

**PENENTUAN WAKTU INKUBASI PADA PEMBENTUKAN  
SENYAWA N-ASETILGLUKOSAMIN YANG DIDEGRADASI SECARA  
ENZIMATIS DARI KITIN**

**DETERMINATION OF INCUBATION TIME ON FORMATION OF  
N-ACETYLGLUCOSAMINE BY ENZYMATIC DEGRADATION FROM CHITIN**

*Adi Wirawan\* dan Nuniek Herdyastuti*

*Jurusan Kimia FMIPA, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam*

*Universitas Negeri Surabaya, Jl. Ketintang, Surabaya, 60231*

*\*e-mail: [adiwirawan80@gmail.com](mailto:adiwirawan80@gmail.com)*

**Abstrak.** Tujuan penelitian ini untuk mengetahui waktu inkubasi optimum pada pembentukan senyawa N-asetilglukosamin hasil degradasi kitin oleh enzim kitinase dari isolat *Pseudomonas sp. TNH-54*. Penentuan waktu inkubasi optimum dilakukan dengan menginteraksikan kitin amorf dengan enzim kitinase pada variasi waktu inkubasi (0 – 72) jam. Jumlah N-asetilglukosamin ditentukan dengan menggunakan Spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 493 nm. Dari hasil penelitian diperoleh waktu inkubasi optimum yang diperlukan untuk pembentukan N-asetilglukosamin adalah 36 jam

**Kata kunci:** kitin, kitinase, N-asetilglukosamin

**Abstract.** The aim of this experiment were to know the optimum incubation time on formation of N-acetylglucosamine from chitin using chitinase of *Pseudomonas sp. TNH-54*. Determination of optimum incubation time was done by interact chitin with chitinase at variation of incubation time (0-72) hours. Amount of N-acetylglucosamine was determined using Spectrophotometer UV-Vis at a wavelength of 493 nm. The result showed that the optimum incubation time required for the formation of N-acetylglucosamine is 36 hours

**Keywords:** chitin, chitinase, N-acetylglucosamine

## PENDAHULUAN

Kitin merupakan homopolimer dari  $\beta$ -1,4 N-asetil-D-glukosamin dan merupakan polimer kedua terbanyak di alam setelah selulosa. Senyawa ini dapat ditemukan pada cangkang udang, kepiting, molusca, serangga dan beberapa dinding sel jamur dan alga. Kitin merupakan zat padat yang tidak larut dalam air, tetapi dapat larut dalam pelarut organik seperti asam sulfat, asam nitrat, asam fosfat, dan asam formiat anhidrat. Kitin juga dapat terurai secara enzimatik dengan menggunakan enzim kitinase [1].

Kitinase merupakan enzim yang mempunyai kemampuan menghidrolisis kitin menjadi turunan kitin yang sangat banyak manfaatnya. Degradasi kitin secara enzimatik telah banyak dilakukan karena merupakan

metode yang sederhana, cepat dan reproduksibel untuk menghasilkan senyawa turunan kitin atau kitin oligosakarida [2].

Produk hasil hidrolisis senyawa kitin memberikan banyak manfaat di bidang pertanian dan industri makanan. Senyawa oligo-kitin telah dilaporkan dapat membantu meningkatkan sistem kekebalan di dalam tubuh, memiliki sifat anti bakteri dan anti kapang, serta meningkatkan daya tahan pada tanaman sedangkan monomernya, yaitu N-asetilglukosamin dapat digunakan sebagai obat untuk mengontrol kadar gula dalam darah, sebagai suplemen, anti *inflamatory* dan sebagainya. Untuk kosmetik, senyawa gula ini dapat membantu mengurangi hilangnya hiperpigmentasi, karena N-asetil-D-glukosamin dapat membantu mengurangi

aktivitas enzim tirosinase yang berperan dalam produksi melanin [3].

