

Penentuan Kondisi Fermentasi Optimal untuk Produksi N-asetilglukosamin Menggunakan Kitinase Ekstraseluler *Mucor circinelloides*

Determination of Optimal Fermentation Condition for N-acetylglucosamine Production Using *Mucor circinelloides* Extracellular Chitinase

Yuniwaty Halim^{*1}, Hardoko^{1,2} & Reinald Febryanto Pengalila¹

¹Jurusan Teknologi Pangan, Universitas Pelita Harapan, Banten, Indonesia

²Jurusan Teknologi Hasil Perikanan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Brawijaya, Malang, Indonesia

*Corresponding author, e-mail: yuniwaty.halim@uph.edu

Submitted 16 Mei 2019 Revised 30 August 2019 Accepted 06 December 2019

Abstrak Penelitian ini bertujuan untuk menentukan kondisi fermentasi terbaik, yang meliputi pH, suhu, lama fermentasi, dan konsentrasi substrat, dalam menghasilkan N-asetilglukosamin dari cangkang udang menggunakan kitinase ekstraseluler kasar yang diperoleh dari kapang *Mucor circinelloides*. Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode eksperimental dengan perlakuan berbagai pH (5, 6, 7, 8, dan 9) dan suhu fermentasi (30, 40, 50, 60, 70, dan 80°C). Nilai pH dan suhu fermentasi optimal yang diperoleh digunakan untuk menentukan konsentrasi substrat (0,5; 1,0; 1,5; dan 2,0%) dan lama fermentasi (2, 4, 6, dan 24 jam) yang diperlukan untuk menghasilkan N-asetilglukosamin dengan konsentrasi tertinggi. Hasil penelitian menunjukkan bahwa pH optimal untuk fermentasi adalah 8, dengan aktivitas kitinase yang dihasilkan adalah $4,38 \pm 0,06$ U/ml, sedangkan suhu optimal adalah 50°C dengan aktivitas enzim sebesar $5,42 \pm 0,06$ U/ml. Konsentrasi substrat dan lama fermentasi berpengaruh terhadap produksi N-asetilglukosamin. Adapun kondisi fermentasi optimal adalah dengan konsentrasi substrat sebesar 1,5% dan lama fermentasi 2 jam, dengan konsentrasi N-asetilglukosamin yang dihasilkan adalah sebesar $2195,83 \pm 15,14$ ppm.

Kata kunci: Cangkang udang; kitinase; kitin; *Mucor circinelloides*; N-asetilglukosamin

Abstract This research aimed to determine the best fermentation condition, consists of pH, temperature, fermentation time and substrate concentration, in N-acetylglucosamine production from shrimp shells using crude extracellular chitinase obtained from *Mucor circinelloides* mould. The method used was experimental method with fermentation treatment of different pH (5, 6, 7, 8 and 9) and temperature (30, 40, 50, 60, 70 and 80°C). The optimal pH and temperature of fermentation obtained was used to determine the maximum substrate concentration (0.5, 1, 1.5 and 2%) and fermentation time (2, 4, 6 and 24 hours) to produce the highest concentration of N-acetylglucosamine. The optimal pH for fermentation was 8, with chitinase activity of 4.38 ± 0.06 U/ml, while the optimal temperature was 50°C with enzyme activity of 5.42 ± 0.06 U/ml. Substrate concentration and fermentation time affected the N-acetylglucosamine production. The optimal fermentation condition was obtained with substrate concentration of 1.5% and fermentation time of 2 hours resulted to N-acetyl Glucosamine concentration of 2195.83 ± 15.14 ppm.

Keywords: Shrimp shells; chitinase; chitin; *Mucor circinelloides*; N-acetylglucosamine

PENGANTAR

Kitin merupakan senyawa polisakarida linear yang jumlahnya di alam adalah kedua terbesar setelah senyawa selulosa. Secara alami, kitin juga merupakan salah satu senyawa penyusun cangkang *Crustacea*. Kitin dan senyawa turunannya telah banyak dimanfaatkan dalam berbagai bidang, antara lain bidang farmasi, tekstil, pangan, dan kosmetik (Junianto *et al.*, 2013). Salah satu sumber kitin yang potensial adalah cangkang udang. Hal ini karena udang merupakan salah satu komoditi utama dalam industri perikanan dan cangkang udang merupakan limbah yang belum banyak dimanfaatkan. Sekitar 75% dari total berat udang biasanya dibuang sebagai limbah (Al-Hassan, 2016).

