

STUDI TENTANG KITIN CANGKANG UDANG II : HIDROLISIS DENGAN LISOZIM

Oleh :

Umar Santoso*)

Intisari

Telah dilakukan penjati-dirian hidrolisat kitin cangkang udang (*Penaeus merguensis*) oleh *lysozyme* menggunakan kromatografi kolom dan kromatografi lapis tipis. Hasil penelitian menunjukkan bahwa hidrolisis kitin oleh *lysozyme* menghasilkan kitooligosakarida sampai dengan trimer, tidak diketemukan dimer maupun monomernya.

Pendahuluan

Kitin adalah polimer 2-asetamido-2-deoksi-D-glukan yang berikatan 1 — 4 beta. Kitin merupakan biopolimer terbanyak kedua di alam setelah selulosa (Muzzarelli, 1977). Karena memiliki kombinasi sifat-sifat unik seperti bioaktivitas, biodegradabilitas, non-alergenitas serta ketiutannya, polimer ini dapat dimanfaatkan di berbagai bidang (Austin *et al.*, 1981; Brine 1984). Kitin merupakan bahan yang sumbernya dapat diperbarui dan polimer ini merupakan bahan yang secara komersial potensial (Berkeley, 1979). Kegunaan kitin dan turunan-turunannya di berbagai bidang/industri telah diketengahkan Santoso (1991).

Kitin di alam terdapat terutama sebagai penyusun kulit keras (cangkang) krustasea, insekta serta artropoda lain, dan dijumpai juga sebagai konstituen dinding-dinding sel yeast dan jamur (Austin *et al.*, 1981). Sumber-sumber kitin di alam beserta gambaran sifat-sifat kimianya telah diuraikan oleh Muzzarelli (1977).

Kitin bersifat tak larut dalam air dan pelarut organik pada umumnya. Namun kitin dapat dimodifikasi secara kimiawi menjadi turunan-turunannya yang mempunyai sifat-sifat khas dan kegunaan-kegunaannya sendiri-sendiri. Kitin dapat dihidrolisis parsial menghasilkan kitinooligosakarida (disebut juga kitooligosakarida) yang dapat larut, dan mempunyai manfaat-manfaat di berbagai bidang (Muzzarelli, 1983). ----, 1985; ----, 1988).

Hidrolisis sempurna kitin secara enzimatis yang menghasilkan monomer N-asetil-D-glukosamin (GlcNac) dilakukan dalam suatu sistem *kitinolitik* terdiri atas dua macam hidrolase yang bekerja secara berturutan. *Kitinase* (E.C. 3.2.1.14) menghidrolisis polimer N-asetil-D-glukosamin termasuk tetramer dan trimer meskipun dengan tingkat yang rendah. Yang kedua adalah *kitobiasa* (E.C. 3.2.1.30) menghidrolisis kitobiosa (dimer GlcNac) dan kitotriosa (trimer GlcNac) (Jeuniaux, 1961; ----, 1966).

Kitinase dihasilkan oleh beberapa macam bakteri, *Streptomyces*, serta jamur. Kitinase juga disintesis dalam protozoa, dalam saluran pencernaan nematoda, polikaeta dan moluska. Dalam hewan bertulang belakang kitinase disekresi oleh pankreas dan lendir pencernaan ikan, amfibia dan reptilia pemakan serangga. Kitinase juga ditemukan terdapat dalam lendir pencernaan burung-burung pemakan serangga (Jeuniaux, 1961; ----, 1966).

Dalam jaringan tanaman kitinase terdapat dalam biji gandum, almond, kacang

*) Staf edukatif pada jurusan T. Pengolahan Hasil Pertanian Fak. Teknologi Pertanian UGM.

(Powning and Irkzykiewics, 1965); dalam batang tomat (Pegg and Young, 1982); dalam biji kedelai (Zikakis and Wadsworth, 1984) dan lain-lain. Ternyata kitinase dapat ditemukan hampir pada semua jaringan tanaman (Hirano and Nagano, 1989), meskipun dalam jumlah yang sangat sedikit dan bervariasi.

