

**Karakteristik Kitosan Hasil Deasetilasi
Enzimatis Oleh Kitin Deasetilase
Isolat *Bacillus papandayan* K29-14**

Emma Rochima.¹⁾ M.T.Suhartono²⁾, Dahrul Syah²⁾, Sugiyono²⁾

¹⁾ Mahasiswa Jurusan Ilmu dan Teknologi Pangan Institut Pertanian Bogor
Alamat korespondensi:

Emma.Rochima@gmail.com

²⁾ Jurusan Ilmu dan Tekonologi Pangan, Institut Pertanian Bogor,
PO Box 220, Kampus Darmaga,
Bogor 16002

ABSTRAK

Kitin, polimer berantai lurus tersusun atas residu N-asetilglukosamina melalui ikatan β -(1,4) merupakan polisakarida paling berlimpah di alam setelah selulosa. Kitin dideasetilasi secara termokimiawi dan enzimatis menghasilkan kitosan.

Penelitian ini bertujuan mengkarakterisasi kitosan hasil aplikasi enzim kitin deasetilase isolat *Bacillus papandayan* K29-14 asal Kawah Kamojang Jawa Barat. Karakteristik kitosan meliputi derajat deasetilasi, viskositas dan berat molekul. Enzim hasil pengendapan ammonium sulfat 80% jenuh dengan aktivator $MgCl_2$ 1 mM (aktivitas enzim 0,04 Unit) ditambahkan pada *soluble* kitosan 1% dengan derajat deasetilasi awal 70%. Selanjutnya diinkubasi pada 55 °C selama 24 jam. Derajat deasetilasi kitosan diukur dengan menggunakan *First Derivative Ultra Violet* Spektrofotometry, viskositas dengan viskometer *Ubbelohde*, dan berat molekul berdasarkan persamaan Mark-Houwink. Kesimpulan penelitian bahwa deasetilasi enzimatis dapat meningkatkan derajat deasetilasi lebih dari 90% apabila derajat deasetilasi awal 70%. Namun viskositas

menurun dari 6,93 ml/g menjadi 4,87 ml/g. Demikian pula berat molekul kitosan menurun dari $6,05 \times 10^3$ menjadi $4,13 \times 10^3$. Hasil penelitian ini diharapkan dapat dimanfaatkan untuk meningkatkan nilai ekonomis limbah hasil perikanan, khususnya rajungan.

Kata kunci : Karakteristik, kitin deasetilase, Bacillus papandayan K29-14, kitosan

PENDAHULUAN

Indonesia sebagai negara bahari, sangat kaya akan potensi hewan bertulang keras (*Crustacea*) termasuk rajungan. Rajungan selain dimanfaatkan dagingnya untuk dikalengkan, cangkangnya juga sangat berguna sebagai bahan baku kitin.

Kitin adalah polimer berantai lurus yang tersusun atas residu N-asetilglukosamina melalui ikatan β -(1,4). 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).

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 dan Vilivalam, 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).

Sebagai alternatif, produksi kitosan secara enzimatik kini tengah menjadi perhatian. Di samping ramah lingkungan, produk kitosan yang dihasilkan memiliki derajat deasetilasi relatif lebih seragam. Enzim yang digunakan adalah enzim kitin deasetilase (*chitin deacetylase* = CDA) yang bekerja spesifik memotong gugus asetil dari kitin menjadi kitosan. Salah satu CDA yang berpotensi diaplikasikan untuk pembuatan kitosan adalah bakteri termofilik *Bacillus papandayan* isolat K29-14 yang berhasil diisolasi dan dikarakterisasi dari Kawah Kamojang Gunung Papandayan Garut Jawa Barat (Subianto 2001; Rahayu 2004).

Aplikasi CDA dalam pembuatan kitosan masih sangat terbatas. Untuk itu penelitian ini bertujuan mengkarakterisasi kitosan hasil deasetilasi enzimatik sebagai langkah awal pemanfaatan kitin dan kitosan yang lebih luas baik di industri pangan maupun biomedis.

