Derajat Deasetilasi Kitosan Hasil Reaksi Enzimatis Kitin Deasetilase Isolat *Bacillus papandayan* K29-14

Emma Rochima.[1)], Sugiyono[2)] Dahrul Syah[2)] , M.T.Suhartono[2)],

[1)] *Mahasiswa Pascasarjana S2 Institut Pertanian Bogor, Darmaga, Bogor*
[2)] *Jurusan Tekonologi Pangan dan Gizi, Institut Pertanian Bogor, PO Box 220, Kampus Darmaga, Bogor 16002*

Abstrak

Penelitian ini bertujuan menganalisis derajat deasetilasi kitosan hasil aplikasi enzim kitin deasetilase isolat Bacillus papandaya[1]n K29-14 *hasil presipitasi ammonium sulfat 80% jenuh yang ditambahkan aktivator $MgCl_2$ 1 mM dengan enzim murni hasil kolom kromatografi DEAE Sephadex A-50. Derajat deasetilasi kitosan diukur dengan First Derivative UV Spectrofotometry. Kitin deasetilase dengan aktivitas 0,04 U/mg ditambahkan pada soluble kitosan 1% yang menghasilkan derajat deasetilasi awal 70% lalu diinkubasi pada 55°C selama 0.25; 0.5; 1,6, 12, dan 24 jam.*
Hasil penelitian menyimpulkan bahwa pemurnian enzim ternyata tidak memberikan pengaruh yang signifikan terhadap tingkat derajat deasetilasi, tetapi mempercepat proses deasetilasi kitosan.l Derajat deasetilasi 80% dan 95% diperoleh dengan enzim murni yang diinkubasi selama masing-masing 6 dan 12 jam, sedangkan enzim presipitasi selama12 dan 24 jam.

Kata kunci/key words : derajat deasetilasi,kitin deasetilase, kitosan

1. Pendahuluan

Kitin, polimer berantai lurus tersusun atas residu N-asetilglukosamina melalui ikatan ß-(1,4) yang terdapat berlimpah di alam setelah selulosa. Secara umum kitin banyak terdapat pada eksoskeleton atau kutikula serangga, *crustacea*, dan jamur (Tsigos, 2000). Lebih dari 80.000 metrik ton kitin diperoleh dari limbah laut dunia per tahun (Patil, 2000), di Indonesia limbah kitin yang belum dimanfaatkan sebesar 56.200 metrik ton per tahun (Departemen Kelautan dan Perikanan, 2000).

Penyebaran kitin yang relatif luas menjadikan enzim pendegradasi kitin, kitin deasetilase (selanjutnya disingkat CDA), berpotensi diaplikasikan untuk menghidrolisis kitin menjadi kitosan. Kitosan adalah kitin yang telah dihilangkan gugus asetilnya menyisakan gugus amina bebas yang menjadikannya bersifat polikationik. Dengan sifat polikationiknya maka kitosan dapat berfungsi sebagai agen penggumpal dalam penanganan limbah terutama limbah berprotein (Suhartono, 1989) dan lebih mudah diolah menjadi bentuk lain (Hirano, 1996; Dodane, 1998).

Saat ini kitosan komersial diproduksi secara termokimiawi. Cara ini dalam banyak hal tidak menguntungkan diantaranya tidak ramah lingkungan, prosesnya tidak mudah dikendalikan, dan kitosan yang dihasilkan memiliki berat molekul dan derajat deasetilasi tidak seragam (Chang, 1997 ;Tsigos, 2000). Hal ini karena proses deasetilasi rantai kitin yang berlangsung secara acak menghasilkan kitosan dengan derajat deasetilasi bervariasi (Tsigos, 1995; Kolodziejska, 2000; Win, 2001). Derajat deasetilasi minimal 70% umumnya dimanfaatkan untuk industri pangan, industri kosmetika dan biomedis sedikitnya 80 dan 90% (Tsugita, 1997).