Lysozyme (Muramidase, E.C.3.2.1.17), enzim yang dapat melisis dinding-dinding sel bakteri, yang sumbernya antara lain putih telur dan cairan-cairan dalam tubuh hewan dan manusia, dilaporkan mempunyai aktivitas kitinolitik ditandai dengan kapasitasnya menghasilkan senyawa-senyawa mereduksi dalam hasil hidrolisis tersebut (Berger and Weiser, 1958). Namun demikian ciri alami senyawa-senyawa hasil hidrolisis kitin oleh *lisozim* itu masih belum dipastikan sehingga masih perlu diteliti lagi seperti dinyatakan Powning and Irkzykiewics (1966). Sebagian ahli menyatakan *lisozim* dapat berlaku kitinolitik, sementara Ito dan Amano (1978) menyatakan bahwa *lisozim* dapat menghidrolisis kitin hanya jika telah dilakukan penghilangan sebagian gugus asetilnya. Powning dan Irkzykiewics (1966) menyatakan bahwa cukup sulit untuk menyimpulkan tentang keterbatasan kerja *lisozim* pada kitin dibandingkan terhadap kerjanya pada dinding-dinding sel bakteri.

Studi mengenai hidrolisis kitin merupakan hal yang perlu, terutama karena dari kitin (yang aslinya tidak larut dalam air) dapat diperoleh kitooligosakarida yang dapat larut, yang di samping berguna dalam studi biokimiawi juga berguna dalam bidang obat-obatan dan industri (Hicks, 1988).

Meskipun kitinase tersebar luas di alam termasuk hewan dan tumbuh-tumbuhan, sekarang kitinase murni komersial umumnya diproduksi dari mikroorganisme, dan harganya sangat tinggi. Kitinase murni komersial dijual ± US\$ 250.-/g (Zikakis and

Castle, 1988) atau lebih dari Rp 450.000.-/g. Oleh karena itu perlu dicari sumber-sumber yang dapat menyediakan kitinase lebih murah, dan juga sumber-sumber yang dapat menyediakan enzim lain yang dapat berperan kitinolitik.

Berkenaan dengan studi terdahulu (Santoso, 1990) bahwa *lysozyme* dapat menghidrolisis kitin menghasilkan senyawa-senyawa mereduksi, penelitian ini bertujuan untuk menjati-dirikan hidrolisat yang bersangkutan.

Bahan dan Metode

1. Bahan

Kitin yang digunakan dua macam, yaitu kitin komersial dibeli dari Cosmobio Co. Ltd., dan kitin yang disiapkan menurut Santoso (1990). *Lisozim* putih telur dibeli dari Nacalai Tesque Ltd., Tokyo.

Reagensia yang digunakan merupakan bahan-bahan kimia standar laboratorium.

2. "Time Course" Hidrolisis Kitin oleh Lisozim

Untuk mengetahui "time course" (hasil hidrolisis fungsi waktu) dilakukan inkubasi sebagai berikut : 10 mg kitin diinkubasi dalam 4,0 ml larutan *lisozim* (10 U/g/ml dalam 0,1 M bufer asetat pH 6,0), pada suhu 37°C. Preparasi dilakukan terhadap beberapa tabung reaksi, dan tiap interval waktu 5 jam hasil hidrolisis dilakukan pengujian gula mereduksinya. Penentuan gula mereduksi dilakukan dengan metode feri-fero sianida menurut Park and Johnson (1949), dengan GlcNac sebagai standar.

3. Preparasi "Hasil Cerna Lisozim"

0,8 g kitin diinkubasi dalam 250 ml 0,1M bufer asetat pH 6,0 yang mengandung

180 g lisozim dan 120 mg natrium azida. Inkubasi dilakukan pada 37°C selama 72 jam dengan pengadukan menggunakan *stirrer*. Setelah inkubasi, erlenmeyer yang berisi cairan tersebut dipanaskan dengan cara dimasukkan dalam air mendidih selama 15 menit untuk menginaktivkan enzim. Campuran kemudian disaring dengan filter paper ADVANTEC Toyo No. 2 (Qualitative), filtrat (disebut "hasil cerna lisozim") dikering-bekukan dan kemudian dilarutkan dalam 20 ml 0,3 M NaCl untuk persiapan kromatografi kolom, atau dalam 20 ml air untuk persiapan kromatografi lapis tipis.