METODE PENELITIAN

Metode

Produksi CDA

Isolat *Bacillus papandayan* K29-14 sebagai produsen CDA merupakan koleksi Laboratorium Mikrobiologi dan Biokimia PAU Institut Pertanian Bogor. Kultur diinkubasi dalam media termus pada 55 °C selama dua hari, hasilnya dipanen dengan disentrifugasi 10.000 rpm selama 20 menit.

Filtrat bebas sel diuji unit aktivitas CDA dengan metode Tokuyasu *et al.* 1996 dan kadar protein dengan metode Bradford 1976.

Produksi kitosan kimiawi

Tepung kitin yang berasal dari limbah rajungan asal Cirebon direndam dalam larutan NaOH 50% pada 80 °C selama 1 jam (Rochima, 2005). Tujuannya untuk memperoleh derajat deasetilasi minimal 50%. Kitin hasil perendaman dibilas dengan air sampai pH netral, dikeringkan dan diukur derajat deasetilasinya menggunakan metode *First Derivative Ultra Violet* (FDUV) Spektrofotometri Perkin Elmer Lambda 25 (Khan, 2002).

Deasetilasi enzimatik

Kitosan hasil produksi kimiawi dibuat dalam bentuk larutan (*soluble*) 1% dengan metode Uchida & Ohtakara 1988. Selanjutnya CDA hasil presipitasi amonium sulfat 80% 1 mM berkekuatan 0,04 Unit dicampurkan ke dalam 1 ml larutan kitosan 1% lalu diinkubasi 55 °C selama 24 jam. Karakterisasi kitosan hasil deasetilasi enzimatik meliputi derajat deasetilasi, viskositas dan berat molekul

Kadar Protein Metode Bradford (1976)

Banyaknya pewarna khusus yang diikat oleh protein menjadi dasar metode ini. Sampel 0,1 ml direaksikan dengan pereaksi Bradford 2 ml dalam tabung reaksi lalu divorteks, lalu diinkubasi selama 30 menit pada suhu ruang. Absorbansinya diukur pada panjang gelombang 595 nm, dan hasilnya dibandingkan dengan kurva standar yang telah dibuat sebelumnya dengan standar BSA. Bufer pengganti larutan protein digunakan sebagai blanko.

Aktivitas CDA (Tokuyasu *et al.* 1996)

Pengukuran unit aktivitas CDA dan konsentrasi protein sampel dilakukan pada setiap akhir tahap pemurnian, sehingga diperoleh nilai aktivitas per mililiter (U/ml).

Satu unit aktivitas enzim CDA didefinisikan sebagai jumlah produk glukosamin yang dihasilkan permenit pada suhu 55 °C.

Tahapan pengukuran aktivitas ini adalah larutan digesti yang terdiri dari 50 µl substrat glikol kitin 1%, 100 µl buffer dan 150 µl enzim diinkubasi selama 30 menit pada suhu 55 °C, direbus selama 7 menit, untuk kontrol enzim yang ditambahkan adalah enzim yang telah direbus selama 5 menit.

Larutan digesti sebanyak 200 µl ditambahkan 200 µl asam asetat 33% dan 200 µl NaNO₂ 5%, kemudian divorteks dan didiamkan 10 menit pada suhu ruang. Setelah itu ditambahkan 200 µl amonium sulfamat 12.5% dan dilakukan deaminasi sambil digoyang selama 30 menit pada suhu ruang. Selanjutnya ditambahkan 800 µl HCl 5% dan 80µl indol 0,1%, direbus selama 10 menit. Setelah dingin, absorbansinya dibaca pada 492 nm untuk mengukur konsentrasi glukosamin yang terbentuk hasil reaksi dengan indol, namun sebelum diukur dilakukan penambahan 800 µl etanol absolut. Sebagai standar digunakan 200 µl glukosamin standar dengan konsentrasi 50 ng/ml. Aktivitas enzim dihitung dengan rumus :

$$[\text{Glc}] = \frac{\{(A_s - A_{\text{blk}}) - (A_k - A_{\text{blk}})\}}{A_{\text{std}} - A_{\text{blk}}} \times [\text{Glc}]_{\text{Std}}$$