Glukosamin merupakan salah satu turunan kitin yang dapat

diperoleh dari pemecahan kitin melalui beberapa metode, yaitu metode proses fermentasi, menggunakan enzim, hidrolisis secara kimiawi ataupun kombinasi dari metode-metode tersebut (Cahyono *et al.*, 2014). Glukosamin terdapat dalam bentuk glukosamin-HCl, glukosamin sulfat, dan N-asetilglukosamin. N-asetilglukosamin saat ini banyak digunakan sebagai suplemen karena sifatnya yang non-toksik dan bermanfaat bagi kesehatan, salah satunya untuk pengobatan osteoarthritis ataupun masalah dalam persendian (Chen *et al.*, 2010). Metode produksi N-asetilglukosamin menggunakan metode hidrolisis kimiawi memiliki beberapa kekurangan, salah satunya berkaitan dengan masalah lingkungan dari limbah yang dihasilkan. Metode fermentasi juga memiliki beberapa kekurangan, antara lain waktu proses yang lama, resiko terkena kontaminasi, dan tantangan untuk produksi dalam

jumlah yang besar. Sebagai alternatif, metode enzimatik menggunakan kitinase memiliki beberapa keuntungan, antara lain *reproducible* dan berpotensi mengurangi kemungkinan terjadinya kontaminasi (McNeil, 2013). Selain itu, metode enzimatik juga dilaporkan dapat menghasilkan N-asetilglukosamin yang murni, menandakan bahwa kitinase dapat mendegradasi kitin secara keseluruhan (Chen et al., 2010).

Kapang merupakan salah satu produsen kitinase. Kapang yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Mucor circinelloides* hasil isolasi dari cangkang udang windu yang dibusukkan (Veronica, 2017). Penelitian sebelumnya oleh Zhang et al. (2017) juga menyatakan bahwa jenis kapang ini memiliki kemampuan menghasilkan kitinase yang digunakan untuk mengubah kitin menjadi N-asetilglukosamin. Akan tetapi, aktivitas enzim yang dihasilkan oleh bakteri dan kapang dipengaruhi oleh pH, suhu, lama fermentasi, dan konsentrasi substrat (Scanlon et al., 2018). Enzim yang dihasilkan oleh kapang maupun bakteri dapat berupa enzim ekstraseluler maupun intraseluler. Keuntungan dari enzim ekstraseluler adalah mudah diekstrak tanpa harus memecah membran sel dari bakteri atau kapang (Traving et al., 2015). Tujuan dari penelitian ini adalah untuk menentukan pH, suhu, konsentrasi substrat, dan lama fermentasi optimal untuk menghasilkan N-asetilglukosamin dari cangkang udang menggunakan kitinase ekstraseluler kasar yang diperoleh dari kapang *M. circinelloides*.

BAHAN DAN METODE

Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah cangkang udang windu (*Penaeus monodon*), terdiri dari 60% bagian kepala dan 40% bagian tubuh dan ekor udang, yang diperoleh dari PT. Lola Mina di Muara Baru, Jakarta, kultur kapang *Mucor circinelloides* yang diisolasi dari cangkang udang windu (Veronica, 2017), larutan NaOH 3,5% (Merck), HCl 1M (Merck), media *Potato Dextrose Agar* (Merck), *Potato Dextrose Broth* (Merck), air destilata (Amidis), larutan HCl pekat (Merck), etanol absolut (Merck), larutan NaOH 5N (Merck), $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (Merck), $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ (Merck), buffer fosfat (Merck), buffer sitrat (Merck), buffer glisin (Merck), standar N-asetilglukosamin (Sigma Aldrich), dan larutan 3,5- *Dinitro salicylic acid* (Merck). Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah timbangan analitik (Ohaus, Jerman), blender kering (Panasonic), *cabinet dryer* (local), mikropipet (Finnpipette F2, Thermo Scientific, Amerika Serikat), sentrifus (Hettich, Jerman), spektrofotometer UV-Vis (Genesys, Jerman), dan alat-alat gelas.

Metode

Pembuatan isolat kitin

Metode pembuatan isolat kitin dilakukan berdasarkan penelitian oleh Arif et al. (2013). Cangkang udang windu *P. monodon* dibersihkan dengan air mengalir dan dikeringkan di bawah matahari selama 1-3 hari kemudian dicekikan ukurannya menggunakan *blender* untuk memperoleh tepung cangkang udang. Tepung cangkang udang yang diperoleh kemudian melalui proses demineralisasi menggunakan larutan HCl 1M (rasio cangkang udang

dengan HCl adalah 1:10) pada suhu 75°C selama 2 jam. Campuran kemudian disaring dan dibilas dengan air hingga mencapai pH netral dan kemudian dikeringkan dengan menggunakan *cabinet dryer* pada suhu 60°C selama 20 jam. Hasil yang diperoleh kemudian melalui proses deproteinasi menggunakan larutan NaOH 3,5% (rasio cangkang udang dengan NaOH adalah 1:10) pada suhu 80°C selama 2 jam. Campuran kemudian disaring dan dibilas dengan air hingga mencapai pH netral dan kemudian dikeringkan dengan menggunakan *cabinet dryer* pada suhu 60°C selama 20 jam. Hasil yang diperoleh merupakan isolat kitin. Tepung cangkang udang dan isolat kitin yang diperoleh kemudian dianalisis rendemen, kadar air (AOAC, 2005), kadar abu (AOAC, 2005), kadar protein metode Bradford (Nielsen, 2009), dan derajat deasetilasi menggunakan FTIR (Czechowska-Biskup et al., 2011).

