
PEMBUATAN KITOSAN DARI CANGKANG KEPITIN MENGGUNAKAN MIKROBA

Andi Artiningsih

*Jurusan Teknik Kimia, Fakultas Teknologi Industri, Universitas Muslim Indonesia
Jl. Urip Sumohardjo km.5 makassar, Indonesia 90231
andiartiningsih@yahoo.com*

INTISARI

Telah dilakukan penelitian tentang biokonversi kitosan dari cangkang kepiting dengan menggunakan mikroba Thermofilik. Hasil yang diperoleh bahwa Isolat M-1 menghasilkan enzim kitin deasetilase dan kitinase pada hari ke-4 dengan kondisi 55 °C dan pH 7. Kitin dari cangkang kepiting dapat dikonversi menjadi kitosan oleh enzim kitin deasetilase yang berasal dari isolat M-1 dan telah difraksinasi dengan amonium sulfat 40% b/v.

Kata Kunci : Kitosan, Kulit, Kitin, Fermentasi.

ABSTRACT

Enzymatic bioconversion of chitosan from crab shell chitin using thermophilic bacterium has been carried out. With chitinolytic optimum activity, called M-1 isolator, at 55⁰C and pH 7.0, the microbe could grow best at fourth day of fermentation with O.D. of 0.62 as well as the enzyme at 7.03 UA/mL. With the same optimum condition, deacetylated chitin enzyme, utilised for converting chitin into chitosan, was also produced at 7.95 UA/mL. After further purification with ammonium sulfate 40%, chitosan was produced, examined, and confirmed accordingly.

Keywords : chitin, shell, chitosan, fermentation

1. PENDAHULUAN

Indonesia merupakan negara yang memiliki wilayah perairan yang lebih luas dari daratan, sehingga hasil perikanan melimpah ruah. Salah satu hasil yang lebih banyak dibudidayakan dan potensial adalah budidaya kepiting. Dari hasil pengolahan kepiting ini dihasilkan limbah berupa cangkang yang tidak dapat dimanfaatkan keseluruhannya sehingga mengganggu lingkungan.

Saat ini limbah dari pabrik pengolahan kepiting umumnya dibuat sebagai campuran makanan ternak, pupuk dan pakan, namun jumlah yang dimanfaatkan tidak seberapa jika dibandingkan dengan jumlah limbah yang ada. Pemanfaatan lain limbah kepiting adalah ekstraksi khitin, untuk pembuatan kitosan, yang mengandung 15% dari limbah tersebut (Permadi, 1998). Di Jepang dan Amerika Serikat, kitin dan produk-produk turunannya telah diproduksi

secara komersial sebagai bahan dasar berbagai industri modern seperti farmasi, bioteknologi, kosmetik, pertanian, industri tekstil, industri kertas, industri pangan, pengolahan air limbah dan sebagainya.

Indonesia sebagai Negara Maritim, sangat berpotensi menghasilkan kitin dan produk turunannya. Limbah cangkang rajungan di Cirebon saja berkisar 10 ton perhari yang berasal dari sekurangnya 20 industri kecil. Kitosan tersebut masih menjadi limbah yang dibuang dan menimbulkan masalah lingkungan. Data statistik menunjukkan negara yang memiliki industri pengolahan kerang menghasilkan sekitar 56.200 ton limbah per tahun (Sandford 2003 dalam Meidina *et. al* 2006).

Pasar dunia menunjukkan bahwa harga internasional untuk kitosan berkisar antara USD 40 per kg sampai USD 100 per kg (Anonim 2007).

Walaupun tersebar luas di alam, sumber utama kitin yang dapat digunakan dalam pengembangan lebih lanjut adalah limbah kepiting berupa cangkang dikarenakan limbah ini mudah didapat dalam jumlah besar sebagai limbah hasil pengolahan Kepiting. Limbah ini juga mengandung protein, CaCO_3 , serta *astaxanthin* (Suptijah *et al.* 1992). Kulit golongan *crustacea* merupakan sumber kitin yang paling kaya, kandungannya dapat mencapai 40–60 % berat kering.

Kitin merupakan homopolimer dari residu N - asetil - D - glukosamin yang terikat melalui ikatan β -1,4 glikosidik dan merupakan sumber daya alam yang dapat diperbaharui dan paling melimpah setelah selulosa. Sebagai contoh, diperkirakan bahwa setiap tahun di dunia, ditemukan 37.300 ton kubik kitin yang berasal dari pengolahan invertebrata laut. Jumlah kitin yang berlimpah di alam ini memungkinkan dimanfaatkan secara luas terutama dalam bidang bioteknologi dan industri (Wang dan Chang, 2000).