Akt.CDA=[(Vol reaksi.1000.Glc_{std})/(Vol diambil. Vol enzim. Waktu Inkubasi.BM)]

A_s : Absorbansi sampel
A_{std} : Asorbansi standar
A_k : Absorbansi kontrol
BM : Berat Molekul Glukosamin
[Glc]_{standar} : Konsentrasi glukosamin standar

Karakterisasi kitosan

a. Derajat deasetilasi (Muzzarelli, 1997)

Pengukuran derajat deasetilasi kitosan ditentukan dengan metode spektroskopi UV turunan pertama (*First Derivate Ultraviolet Spectrophotometry*) Dengan metode FDUV spektra turunan pertama diperoleh dari hasil pertemuan titik 0,01 M; 0,02 M dan 0.03 M asam asetat pada panjang gelombang 202 nm yang disebut dengan *Zero Crossing Point (ZCP)*. Ketinggian spectra (H) dari N-asetil glukosamin konsentrasi 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 mg/ml dalam 0.01 M asam asetat diukur mulai titik ZCP sampai tinggi spektra tertinggi dari masing-masing konsentrasi sehingga diperoleh plot antara konsentrasi N-asetil glukosamin dengan H. Persamaan kurva standarnya adalah H=f(C). Persentase derajat deasetilasi dihitung dengan rumus:

$$\% \text{Derajat Deasetilasi} = 100 - \{H=f(C)\}$$

{H=f(C)} = Derajat asetilasi yang diperoleh dari kurva N-asetilglukosamin (mg/ml) terhadap tinggi spektra (mm)

Viskositas Kitosan (Hwang *et al.* 1997)

Viskositas kitosan diukur menggunakan Ubbelohde *dilution viscometer* yang dicuci dengan akuades dan dikeringkan terlebih dahulu. Larutan kitosan dibuat dalam berbagai konsentrasi dalam pelarut asam asetat aqueous 0.1 M dan sodium asetat 0.25 M. Masing-masing sampel ditempatkan di dalam viskometer sebanyak 10 ml. Sampel ditarik hingga ke labu di bagian atas viskometer secara perlahan. Waktu yang dibutuhkan sampel untuk mengalir antara dua batas yang mengapit labu tersebut dicatat. Sebagai blanko, digunakan pelarut asam asetat aqueous 0.1M dan sodium asetat 0.25 M dan ditentukan viskositasnya dengan cara yang

sama. Viskositas spesifik dihitung dengan cara berikut:

$$y_{sp} = \frac{t - t_0}{t_0}$$

η_{sp} = viskositas spesifik (detik)
 t = waktu yang diperlukan untuk mengalirnya larutan sampel (detik)
 t_0 = waktu yang diperlukan untuk mengalirnya larutan solven (detik)

Dengan cara ini akan diperoleh nilai viskositas spesifik, yang tidak mempunyai satuan. Viskositas kinematik dihubungkan dengan viskositas spesifik melalui koefisien kinematik yang besarnya tergantung pada viskometer kapiler yang digunakan (Harrington 1984). Viskositas kinematik dihitung dengan menggunakan rumus sebagai berikut:

$$\eta_{kin} = t \times k_{kin}$$

η_{kin} = viskositas kinematik (centistokes= cSt)

t = waktu yang diperlukan untuk mengalirnya larutan sampel (detik)

k_{kin} = koefisien kinematik viskometer Ubbelohde tipe 1B M 132

$$= 0.009671 \text{ cSt per detik}$$

Walaupun terminologi viskositas kinematik lebih umum digunakan, viskositas spesifik tetap digunakan sebab nilainya diperlukan untuk penentuan viskositas intrinsik dan berat molekul.