Pembuatan kitin koloidal

Kitin koloidal dibuat dengan menggunakan metode Setia (2015). Sebanyak 10 gram isolat kitin dicampurkan dengan larutan HCl pekat (rasio 1:14 b/v) dan diaduk selama 2 jam hingga seluruh isolat kitin larut. Setelah itu, campuran ditambahkan dengan 500 ml etanol absolut dan disaring. Endapan yang diperoleh ditambahkan dengan larutan NaOH 5N hingga mencapai pH netral dan disentrifugasi pada kecepatan 3,500 rpm selama 10 menit. Endapan yang diperoleh merupakan kitin koloidal.

Pembuatan media untuk produksi enzim

Media *Potato Dextrose Agar* (PDA) digunakan untuk pembuatan kultur stok dan media *Potato Dextrose Broth* (PDB) digunakan untuk pembuatan kultur kerja dan media fermentasi untuk produksi enzim. Untuk produksi enzim, media PDB ditambahkan dengan 0,5% $MgSO_4$, 0,5% Na_2HPO_4 , dan 0,5% kitin koloidal.

Ekstraksi kitinase ekstraseluler kasar dari *M. circinelloides*

Proses ekstraksi enzim dilakukan menggunakan metode Jenifer et al. (2014). Sebanyak 1 ose kultur *M. circinelloides* dimasukkan ke dalam 10 ml media PDB dan diinkubasi pada suhu ruang ($\pm 25^\circ C$) selama 48 jam. Sebanyak 3 ml inokulum dipindahkan ke dalam 300 ml media PDB yang telah ditambahkan dengan kitin koloidal, $MgSO_4$, dan Na_2HPO_4 , kemudian diinkubasi selama 48 jam pada suhu ruang. Setelah inkubasi, media kemudian disentrifugasi pada kecepatan 3,500 rpm selama 10 menit. Supernatan yang diperoleh merupakan kitinase ekstraseluler kasar dari *M. circinelloides*.

Penentuan pH optimal kitinase ekstraseluler

Media fermentasi sebanyak 300 ml ditambahkan dengan 0,5% (b/v) kitin koloidal dan pH media diatur menjadi pH 3, 4, 5, 6, 7, 8, dan 9 menggunakan buffer fosfat, sitrat, atau glisin (Herdyastuti & Cahyaningrum, 2017). Setelah itu, media ditambahkan dengan 1 ml kitinase kasar dari *M. circinelloides* dan diinkubasi selama 1 jam pada suhu ruang. Setelah inkubasi selesai, campuran disentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm selama 10 menit dan supernatan yang diperoleh kemudian dianalisis menggunakan metode DNS untuk menentukan konsentrasi N-asetilglukosamin yang dihasilkan. Konsentrasi N-asetilglukosamin yang dihasilkan kemudian digunakan untuk perhitungan aktivitas enzim (Rahmansyah & Sudiana, 2003). Nilai pH optimal ditentukan berdasarkan aktivitas enzim tertinggi.

Penentuan suhu optimal kitinase ekstraseluler

Media fermentasi sebanyak 300 ml ditambahkan dengan 0,5% (b/v) kitin koloidal dan disesuaikan pH-nya berdasarkan pH optimal yang telah diperoleh dari tahapan sebelumnya. Setelah itu, media ditambahkan dengan 1 ml kitinase kasar dari *M. circinelloides* dan diinkubasi selama 1 jam pada suhu 30, 40, 50, 60, 70, dan 80°C (Herdyastuti & Cahyaningrum, 2017). Setelah inkubasi selesai, campuran disentrifugasi dengan kecepatan 3,000 rpm selama 10 menit dan supernatan yang diperoleh kemudian dianalisis menggunakan metode DNS untuk menentukan konsentrasi N-asetilglukosamin yang dihasilkan. Konsentrasi N-asetilglukosamin yang dihasilkan kemudian digunakan untuk perhitungan aktivitas enzim (Rahmansyah & Sudiana, 2003). Suhu optimal ditentukan berdasarkan aktivitas enzim tertinggi.

