

hasil penelitian

STUDI TENTANG KITIN CANGKANG UDANG (*Penaeus merguensis*) I : ISOLASI MENGGUNAKAN ACTINASE E DAN EDTA

Oleh :

Umar Santoso*)

Abstrak

Telah dilakukan isolasi *kitin* dari cangkang udang (*Penaeus merguensis*) menggunakan *Actinase E* untuk deproteinisasi dan *EDTA* untuk demineralisasi. Pada optimasi kondisi *Actinase E* dalam deproteinisasi, hasil percobaan menunjukkan bahwa pH, suhu dan konsentrasi enzim optimum berturut-turut adalah 6,0; 50°C dan 4,0 mg/ml (4000 tyrosine unit/ml) untuk substrat 40 mg/ml.

Kitin yang diperoleh dengan prosedur dalam percobaan ini mempunyai residu protein, abu, kalsium, fosfor, serta derajat deasetilasi relatif sama dengan *kitin* komersial. Dalam bentuk *kitin* yang dapat larut dalam air, *kitin* yang diperoleh mempunyai berat molekul > 800.000; sedangkan *kitin* komersial mempunyai berat molekul > 50.000, diestimasi dengan HPLC. Hasil percobaan menunjukkan pula bahwa *Actinase E* tidak menampakkan aktivitas deasetilitik maupun kitinolitik.

Pendahuluan

Kitin (*Chitin*), poli-beta-N-asetil-D-glukosamin, adalah biopolimer alami, terutama sebagai penyusun cangkang (kulit keras) udang-udangan dan serangga, dan penyusun dinding-dinding sel yeast dan fungi. Karena sifat-sifat khas yang dimilikinya seperti bioaktivitas, biodegradabilitas dan keliatannya, *kitin* memberikan kegunaan yang dapat diterapkan di berbagai bidang.

Meskipun sumber *kitin* di alam bermacam-macam, namun sampai saat ini sumber utama yang praktis dieksplorasi adalah cangkang udang-udangan yang secara ekonomis potensial seperti udang, lobster, kepiting, dan udang karang atau crayfish (Johnson and Peniston, 1982). Cangkang udang-udangan ini bukan saja terkaya, namun juga merupakan sumber utama yang saat ini tersedia secara kuantitas mencukupi kebutuhan *kitin* di negara-negara industri. Suatu pabrik pengolahan udang akan menghasilkan limbah atau hasil samping sekitar 50 — 60% dari bahan dasar. Dari bagian ini sekitar 32% adalah bahan kering, dan 25% dari bahan ini adalah *kitin* (Muzzarelli, 1985).

Sebagai negara kepulauan dengan wilayah laut yang luas, Indonesia mempunyai potensi besar untuk produksi udang. Estimasi produksi udang per tahun mencakup 130 ribu ton untuk sumber air laut, dan 82 ribu ton untuk sumber-sumber air payau, atau total 212 ribu ton (Ilyas and Djajadiredja, 1979). Jika dianggap separoh potensi tersebut dipanen, dan diolah dalam negeri, dengan perhitungan seperti di atas, maka secara teoretis Indonesia mampu memproduksi *kitin* 4,7 ribu ton per tahun. Studi

*) Staf Pengajar Fak. Teknologi Pertanian UGM Yogyakarta.

dan eksplorasi *kitin* dari cangkang udang mempunyai makna penting bukan saja karena bahan ini secara ekonomis potensial, tetapi juga karena tuntutan untuk mengatasi masalah lingkungan yang ditimbulkan oleh industri-industri pengolahan udang.

Kitin merupakan bahan dasar untuk bahan-bahan kimia yang diperlukan secara luas di berbagai bidang seperti bidang biokimia, obat-obatan/farmakologi, pangan dan gizi, enzimologi, pertanian, industri kertas, tekstil, film dan lain-lain. Dalam bidang pengolahan pangan, *kitin* dapat digunakan sebagai pematap sistem emulsi, sebagai agensia pengikat air atau lemak, menaikkan "loaf volume" roti tawar (Knoor, 1982), sebagai agensia pengikat pewarna makanan (Knoor, 1983) dan lain sebagainya. *Kitin* adalah sumber asetil glukosamin dan glukosamin yang dapat dipakai sebagai pengawet dan antibiotik.