4. Kromatografi Kolom

Gel yang digunakan adalah TOYO PEARL HW 40F. Setelah dicuci dengan air dan 0,3M NaCl, gel dilakukan deaerasi (penghilangan udara). Gel dimasukkan/dituangkan ke kolom ukuran 70 × 1,8 cm; dan dilakukan stabilisasi dengan 0,3N NaCl. 1,0 ml "hasil cerna lysozyme" dimasukkan dalam kolom dengan cara meneteskannya pada permukaan gel dalam kolom, kemudian dielusi dengan 0,3M NaCl pada kecepatan aliran 10 ml/jam, dan fraksi-fraksi (2 ml/tabung) dikumpulkan dengan fraction collector ATTO MINI Collector SJ-1410 untuk kemudian dideterminasi gugus mereduksinya dengan metode ferri ferro sianida. Kromatografi kolom dilakukan pada suhu kamar.

5. Kromatografi lapis tipis

Plate yang digunakan adalah plate selulosa AVICEL SF 2020; solven yang digunakan 1-butana, pyridine, asam asetat, air (60 : 40 : 3 : 30). Hasil cerna lisozim dan standar-standar GlcNac, (GlcNac)² dan (GlcNac)³ ditutulkan dengan volume 10 μL. Pengembangan dilakukan pada suhu kamar. Noda-noda dimunculkan dengan

mencelupkan kromatogram dalam 0,1 N NaOH dalam etanol, 1-propanol (6:4; V/V) diikuti dengan pemanasan dalam oven suhu 110°C selama 5 menit. Noda *fluorecent* dapat diamati dengan jelas di bawah lampu ultra violet. Cara ini menurut Sharon and Shifter (1964).

Hasil dan Pembahasan

1. Time Course Hidrolisis Kitin oleh Lisozim

Lisozim dapat menghidrolisis kitin ditandai dengan keberadaan senyawa-senyawa mereduksi dalam hasil hidrolisis tersebut (Santoso, 1990). Gambar 1 menunjukkan bahwa hidrolisis kitin oleh *lisozim* mempunyai pola yang selalu naik sampai inkubasi selama 72 jam. Setelah periode ini menunjukkan pola yang mendatar. Baik kitin komersial maupun kitin sediaan menunjukkan pola yang sama.

Lisozim adalah endo-β-asetilmuramidase yang dapat menghidrolisis glikan dinding sel bakteri menghasilkan oligosakarida tipe N-asetil glukosamin-N-asetil-asam muramat (Muzzarelli, 1977). Lisozim juga dapat menghidrolisis kitin dengan cara memecah ikatan 1 — 4 β antara N-asetil glukosamin-N-asetil glukosamin menghasilkan polimer yang lebih pendek (kitodekstrin) dan oligomer yang pada derajad tertentu mempunyai daya mereduksi (Muzzarelli, 1977; Ito and Amano, 1978). Dimungkinkan juga hidrolisis kitin menghasilkan monomer N-asetil glukosamin.

2. Kromatografi Kolom

Gambar 2 menunjukkan hasil kromatografi kolom hasil cerna lisozim, terlihat tiga puncak pada pola elusi yang diamati dengan daya mereduksinya. Baik kitin komersial maupun kitin sediaan memperlihatkan pola