Optimasi konsentrasi substrat dan lama fermentasi

Media fermentasi disesuaikan dengan pH optimal menggunakan 1 ml buffer dan ditambahkan dengan substrat kitin dengan konsentrasi 0,5%, 1%, 1,5%, dan 2%. Media ini kemudian ditambahkan dengan 1 ml kitinase ekstraseluler kasar dan diinkubasi pada suhu optimal selama 2 jam, 4 jam, 6 jam, dan 24 jam (Jamialahmadi *et al.*, 2011). Setelah inkubasi selesai, campuran disentrifugasi dengan kecepatan 3,000 rpm selama 10 menit dan supernatan yang diperoleh kemudian dianalisis. Analisis N-asetilglukosamin dilakukan dengan metode DNS berdasarkan Rahmansyah & Sudiana (2003).

Analisis N-asetilglukosamin dan aktivitas enzim

Aktivitas enzim dan konsentrasi N-asetilglukosamin dianalisis menggunakan metode kolorimetrik DNS berdasarkan penelitian Rahmansyah & Sudiana (2003). Sampel hasil fermentasi enzimatis ditambahkan 2 ml larutan DNS dan 1 ml larutan Na-K-tartarat, kemudian diinkubasi pada suhu 100°C selama 15 menit. Setelah inkubasi, sebanyak 1 ml larutan yang diperoleh diencerkan dengan 5 ml air destilata. Sampel kemudian diukur konsentrasi N-asetil glukosaminnya menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 540 nm. Kurva standar dibuat menggunakan konsentrasi standar N-asetilglukosamin sebesar 200, 400, 600, 800 and 1000 µg/ml. Sebanyak 1 µmol N-asetilglukosamin yang dihasilkan per menit dari reaksi enzimatis menggunakan kitinase dengan kondisi reaksi tersebut di atas dinyatakan sebagai 1 unit (U) aktivitas enzim.

Analisis data

Analisis statistik menggunakan program SPSS dilakukan untuk mengetahui konsentrasi substrat (kitin koloidal) dan lama fermentasi yang optimal untuk produksi N-asetilglukosamin. Adapun rancangan percobaan yang digunakan adalah rancangan acak lengkap 2 faktor, dengan faktor-faktor berupa substrat dan lama fermentasi. Uji statistik menggunakan *Univariate analysis* dengan uji lanjut menggunakan *Duncan test*.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Karakteristik tepung cangkang udang dan isolat kitin

Beberapa analisis kimia dilakukan untuk mengetahui karakteristik tepung cangkang udang dan isolat kitin yang diperoleh (Tabel 1).

Tabel 1. Karakteristik tepung cangkang udang dan isolat kitin.

Parameter	Tepung cangkang udang	Isolat kitin
Kadar air (basis basah) (%)	9,74±0,34	4,59±0,44
Kadar abu (basis basah) (%)	49,72±3,66	0,45±0,03
Kadar protein (%)	34,84±1,30	1,74±0,07
Derajat deasetilasi	-	28,08

Rendemen tepung cangkang udang yang diperoleh setelah melalui proses pengeringan adalah sekitar 38,43%, sedangkan rendemen kitin yang diperoleh adalah sekitar 23,02%. Rendemen kitin yang diperoleh pada penelitian ini lebih tinggi jika dibandingkan dengan penelitian sebelumnya, yaitu sekitar 18,4% (Ramadhan *et al.*, 2010) dan 17,36% (Hossain & Iqbal, 2014).

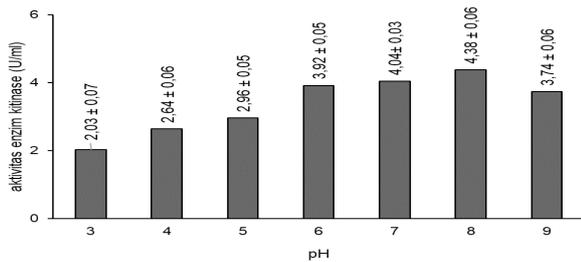
Kadar air tepung cangkang udang yang diperoleh pada penelitian ini, yaitu 9,74±0,34%, lebih rendah dibandingkan hasil dari penelitian Sanusi (2004) dan Percot *et al.* (2003), yaitu sekitar 13,29% dan 11,3%. Kadar air yang lebih rendah ini menunjukkan bahwa pengeringan cangkang udang di bawah sinar matahari cukup efektif untuk menurunkan kadar air dari tepung cangkang udang yang dihasilkan. Kadar air isolat kitin yang diperoleh pada penelitian ini adalah 4,59±0,44%, juga lebih rendah dibandingkan dengan hasil dari penelitian sebelumnya oleh Hossain & Iqbal (2014), yang menunjukkan kadar air kitin yang dihasilkan adalah 8,5%. Menurut Khan *et al.* (2002), kitin merupakan senyawa higroskopis sehingga untuk memperpanjang umur simpannya, kadar air kitin sebaiknya kurang dari 10%.