Kitosan (hasil deasetilasi *kitin*), yang telah lama digunakan dalam penanganan air limbah, dan sebagai agensia pengikat logam, sekarang ditemukan bersifat dapat menurunkan kadar kolesterol darah (*hypocholesterolemic*) (Sugano *et al.*, 1988). *Kitin* dan *kitosan* dapat digunakan sebagai bahan pembungkus atau kapsul obat-obatan; dalam ilmu bedah, dapat digunakan untuk bahan benang operasi. Dalam bidang enzimologi, *kitin* digunakan sebagai media untuk immobilisasi enzim. Pemanfaatan *kitin* dan turunan-turunannya di berbagai bidang secara luas telah diuraikan oleh Muzzarelli (1977), _____ (1983), _____ (1985), dan _____ (1988).

Meskipun penelitian-penelitian tentang pemanfaatan *kitin* dan turunannya telah dikembangkan, namun penelitian tentang cara ekstraksi (isolasi dan purifikasi) masih menjadi perhatian khusus terutama untuk mendapatkan *kitin* yang semurni dan dalam bentuk sealam mungkin, misalnya *kitin* yang akan

digunakan dalam bidang biomedik dan enzimologi (Austin, 1988).

Kitin, lebih tepat disebut sebagai *isolat kitin* karena sifat-sifatnya berbeda-beda menurut sumber dan cara penyediaannya (Austin *et al.*, 1981; Austin, 1988). Dalam cangkang, udang *kitin* berikatan dengan protein, garam-garam anorganik seperti kalsium karbonat, dan lipid termasuk pigmen-pigmen (Muzzarelli, 1977; Shimahara *et al.*, 1984; Austin, 1988). Oleh karena itu isolasi dan purifikasi *kitin* dari cangkang udang pada dasarnya terdiri atas dua perlakuan, yaitu deproteinisasi dan demineralisasi, di samping penghilangan lipid dengan pelarutnya.

Sampai saat ini cara yang umum digunakan untuk isolasi dan purifikasi *kitin* dari cangkang udang-udangan adalah cara Hackman (Hackman, 1954). Proses ini melibatkan demineralisasi dengan HCl encer dan deproteinisasi dengan NaOH panas dalam waktu relatif lama. Karena proses ini merupakan perlakuan-perlakuan kasar (*harsh treatment*), dicurigakan dapat mempengaruhi perubahan-perubahan kimiawi *kitin* misalnya depolimerisasi dan deasetilasi (Foster and Hackman, 1957). Oleh karena itu perlu dikembangkan cara isolasi dan purifikasi untuk mendapatkan *kitin* semurni dan dalam bentuk sealam (tidak mengalami depolimerisasi dan deasetilasi) mungkin, dengan perlakuan yang lebih lunak (*mild treatment*). Foster and Hackman (1954) menggunakan *ethylenediaminetetraacetic acid* (EDTA) untuk demineralisasi cangkang kepiting *Cancer pagurus*, dilaporkan bahwa demineralisasi dengan EDTA dapat menurunkan kadar abu dari mula-mula 45% menjadi 2,6%. Dalam hal deproteinisasi dengan perlakuan lunak, Herzog *et al.*, (1975) mencoba menggunakan protease-protease *pronase* dan *papaine* untuk deproteinisasi cangkang udang karang, *Astacus fluviatilis*, didapatkan bahwa enzim-enzim tersebut