Untuk memperoleh kitosan dengan derajat deasetilasi tertentu dapat dilakukan secara enzimatik dengan memanfaatkan CDA yang bekerja spesifik memotong gugus asetil dari kitin. Salah satu CDA yang berpeluang diaplikasikan untuk pembuatan kitosan adalah bakteri termofilik *Bacillus papandayan* isolat K29-14 yang berhasil diisolasi dari Kawah Kamojang Gunung Papandayan Garut Jawa Barat (Subianto, 2001). *Bacillus papandayan*K29-14 termasuk bakteri Gram positif berbentuk batang, berspora, dan motil dengan berat molekul 67 kDa; memiliki pH dan suhu optimum 8,0 dan 55°C, stabil terhadap panas selama 5 jam pada suhu 55° C, diaktifkan oleh ion Mg dan Na-asetat , namun dihambat ion Mn, Ca, dan Ni (Rahayu, 2004).

Berdasarkan hal tersebut di atas maka tujuan penelitian ini menganalisis derajat deasetilasi kitosan hasil aplikasi enzimatis CDA sebagai langkah awal pemanfaatan kitin dan kitosan yang lebih luas baik di industri pangan maupun biomedis.

[1)] Makalah ini disampaikan pada Seminar Nasional dan Kongres PATPI, Gedung II BPPT Lt 3 Jakarta tanggal 17-18 Desember 2004

2. Metodologi

Bahan-bahan yang digunakan: isolat *Bacillus papandayan*K29-14 hasil skrining koleksi Laboratorium Mikrobiologi dan Biokimia PAU Institut Pertanian Bogor, akuades, buffer borat pH 8, Na-bikarbonat 2%, I mM EDTA, K_2HP0_4, NaCl, $(NH_4)_2SO_4$, $MgS0_4.7H_20$, ekstrak kamir, bacto tripton , bacto agar, glikol kitosan, dan kitin komersial. Untuk pengukuran aktivitas enzim digunakan glikol kitin sebagai substrat, buffer dengan pH optimum, $NaNO_2$ 5%, asam asetat 33%, amonium sulfamat 12.5%, HCI 5%, Indol 0,1%, etanol absolut, glukosamin standar. Untuk produksi kitosan digunakan bahan kitin dari limbah pengolahan rajungan asal Cirebon, NaOH, HCl, Na-bikarbonat, asam asetat.

Alat-alat yang digunakan antara lain inkubator goyang, centrifuge, pH-meter, alat timbang, pipet mikro, bulb, peralatan gelas, evendorph, *fraction collector*, kolom kromatografi DEAE Sephadex A-50, spektrofotometer FDUV.

Produksi CDA

Media termus cair diinokulasikan dengan 10% (v/v) starter, diinkubasi pada inkubator goyang 150 rpm selama 2 hari. Hasil fermentasi disentrifuse pada 10.000 rpm selama 20 menit, filtrat yang berisi enzim diukur unit aktivitas (modifikasi Tokuyasu *et al.*, 1996) dan aktivitas spesifiknya (metode Bradford 1976).

Pemurnian CDA

Pemurnian CDA meliputi tahap pengendapan dengan amonium sulfat, dialisis, pemanasan 55^{o}C, dan kromatografi kolom. Filtrat bebas sel hasil produksi diendapkan dengan ammonium sulfat selama semalam pada suhu 4°C dengan konsentrasi 80% kelarutan, lalu disentrifuse selama 20 menit kecepatan 10.000 rpm (Jayanti, 2002). Peletnya dilarutkan dengan buffer borat 0.05 M pH 8 (1:1). Enzim hasil pengendapan dipanaskan 55^{o}C selama 24 jam untuk inaktivasi enzim non termofilik. Selanjutnya enzim didialisis (Boyer, 1986) dengan bufer borat 0.025M pH 8 dalam kantong dialisis. Pemurnian lebih lanjut dengan kromatografi kolom (Modifikasi Harris dan Angal, 1989) menggunakan matriks DEAE Sephadex A-50 (*anion exchanger*), eluen 20 mM Tris-Cl pH 7 yang mengandung NaCl 0,1 M (Rahayu, 2000)