Berat Molekul Kitosan (Hwang *et al.* 1997)

Berat molekul kitosan ditentukan berdasarkan viskositas intrinsik menurut persamaan Mark-Houwink berikut ini:

$$[\eta] = KM^a$$

$[\eta]$ = viskositas intrinsik (ml/g)

K = konstanta untuk pelarut (ml/g)

a = konstanta

M = berat molekul

Viskositas intrinsik kitosan dapat ditentukan apabila nilai K dan a untuk pelarut yang digunakan telah diketahui. Pada penelitian ini pelarut yang digunakan adalah asam asetat 0.1 M/sodium asetat 0.25 M yang nilai K dan a belum diketahui. Oleh karena itu terlebih dahulu dilakukan pengukuran viskositas intrinsik dari lima kitosan standar dengan menggunakan pelarut asam asetat 0.1 M/NaCl 0.2 M yang memiliki nilai K dan a yaitu 1.81×10^{-3} ml/g dan 0.93. Kedua nilai tersebut dimasukkan ke dalam persamaan Mark-Houwink hingga diperoleh nilai berat molekul untuk kelima kitosan standar.

Selanjutnya kelima kitosan standar yang sama dilarutkan dalam asam asetat 0.1 M/sodium asetat 0.25 M pada berbagai konsentrasi lalu viskositas intrinsik diukur dengan cara yang sama. Nilai viskositas intrinsik ini dan berat molekul yang telah diperoleh sebelumnya dengan pelarut asam asetat 0.1 M/NaCl 0.2 M, digunakan untuk menentukan K dan a untuk pelarut asam asetat 0.1 M/sodium asetat 0.25 M dengan melinearkan persamaan Mark-Houwink, sebagai berikut:

$$\log[\eta] = \log K + a \log M$$

HASIL DAN PEMBAHASAN

Produksi CDA

Morfologi dan karakterisasi isolat *Bacillus papandayan* penghasil enzim CDA menurut Rahayu *et al.* 2004 sebagai berikut: Termasuk bakteri Gram positif berbentuk batang, berspora, dan motil. Kondisi optimum produksi enzim pada pH 7 dan suhu 55 °C. Filtrat bebas selnya dipanen pada tahap stationer jam ke 28-32 masa inkubasi. Aktivitas deasetilase optimum pada pH 8 dan suhu 55 °C, serta diaktifkan oleh MgCl₂ 1 mM.



Gambar 1. Koloni *Bacillus papandayan* K29-14 dalam media termus padat

Derajat deasetilasi

Derajat deasetilasi kitosan awal hasil deasetilasi kimiawi sebesar 70,7% kemudian meningkat menjadi 87,81% setelah dideasetilasi enzimatis dengan kekuatan 0,04 Unit.

Derajat deasetilasi menunjukkan banyaknya jumlah residu asetil yang belum terpotong. Lebih banyak residu asetil menunjukkan lebih banyak substrat yang tersedia untuk reaksi enzim. Sesuai dengan kinetika enzim, semakin banyak substrat yang tersedia, laju reaksi akan semakin cepat dan akan menurun jika jumlah substrat berkurang (Suhartono 1989). Diduga hal inilah yang menyebabkan peningkatan derajat deasetilasi setelah deasetilasi enzimatis terjadi lebih tinggi pada kitosan dengan derajat deasetilasi awal lebih rendah.

Kitosan hasil kimiawi dilarutkan dalam asam asetat 0.1 M sampai konsentrasi akhir 1% dengan pH 4. Selanjutnya ditambahkan Na-asetat 0.25 M untuk meningkatkan pH menjadi 6. Hal ini dimaksudkan agar larutan tidak mengendap pada pH 4, namun tetap dalam bentuk

soluble, juga agar enzim CDA lebih aktif. Kenaikan pH hanya sampai dengan pH 6 walaupun CDA baru bekerja optimum pada pH 8, disebabkan jika pH terlalu tinggi, kitosan akan mengendap kembali. Rahayu *et al.* (2004) menyatakan bahwa Na-asetat tidak menghambat aktivitas CDA.