dapat menghilangkan sebagian besar protein; sedangkan deproteinisasi dengan *anhydrous formamide* atau 1 N sodium hidroksida dapat menghilangkan hampir semuanya. Shimahara *et al.*, (1984) menggunakan bakteri proteolitik *Pseudomonas maltophilia* LC 102 untuk deproteinisasi cangkang udang (*Penaeus japonicus*) yang telah dilakukan demineralisasi dengan 0.1 M EDTA sebelumnya. Setelah inkubasi selama 24 jam pada suhu 30°C, kandungan protein dalam cangkang udang berkurang dari semula 25,4% menjadi 0,7%; setelah tujuh hari inkubasi, kandungan proteinnya menjadi 0,3%. Lebih lanjut dilaporkan, bahwa preparasi *kitin* dari cangkang udang menggunakan kombinasi demineralisasi dengan EDTA dan deproteinisasi dengan inkubasi oleh *Pseudomonas maltophilia* LC 102 menghasilkan isolat *kitin* dengan residu protein dan abu serta derajat deasetilasi masing-masing 0,3%; 0,5% dan 9,9%.

Tujuan penelitian ini adalah untuk menemukan cara lain isolasi dan purifikasi untuk mendapatkan *kitin* yang semurni ada sealami mungkin, menggunakan *Actinase E* (suatu protease dari *actinomyces*) untuk deproteinisasi, dan EDTA untuk demineralisasi.

Bahan dan Cara Penelitian

Dalam penelitian ini, mula-mula dilakukan analisis penyusunan optimasi pH, suhu dan konsentrasi *Actinase E* dalam deproteinisasi, dan kemudian isolasi dan purifikasi *kitin* dilakukan dengan cara dan suasana yang ditetapkan. Demineralisasi dilakukan menurut Foster and Hackman, (1957) dengan modifikasi menurut Shimahara *et al.*, (1984). *Kitin* yang diperoleh ditentukan kadar residu protein, abu, kalsium, fosfor, derajat deasetilasi dan berat molekul, dibandingkan dengan *kitin* komersial.

1. Bahan

Udang (*Penaeus merguensis*), dengan nama lokal BANANA PRAWN, mulanya diambil dari pantai utara Jawa. Setelah dilakukan pencucian, cangkang udang dipisahkan, dijemur selama tiga hari, kemudian dibubuk dengan blender.

Kitin komersial dibeli dari Cosmo Bio Co. Ltd., *Actinase E* (protease dari *Streptomyces griseus*) dibeli dari Kaken Seiyaku Co. Ltd., *Kitinase* (*Chitinase*) merupakan sumbangan dari Go Do Shusei Co. Ltd., (bersama ini diucapkan banyak terimakasih); *lysozyme* dibeli dari Nacalai Tesque Co. Ltd. Semua pereaksi yang dipakai adalah bereaksi baku laboratorium.

2. Analisis Kimia

Analisis proksimat dilakukan menurut AOAC (1984). Penentuan protein dilakukan terhadap cairan hasil deproteinisasi sampel dengan perebusan dalam 2 N NaOH selama 36 jam. Penentuan protein pada *kitin* yang diperoleh dilakukan dengan cara Hartree (1972) (modifikasi metode Lowry) dengan Bovine Serum Albumin (BSA) sebagai baku protein.

Analisis mineral dilakukan dengan SHIMADZU Sequential Plasma Spectrophotometer, ICPS - 1000 II.

3. Time Course Deproteinisasi oleh Actinase E

Inkubasi dilakukan terhadap 200 mg sampel dengan 5,0 ml larutan *Actinase E* 4,0 mg/ml (4000 tyrosine unit/ml) dalam 0,1 M *buffer* sitrat pH 6,0, dilakukan dalam tabung reaksi yang diletakkan pada magnetic stirrer bath (EYELA Model RC-12, Tokyo Rikakai Co. Ltd) pada suhu 50°C. Sebagai pengawet ke dalam tabung reaksi ditambahkan beberapa

tetes toluen. Preparasi dilakukan terhadap beberapa tabung sedemikian rupa sehingga pada setiap 12 jam inkubasi dapat disiapkan untuk dilakukan analisis terhadap kandungan protein dalam hasil deproteinisasi.