),1 N
; V/V)
suhu
ecent
ampu
and

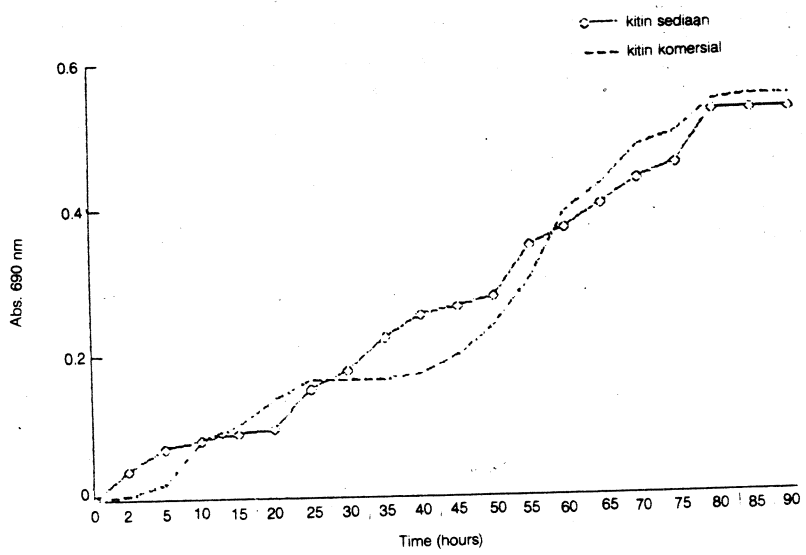
im

ditan-
nyawa
sebut
ukkan
nyai
tubasi
enun-
omer-
pola

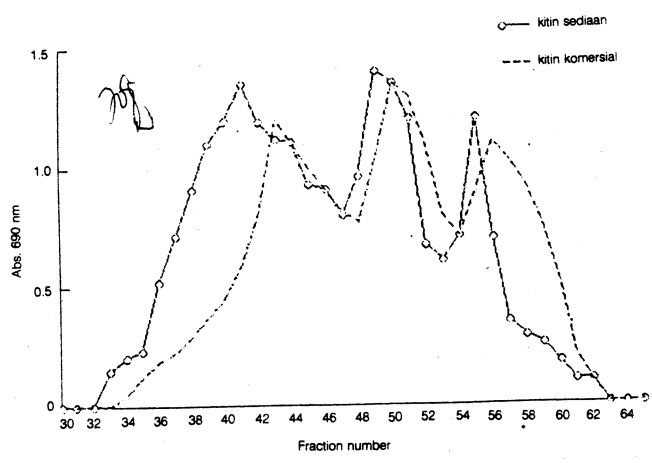
rami-
din-
arida
asam
juga
cara
asetil
amin
ndek
dera-
duksi
978).
kitin
imin.

rato-
tiga
rgan
rsial
pola

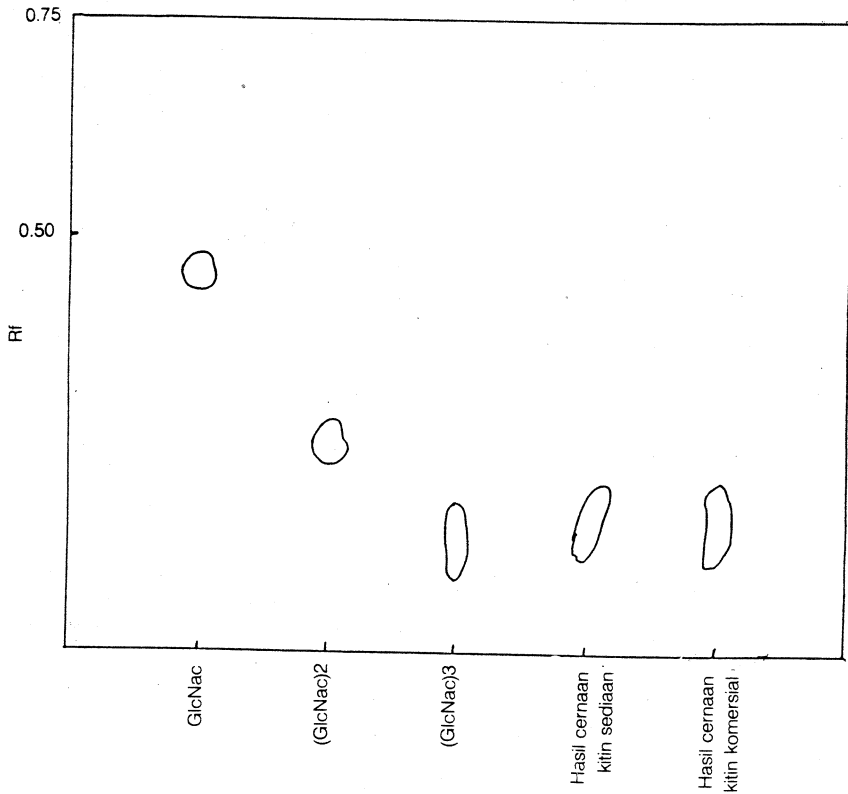
o. 2



Gambar 1. **Time course hidrolisis kitin oleh lisozim.** Kitin 10 mg dilinkubasi dalam 4,0 ml larutan lisozim (10 U_g/ml dalam 0,1M bufer asetat pH 6,0) pada suhu 37°. Absorbans 690 nm menunjukkan adanya senyawa mereduksi dalam hasil hidrolisis diterminasi dengan metode feri-fero sianida.