Produksi Kitosan

Produksi kitosan bertahap dengan cara kimiawi dengan merendam tepung kitin dalan larutan NaOH 50% pada suhu 60^o C selama 0.5;1,3,dan 24 jam serta suhu 80oC selama 0.25;1,2, dan 3 jam. Tujuannya untuk memperoleh derajat deasetilasi 70%. Tahap berikutnya deasetilasi enzimatis dengan menginkubasi kitosan derajat deasetilasi hasil tahap kimiawi dengan CDA hasil pengendapan+$MgCl_2$ dan hasil kolom kromatografi selama 3,6,9,12, dan 24 jam. Pengukuran derajat deasetilasi kitosan dengan *First Derivative Ultra Violet* (FDUV) Spekrophotometry Perkin Elmer Lambda 25 (Khan, 2002)

3. Hasil dan Diskusi

Pemurnian CDA

Pemurnian CDA terdiri beberapa tahap yaitu presipitasi dengan ammonium sulfat 80% jenuh. Keuntungan menggunakan garam ammonium sulfat karena mempunyai kelarutan tinggi, pH moderat, relatif lebih murah, non toksik, dan tidak mempengaruhi enzim. Tahap kedua adalah inkubasi CDA hasil presipitasi pada suhu optimal 55oC selama 24 jam. Hal ini dilakukan untuk menghilangkan enzim-enzim lain yang non termostabil sehingga terdenaturasi dan mengendap setelah disentrifugasi pada 10.000 rpm selama 10 menit. Perlakuan pemanasan 40-60oC menyebabkan protein yang labil akan terdenaturasi (White, 1970). Tahap ketiga, dialisis dengan bufer borat 0.025M pH 8 tujuannya menghilangkan molekul garam dan kontaminan yang berpengaruh terhadap kestabilan enzim. Hal ini terjadi karena konsentrasi bufer di luar tabung dialisis lebih rendah sehingga molekul garam dan ion berdifusi ke luar. Tahap keempat adalah kolom kromatografi penukar ion menggunakan DEAE Sephadex A-50 dengan gradien linier NaCl (0-1 M) dan bufer TrisCl 0.1 M pH 7. Tahapan pemurnian CDA *Bacillus papandayan* K29-14dapat dilihat pada Tabel 1.

Pemurnian dengan perlakuan presipitasi, inkubasi 55^{o}C dan dialisis dapat meningkatkan aktivitas spesifik CDA masing-masing 2, 4, dan 9 kali. Presipitasi dengan amonium sulfat mampu meningkatkan aktivitas CDA dua kalinya,. Hal ini disebabkan presipitasi akan mengendapkan enzim, yang juga merupakan protein, sehingga konsentrasinya meningkat dalam larutan. Aktivitas CDA dari *C.lindemuthianum* meningkat enam kali dengan presipitasi 80% (Tokuyasu*,* 1996).Pemanasan 55^{o}C dapat meningkatkan aktivitas hampir empat kalinya sehingga perlakuan ini menjadi salah satu alternatif untuk seleksi enzim termostabil.

Tabel 1. Tahapan Pemurnian CDA *Bacillus papandayan* K29-14

Tahap	Aktivitas (U/ml)	Protein (mg/ml)	Akt.Spesifik (U/mg)	Kemurnian	Yield %
Filtrat bebas sel	0.005	0.085	0.058	1	100
Amonium sulfat	0.017	0.135	0.126	2.17	38
Inkubasi 55^{o}C	0.023	0.108	0.213	3.6	11
Dialisis	0.037	0.019	0.522	9	9
Kromatografi kolom	0.043	0.089	2.088	36	1.5

Pemurnian dengan kolom kromatografi DEAE Sephadex A-50 meningkatkan aktivitas CDA sebesar 36 kalinya. Hal ini sesuai dengan Ueda, 1995 yang memurnikan kitinase *Streptomyces* sp dengan kolom berhasil meningkatkan aktivitas 71 kalinya.