Setelah inkubasi, campuran disaring, dicuci sampai bersih dengan air dan etanol. Residu kemudian di-digesti dengan 2 N NaOH pada suhu 100°C selama 36 jam. Setelah disaring, kandungan protein dalam filtrat dideterminasi dengan metode Hartree (Hartree, 1972).

4. Estimasi pH Optimum

200 mg sampel diinkubasikan dengan 5,0 ml larutan *Actinase E* 4,0 mg/ml dalam 0,1 M buffer sitrat pH 4,0; 5,0; 6,0; 7,0 atau 0,1 M buffer borat pH 8,0 dan 9,0. Inkubasi dilakukan pada suhu 50°C selama 48 jam. Setelah inkubasi, campuran dalam tabung reaksi diperlakukan seperti pada (3).

5. Estimasi Suhu Optimum

200 mg sampel diinkubasikan dengan 5,0 ml larutan *Actinase E* 4,0 mg/ml dalam 0,1 M buffer sitrat pH 6,0 dengan jangkauan suhu 30 — 80°C pada interval suhu 10°C. Inkubasi dilakukan selama 48 jam.

6. Estimasi Konsentrasi Enzim Optimum

200 mg sampel diinkubasikan dengan larutan *Actinase E* dalam 0,1 M buffer sitrat pH 6,0, dengan konsentrasi enzim dalam buffer $4,0 \times 10^{-4}$ mg/ml; $4,0 \times 10^{-3}$ mg/ml; $4,0 \times 10^{-2}$ mg/ml; $4,0 \times 10^{-1}$ mg/ml; 4,0 mg/ml; 4,0 x 10 mg/ml. Inkubasi dilakukan pada suhu 50°C selama 48 jam.

7. Isolasi dan Purifikasi Kitin

Ke dalam labu erlenmeyer 1000 ml ditambahkan 20,0 g sampel, 2,0 g Ac-

tinase E dalam 500 ml 0,1 M buffer sitrat pH 6,0 dan beberapa tetes toluene. Campuran diinkubasikan dalam magnetic stirrer bath suhu 50°C selama 60 jam. Setelah inkubasi, campuran disaring dengan kertas saring (ADVANTEC TOYO No. 2) dan dicuci dengan air dan dengan etanol sampai bersih. Residu diinkubasi lagi dengan *Actinase E* pada kondisi dan lama waktu yang sama. Setelah disaring dan dicuci, residu direndam dalam 0,1 M EDTA (disodium) pH 7,5 dan dibiarkan pada suhu kamar selama enam hari dengan penggantian EDTA yang baru setiap dua hari (cara Shimahara *et al.*, 1984). Campuran disaring dan dicuci dengan air dan dengan etanol sampai bersih, kemudian residu dikeringkan dalam oven suhu 40°C. Untuk *bleaching*, *kitin* yang diperoleh ini direndam dalam 0,5% (v/v) antiformine selama 5 Jam pada suhu kamar. Setelah disaring dan dicuci sampai bersih, *kitin* dikeringkan dalam oven suhu 40°C sampai kering. Diagram alir isolasi dan purifikasi *kitin* dari cangkang udang dapat dilihat pada Gambar 1.

8. Estimasi Derajat Deasetilasi

Hidrolisis *kitin* dengan HCl pekat pada suhu 40°C selama 2,5 jam menurut Rupley (1964), kemudian dilakukan penetapan N-asetil-D-glukosamin (GlcNAc) dan D-glukosamin (GlcN). Penetapan GlcNAc dilakukan dengan cara Reissig (Reissig *et al.*, 1955) dan GlcN dengan metode MBTH menurut Tsuji *et al.* (1969).

