

Proceeding

The 2nd International Conference of the Indonesian Chemical Society 2013
October, 22-23th 2013

Enzymatic Production of Chitosan from the White Shrimp Waste (*Penaeus merguensis*) and Its Applications as Preservatives in Fishery Products

Hasnah Natsir¹ *, Seniwati Dali¹ Nurlaeli Fattah², dan Muhammad Nadir²

¹ Laboratorium Biokimia Jurusan Kimia Fakultas MIPA Universitas Hasanuddin,
Jl. Perintis Kemerdekaan Km 10 Tamalanrea, Makassar Sulawesi Selatan, Indonesia
90245, * [email: hasnahnatsir@gmail.com](mailto:hasnahnatsir@gmail.com)

² Politeknik Pertanian Negeri Pangkep, Jl. Poros Makassar-Pare,
Km. 83 Pangkep, Indonesia 90655

Abstract

Production of chitosan from white shrimp waste (*Penaeus merguensis*) enzymatically with protease and chitin deacetylase. These both enzymes are a group of hydrolytic enzymes that could potentially be used in the processing of fish waste that contains protein and chitin. This study aims to produce chitosan enzymatic and applied as a natural preservative in fishery products especially fresh mackerel. The results showed that the enzyme protease and chitin deacetylase from *bacteria B. licheniformis* HSA3- 1a can be used in producing enzymatic chitosan. The value of the enzymatic characteristics of chitin-total N content = 7.56%, water = 2.85%, ash content = 0.94% and the texture / color in the form of white powder and the value of the degree of chitin deacetylase (DD%) is 42.4 1%. Medium value of the characteristics of chitosan-total N content = 7.34%, water content = 2.11%, ash content = 0.2 1% and the texture / color in the form of white powder and the value of the degree of chitin deacetylase (DD%) was 74, 94% (included in the standard chitosan). The results of the application of chitosan as a preservative in fresh mackerel at various concentrations, suggests that chitosan can be used as a preservative enzymatically at a concentration of 2.5% during the next 24 hours with TPC value = 6.8×10^3 CFU; TVB value = 10 045 mg/100 grams of material, and the results of organoleptic test showed that fish consumption is still in decent condition.

Keywords: Shrimp Waste, chitin, chitosan, protease, chitin deacetylase, and *Bacillus licheniformis*

Pendahuluan

Enzim protease dan kitin deasetilase merupakan enzim golongan hidrolitik berpotensi digunakandalampengolahan limbah perikanan khususnya limbah yang mengandung protein dan kitin. Protease digunakan dalam mendeproteinasilimbah yang mengandung kitin sedangkan kitin deasetilase digunakan dalam mendeasetilasi kitin menjadi kitosan. Kitin merupakan polimer N-asetil D-glukosamin yang terikat 1,4-glikosidik yang banyak terdapat pada limbah hasil laut terutama golongan udang, kepiting dan kerang-kerangan. (Sakai, dkk, 1998 dan Natsir, dkk., 2013). Kitin dapat mengalami proses deasetilasi secara kimiawi maupun secara enzimatik. Proses deasetilasi kitin secara enzimatik dengan kitin deasetilase banyak digunakan karena menghasilkan produk dengan ukuran yang seragam. Hal ini bisa terjadi karena enzim tersebut dapat bekerja sangat spesifik sehingga diperoleh kitosan yang memiliki derajat deasetilasi yang tinggi yaitu sekitar 80-90 % (Rukayadi, 2003). Kitosan

adalah senyawa polimer linier golongan karbohidrat yang tersusun dari monomer D-Glukosamin dengan ikatan β -1,4-glikosida. Kitosan ini mempunyaimampuan menghambat pertumbuhan mikroba sehingga berpotensi sebagai pengawet. Kitosan dan oligomernya mendapat perhatian khusus karena mempunyai kemampuan sebagai antimikroba dan dapat merangsang pembentukan senyawa metabolit sekunder pada tanaman. (Kuroiwa, dkk., 2003). Dalam Penelitian ini menggunakan limbah udang putih (*Penaeus merguensis*) sebagai sampel dan *B. licheniformis* HSA3-1a sebagai sumber enzim protease dan kitin deasetilase karena bakteri ini diketahui dapat menghasilkan kedua enzim tersebut dan mengaplikasikan kitosan sebagai pengawet pada ikan kembung.