Derajat Deasetilasi

Derajat deasetilasi adalah suatu parameter mutu yang menunjukkan gugus asetil yang dapat dihilangkan dari rendemen kitosan. Semakin tinggi derajat deasetilasi kitosan, maka gugus asetil yang terdapat dalam kitosan tersebut semakin sedikit (Knoor, 1982). Derajat deasetilasi kitosan yang diperoleh secara kimiawi dengan penambahan NaOH 50% pada suhu dan waktu tertentu menggunakan metode Spektrometer FDUV dapat dilihat pada Tabel 2

Larutan NaOH yang digunakan untuk produksi kitosan bersifat reaktif sehingga mudah mereduksi air melalui reaksi yang sangat eksoterm dan larut dalam air. Tujuan penggunaan alkali konsentrasi tinggi (≥ 40%) untuk memutuskan ikatan antara gugus karboksil dengan atom nitrogen . Selain itu kitin lebih tahan terhadap proses deasetilasi dengan penambahan alkali, yang biasanya menimbulkan masalah pada senyawa bergugus N-asetil. Hal ini disebabkan karena struktur kitin yang tebal dan ikatan hidrogen diantara atom nitrogen sangat kuat serta mempunyai karboksil pada rantai berikutnya. Hal ini sesuai pula dengan pendapat Martinou*,* 1995 yang menyatakan bahwa larutan NaOH mampu merubah konformasi kitin yang sangat rapat menjadi renggang sehingga enzim lebih mudah terekspos untuk mendeasetilasi polimer kitin. Penggunaan konsentrasi NaOH yang tinggi pada proses deasetilasi akan menghasilkan rendemen kitosan yang memiliki derajat deasetilasi tinggi. Hal ini disebabkan gugus fungsional amino ($-NH_3^+$) yang mensubtitusi gugus asetil kitin di dalam sistem larutan semakin aktif, maka semakin sempurnalah proses deasetilasi (Arlius, 1989).

Suhu dan lama perendaman NaOH meningkat mengakibatkan derajat deasetilasi meningkat (Tabel 2). Derajat deasetilasi tertinggi setelah direndam NaOH pada 60^{o}C selama 24 jam dan 80^{o}C selama 3 jam. Kenaikan suhu sebesar 20^{o}C dari 60^{o}C menjadi 80^{o}C) dapat meningkatkan derajat deasetilasi sebesar 9,7% (dari 60.97% menjadi 70.70%) pada perendaman 1 jam dan 15% (dari 84.15% menjadi 99.41%) pada perendaman 3 jam. Sedangkan lama perendaman yang semakin tinggi dari 1 jam sampai 3 jam meningkatkan derajat deasetilasi sebesar 23.18% pada 60^{o}C dan 29% pada 80^{o}C. Dengan demikian kenaikan derajat deasetilasi lebih dipengaruhi oleh kenaikan suhu daripada perpanjangan waktu. Kolodziejska, 2000 menguatkan hal ini bahwa kenaikan derajat deasetilasi sebesar 8% (dari 68% menjadi 76%) dengan memperpanjang lama perendaman NaOH 50% dari 1.5 jam sampai 3 jam pada 60^{o}C. Suhu dan lama perendaman NaOH berpengaruh terhadap pemecahan rantai molekul kitin. Penggunaan suhu yang terlalu tinggi (di atas 150^{o}C) menyebabkan pemecahan ikatan polimer (depolimerisasi) rantai molekul kitosan sehingga menurunkan berat molekul kitosan. Sedangkan pada suhu di bawah 100^{o}C, pemutusan gugus asetil tidak berlangsung sempurna dan membutuhkan waktu lebih lama (Johson, 1982).

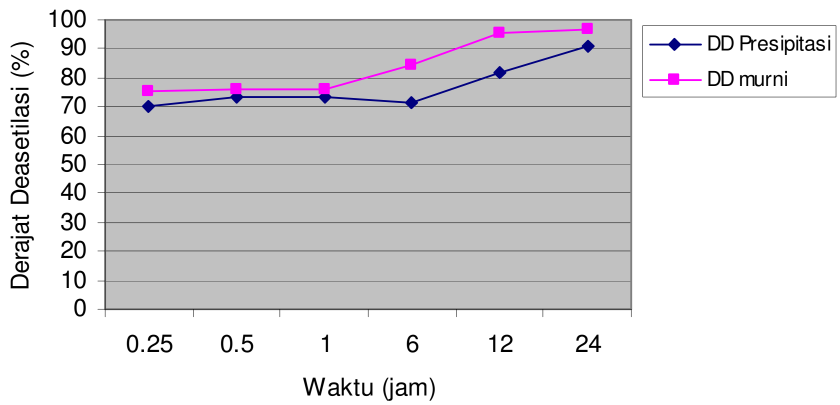
Tabel 2. Derajat deasetilasi kitosan hasil perlakuan kimiawi