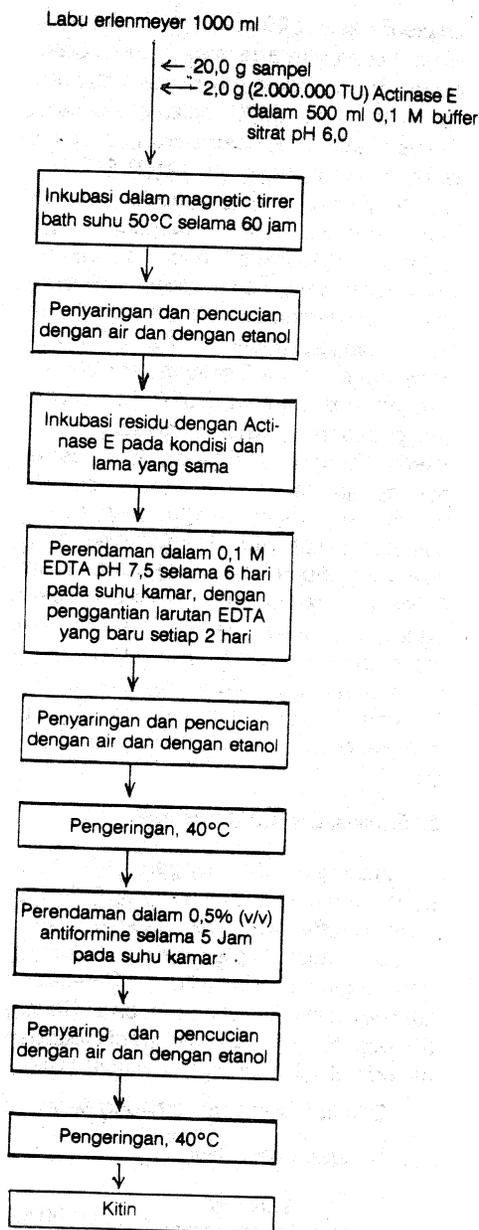
Derajat deasetilasi dihitung sebagai:

Derajat deasetilasi :

$$= \frac{\text{GlcN mol}}{\text{mol GlcNAc} + \text{mol GlcN}} \times 100\%$$

9. Estimasi Berat Molekul Kitin

Berat molekul dikirakan setelah dihasilkan *kitin* yang dapat larut dalam air,



Gambar 1. Isolasi dan purifikasi *kitin* dari cangkang udang

yaitu *kitin* alkali hasil regenerasi menurut Sannan *et al*, (1976). *Kitin* alkali disiapkan menurut Sannan *et al*, (1975).

Sebagai *kitin* yang dapat larut dalam air, berat molekulnya diperkirakan dengan HPLC. Kondisi HPLC: pompa, SHIMA-DZU LC-6A; kolom, ASAHIPAK GS-620; fase gerak, 0,1 M NaCl; laju aliran, 0,5 ml/menit; pengindra *indek bias*. Berat molekul baku adalah *pulullan* : P-800, P-400, P-200, P-100.

10. Pengujian Aktivitas Deasetilitik dan Kitinolitik Actinase E

Kitin komersial dilakukan inkubasi dengan *Actinase E* pada suasana yang sama dengan suasana pada proses deproteinisasi. Setelah inkubasi, campuran disaring dan residu dicuci sampai bersih. Untuk pengujian adanya aktivitas deasetilitik, residu *kitin* diperkirakan derajat aktivitas kitinolitik, dibuat suspensi residu *kitin* dalam air, kemudian cairan ditentukan daya mereduksi dengan cara *fero-feri sianida* menurut Park and Johnson (1949). Sebagai pembandingan, dilakukan inkubasi *kitin* komersial dengan *kitinase*, dan dengan *lysozyme*. Hidrolisat *kitin* oleh enzim-enzim ini diketahui mempunyai daya mereduksi seperti dilaporkan Berger and Weiser (1957).

Hasil dan Pembahasan

1. Komposisi Proksimat dan Kandungan Mineral Sampel

Hasil analisis proksimat dan analisis mineral cangkang udang (*Penaeus merguensis*) dan bagian yang tak dapat dimakan tercantum pada Tabel 1. Kadar protein, abu dan karbohidrat (*by difference*) pada kedua macam sampel merupakan penyusun yang banyak; sedangkan lipid sedikit. Kalsium dan fosfor merupakan mineral terbanyak pada kedua macam sampel.