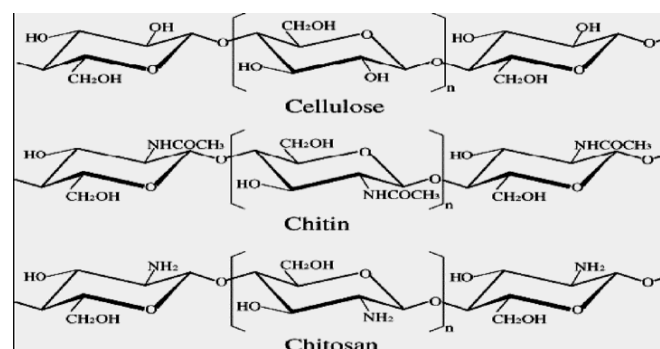
Kitosan sebagai polimer alami dapat dihasilkan dari hewan berkulit keras terutama dari laut seperti kulit udang, rajungan, kepiting, cumi-cumi dengan kadar kitosan antara 10–15 %. Selain dari kulit hewan laut, kitosan juga dapat diperoleh dari dinding sel jamur antara lain *Aspergillus niger* (Hardjito 2006). Kitosan adalah biopolimer alami yang diperoleh dari eksoskeleton *crustacea* dan *Arthropoda* dimana polimernya terbentuk dari unit-unit β -(1,4)-2- acetamido-2-deoxy-D-glukosa dan β -(1,4)-2-amino-2-deoxy-D-glukosa (Nan *et. al* 2006).

Kitosan merupakan biopolimer karbohidrat alami yang dibuat dari deasetilasi kitin, komponen mayor pada cangkang *crustacean* seperti kepiting dan udang (No dan Meyer 1989 dalam Kim 2004). Kitosan juga merupakan fiber seperti halnya selulosa. Cangkang udang mengandung protein (30–40 %), kalsium karbonat (30-50 %) dan kitin (20-30 %) pada basis kering (Johnson dan Peninston 1982 dalam Kim 2004). Jumlah kandungan tersebut bervariasi tergantung dari spesies dan musim

Struktur dan sifat kitosan

Kitosan merupakan turunan dari kitin yang dideasetilasi dapat larut pada larutan asam seperti asam asetat atau asam format. Isolasi secara tradisional kitin dari limbah/kulit *crustacea* melewati tiga tahapan yaitu, demineralisasi, deproteinase dan dekolorisasi. Tiga tahapan

tersebut merupakan standar prosedur pada pembuatan kitin (No 1989 dalam Kim 2004). Karakteristik kitosan adalah non toksik, polimer *biodegradable* pada bobot molekul yang tinggi dan sangat mirip dengan selulosa. Struktur kimia kitin dan kitosan dapat dilihat pada Gambar -1 dibawah ini:



Gambar-1, Struktur kimia selulosa, kitin dan kitosan (Kim 2004)

Kitosan pada umumnya tidak larut dalam air tetapi larut dalam pelarut asam dengan pH di bawah 6 seperti asam asetat, asam format dan asam laktat yang digunakan sebagai pelarut kitosan dan yang sering digunakan adalah pelarut asam asetat 1 % (Nadarajah 2005). Kitosan dapat dikelompokkan berdasarkan BM dan kelarutannya (Janesh dan Alonso 2003), yaitu:

- Kitosan larut asam dengan BM 800.000 Dalton sampai 1.000.000 Dalton,
- Kitosan mikrokristalin (larut air dengan BM sekitar 150.000 Dalton
- Kitosan nanopartikel (larut air) dengan BM 23.000 Dalton sampai 70.000 Dalton, dapat berfungsi sebagai imunomodulator.