Kadar abu dan kadar protein dari tepung cangkang udang maupun isolat kitin diukur untuk mengetahui efektifitas proses demineralisasi dan deproteinasi yang dilakukan. Kadar abu tepung cangkang udang adalah sekitar 49,72±3,66%, sedangkan kadar abu pada isolat kitin adalah 0,45±0,03%. Kadar abu pada isolat kitin yang dihasilkan mirip dengan hasil penelitian sebelumnya oleh Hossain & Iqbal (2014), yaitu sekitar 0,36%. Hasil ini menunjukkan proses demineralisasi berjalan dengan baik karena isolat kitin yang dihasilkan mengandung kadar abu yang rendah.

Kadar protein dari tepung cangkang udang adalah 34,84±1,30%, sedangkan kadar protein pada isolat kitin adalah 1,74±0,07%. Hasil ini sesuai dengan penelitian oleh Younes & Rinaudo (2015), yang menyatakan bahwa isolat kitin yang diperoleh dari udang memiliki kadar protein kurang dari 5%. Hasil penelitian lain oleh Islam *et al.* (2016) juga menunjukkan bahwa kadar protein kitin adalah sekitar 3,5%. Hasil ini menunjukkan bahwa proses deproteinasi yang dilakukan dalam penelitian ini sudah efektif.

Derajat deasetilasi diukur untuk memastikan bahwa hasil yang diperoleh setelah proses demineralisasi dan deproteinasi adalah kitin dan bukan kitosan. Pada penelitian ini, analisis menggunakan FTIR menunjukkan bahwa derajat deasetilasi isolat kitin yang diperoleh adalah 28,08%. Hasil ini menunjukkan bahwa isolat yang diperoleh adalah kitin, karena berdasarkan Puspawati & Simpen (2010), senyawa kitin memiliki derajat deasetilasi antara 25-70%.

Penentuan pH optimal untuk aktivitas kitinase ekstraseluler

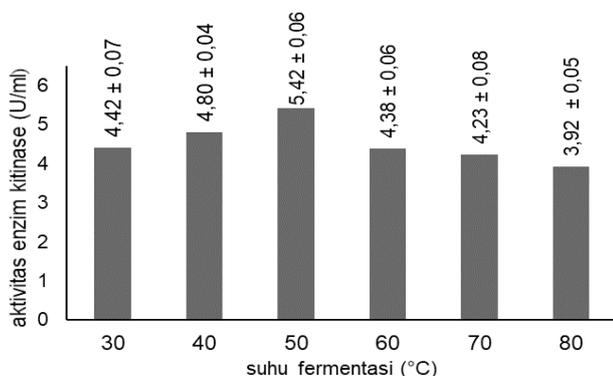


Gambar 1. Pengaruh pH media fermentasi terhadap aktivitas kitinase.

Fermentasi menggunakan kitinase ekstraseluler kasar dari *M. circinelloides* dilakukan pada media dengan berbagai pH, yaitu dari pH 3-9. Aktivitas enzim kemudian diukur dan hasilnya dapat dilihat pada Gambar 1. Hasil penelitian menunjukkan bahwa aktivitas enzim tertinggi didapatkan pada pH 8, yaitu sebesar 4,38±0,06 U/ml. Beberapa penelitian sebelumnya menunjukkan kitinase dari kapang memiliki aktivitas optimal pada pH basa, antara lain kapang *Basidiobolus ranarum* memiliki aktivitas kitinase tertinggi pada pH 9 dengan aktivitas enzim sebesar 3,47 U/ml (Mishra et al., 2012) dan kapang *Streptomyces sporovirgulis* memiliki aktivitas kitinase tertinggi pada pH 8 (Brzezinska et al., 2013).

Penentuan suhu optimal untuk aktivitas kitinase ekstraseluler

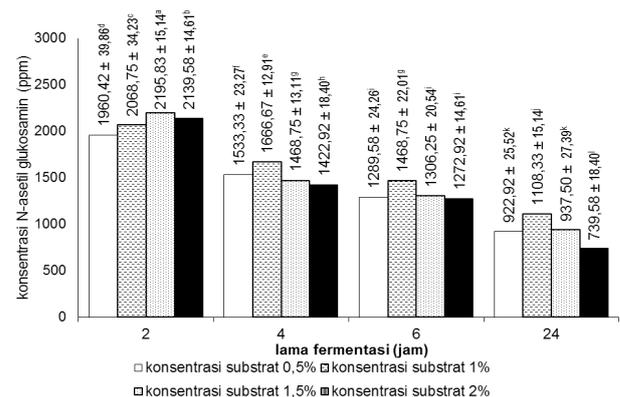
Untuk menentukan suhu optimal, proses fermentasi dilakukan pada pH optimal untuk kitinase dari *M. circinelloides*, yaitu pH 8, pada berbagai suhu inkubasi, yaitu dari suhu 30°C hingga 80°C. Pengaruh suhu fermentasi terhadap aktivitas enzim kitinase dapat dilihat pada Gambar 2. Hasil menunjukkan bahwa suhu optimal untuk kitinase ekstraseluler dari *M. circinelloides* adalah 50°C dengan aktivitas enzim sebesar 5,42±0,06 U/ml. Aktivitas enzim optimal pada suhu 50°C juga ditemukan pada kitinase yang dihasilkan oleh kapang *Beauveria bassiana*, dengan aktivitas enzim sebesar 0,486 U/ml (Suryadi et al., 2013). Penelitian lain oleh Ghanem et al. (2010) menunjukkan bahwa kitinase dari *Aspergillus terreus* memiliki aktivitas enzim optimal pada suhu 50°C, bersifat *thermostable* dan hanya mengalami penurunan aktivitas sebanyak 10% pada saat dipanaskan pada suhu 60°C selama 60 menit.