Pada proses pembentukan N-asetilglukosamin diperlukan suatu kondisi optimum tertentu seperti waktu inkubasi dimana enzim kitinase dapat bekerja secara maksimal dalam mendegradasi kitin sehingga dapat dihasilkan N-asetilglukosamin dalam jumlah yang tinggi. Jamialahmadi *et al.* (2011), dalam penelitiannya dengan menggunakan enzim kitinase yang diperoleh dari *Aeromonas sp.* PTCC1691. Dari hasil penelitian didapatkan produksi maksimum N-asetil-glukosamin sebesar 79% setelah 24 jam inkubasi dengan konsentrasi enzim  $2 \text{ U mg}^{-1}$ . Widhyastuti (2007), dalam penelitiannya memproduksi N-asetil-D-glukosamin dan N-asetilkitoooligosakarida setelah waktu inkubasi 48 jam dengan menggunakan kitin koloidal dan enzim kitinase yang diperoleh dari *Aspergillus rugulosus* 501.

Berdasarkan pemaparan diatas maka perlu dilakukan penelitian untuk mengetahui waktu inkubasi optimum sehingga dapat dihasilkan N-asetilglukosamin dalam jumlah yang tinggi.

## METODE

### Alat

Alat – alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Centrifuge* 5810 R, Spektrofotometer SHIMADZU UV-Vis 1800, *rotary shaker*, *magnetic stirrer*, dan peralatan gelas

### Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu kitin, *Pseudomonas sp.* TNH 54, N-asetil-glukosamin (Sigma), NaOH, HCl, Etanol, Aseton, Asam 3,5-dinitrosalisilat (Sigma), SDS, NaOH,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , Natrium kalium tartarat tetrahidrat.

### Pembuatan Kitin Amorf

Kitin sebanyak 10 gram dilarutkan ke dalam 40 mL larutan NaOH 40% dingin ( $4^\circ\text{C}$ ) yang mengandung 0,2% SDS kemudian disimpan selama 12 jam. Larutan dinetralkan dengan HCl 6N, difiltrasi, kemudian dicuci

dengan etanol, air, etanol, kemudian aseton. Setelah itu kitin yang diperoleh dikeringkan pada suhu ruang.

### Produksi enzim kitinase

Koloni tunggal isolat bakteri *Pseudomonas sp.* TNH-54 ditumbuhkan pada 100 mL media cair yang mengandung 0,1% kitin (b/v) pada suhu  $30^\circ\text{C}$ . Larutan dikocok pada 120 rpm selama 40 jam. Kultur cair kemudian disentrifugasi pada 4000 rpm, suhu  $4^\circ\text{C}$  selama 15 menit. Supernatan yang diperoleh merupakan enzim kitinase.

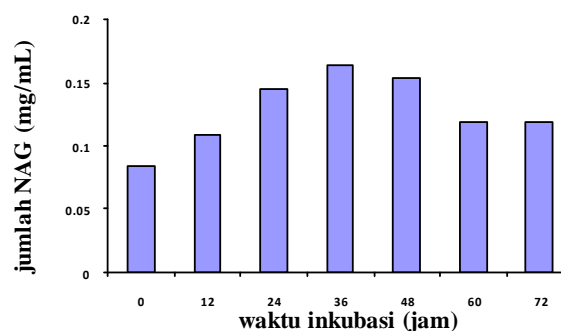
### Penentuan waktu inkubasi optimum

Kitin amorf konsentrasi 1% sebanyak 2 mL dilarutkan dalam buffer kalium fosfat dan ditambahkan dengan 0,5 mL enzim kitinase kemudian diinkubasi selama (0-72) jam dengan pengocokan 120 rpm pada suhu  $30^\circ\text{C}$ . Setelah diinkubasi, larutan diletakkan dalam penangas air mendidih kemudian didinginkan pada suhu kamar. Setelah itu, larutan disentrifugasi selama 10 menit pada kecepatan 4000 rpm dan diambil supernatannya. Supernatan diukur serapannya dengan menggunakan Spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 493 nm.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Penentuan Waktu inkubasi optimum

Hasil penentuan waktu inkubasi untuk pembentukan N-asetilglukosamin (NAG) ditunjukkan seperti pada Gambar 1.