Tabel 1. Penyusun cangkang udang (*Panaeus merguensis*) dan semua bagian yang tak dapat dimakan

Penyusun	Unit	Sampel	
		Cangkang Udang	Semua bag. yang tak dapat dimakan
Air	% WB	12,86	14,10
Protein	% DB	23,75	28,52
Lipid	% DB	2,04	3,83
Abu	% DB	37,24	25,04
Karbohidrat (by difference)	% DB	36,96	42,61
Kalsium	% DB	13,290	8,533
Magnesium	% DB	0,850	0,650
Fosfor	% DB	1,840	1,820
Besi	% DB	0,023	0,035
Mangan	% DB	0,0003	0,0002
Kalium	% DB	0,370	0,650
Tembaga	% DB	0,005	0,006
Natrium	% DB	0,436	0,630
Seng	% DB	0,005	0,007
Nikel		ND	ND
Aluminium	% DB	0,020	0,030
Sulfur	% DB	0,419	0,630

WB : wet basis
 DB : dry basis
 ND : not detected

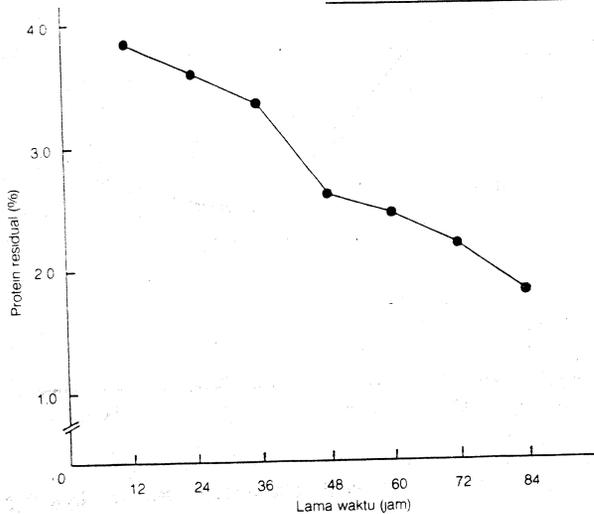
Tabel 2. Berbagai konsentrasi *Actinase E* dalam deproteinisasi

<i>Actinase E</i> (mg/ml)	Protein residual* (%)
0,0004	18,49
0,004	9,30
0,04	4,78
0,40	4,26
4,00	2,50
40,00	5,00

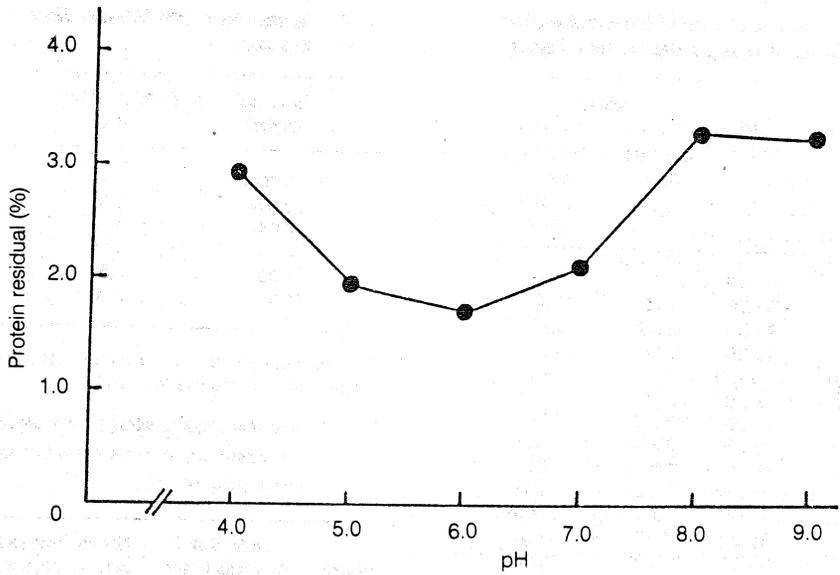
* Harga rata-rata dari tiga ulangan, ditetapkan dengan cara Hartree (Hartree, 1972)