Gambar 2. Pengaruh suhu fermentasi terhadap aktivitas kitinase.

Penentuan konsentrasi substrat kitin dan lama fermentasi optimal untuk produksi N-asetilglukosamin

Lama fermentasi dan konsentrasi substrat merupakan faktor-faktor yang menentukan produksi N-asetilglukosamin (Cahyani, 2013). Hasil analisis statistik menggunakan SPSS menunjukkan bahwa interaksi antara lama fermentasi dengan konsentrasi substrat memberikan pengaruh signifikan terhadap konsentrasi N-asetilglukosamin yang dihasilkan. Selain itu, lama fermentasi dan konsentrasi substrat juga berpengaruh terhadap konsentrasi N-asetilglukosamin yang diperoleh. Pengaruh konsentrasi substrat kitin dan lama fermentasi terhadap produksi N-asetilglukosamin pada penelitian ini dapat dilihat pada Gambar 3.



Gambar 3. Pengaruh konsentrasi substrat dan lama fermentasi terhadap konsentrasi N-asetilglukosamin.

Keterangan: Notasi yang berbeda menyatakan adanya perbedaan signifikan ($p < 0,05$).

Gambar 3. menunjukkan bahwa produksi N-asetilglukosamin tertinggi diperoleh pada saat konsentrasi substrat kitin sebesar 1,5% dengan lama fermentasi 2 jam. Konsentrasi N-asetilglukosamin yang dihasilkan adalah sebesar 2195,83±15,14 ppm, lebih tinggi jika dibandingkan dengan penelitian oleh Herdyastuti & Cahyaningrum (2017), dengan konsentrasi N-asetilglukosamin yang dihasilkan adalah sebesar 1360 ppm dengan lama fermentasi 8 jam dan konsentrasi enzim 0,1 U/ml. Adapun kitinase yang digunakan dalam penelitian tersebut berasal dari bakteri *Pseudomonas* sp. TNH54.

Secara umum, peningkatan konsentrasi substrat akan meningkatkan jumlah produk fermentasi yang dihasilkan. Akan tetapi pada konsentrasi tertentu, penambahan substrat tidak akan lagi meningkatkan jumlah produk yang dihasilkan ketika seluruh enzim sudah digunakan dalam reaksi. Fenomena ini dikenal sebagai kinetika reaksi Michaelis-Menten (Scanlon et al., 2018). Hal lain yang dapat menyebabkan penurunan konsentrasi N-asetilglukosamin pada lama fermentasi yang lebih panjang adalah adanya kemungkinan kitinase telah mengalami denaturasi atau ada penghambatan yang terjadi selama proses fermentasi. Hidrolisis kitin menggunakan kitinase pada konsentrasi yang tinggi akan menyebabkan terjadinya *feedback inhibition* yang disebabkan oleh terbentuknya senyawa chito-oligosakarida selama proses hidrolisis

dan konsentrasi N-asetilglukosamin yang terlalu tinggi (Herdyastuti & Cahyaningrum, 2017). Selain itu, Umemoto *et al.* (2015) juga menyatakan bahwa beberapa senyawa seperti allosamidin dapat menghambat kerja kitinase. Allosamidin terdapat secara alami di alam dan diketahui dapat berikatan dengan kitinase sehingga mengurangi aktivitas enzimnya.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa kitinase ekstraseluler dari *M. circinelloides* dapat digunakan untuk produksi N-asetilglukosamin dalam waktu yang cukup singkat, yaitu konsentrasi N-asetilglukosamin optimal telah didapatkan dengan lama fermentasi 2 jam, sedangkan produksi N-asetilglukosamin menggunakan sel kapang biasanya memerlukan waktu beberapa hari. Kitinase dari *M. circinelloides* ini juga bersifat *thermostable* karena masih menunjukkan aktivitas enzim pada suhu fermentasi hingga 80°C. Akan tetapi, kitinase hanya dapat digunakan dalam satu kali reaksi fermentasi, padahal proses ekstraksi kitinase cukup panjang dan rumit. Oleh karena itu, perlu dilakukan proses imobilisasi enzim sehingga kitinase yang diperoleh dapat digunakan secara berulang untuk menghasilkan N-asetilglukosamin.