Bahan dan Metode

Isolasi enzim protease dan kitin deasetilase dari *B. licheniformis* HSA3-1a: Isolasi protease dan kitin deasetilase dari *B. licheniformis* HSA3-1a dilakukan dengan komposisi medium yang sama namun substratnya berbeda yaitu: amonium sulfat 0,7%, yeast ekstrak 0,05%, bakto tripton 0,1%, NaCl 0,1%, K₂HPO₄ 0,01%, CaCl₂ 0,015%, MgSO₄.7H₂O 0,01%. Untuk protease menggunakan substrat kasein 0,5% dan kitin deasetilase menggunakan koloidal kitin 0,5%.

Uji aktivitas protease dengan metode Bollag and Edelstein (1991) dan Baehaki, dkk., (2001). Uji aktivitas kitin deasetilase (Tokuyasu, 1996) serta analisis kadar protein dengan metode Lowry.

Isolasi kitin dari limbah udang: Isolasi kitin dilakukan dalam tiga tahapan yaitu: tahap I dilakukan demineralisasi dengan HCl 1,5M pada suhu 75°C selama satu jam, kemudian dicucihingga pH netral, dan dikeringkan selama 24 jam pada suhu 80 °C. Tahap II dilakukan dekolourisasi menggunakan larutan NaOCl 0,5 % selama satu jam pada suhu 75°C kemudian disaring dan dikeringkan pada suhu 80°C selama 24 jam. Tahap III dilakukan deproteinasi menggunakan enzim protease dari *B. licheniformis* HSA3-1a pada berbagai variasi konsentrasi enzim dan substrat. Akhirnya diperoleh senyawa kitin digunakan untuk produksi kitosan dan akan diuji nilai karakteristiknya (kadar abu, kadar air, N-total, tekstur dan derajat deasetilasi (% DD) (Bastaman, 1998 dan Natsir, dkk., 2007).

Produksi kitosan secara enzimatis: kitin yang diperoleh dari hasil isolasi limbah udang dilakukan proses deasetilasi dengan enzim kitin deasetilase pada berbagai variasi: konsentrasi enzim, konsentrasi substrat dan waktu inkubasi (Natsir, dkk., 2007). Senyawa kitosan enzimatis, yang dihasilkan dikarakterisasi sifat fisika kimianya.

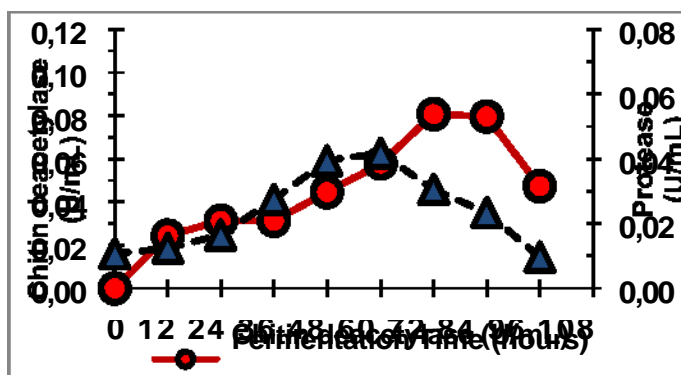
Penggunaan kitosan enzimatis sebagai pengawet produk perikanan: Kitosan enzimatis diaplikasikan sebagai pengawet pada produk perikanan khususnya ikan kembung segar yang dibeli dari nelayan. Perlakuan ini menggunakan ikan + es sebagai standar (kontrol) dan

konsentrasi kitosan bervariasi (0,5 – 2,5%) dengan analisa: *TPC*, (*Total Plate Count*), *TVB*(*Total Volattyl Basa*), dan uji organoleptik.

Hasil dan Pembahasan

Produksi protease dan kitin deasetilase dari B. licheniformis HSA3-1a:

Protease dan kitin deasetilase dari *B. licheniformis HSA3-1a* diproduksi dalam medium yang sama pada substrat yang berbeda. Hasil penelitian menunjukkan bahwa bakteri *B. licheniformis HSA3-1a* dapat memproduksi protease maksimum pada waktu fermentasi 60 jam dengan aktivitas 0,0417 U/mL. Sedangkan kitin deasetilase diproduksi maksimum pada waktu fermentasi 72 jam dengan aktivitas 0,0807 U/mL (Gambar 1). Protease ini digunakan dalam isolasi kitin khususnya sebagai agensia dalam deproteinasi limbah udang sehingga diperoleh kitin. Selanjutnya kitin tersebut dideasetilasi oleh enzim kitin deasetilase sehingga diperoleh kitosan yang digunakan sebagai pengawet pada ikan kembung.