Gambar 2. **Kromatografi kolom hasil cerna lisozim pada TOYO PEARL HW 40F.** Kolom: 70 × 1,8 cm, Eluent : 0,3M NaCl, Kecepatan aliran : 10 ml/jam; 2,0 ml/fraksi Pola elusi dimonitor dengan determinasi gugus mereduksi dengan metode feri-fero sianida.



Gambar 3. Kromatografi lapis tipis hasil cerna lisozim dan standar-standa GlcNac, (GlcNac)² dan (GlcNac)³ pada AVICEL SF 2020 Solvent : 1-butanol, pirdine, asam asetat, air (60:40:3:30)

yang sama. Hal tersebut menunjukkan bahwa hidrolisis kitin oleh *lisozim* menghasilkan beberapa macam senyawa mereduksi, yang daya mereduksinya berbeda. Dan menunjukkan juga bahwa hasil hidrolisis kedua macam kitin tersebut tidak tergantung jenisnya sampai inkubasi selama 72 jam.

Meskipun hasil cernaan tersebut mengandung senyawa-senyawa mereduksi, namun pada determinasi N-asetil-D-glukosamin (GlcNac) dengan metode Reissig (Reissig *et al.*, 1955) menunjukkan hasil negatif.

3. Kromatografi Lapis Tipis

Gambar 3 merupakan kromatogram hasil cerna lisozim dan standar-standar GlcNac, (GlcNac)² dan (GlcNac)³ pada *plate* AVICEL SF 2020. Terlihat pada gambar bahwa hasil cernaan kitin komersial maupun kitin sediaan hanya memberikan satu noda dengan harga Rf yang sebanding dengan harga Rf (GlcNac)³, yang merupakan kitooligosakarida standar terbesar.

Ketiadaan noda dengan harga Rf yang sama dengan Rf GlcNac dan (GlcNac)²

menunjukkan bahwa dalam hasil cerna tersebut tidak mengandung adanya monomer dan dimer kitin (pada penentuan GicNac menggunakan metode Reissig juga menunjukkan hasil negatif). Karena pada kromatografi kolom hasil cerna lisozim menghasilkan lebih dari satu puncak, maka dapat disimpulkan bahwa hidrolisis kitin oleh putih telur menghasilkan kitooligoskarida sampai dengan trimer.