KESIMPULAN

Enzim kitinase ekstraseluler kasar dari *Mucor circinelloides* memiliki aktivitas enzim optimal pada pH 8, yaitu sebesar $4,38 \pm 0,06$ U/ml, sedangkan suhu optimalnya dicapai pada suhu fermentasi 50°C dengan aktivitas enzim sebesar $5,42 \pm 0,06$ U/ml. Konsentrasi substrat dan lama fermentasi mempengaruhi produksi N-asetilglukosamin. Adapun kondisi fermentasi optimal adalah dengan konsentrasi substrat sebesar 1,5% dan lama fermentasi 2 jam, dengan konsentrasi N-asetilglukosamin yang dihasilkan adalah sebesar $2.195,83 \pm 15,14$ ppm.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis ingin menyampaikan terima kasih kepada Lembaga Penelitian dan Pengabdian Masyarakat (LPPM), Universitas Pelita Harapan, yang telah membantu mendanai penelitian ini melalui skema penelitian No. P-0004/FaST/II/2018. Penulis juga ingin menyampaikan terima kasih kepada Laboratorium Penelitian dan Inovasi Pangan serta Laboratorium Mikrobiologi Universitas Pelita Harapan yang telah memfasilitasi penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Al-Hassan, A.A. 2016. Utilization of waste: extraction and characterization of chitosan. *Civil and Environmental Research*. 8 (3): 117-123
- Annamalai, N., V.R. Mayavan, V. Shanmugam & B. Thangavel. 2011. Purification and characterization of chitinase from *Alcaligenes faecalis* AUO2 by utilizing marine waste and its antioxidant activity. *Annals of Microbiology*. 61: 801-807
- AOAC. 2005. Determination of Moisture, Ash, Protein and Fat. Official Method of Analysis of the Association of Analytical Chemists. 18th Edition, AOAC, Washington DC
- Arif, A.R., H.N. Ischaida & S. Dali. 2013. Isolasi kitin dari limbah udang putih (*Penaeus merguensis*) secara enzimatik. Prosiding Seminar Nasional Kimia "Peran Sains dan Teknologi dalam Mendukung Ketahanan Pangan dan Energi Nasional". Universitas Hasanuddin, Makassar, Indonesia. 10-16
- Brzezinska, M.S., U. Jankiewicz & K. Lisiecki. 2013. Optimization of cultural conditions for the production of antifungal chitinase by *Streptomyces spovirgulis*. *Applied Biochemistry and Microbiology*. 49 (2): 154-159
- Cahyani, L. 2013. Pemanfaatan Tepung Cangkang Udang sebagai Media Produksi Kitinase oleh Bakteri Kitinolitik Isolat 26. Skripsi, Universitas Jember, Jember
- Cahyono, E., S. Pipih & W. Ietje. 2014 Development of a pressurized hydrolysis method for producing glucosamine. *Asian Journal of Agriculture and Food Sciences*. 2 (5): 390-396
- Chen, J., C. Shen & C. Lui. 2010. N-acetylglucosamine: production and applications. *Marine Drugs*. 8(9): 2493-2516
- Czechowska-Biskup, R., J. Diana, R. Bozena, U. Piotr & M.R. Janusz. 2012. Determination of degree of deacetylation of chitosan-comparison methods. *Progress on Chemistry and Application of Chitin and Its Derivative*. 17: 5-20
- Ghanem, K. M, S.M. Al-Garni & N.H. Al-Makishah. 2010. Statistical optimization of cultural conditions for chitinase production from fish scales waste by *Aspergillus terreus*. *African Journal of Biotechnology*. 9 (32): 5135-5146
- Herdyastuti, N & S. E. Cahyaningrum. 2017. Analysis of N-acetyl-glucosamine from enzymatic degradation of amorphous chitin. *Rasayan Journal of Chemistry*. 10 (1): 226-233
- Hossain, M.S & A. Iqbal. 2014. Production and characterization of chitosan from shrimp waste. *Journal of the Bangladesh Agricultural University*. 12 (1): 153-160
- Islam, S. Z., M. Khan & A. Alam. Production of chitin and chitosan from shrimp shell wastes *Journal of the Bangladesh Agricultural University*. 14 (2): 253-259
- Jamialahmadi, K., J. Behravan, M.F. Najafi, M.T. Yazdi, A.R. Shahverdi & M.A. Faramarzi. 2011. Enzymatic production of N-acetyl-D-glucosamine from chitin using crude enzyme preparation of *Aeromonas* sp. PTCC1691. *Biotechnology*. 10 (3): 292-297
- Jenifer, S., J. Jeyasree, D.L. Kezia & K. Manikandan. 2014. Purification and characterization of chitinase from *Trichoderma viride* N9 and its antifungal activity against phytopathogenic fungi. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 3 (2): 1604-1611
- Junianto, B.W & S. Siswa. 2013. Selection of methods for microbiological extraction of chitin from shrimp shells. *Microbiology Indonesia*. 7 (2): 75-83
- McNeil, B., A. David, G. Ioannis & H. Linda. 2013. Microbial Production of Food Ingredients, Enzyme and

