutnya dengan menggunakan spektrofotometer IR atau FTIR.

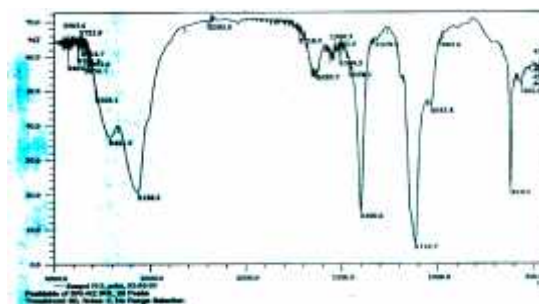
HASIL DAN PEMBAHASAN

Enzim khitin deasetilase yang diperoleh dari isolat M-1 diproduksi secara ekstraseluler setelah pertumbuhannya mencapai fasa stasioner, yaitu antara hari ke 3-4 waktu fermentasi, di mana pada fasa tersebut aktivitas khitin deasetilase optimum dengan nilai aktivitas enzim sebesar 14,5 UA/mL (Gambar 2). Hal ini terjadi karena kerapatan sel semakin padat dan ketersediaan nutrisi dalam mediumnya semakin berkurang sehingga enzim khitin deasetilase disekresikan keluar sel dalam jumlah yang banyak untuk mendegradasi substrat (khitin) pada dinding sel mikroba. Hasil degradasinya digunakan sebagai sumber nutrisi alternatif.



Gambar 2
Grafik Hubungan Antara Aktivitas Enzim dengan Waktu Inkubasi

Hal tersebut di atas sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Natsir (2000) yaitu enzim khitin deasetilase yang diproduksi dari isolat K-22 pada kondisi optimum 37 °C, pH 5,0 dan optimal produksinya pada hari ke-4. Tapi berbeda halnya dengan kitinase yang diisolasi dari *Bacillus sp* K-29 pada kondisi optimum 55 °C, pH 7,0 dan produksi optimal pada hari ke-2 (Rahayu, 2000). Enzim ekstrak kasar (*crude*) difraksinasi dengan amonium sulfat 40 % (b/v) sebelum enzim tersebut diinkubasi dengan substrat dari serbuk cangkang kepiting.



Gambar 3
Spektrum Infra Merah Khitosan Hasil Deasetilasi Enzim

Hasil inkubasi enzim dengan substrat koloidal kitin yang dianggap sebagai kitosan dianalisis lebih lanjut dengan spektrofotometer inframerah pada variasi waktu inkubasi yaitu 1, 2, 3 dan 4 jam mempunyai bentuk yang hampir sama, namun salah satu spektrum inframerah khitosan hasil deasetilasi enzim kitin deasetilase diperlihatkan pada gambar berikut ini (Gambar 3) adalah waktu inkubasi selama 3 jam

Berdasarkan hasil intepretasi serapan atau puncak pada Gambar 3, maka diperoleh beberapa daerah frekuensi dengan gugus fungsi yang menyerap pada daerah tersebut, gugus fungsi ini terlihat pada Tabel 1.

Tabel 1.
Beberapa Gugus Fungsi yang Menyerap pada Spektrum IR Senyawa Khitosan

Gugus fungsi	Frekuensi (cm ⁻¹)	Intensitas
NH ₂ asimetrik	3421,5	Sedang
NH ₂ simetrik	3128,3	tajam
C – H stretching	2810,1	Lemah
C = O (amida I)	1718,5	Lemah
N – H (amida II)	1629,7	Sedang
CH ₂	1458,1	Sedang
C – N	1400,2	Tajam, kuat
O – H sekunder pada atom C3	1116,7	Tajam, kuat
O – H primer pada atom C6	1033,8	sedang

Hasil analisis kadar air, kadar abu dan derajat deasetilasi dari khitosan yang terlihat pada Tabel 2, menunjukkan bahwa kadar air khitosan yang diperoleh tidak lebih dari 10 %. Kadar air yang baik untuk khitosan diharapkan kurang dari 10 %, karena semakin tinggi kadar air khitosan semakin besar kemungkinan untuk cepat rusak. Sedangkan kadar abu khitosan sangat jauh lebih besar dari kadar abu yang diharapkan yaitu 1 %.