Gambar 1. Produksi protease dan kitin deasetilase dari *B. licheniformis HSA3-1* pada kondisi pH 7,0 suhu 50°C, kecepatan aerasi 170 rpm.

Karakterisasi kitin dan kitosan hasil isolasi:

Hasil deproteinasi dengan enzim protease pada waktu inkubasi 1-3 jam memiliki nilai karakteristik yang masuk dalam kategori kitin standar protan laboratories dan kitosan hasil deasetilasi kitin dengan enzim kitin deasetilase juga memiliki karakteristik yang masuk dalam kategori kitosan standar protan laboratories (Tabel 1). Hal ini menunjukkan bahwa protease dan kitin deasetilase dari bakteri *B. licheniformis HSA3-1* layak digunakan dalam proses isolasi kitin dan kitosan secara enzimatik. Menurut Protan Laboratories nilai karakteristik kitin dan kitosan standar yang beredar dipasaran sebaiknya masuk pada kisaran tersebut. Analisis derajat deasetilasi (% DD) dilakukan dengan menggunakan FTIR untuk mengetahui pergeseran gugus fungsi amida –NH sekunder menjadi gugus amina primer –NH₂. dengan cara menghitung persen transmitansi dari spektrum IR senyawa kitin dan kitosan

dengan metode *base line*. Cara ini membandingkan absorbansi bilangan gelombang gugus amida –NH (1650 – 1500) cm^{-1} (A_{1655}) dan gugus amina primer –NH₂ (3500 – 3200) cm^{-1} (A_{3450}) dengan nilai absorbansi 1,33 pada proses deasetilasi sempurna (Bastaman, 1998 dan Rizqiyah, 2010).

Tabel 1. Parameter Karakteristik kitindan kitosan secara enzimatis dibandingkan dengan Standar Protan Laboratories.

Parameter karakteristik fisika-kimia	Kitin hasil isolasi dengan enzim protease (<i>hasil penelitian</i>)	Kitin standar protan lab.	Kitosan hasil deasetilasikitin deasetilase (<i>hasil penelitian</i>)	Kitosan standar protan lab.
Kadar Air (%)	2,95%	< 10%	2,11 %	< 10%
Kadar Abu pada 900 ^o C (%)	0,96 %	< 2%	0,21 %	< 1%
Nitrogen Total (%)	7,56%	6 – 8%	7,34 %	7 – 8%
Derajat Deasetilasi (%DD)	42,4%	15 – 60%	74,9%	> 60 %
Tekstur/ Warna	serbuk/ putih	serbuk/ putih	serbuk/ putih	serbuk/ putih

Aplikasi kitosan enzimatis sebagai pengawet

Tabel 2. Hasil analisis TVB (*Total Volatile Base*) dan TPC (*Total Plate Count*) terhadap kesegaran ikan yang telah diawetkan menggunakan kitosan enzimatis.

Kode Sampel	Perlakuan Sampel	Analisis Kadar TVB		Analisis Kadar TPC (CFU)				Analisis Organoleptis (Mata, Insang dan Tekstur)		
		0 jam	24 jam	0 jam	6 jam	12 jam	24 jam	6 jam	12 jam	24 jam
A	Ikan + es	2,26	51,04	$0,9 \times 10^3$	$5,2 \times 10^3$	$1,2 \times 10^5$	$1,6 \times 10^9$	sedang	busuk	busuk
B	Ikan + es + Kitosan 1,0%	2,26	39,87	$1,2 \times 10^3$	$2,7 \times 10^3$	$2,1 \times 10^5$	$1,9 \times 10^8$	segar	busuk	busuk
C	Ikan + es + Kitosan 1,5%	2,26	32,4	$1,1 \times 10^3$	$2,1 \times 10^3$	$1,1 \times 10^5$	$2,2 \times 10^8$	segar	mulaibusuk	busuk
D	Ikan + es + Kitosan 2,0%	2,26	10,82	$1,2 \times 10^3$	$3,0 \times 10^3$	$1,2 \times 10^5$	$1,3 \times 10^8$	segar	masihlayak	busuk
E	Ikan + es + Kitosan 2,5%	2,26	10,05	$1,1 \times 10^3$	$2,1 \times 10^3$	$6,8 \times 10^3$	$1,6 \times 10^8$	segar	masihlayak	masihlayak