Gambar 1. Jumlah NAG pada variasi waktu inkubasi

Gambar 1. menunjukkan bahwa produksi N-asetilglukosamin meningkat seiring dengan meningkatnya waktu inkubasi. Peningkatan terjadi mulai dari inkubasi 12 jam hingga mencapai titik maksimum pada inkubasi 36 jam dengan jumlah N-asetilglukosamin yaitu sebesar 0,164 mg/mL. Hal ini kemungkinan dikarenakan enzim mulai mendegradasi kitin dengan memutus ikatan glikosida yang menghubungkan antar monomer pada kitin sehingga terbentuk senyawa yang lebih sederhana dalam bentuk oligomer kitin dan monomer N-asetilglukosamin. Menurut Wulandari (2009), pada saat proses hidrolisis berlangsung sebagian kitin masih terhidrolisis dalam bentuk oligomer dan belum terdegradasi secara sempurna menjadi N-asetilglukosamin. Setelah melewati waktu inkubasi 36 jam mulai terjadi penurunan jumlah NAG. Hal ini kemungkinan dikarenakan enzim terdenaturasi selama reaksi berlangsung atau terjadi penghambatan saat proses pembentukan N-asetilglukosamin [4]. Menurut Widyastuti (2007), senyawa kito oligosakarida dan N-asetilglukosamin hasil hidrolisis kitin oleh kitinase pada konsentrasi yang tinggi akan dapat menyebabkan inhibisi umpan balik karena kelebihan N-asetilglukosamin sebagai produk akhirnya. Dalam proses pembentukan senyawa N-asetilglukosamin, kitinase dapat dihambat secara kompetitif oleh beberapa senyawa. Penelitian lain menyebutkan bahwa kitinase dapat dihambat oleh alosamidin dan beberapa senyawa selain gula. [5].

### Simpulan

Berdasarkan hasil penelitian di atas, dapat disimpulkan bahwa waktu inkubasi yang optimum untuk pembentukan senyawa N-Asetilglukosamin hasil degradasi kitin secara enzimatis adalah 36 jam.

### DAFTAR PUSTAKA

1. Yurnaliza, 2002, *Senyawa Kitin dan Kajian Aktivitas enzim Mikrobial Pendegradasinya*, FMIPA-USU.
2. Krokeide, I.M., Eijsink, V.G.H., and Sørli. 2007. Enzyme Assay For Chitinase Catalyzed Hydrolysis Of Tetra-N-Acetylchitotetraose By Isothermal Titration Calorimetry.
3. Herdyastuti, N., Raharjo, T.J., Mudasir, and Matsjeh, S. 2009. Chitinase and Chitinolytic Microorganism : Isolation, Characterization and Potential. *Indo.J Chem.*9(1):37-47.
4. K. Jamialahmadi, J. Behravan, M. Fathi Najafi, M. Tabatabaei Yazdi, A.R.Shahverdi and M.A. Faramarzi.2011. Enzymatic Production of N-Acetyl-D-Glucosamine from Chitin Using Crude Enzyme Preparation of *Aeromonas sp.* PTCC1691 *Biotechnology*, 10 (3): 292-297
5. Peter MG. 2005. Chitin and chitosan from animal sources. Di dalam: Steinbuechel A dan SK Rhee, editor. *Polysaccharides nd Polyamides in the Food Industry*. Volume ke-1. Wernheim: Wiley-VCH.
6. Mane, U. V., dan Deshmukh, A. M., 2009, Chitin degrading potential of three aquatic actinomycetes and its optimization, *African J. Biotechnol.*, Vol. 8 (23) : 6617-6620
7. Widyastuti, Nunuk. 2007. *Produksi Kitinase Ekstraseluler Aspergillus rugulosus 501 Secara Optimal Pada Media Cair*. Pusat Penelitian Biologi-LIPI: Cibinong.
8. Wulandari, Fitri. 2009. *Optimasi Produksi N-Asetilglukosamin Dari Kitin Melalui Fermentasi Oleh Aspergillus rugulosus 501*. FMIPA-IPB.