DAFTAR PUSTAKA

- Bastaman, S., 1990. *Penelitian Limbah Udang Sebagai Bahan Industri Khitin dan Khitosan*. Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Industri Hasil Pertanian, Jakarta.
- Dunn, E.T. and Grandmaison, E.W., 1992. *Applications of Chitin and Chitosan*, Department Of Chemical Engineering Queen's University Of Kingston, Ontario, Canada.
- Gooday, G.W., 1990. *The Ecology of Chitin Degradation*. In : K.C Marshall (Ed) *Advances and Biotechnology*.

Tabel 2
Hasil Analisis Kadar Air, Kadar Abu dan Derajat Deasetilasi Khitosan

Waktu inkubasi (jam)	Derajat deasetilasi (%)	Kadar air (%)	Kadar abu (%)
1	76,10	7,56	33,56
2	78,90	6,97	34,1
3	66,53	6,00	34,25
4	77,16	5,75	33,26

Derajat deasetilasi khitosan adalah persentase gugus asetil khitin yang berhasil dideasetilasi oleh enzim khitin deasetilase agar diperoleh khitosan. Pada standar, derajat deasetilasi khitosan diharapkan tidak kurang dari 80 %. Derajat deasetilasi khitosan ditentukan dengan mengukur absorbansi contoh pada panjang gelombang 1655 cm⁻¹ yang menunjukkan nilai absorbansi gugus amida (N-H) dan 3450 cm⁻¹ menunjukkan serapan pita O-H. Molekul khitosan yang terdeasetilasi dapat dilihat dari pita serapan pada 3421,5 cm⁻¹, 3136,0 cm⁻¹ yang diperkuat dengan serapan di daerah frekuensi 1629,7 cm⁻¹. Hasil analisis derajat deasetilasi khitosan dapat terlihat pada Tabel 2 di atas, dengan derajat deasetilasi yang mendekati 80 % yaitu sekitar 66,5 % - 78,9 %..

KESIMPULAN

Kesimpulan

Dari hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa, mikroba termofilik penghasil enzim khitin deasetilase pada kondisi 55 °C dan pH 7,0. dapat mengkonversi khitin dari kulit kepiting bakau (*Scylla serrata*) menjadi khitosan dengan derajat deasetilasi antara 66,53 – 78,9 %, kadar air 5,75 – 7,56 %; dan kadar abu antara 33,26 – 34,25 %.

- Indra dan Achlus, S., 1993. **Hidrolisa khitin Menjadi Khitosan Serta Aplikasinya Sebagai Pendukung Padat**, Laporan Penelitian ITS, Surabaya.
- Majeti N.V., 2000. **A Review Of Chitin and Chitosan Application, Reactive and Functional Polymers**, Vol.46, P.1-27, Departement Of Chemistry, University Of Roorkee, India.
- Natsir, H., 2000. **Karakterisasi dan Purifikasi Enzim Pendegradasi Khitin dari Mikroba Asidofilik Asal Kawah Kamojang**. Tesis. Program Pascasarjana, IPB, Bogor.
- Natsir, H., 2002. **Eksplorasi Mikroba Asidofilik Penghasil Enzim Pendegradasi Kitin**. *Marina Chica Acta*. Vol.2.3.4. No.1 ISSN-1411-2132.
- Permadi, W., 1999. **Produksi dan Kegunaan Khitin dan Khitosan**, Makalah.
- Rahayu, S., Fredy, T., Maggy, T.S., J.K. Hwang, dan Y.R. Pyun., 1999. **Eksplorasi Bakteri Termofilik Penghasil Enzim Kitinase Asal Indonesia**. Prosiding II. Seminar Hasil-hasil Penelitian Bidang Ilmu Hayat. Pusat Antar Universitas Ilmu Hayat. Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Tokuyasu, K.M., Ohnishi-Kameyama, and Hayashi, K., 1996. **Purification and Characterization Of Extracellular Chitin Deacetylase From Colletotrichum Lindemuthianum**. *Biosci, Biotech, Biochem.*, 60 (10):1598-1603
- Tsigos, I.A., Martinou, D. Kafetzopoulos, and V. Bouriotis, 2000. **Chitin Deacetylase : New, Versatile Tools in Biotechnology**, *Tibtech.*, 18 : 305-312.