Daftar Acuan

- Austin, P.R., Brine, C.J., Castle, J.E. and Zikakis, J.P., 1981. Chitin : New facet of research. *Science* 212 : 749.
- Berger, L.R. and Weiser, R.S., 1958. The -glucosaminidase activity of egg-white lysozyme. *Bichim. Biophys Acta* 26:517.
- Berkeley, R.C.W., 1979. Chitin, chitosan and their degradative enzymes. *In* "Microbial Polysaccharides and Polysaccharides" p.205. Berkeley, R.C.W., Goodey, G.W. and Elwood, D.C. (Ed), Academic Press, New York, London.
- Brine, C.J., 1984. Chitin : accomplishment and perspectives. *In* "An introduction of Chitin, Chitosan and Related Enzymes" Zikakis, J.P. (Ed), Academic Press Inc., Orlando, San Diego, New York.
- Hicks, K.B., 1988. Isolation of oligomeric fragments of chitin by preparative of high-performance liquid chromatography. *In* "Methods of Enzymology" Vol. 161, Biomass Part B, p. 410, Wood, W.A. and Kellog, S.T. (ed), Academic Press Inc., San Diego, New York.
- Hirano, S. and Nagano, N., 1989 Effects of chitosan, pectic acid lysozyme and chitinase on the growth of several phytopatogens. *Agric. Biol. Chem.* 53 (11) : 3065.
- Ito, E. and Amano, K., 1978. The action of lysozyme on partially deacetylated chitin. *Eur. J. Biochem.* 85 : 97.
- Jeuniaux, C. 1961. Chitinase, an addition to the list of hydrolases in the digestive tract of vertebrate. *Nature* 192 : 135.
- Jeuniaux, C., 1966. Chitinases. *In* "Methods of Enzymology, 8" p. 644, Academic Press Inc., New York.
- Muzzarelli, R.A.A., 1977. Chitin. Pergamon Press, New York.
- Muzzarelli, R.A.A., 1983. Chitin and its derivatives : New trends of applied research. *Carbohydrate Polymers* 3 : 53.
- Muzzarelli, R.A.A., 1985. Chitin. *In* "The Polysaccharides" Vol. 3, p. 147, Aspinall (Ed), Academic Press Inc., Orlando, San Diego.
- Muzzarelli, R.A.A., 1988. Carboxymethylated chitins and chitosans. *Carbohydrate Polymers* 8 : 1.
- Park, J.T. and Johnson, M. 1949. A sub-microdetermination of glucose. *J. Biol. Chem.* 81 : 149.
- Pegg, G.F. and Young, D.H., 1982. Purification and characterization of chitinase enzymes from healthy and *Verticillium albo-atrum*-infected tomato plants, and from *V. albo-atrum*. *Physiol. Plant Path.* 21 : 389.
- Powning, R.F. and Irzykiewicz, H. 1965. Studies on chitinase system in bean and other seeds. *Comp. Biochem. Physiol.* 14 : 127.
- Powning, R.F. and Irzykiewicz, H., 1966. The effect of lysozyme on chitin oligosaccharides. *Biochim. Biophys. Acta* 26:517.
- Reissig, J.L., Strominger, J.L. and Leloir, L.F., 1955. A modified colorimetric method for the estimation of

hasil
Nac,
CEL
hasil
liaan
arga
ac)³,
rdar

ang
ac)²

- N-acetylamino sugars. *J. Biol. Chem.* 277 : 959.
- Santoso, U. 1990. Studi tentang kitin cangkang udang (*P. merguensis*) I : Isolasi menggunakan actinase E dan EDTA. *Agritech* Vol. 1 No. 3, : 2.
- Santoso, U., 1991. Hasil-hasil penelitian terapan kitin dan turunan-turunannya. *Harian Kedaulatan Rakyat*, 22 Januari 1991, Yogyakarta.
- Sharon, N. and Shifter, S., 1964. A transglycolation reaction catalyzed by lysozyme (Preliminary communication). *J. Biol. Chem.* 239:7 PC 2398.
- Zikakis, J.P. and Wardsworth, S.A., 1984. Chitinase from soybean seeds : purification and some properties of the enzymes system. *J. Agric. Food Chem.* 32 : 1284.
- Zikakis, J.P. and Castle, J.E., 1988. Chitinase-chitobiase from soybeans seeds and puffballs. In "Methods in Enzymology" Vol. 161 Biomass Part B. p. 491, Wood, W.A. and Kellog, S.T. (Ed), Academic Press Inc., San Diego, New York.

Ucapan Terima Kasih

Penulis : banyak terima kasih kepada INPEX Foundation, Tokyo, atas dana yang disediakan untuk penelitian ini. My sincerely thanks are also due to Prof. A. Maekawa, Dr. T. Tadokoro and Dr. M. Wada, Tokyo Univ. of Agric, for their kind guidance and support of this research.

**DAFTAR PENGIRIM WESEL
PEBRUARI S/D APRIL 1991**

- | | |
|----------------------------|--------------|
| 1. Ir. Nugroho Tri Waskito | (Malang) |
| 2. Ir. Joni Kusnadi | (Pontianak) |
| 3. Ir. Aisyah T.S. | (Purwokerto) |
| 4. Ir. Suharyanto | (Medan) |
| 5. SITG | (Bandung) |
| 6. Ir. Sudaryono | (Jakarta) |