- Nutraceuticals. Woodhead Publishing. Cambridge. 494-530
- Mishra, P., P. Kshirsagar, S.S. Nilegaonkar & S.K. Singh. 2012. Statistical optimization of medium components for production of extracellular chitinase by *Basidiobolus ranarum*: a novel biocontrol agent against plant pathogenic fungi. *Journal of Basic Microbiology*. 52 (5): 539-548
- Nielsen, S. S. 2010. *Food Analysis* 4th ed. Springer Science+Business Media. New York. 578-582
- Percot, A., V. Christophe & D. Alain. 2003. Optimization of chitin extraction from shrimp shells. *Biomacromolecules*. 4 (1): 12-18
- Puspawati, N.M & I.N. Simpen, 2010. Optimasi deasetilasi khitin dari kulit udang dan cangkang kepiting limbah restoran seafood menjadi khitosan melalui variasi konsentrasi NaOH. *Jurnal Kimia*. 4 (1): 79-90
- Rahmansyah, M & I.M. Sudiana. 2003. Optimasi analisis amilase dan glukukanase yang diekstrak dari miselium *Pleurotus ostreatus* dengan asam 3,5 dinitrosalisilat. *Berkala Penelitian Hayati*. 9: 7-12
- Ramadhan, L.O.A.N., C.L. Radiman, D. Wahyuningrum, V. Suendo, L. O. Ahmad & S. Valiyaveetil. 2010. Deasetilasi kitin secara bertahap dan pengaruhnya terhadap derajat deasetilasi serta massa molekul kitosan. *Jurnal Kimia Indonesia* 5 (1): 17-21
- Salazar, J., L. Bello, M. Chávez, R. Añez, J. Rojas & V. Bermúd. 2014. Glucosamine for osteoarthritis: biological effects, clinical efficacy, and safety on glucose metabolism. *Arthritis*: 1-13
- Sanusi, M. 2004. Transformasi kitin dari hasil isolasi limbah industri udang beku menjadi kitosan. *Marina Chimca Acta*. 5 (2): 28-32
- Scanlon, M.G., A.W. Henrich & J.R. Whitaker. 2018. Factors Affecting Enzyme Activity in Food Processing. *Proteins in Food Processing*. Elsevier BV. Amsterdam. 337-365
- Setia, I.N. 2015. Chinolytic assay and identification of bacteria isolated from shrimp waste based on 16S rDNA sequences. *Advances in Microbiology*. 5 (7): 541-548
- Suryadi, Y., T.P. Priyatno, I.M. Samudera, D.N. Susilowati, N. Lawati & E. Kustaman. 2013. Pemurnian parsial dan karakterisasi kitinase asal jamur entomopatogen *Beauveria bassiana* Isolat BB200109. *Jurnal AgroBiogen*. 9 (2):77-84
- Suzuki, S., E. Nakanishi., T. Ohira, R. Kawachi, H. Nagasawa & S.Sakuda. 2006. Chitinase inhibitor allosamidin is a signal molecule for chitinase production in its producing *Streptomyces*. *The Journal of Antibiotics*. 59 (7): 402-409
- Traving S.J., U.H. Thygesen, L. Riemann, C.A. Stedmon. 2015. A model of extracellular enzymes in free-living microbes: which strategy pays off?. *Applied and Environmental Microbiology*. 81: 7385-7393
- Umemoto, N., K. Yuka, O. Takayuki, O. Takuo, N. Tomoyuki, S. Sakuda, T. Taira & T. Fukamizo. 2015. Crystal structures and inhibitor binding properties of plantclass V chitinases: the cycad enzyme exhibits unique structural and functional features. *The Plant Journal*. 82: 54-66
- Veronica. 2017. Uji Aktivitas Kitinolitik Kapang yang Diisolasi dari Kulit Udang Windu (*Penaeus monodon*). Skripsi, Universitas Pelita Harapan, Tangerang
- Younes, I & M. Rinaudo. 2015. Chitin and chitosan preparation from marine sources. structure, properties and applications. *Marine Drugs*. 13 (3): 1133-1174
- Zhang, L.Y., X.Y. Zhang, W. Zhang, C. Lin & Y.G. Zhang. 2017. Screening and identification of chitinase producing strain and its inhibition action to dominant moulds in corn stalk. *Chinese Journal of Animal Nutrition*. 3: 1-8