Pada umumnya, kitin dengan derajat deasetilasi di atas 70 % dapat dikatakan sebagai kitosan (Li *et al.* 1997 dalam Nadarajah 2005). Pada proses deasetilasi, gugus asetil dari rantai molekuler kitin dihilangkan menjadi bentuk gugusamino. Temperatur dan konsentrasi dari larutan natrium hidroksida berpengaruh terhadap penghilangan gugus asetil dari kitin, yang menghasilkan kitosan yang berbeda tergantung dari aplikasi yang akan digunakan (Baxter *et al.* 1992 dalam Nadarajah 2005, Mima *et al.* 1983 dalam Nadarajah 2005). Konversi kitin dan kitosan dapat dilihat pada Gambar 2. Gambar 2. Konversi kitin menjadi kitosa

Aplikasi kitosan

Kitosan telah dimanfaatkan dalam berbagai keperluan industri seperti industri kertas dan tekstil sebagai zat aditif, industri pembungkus makanan berupa film khusus, industri metalurgi sebagai absorban untuk ion-ion metal, industri kulit untuk perekat, fotografi, industri cat sebagai koagulan, pensuspensi dan flokulasi, serta industri makanan sebagai aditif

Enzim pendegradasi kitin secara langsung adalah kitinase dan kitin deasetilase. Kitinase adalah enzim yang dapat menghidrolisis kitin secara acak pada ikatan glikosidiknya, sedang kitin deasetilase adalah enzim yang dapat mengkonversi kitin menjadi kitosan (Gooday, 1990). Teknik produksi kitosan secara ensimatik, dibanding secara termokimia, relatif lebih baik karena mudah dikendalikan, terurai biologis (biodegradable), dan sesuai lingkungan (biocompatible), serta dapat membentuk oligomer atau polimer (Tsigos, 2000).

Kitosan adalah senyawa polimer alam turunan kitin yang diisolasi dari limbah perikanan, seperti kulit, udang dan cangkang kepiting dengan kandungan kitin antara 65-70 persen. Sumber bahan baku kitosan yang lain di antaranya kalajengking, jamur, cumi, gurita, serangga, laba-laba dan ulat sutera dengan kandungan kitin antara 5-45 persen. Kitosan merupakan bahan kimia multiguna berbentuk serat dan merupakan kopolimer berbentuk lembaran tipis, berwarna putih atau kuning, tidak berbau. Kitosan merupakan produk deasetilasi kitin melalui proses kimia menggunakan basa natrium hidroksida atau proses enzimatik menggunakan enzim *chitin deacetylase*. Serat ini bersifat tidak dicerna dan tidak diserap tubuh. Sifat menonjol kitosan adalah kemampuan mengabsorpsi lemak hingga 4-5 kali beratnya

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pemanfaatan cangkang kepiting untuk menghasilkan kitosan dengan menggunakan mikroba termofilik.

2. METODE PENELITIAN

Bahan yang digunakan adalah mikroba termofilik, serbuk kitin (rajungan), glukosamin (Sigma-Aldrich), glikol kitin, HCl pekat, NaOH pekat, bacto agar, yeast ekstrak, NaCl, $(\text{NH}_4)_2$

SO_4 , K_2HPO_4 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, CaCl_2 , Indole, amonium sulfamat, amonium sulfat.

Alat yang digunakan antara lain Inkubator (Mettler®), Spektrofotometer UV-VIS Hewlett Packard, Model 340, Shaker batch (Aureus®), kulkas (Samsung), otoclaf (Model No. 1925x), vibrator (Janke & Kunkel, Type VF2), timbangan analitik (Chyo), timbangan kasar (Chyo), oven (Ohaus), sentrifugasi dingin (Aureus), magnetik stirer (Fisher) dan peralatan gelas yang biasa digunakan dalam laboratorium.

Tahapan penelitian terdiri dari pembuatan substrat, peremajaan mikroba termofilik, penyiapan inokulum, dan penentuan waktu produksi optimum, kemudian dilakukan produksi pada kondisi optimum. selanjutnya dilakukan biokonversi kitin menjadi kitosan secara enzimatik.

Untuk produksi enzim pada medium fermentasi, 10 ml medium inokulum untuk 100 ml medium fermentasi diinokulasikan bakteri yang terpilih sebanyak 4-5 ose, selanjutnya diinkubasikan pada suhu 55°C , 170 rpm selama 12-18 jam. Komposisi medium adalah $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,7%; K_2HPO_4 0,1%; NaCl 0,1%; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,01%; yeast ekstrak 0,05%; CaCl_2 0,025%; dan koloidal kitin 0,5% (Natsir, 2000). Inokulum lalu dituang ke dalam medium fermentasi (medium produksi) yang komposisinya sama dengan medium inokulum, kemudian diinkubasi pada kondisi yang sama selama 4 hari. Penarikan contoh tiap 24 jam dilakukan untuk pengukuran o.d (optical density) pada 660 nm, uji protein menggunakan pereaksi uji biuret (Saleh, 2002) dan uji aktivitas kitinase serta kitin deasetilase (Natsir, 2000).