Selain itu CDA lebih mudah penetrasi ke dalam substrat berbentuk *soluble* kitosan daripada bentuk tepung, karena dalam bentuk *soluble* 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).

Kolodziejska *et al* (2000) menggunakan CDA ekstrak kasar dari *Mucor rouxii* sebesar 40 mU/ml *soluble* kitosan. Deasetilasi enzimatis mampu meningkatkan derajat deasetilasi kitosan mulai 5-30%, semakin tinggi derajat deasetilasi awal maka peningkatan derajat deasetilasi semakin rendah. Derajat deasetilasi di atas 90% dapat dicapai pada sampel dengan derajat deasetilasi awal di atas 75%. Hal ini diduga karena reaksi kimiawi pada awal pembuatan kitosan mengakibatkan konformasi semakin merenggang sehingga enzim lebih mudah mendeasetilasi.

Derajat deasetilasi juga dipengaruhi oleh jumlah enzim yang ditambahkan. Pada umumnya semakin banyak enzim ditambahkan, maka derajat deasetilasi semakin tinggi, namun kisaran peningkatannya kecil. Hal ini kemungkinan karena kisaran enzim yang digunakan tidak

terlalu luas sehingga pengaruhnya belum signifikan.

Hubungan Derajat Deasetilasi, Viskositas Intrinsik dan Berat Molekul Kitosan

Untuk mengamati hubungan antara perlakuan perendaman dengan NaOH terhadap viskositas dan berat molekul, sampel kitosan hasil perendaman pada suhu 80 °C dengan waktu 1 dan 2 jam. Kedua sampel dipilih karena derajat deasetilasi yang tinggi (di atas 70%) dan adanya perbedaan yang signifikan antara keduanya dalam hal derajat deasetilasi dan kelarutan (Tabel 1) berikut.

Tabel 1 Hubungan derajat deasetilasi kitosan dengan viskositas intrinsik dan berat molekul

Sebelum Deasetilasi Enzimatis			Setelah Deasetilasi Enzimatis		
Derajat Deasetilasi (%)	Viskositas Intrinsik (ml/g)	Berat Molekul (10 ³)	Derajat Deasetilasi (%)	Viskositas Intrinsik (ml/g)	Berat Molekul (10 ³)
70.70	31.17	30.697	87.81	6.93	6.05
99.3	499.07	613.853	99.36	4.87	4.13

Nilai viskositas intrinsik kitosan sebelum dideasetilasi enzimatis meningkat 16 kali (dari 31.17 menjadi 499.07 ml/g) dengan meningkatnya derajat deasetilasi sebesar 28.6% (dari 70.7% menjadi 99.3%). Nilai viskositas intrinsik dipengaruhi oleh derajat deasetilasi, konsentrasi, berat molekul, kekuatan ion, pH dan suhu saat pengukuran (Dunn *et al.* 1997).

Hubungan antara derajat deasetilasi dengan viskositas intrinsik pada berat molekul yang sama dari kitosan dijelaskan oleh Wang (1991). Rigiditas/kekakuan rantai kitosan dalam larutan menurun dengan meningkatnya derajat deasetilasi. Hal ini disebabkan adanya ikatan hidrogen antara segmen rantai dalam struktur kitin. Adanya dua ikatan hidrogen intramolekuler yang membatasi rotasi gugus asetamido (-NHCOCH₃), gugus hidroksimetil (HOCH₂) dan ikatan glikosidik -1.4 dari cincin glukopiranosida dalam rantai kitosan. Setelah proses deasetilasi, gugus asetamido berubah menjadi amido sebagian atau seluruhnya. Atom nitrogen tidak dapat membentuk ikatan hidrogen ke-II disebabkan adanya protonasi amido dengan H⁺ sehingga hambatan berotasi menjadi berkurang atau bahkan hilang. Dengan demikian rigiditas kitosan menurun dan kelarutan (*softness*) meningkat saat derajat deasetilasi meningkat. Semakin tinggi derajat deasetilasi, residu amina semakin banyak, muatan positif kitosan juga akan semakin banyak. Di dalam larutan, tingginya muatan positif akan menghasilkan gaya tolak menolak, yang akan membuat polimer kitosan yang sebelumnya berbentuk gulungan, membuka menjadi rantai lurus. Sebagai akibatnya, viskositas larutan akan meningkat.