Hasil analisis penggunaan kitosan enzimatis sebagai pengawet pada ikan kembung dengan parameter uji TVB, TPC dan uji sensorik atau organoleptik(Tabel 2) menunjukkan bahwa kitosan enzimatis dapat digunakan sebagai pengawet ikan kembung pada konsentrasi 2,5 % dari berat ikan dengan nilai TVB 10, 05. TVB merupakan hasil dekomposisi protein oleh aktivitas bakteri dan enzim yang tergantung mutu kesegaran ikan, makin tinggi kadar TVB makin mundur mutu ikan. TVB digunakan sebagai indikator untuk mengukur tingkat kesegaran ikan dan sebagai batasan ikan layak konsumsi adalah jika kadar TVB <30 mg/100 gram bahan.

Kesimpulan

Kitin telah diisolasi dari limbah udang dengan nilai karakteristik: kadar air= 2,85%; kadar abu= 0,94%, N-total= 7,56%, dan derajat deasetilase 42,41% yang berupa serbuk berwarna putih. Sedangkan kitosan enzimatis yang dihasilkan memiliki nilai karakteristik: kadar air= 2,11%; kadar abu= 0,21% N-total= 7,34%, dan derajat deasetilase 74,94% yang berupa serbuk berwarna putih. Kitosan enzimatis 2,5% dapat digunakan sebagai pengawet pada ikan kembung segar selama 24 jam dengan nilai TPC = 6.8×10^3 CFU, TVB = 10.045 mg/100 gr bahan, dan uji organoleptik masih layak.

Ucapan Terima Kasih

Terima kasih kepada Dirjen Dikti Kemdikbud atas bantuan Penelitian MP3EI Tahun 2012 - 2013 dan Terima kasih pula kepada anggota peneliti di Lab Biokimia Jurusan Kimia FMIPA Unhas dan Lab. Pengolahan Politani Pangkep serta semua pihak yang terkait dengan penelitian.

Daftar Pustaka

- Bastaman, S., N. Aprianita dan Hendarti. 1998. Penelitian Limbah Udang sebagai Bahan Industri Kitin dan Kitosan. Balai Penelitian dan Pengembangan Industri Hasil Pertanian. Jakarta.
- Bollag, D.M. and Edelstein, S.J. 1991. Protein Methods. New York: Wiley-Less.
- Kuroiwa, T., S. Ichikawa, S. Sato, and S. Mukataka. 2003. Improvement of the Yield of Physiologically Active Oligosaccharides in Continuous Hydrolysis of Chitosan Using Immobilized Chitinase. *J. Biotech. and Bioeng* 84 (1) : 121-123
- Natsir, H., Dali, S., Jawahir, B. dan Aziz, F., 2007. Konversi Kitin dari Limbah Udang Api-api (*Metapenaeus monoceros*) Menjadi Senyawa Kitosan Secara Enzimatis. *J. Marina Chemica Acta*. Edisi Khusus Seminar Nasional FK3TI: 82-89.
- Natsir, H., Patong, A.R., Suhartono, M.T. and Ahmad, A. 2010. Production and Characterization of Chitinase Enzymes from Hot Spring in South Sulawesi, *Bacillus* sp. HSA3-1a. *Indo. J. of Chem.* 10 (2): 256-260.
- Natsir, H., Patong, A.R., Suhartono, M.T. and Ahmad, A. 2013. Isolation and purification of thermostable chitinase *B. licheniformis* HSA3-1 from Sulili hot springs in South Sulawesi, Indonesia, *Int. J. of Pharm. Bio Sciences* 4 (3): (B) 1252 -1259.
- Rukayadi, Y, 2003, Kitin Deasetilase dan Pemanfaatannya, *Hayati*, Vol.9 (4): 130-134.
- Rokhati, N., 2006, Pengaruh Derajat Deasetilasi Kitosan dari Kulit Udang terhadap Aplikasinya sebagai Pengawet Makanan, *Reaktor*, Vol.10 (2): 54-58
- Rizqiyah, D.N.R., 2010, Isolasi dan Identifikasi Kitin dan Kitosan dari Cangkang Hewan Mimi (*Horseshoe Crab*) Menggunakan Spektrofotometri Infra Merah, *Alchemy*, Vol.2 No. 1, hal. 104 - 157.