Filtrat kultur (enzim ekstrak kasar) diperoleh dengan sentrifugasi contoh pada kecepatan 3000 rpm, suhu 4°C selama 15 menit. Pengukuran dilakukan selama 4 hari untuk menentukan pencapaian kondisi optimum.

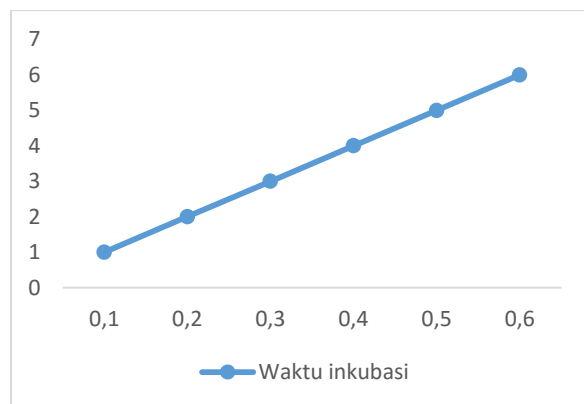
Enzim ekstrak kasar difraksinasi dengan amonium sulfat teknis pada berbagai konsentrasi yang dimulai dari 30, 40, 50, dan 60%. Perlakuan ini dilakukan dengan cara sebagai berikut: Enzim ekstrak kasar ditambahkan amonium sulfat sedikit demi sedikit sambil diaduk dengan *magnetic stirer* hingga larut sempurna dan dibiarkan semalam pada suhu 4°C . Filtrat enzim dipisahkan dengan sentrifugasi 5000 rpm selama 30 menit dengan suhu 4°C , kemudian dilarutkan dalam buffer sitrat fosfat 0,1M pH 7,0.

Untuk produksi kitosan, enzim ekstrak kasar difraksinasi menggunakan amonium sulfat ditambahkan dengan substrat koloidal kitin (serbuk kitin) 0,3 % yang sebelumnya sudah dilarutkan dalam buffer sitrat fosfat 0,1M pH 7,0 dengan perbandingan 1:1, 1:2, dan 1:3 (b/v), diinkubasi pada suhu 55°C, sentrifugasi pada 170 rpm selama 60 menit, dan endapan diambil. Kitosan yang diperoleh ditimbang dan disimpan pada suhu dingin untuk analisis dan pengujian lebih lanjut.

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

Mikroba termofilik diperoleh dari hasil skrining sampel air laut panas yang berasal dari Manado Sulawesi Utara. Mikroba termofilik tersebut merupakan isolat M-1 yang memiliki aktivitas kitinolitik dan dapat tumbuh secara optimal pada kondisi temperatur 55 °C dengan pH 7,0. Isolat M-1 ditumbuhkan pada medium cair dan medium padat dengan menggunakan koloidal kitin 2,0 % sebagai substratnya.

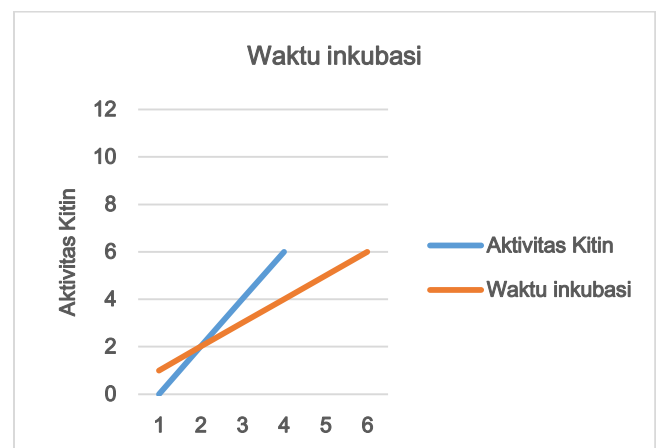
Isolat M-1 di tumbuhkan lebih lanjut pada medium fermentasi untuk mengetahui kondisi optimal produksi, sebab dalam medium fermentasi pertumbuhan mikroba dan produk yang dihasilkan dapat dipantau dengan baik sesuai kondisi yang optimal. Pertumbuhan isolat M-1 medium fermentasi meningkat terus hingga hari ke - 4 dan mulai menurun pada hari ke - 5 (Gambar-1).