Peningkatan viskositas intrinsik sebelum deasetilasi enzimatis sebesar 16 kali dapat meningkatkan berat molekul sekitar 20 kali. Berat molekul berhubungan dengan derajat polimerisasi. Polimer rantai lurus seperti kitosan akan menunjukkan peningkatan densitas jika derajat polimerisasi bertambah. Dengan demikian, viskositas intrinsik juga akan meningkat. Wang *et al.* (1991) menunjukkan hubungan linier antara nilai log viskositas intrinsik dengan nilai log berat molekul, untuk larutan kitosan dengan derajat deasetilasi sama.

Setelah deasetilasi enzimatis, derajat deasetilasi kitosan meningkat (dari 87.81% menjadi 99.36%) tetapi menurunkan viskositas intrinsik (6.93 ml/g menjadi 4.87 ml/g) dan berat molekul (dari 6.05×10^3 menjadi 4.13×10^3). Penurunan viskositas hanya mungkin terjadi jika selama inkubasi dengan enzim terjadi degradasi rantai polimer atau depolimerisasi. Dugaan ini dikonfirmasi oleh nilai berat molekul yang juga menurun selama deasetilasi enzimatis.

Penurunan viskositas setelah deasetilasi enzimatis juga dilaporkan oleh Kolodziejska *et al* (2000). Viskositas larutan kitosan menurun sebesar satu log setelah inkubasi dengan enzim selama 16 jam. Akan tetapi Kolodziejska *et al.* (2000) tidak melakukan penentuan berat molekul sehingga tidak dapat dilakukan perbandingan. Enzim CDA yang digunakan telah diberi perlakuan pengendapan pada pH 4.

Depolimerisasi diduga karena adanya enzim-enzim pendegradasi kitin dan kitosan yang lain di dalam ekstrak enzim CDA dari *Bacillus* K29-14. Rahayu (2000) telah mengisolasi kitinase dari *Bacillus* K29-14 selain CDA dan mungkin juga terdapat kitosanase. Beberapa protease juga dapat menyebabkan depolimerisasi kitin dan kitosan (Muzzarelli 1997), dan bukan tidak mungkin disekresi juga oleh *Bacillus* K29-14. Sekresi protease mungkin terjadi karena diinduksi oleh adanya protein dalam medium pertumbuhan, yang dapat berasal dari komponen medium, seperti *yeast extract*, atau dari enzim-enzim yang disekresi oleh mikroba ke medium untuk memenuhi kebutuhan nutrisinya. Kitosan yang memiliki berat molekul yang lebih besar lebih sensitif terhadap depolimerisasi dan tidak terjadi perubahan struktur selama proses tersebut yang terdeteksi oleh spektrofotometer infra red dan proton *nuclear magnetic resonance* (Mao *et al.* 2004).

Selain diakibatkan oleh depolimerisasi karena aktivitas enzim lain, penurunan viskositas setelah deasetilasi enzimatis juga dapat disebabkan karena penanganan setelah inkubasi selesai. Inaktivasi enzim dengan cara pemanasan pada 100 °C selama 15 menit dapat menyebabkan depolimerisasi berlanjut, demikian juga dengan penyimpanan sebelum analisis lebih lanjut. Penyimpanan dilakukan karena analisis derajat deasetilasi dengan metode FDUV dan penentuan viskositas dengan viskometer Ubbelohde dapat memakan waktu beberapa hari.