Suhu (^oC)	Waktu (jam)	Derajat Deasetilasi (%)
60	0.5	52.51
	1.0	60.97
	3.0	84.15
	24	99.12
80	0.25	65.65
	1.0	70.70
	2.0	99.30
	3.0	99.41
Kitin Tanpa Perlakuan		38.02

Berdasarkan hal tersebut di atas, maka kitosan hasil perlakuan 80^{o}C selama 1 jam dipergunakan untuk deasetilasi enzimatis.

Deasetilasi enzimatis

CDA lebih mudah terekspos ke dalam substrat kitosan berbentuk *soluble* daripada bentuk tepung, karena dalam bentuk larutan reaksi menjadi lebih homogen di setiap bagian. Hal ini sesuai dengan Kolodziejska, 2000 yang mendeasetilasi *soluble* kitosan hingga mencapai derajat deasetilasi sampai 99%. Namun dengan CDA dari *M. rouxii* yang diekspos dalam bentuk kristalin dan amorf, kenaikan derajat deasetilasinya masing-masing hanya 0.5% dan 9.5% (Martinou, 1995). CDA dari *C.lindemuthianum* derajat deasetilasinya meningkat sekitar 0.5% dan 4.5% untuk kitin dalam bentuk yang sama (Tsigos dan Bouriotis, 1995).



Gambar 1. Grafik derajat deasetilasi kitosan 0.04 U/mg hasil pemurnian

Proses deasetilasi enzimatis dalam penelitian ini menggunakan enzim hasil presipitasi oleh ammonium sulfat 80% dengan hasil kolom kromatografi. Hasilnya bahwa secara umum peningkatan waktu inkubasi akan meningkatkan derajat deasetilasi kitosan sampai 24 jam. Pada enzim presipitasi, kenaikan derajat deasetilasi mencapai 12,5% (dari 70.23 menjadi 82.75), sedangkan enzim murni 20.4% (dari 75.23% menjadi 95.66%) (Gambar 2)

Kemurnian CDA mempengaruhi waktu pencapaian derajat deasetilasi antara 5-15% tergantung derajat deasetilasi awal. Semakin tinggi derajat deasetilasi awal, maka semakin kecil peningkatannya. Derajat deasetilasi di atas 90% hanya dapat dicapai pada kitosan dengan derajat deasetilasi awal di atas 70%. Hal ini kemungkinan karena dengan perlakuan awal secara kimiawi pada kitosan, konformasinya menjadi semakin mudah untuk diekspos oleh CDA. Selain itu pada enzim presipitasi, masih mengandung enzim lain seperti kitinolitik dan kitosanolitik selain CDA. Enzim selain CDA kemungkinan masih tertinggal dari preparasi kitosan sebelumnya dimana CDA tidak mampu bekerja pada substrat yang mengandung gugus N-asetil glukosamin kurang dari empat buah (Kafetzopoulos, 1993; Kolodziejska, 1997).

Derajat deasetilasi 80% diperoleh hanya dalam waktu 6 jam untuk enzim murni sedangkan untuk enzim presipitasi sampai 12 jam. Selain itu derajat deasetilasi 95% tercapai setelah inkubasi selama 12 jam untuk enzim murni, sedangkan enzim presipitasi baru mencapai 85%. Penggunaan CDA murni dapat mempercepat derajat deasetilasi sesuai dengan Martinou, 1995 yang menggunakan CDA dari *M. rouxii* mampu meningkatkan derajat deasetilasi sampai 14% (dari 58% menjadi 72%).