Gambar 1. Kurva Pertumbuhan OD terhadap Waktu Inkubasi

Pada grafik di atas terlihat bahwa pertumbuhan optimal mikroba adalah pada hari ke

- 4 dengan nilai OD 0,62, dan menurun pada hari ke-5. Hal ini mungkin disebabkan oleh terjadinya penumpukan produk beracun atau kehabisan nutrisi sehingga beberapa sel mati, sedangkan yang lain tumbuh dan membelah. Sejalan dengan pengukuran kurva pertumbuhan dilakukan pula pengukuran aktivitas enzim secara optimal. Ternyata aktivitas enzim adalah optimal pada hari ke - 4 (Gambar-2). Hal ini seiring dengan enzim kitinase yang diproduksi pada hari ke - 4 dari isolat K- 22 yang telah di isolasi dari sumber air panas Kawah Kamojang Jawa Barat (Natsir, 2000).

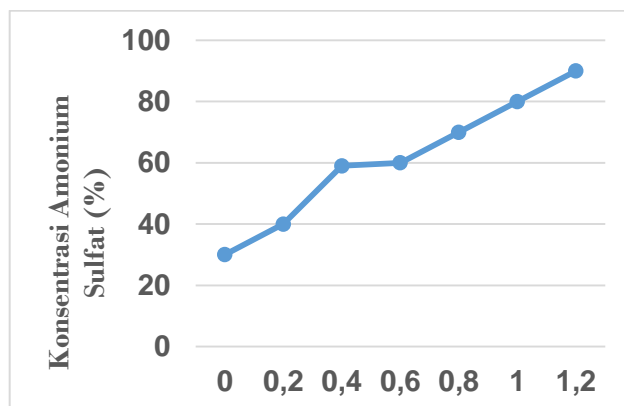


Gambar 2, Grafik antara aktivitas kitin diasetilase dan waktu inkubasi

Dari Gambar-2 di atas terlihat bahwa aktivitas kitin diasetilase mencapai nilai optimum pada pH 7,0 yaitu 9,75 UA/mL pada hari ke -4 (Gambar 5). Pada hari ke-5, aktivitas kitin diasetilase menurun yaitu 7,95 UA/mL. Enzim pendegradasi kitin, yaitu kitinase dan kitin deasetilase di produksi setelah pertumbuhan mencapai fase stasioner, yaitu pada hari ke-4 waktu fermentasi, dimana pada fase tersebut aktivitas kitinase dan kitin deasetilase optimum. Hal ini kemungkinan di sebabkan oleh terjadinya kondisi tertentu di dalam medium, yaitu kondisi kerapatan sel dan ketersediaan nutrisi dalam mediumnya semakin berkurang, sehingga kitinase dan kitin deasetilase disekresikan keluar sel dalam jumlah yang banyak untuk mendegradasi kitin pada dinding sel mikroba tersebut. Kemudian hasil degradasinya digunakan sebagai sumber nutrisi alternatif.

Enzim pendegradasi kitin umumnya diproduksi secara ekstra selular menurut Natsir (2000), enzim ekstraselular akan dikeluarkan oleh sel dan tertampung pada medium, kemudian disentrifugasi dengan kecepatan tertentu. Enzim tersebut akan tersuspensi pada filtrat atau supernatan dan terpisah dari sel. Enzim kitinase dan kitin diasetilase yang terdapat pada

supernatan hasil sentrifugasi 3000 rpm, 4°C selama 15 menit merupakan enzim ekstrak kasar. Enzim ini difraksinasi dengan amonium sulfat pada berbagai konsentrasi



Gambar 3. Grafik hubungan antara aktivitas enzim dengan konsentrasi ammonium sulfat

Frakasi yang memiliki aktivitas tertinggi selanjutnya digunakan untuk penelitian lebih lanjut, aktivitas tertinggi tercapai pada kondisi optimum 40% b/v yang setara dengan kejenuhan 65%. Salah satu cara untuk mengidentifikasi adanya kitosan ialah melalui test warna Van Wisselingh (Bastaman, 1991). Pada test ini kalium yodida (KI-I₂) akan merubah warna kitosan menjadi merah, kecoklatan dan dalam suasana asam, dengan penambahan asam sulfat (H₂SO₄) akan berubah menjadi hitam. Ini merupakan uji kualitatif kitosan yang paling akurat. Perubahan warna dapat dilihat pada table -1 dibawah ini.