Variasi waktu dan lama perendaman alkali terhadap kitin dapat menghasilkan kitosan dengan derajat deasetilasi yang berbeda-beda. Proses yang dipilih akan tergantung pada tujuan aplikasi kitosan. Masing-masing bentuk aplikasi membutuhkan kitosan dengan karakteristik yang berbeda-beda. Kitosan dengan derajat deasetilasi tinggi, lebih dari 85%, dan berat molekul rendah dibutuhkan sebagai antibakteri, antifungi, antioksidan, antitumor dan *immunoenhancing*. Untuk aplikasi sebagai membran dan pengemas dibutuhkan kitosan dengan derajat deasetilasi sekitar 70% dan berat molekul tinggi.

Penelitian ini menghasilkan kitosan dengan berat molekul rendah, sehingga akan lebih tepat diaplikasikan sebagai antibakteri, antifungi, antioksidan dan antitumor. Emmawati (2004) telah memproduksi kitosan dari limbah kulit udang menghasilkan berat molekul kitosan 29-104 melalui tahapan kimiawi dengan larutan NaOH 60% dan deasetilasi enzimatis menggunakan enzim kitin deasetilase hasil presipitasi amonium sulfat. Hasil penelitian Brzezinski *et al.* 2004 menunjukkan bahwa kitosan yang memiliki berat molekul medium (30 kDa) ternyata mempunyai aktivitas anti kolesterol yang lebih tinggi daripada kitosan berat molekul tinggi (250 kDa).

SIMPULAN DAN SARAN

Simpulan

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa deasetilasi enzimatis dapat meningkatkan derajat deasetilasi di atas 90% apabila derajat deasetilasi awal di atas 70%. Deasetilasi enzimatis menurunkan viskositas intrinsik (dari 6.93 sampai 4.87 ml/g) dan berat molekul (dari 6.05 sampai 4.13×10^3).

Saran

Studi aplikasi CDA yang lebih murni perlu dilakukan untuk meningkatkan kecepatan deasetilasi kitosan.

Ucapan terima kasih

Penulis menyampaikan ucapan terima kasih kepada Research Grant Program B Jurusan Teknologi Pangan dan Gizi, Institut Pertanian Bogor tahun 2004 yang telah membiayai pelaksanaan penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Bradford M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254.
- Brzezinski R, LeHoux JG, Kelly A. 2004. Clinical studies on the innocuousness of chitosan and its short-chain derivative generated by enzymatic hydrolysis. *Asia Pac J Clin Nutr*, 13:S96
- Chang KLB., G.Tsai, J. Lee dan W. Fu. 1997. Heterogenous N-deacetylation of chitin in alkaline solution. *Carbohydr Res* 303:327-332
- Dhiman Harpreet K. Ray AR, Panda AK. 2004. Characterization and evaluation of chitosan matrix for in vitro growth of MCF-7 breast cancer cell lines. *Biomat* 25:5147-5157
- [DKP] Departemen Kelautan dan Perikanan Republik Indonesia. 2003. Perkembangan ekspor komoditi hasil perikanan Indonesia 1998-2002. url: <http://www.dkp.go.id/>
- Dodane V, Vilivalam VD. 1998. Pharmaceutical applications of chitosan. *PSTT* 1:246-253
- Dunn, ET., EW. Grandmaison dan MFA. Goosen. 1997. Applications and properties of chitosan. Di dalam MFA. Goosen (ed). Applications of Chitin and Chitosan. *Technomic Pub*, Basel, p 3-30
- Emmawati A. 2004. Produksi kitosan dengan perlakuan kimia dan enzimatis menggunakan NaOH dan kitin deasetilase. [Tesis]. Fateta IPB
- Harrington R.E. 1984. Viscosity. Di Dalam D.W. Gruenwedel dan J.R. Whitaker. Food Analysis: Principles and Techniques, Vol 2, Physicochemical Techniques. Marcel Dekker, Inc., New York
- Hirano S. 1996. Chitin biotechnology applications. *Biotechnol Annu Rev*, 2:237-258
- Hwang JK, SP Hong, CT Kim. 1997. Effect of molecular weight and NaCl concentration on dilute solution properties of chitosan. *J Food Sci Nutr* 2: 1-5
- Khan, TA., K. Kok dan S. Hung. 2002. Reporting degree of deacetylation values of chitosan: the influence of