4.Kesimpulan

Produksi kitosan secara kimiawi dapat meningkatkan derajat deasetilasi polimer kitin. Dengan meningkatnya suhu dam lama perendalaman dalam larutan alkali, semakin tinggi pula derajat deasetilasinya sampai 99%. Semakin murni enzim yang digunakan maka kecepatan deasetilasi semakin tinggi. Kitosan dengan derajat deasetilasi 80% diperoleh dengan enzim murni setelah masing-masing 6 dan 12 jam, sedangkan 90% selama 12 dan 24 jam.

Ucapan Terimakasih

Penelitian ini dibiayai oleh Research Grant Program B Jurusan Teknologi Pangan dan Gizi, Institut Pertanian Bogor tahun 2004.

Daftar Pustaka

Boyer, R.F.. (1986), "*Modern Experimental Biochemistry*. The Benjamin/Cummings Pub.Co.Inc. Canada.

Bradford, M.M., (1976). Anal.Biochem. 72:248-254, "*A Rapid and Sensitive Method for The Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding*" Di dalam; D.M. Bollang dan S.J. Edelstein. Protein Methods. John Wiley & Sons, Inc., Publication,Oxford.

Dodane, V., Vilivalam V.D. (1998), " *Pharmaceutical applications of chitosan. Research Focus 1:246-253*

Harris, E.L.V. dan Angal, S., (1989), " *Protein Purification Methods*. Oxford University. Press. New York.

Hirano, S. (1996), *"Chitin biotechnology applications." J. Biotecnol. Annu. Rev. 2:237-258*

Jayanti, J.F.L., (2002), "Studi Kitinase dan Kitin Deasetilase Termostabil Dari Isolat Asal Manado". Skripsi FATETA, IPB.

Kafetzopoulos, D., Martinou, A. , dan Bouriotis, V., (1993). *Bioconversion of Chitin to Chitosan Purification dan Characterization of ChitinDeacetylase from Mucor Rouxii*. J. Appl. Bio.Sci (90): 2564-2568.

Khan, T.A., K. Kok dan S. Hung. (2002)., *"Reporting degree of deacetylastion values of chitosan; the influence of analytical methods." J. Pharm. Pharmaceut. Sci., 5:205-212*

Kolodzjieska, I., A. Wojtasz-Pajak, G. Ogonoskwa, dan Z.E. Sikorski. 2000' *" Deacetylation of chitin in two-stage chemical and enzymatic process, " Bul. Sea. Fisheries Inst., 2(150):15-24*

Martinou, A.D., D. Kafetzopoulos dan V. Bouriotis. (1995)*, "Chitin deacetylation by enzymatic means: monitoring of deacetylation processes." J. Carbohyd. Res., 273:235-242*

Muzzarelli dan M.G. Peter ., (1997), "*Chitin Handbook*." European Chitin Society. Italy.

Patil, R. S., V. Ghormade dan M.V., Deshpande., (1999), "*Chitinolytic Enzymes An Exploration*."
J. Enzyme and Microbial Technol. 26.473-483.

Rahayu, S., Tanuwijaya F., Rukayadi Y., Suwanto A., Suhartono M.T., Hwang J.K., Pyun Y.R., (2004). *," Study of thermostable chitinase enzymes from Indonesian Bacillus K29-14." J. Microbiol. Biotech. 14(4): 647-652*.

Subianto, Y., (2001)., "Isolasi dan Pemilahan Bakteri Termofilik Penghasil Enzim Kitinase dan Kitin Deasetilase Dari Isolat Beberapa Daerah di Indonesia." Skripsi. FATETA .IPB

Tokuyasu, K., Ono, H., Hayasi, K., dan Mori, Y., (1996). *" Purification and Characterization of Extracellular Chitin Deacetylase from Colletotricum lindemuthianum." J.Biosc. Biotech. Biochem*. Vol (10) : 1598-1603.

Tsigos I., dan V. Bouriotis. (1995)*," Purification and characterization of chitin deacetylase from Colletotrichum lindemuthianum," J. Biol.Chem. 270:26286-26291*

Tsigos, I., Martinou, A., Kafetzopoulos. D., Bouriotis, V., (2000), "*Chitin Deacetylas*e *:New, Versatile Tools in Biotechnology."* TIBTECH 18: 305-311.