Tabel -1, Identifikasi Kitin dan Kitosan

Hasil	Penambahan zat	Uji Kitin/Kitosan	Warna Isolat
Serbuk Kitin	KI-I ₂	Merah jingga	Merah Jingga
Koloidal Kitin	KI-I ₂	Merah Jingga	Coklat Susus
Kitosan	KI-I ₂ +H ₂ SO ₄	Hitam	Hitam

Derajat deasetilase kitosan adalah persentase gugus asetil kitin yang berhasil

dihilangkan pada proses deasetilase agar diperoleh kitosan. Hasil analisis derajat diasetilase kitin menghasilkan kitosan dapat dilihat pada table-2 dibawah ini.

Tabel -2, Hasil Analisis Derajat Deasetilase Kitin Menghasilkan Kitosan (%)

Perlakuan	Derajat Deasetilase (%)
E: SK (b/v) = 1:1	44
E: KK (b/v) = 1:1	59
E: KK (b/v) = 1:2	70
E: KK (b/v) = 1:3	63

Dari tabel di atas dapat dilihat bahwa pada derajat deasetilasi 1:2 KK (b/v) ternyata memberikan hasil yang optimal karena mempunyai derajat deasetilasi yang tinggi yaitu 70% dibandingkan dengan nilai derajat deasetilasi pada perbandingan 1:1 SK (b/v), 1:1 KK (b/v), dan 1:3 KK (b/v). Dari hasil analisis

gugus fungsi dengan spektroskopi infra merah ditemukan puncak-puncak serapan yang merupakan karakteristik senyawa khitin

Tabel-3, Hasil absorpsi infra merah isolat yang bersesuaian dengan karakteristik khitin

Gugus Fungsi	Frekuensi /Cm	Karakteristik
OH	3449	Kuat (s)

CH-Streching	2880	Sedang (m)
C=O	1670	Kuat (s)
N-H	1550	Kuat (s)
CH3	1327	Kuat (s)
C-O-C	1072	Kuat (s)

Dengan demikian uji kualitatif, baik dengan test warna maupun dengan spektroskopi infra merah, keduanya menunjukkan isolat sebagai khitin yaitu produk usaha biokonversi yang telah dilakukan.

4. KESIMPULAN

1. Isolat M-1 menghasilkan enzim kitin deasetilase dan kitinase pada hari ke-4 dengan kondisi 55 °C dan pH 7
2. Kitin dari kulit kepiting dapat dikonversi menjadi kitosan oleh enzim kitin deasetilasi yang berasal dari isolat M-1 dan telah difraksinasi dengan amonium sulfat 40% b/v. Sehingga dikatakan bahwa kitin dapat terdeteksi melalui uji kualitatif.

DAFTAR PUSTAKA

- Bastaman, S; 1989. *Mempelajari Proses Degradasi Dan Ekstraksi Chitin Dan Chitosan dari Kulit udang* (Nephrops virgatus). The Institute for Research on Chemistry and Multi Various Industry. Vol. 6 No. 2 p.1-8.
- Bastaman, S; Aprianita, N ; dan Hendarti, 1990/1991. *Penelitian Limbah Udang Sebagai Bahan Industri Chitin dan Chitosan*. Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Industri Hasil Pertanian.
- Goody W. Graham. 1990. *The Ecology Of Chitin Degradation Advance In Microbial*. Ecot. Vol. II editor K.C. Marshall
- Tsigost, Lason. 2000. Aggeliki Martinou, Dimitris kafetzoupolos and Vassillis Bouriotis. *Chitin deactylases: New Versatile tools in biotechnology*.
- Natsir. Hasnah,. 2000. *Karakterisasi dan Purifikasi Sifat-Sifat Biokimiawi Enzim Kitinase dan Kitin Deasetilase Yang Berasal Dari Mikroba Asidofilik Tanah Kawah Kamojang*, Jawa Barat. (Tesis)
- Permadi, Wisnu. 1999. *Produksi dan Kegunaan Kitin dan Kitosan*. Makalah.
- Saleh, Asri. 2002. *Pengendalian Pencemaran Limbah Air Kelapa k Mengurangi Dampak Lingkungan dan Untuk Meningkatkan Mutu Pakan*. Tesis Unhas.