- analytical methods. *J Pharm Pharmaceut Sci* 5:205-212
- Kolodziejska I, Wojtasz-Pajak A, Ogonowska G, and Sikorski Z E. 2000. Deacetylation of chitin in two-stage chemical and enzymatic process. *Bull Sea Fish Inst*, 150:15-24
- Mao S, Shuai X, Unger F, Simon M, Bi D, Kissel T. 2004. The polymerization of chitosan: effects on physicochemical and biological properties. *Int J Pharm*, 281:45-54
- Martinou, A., D. Kafetzopoulos dan V. Bouriotis. 1995. Chitin deacetylation by enzymatic means: monitoring of deacetylation processes. *Carbohydr Res* 273:235-242
- Muzzarelli, RAA. 1997. Depolymerization of chitins and chitosans with hemicellulase, lysozyme, papain, and lipases. Di Dalam RAA. Muzzarelli dan MG Peter (ed). Chitin Handbook. European Chitin Soc, Grottamare
- Patil, R. S., V. Chormade, and M. V. Desphande. 2000. Chitinolytic enzymes an exploration. *Enz Microb Technol* 26:473-483.
- Rahayu S., Tanuwijaya F., Rukayadi Y., Suwanto A., Suhartono, MT., Hwang JK., Pyun YR. 2004. Study of thermostable chitinase enzymes from Indonesian *Bacillus* K29-14. *J Microbiol Biotech* 4:647-652
- Rochima, E. 2005. Aplikasi kitin deasetilase termostabil dari *Bacillus papandayan* K29-14 asal Kawah Kamojang Jawa Barat pada pembuatan kitosan. Tesis Pascasarjana IPB. Bogor
- Subianto Y. 2001. Isolasi dan pemilahan bakteri termofilik penghasil enzim kitinase dan kitin deasetilase dari isolat beberapa daerah di Indonesia [Skripsi]. Fateta IPB
- Suhartono M.T. 1989. Enzim dan Bioteknologi. Pusat Antar Universitas Bioteknologi, IPB
- Tokuyasu, K., M. O. Kameyama, and K. Hayashi. 1996. Purification and characterization of extracellular chitin deacetylase from *Colletotrichum lindemuthianum*. *Biosci Biotech Biochem* 10:1598-1603.
- Tsigos, I., A. Martinou, Kafetzopoulos and V. Bouriotis. 2000. Chitin deacetylases: New versatile tools in biotechnology. *TIBTECH Rev*, 18: 305-312.
- Tsigos I. dan V. Bouriotis. 1995. Purification and characterization of chitin deacetylase from *Colletotrichum lindemuthianum*. *J Biol Chem*, 270:26286-26291
- Tsugita T. 1997. Chitin/chitosan and their application. *Biosci Res* Lab Katokichi Ltd. Japan
- Uchida Y dan Ohtakara A. 1998. Chitosanase from *Bacillus* species methods in Enzymology, 161:501-506
- Wang W, S. Bo, S. Li, W. Qin. 1991. Determination of Mark-Houwink equation for chitosans with different degrees of deacetylation. *Int J Biol Macromol*, 13:281-285
- Win, N.N. dan W.F. Steven. 2001. Shrimp chitin as substrate for fungal chitin

deacetylase. *Appl Microbiol*
Biotechnol, 57: 334-341