Tabel 3. Yield kitin cangkang udang (*P. merguensis*) dan semua bagian udang yang tak dapat dimakan (20 g sampel)

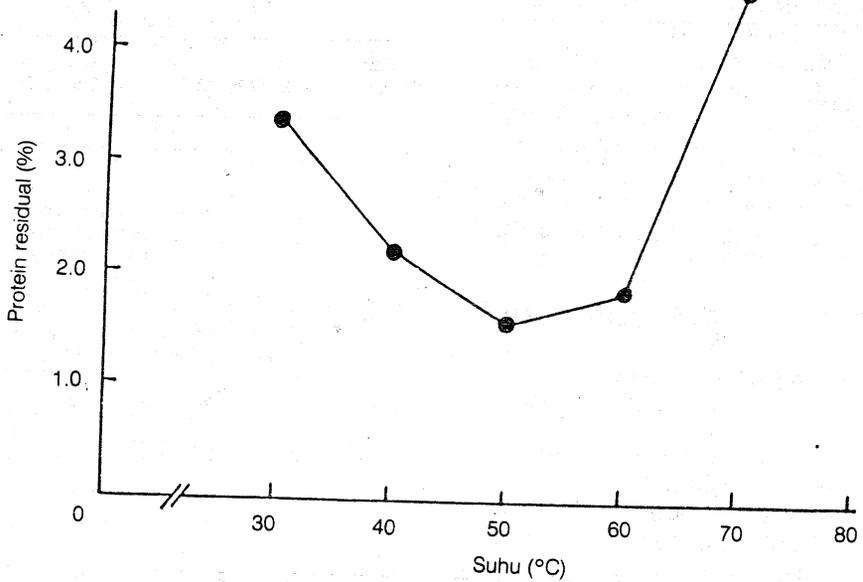
Ulangan	Kitin dari Cangkang Udang (g)	Kitin dari semua bagian yang tak dapat dimakan (g)
1	5,80	2,25
2	5,65	2,40
3	5,70	2,35
Rata-rata	5,71 g = 32,76% DB	2,33 g = 13,56% DB



Gambar 2. Time course deproteinisasi cangkang udang (*Panaeus merguensis*) oleh *Actinase E*



Gambar 3. Profil pH-deproteinisasi oleh *Actinase E*



Gambar 4. Profil suhu-deproteinisasi oleh *Actinase E*

2. Time Course dan Optimum pH, suhu, serta Konsentrasi Actinase E dalam deproteinisasi

Pada Gambar 2, terlihat bahwa deproteinisasi cangkang udang (*P. merguensis*) oleh *Actinase E* berlangsung dengan laju tinggi sampai inkubasi selama 48 jam. Setelah periode ini, deproteinisasi berlangsung lambat.

Nilai pH optimum, suhu dan konsentrasi *Actinase E* dalam deproteinisasi berturut-turut adalah 6,0; 50°C dan 4,0 mg/ml (4000 TU/ml) seperti dilukiskan oleh Gambar 3, Gambar 4, dan Tabel 2 (ditunjukkan dengan residu protein yang paling rendah pada *kitin*).

Suasana optimum protease-protease dalam deproteinisasi bervariasi terutama tergantung jenis/sumber protease dan substratnya. Sebagai perbandingan, *pro-*

nase digunakan untuk deproteinisasi cangkang udang karang (*Astacus fluviatilis*) oleh Herzog et al. (1975) pada pH 7,5; suhu 40°C dan konsentrasi enzim 5 mg/ml. Penelitian lain, suatu protease dari ikan tuna digunakan untuk deproteinisasi cangkang kepiting pada pH 8,6 dan suhu 37,5°C oleh Takeda & Abe (1962) dan Takeda & Katsuura (1964).

3. Yield Kitin

Hasil atau *yield* kitin dari cangkang udang (*P. merguensis*) yang disiapkan dengan prosedur dalam penelitian ini ditunjukkan oleh Tabel 3. Seperti terlihat pada Tabel, *yield kitin* dari cangkang udang adalah 32,76% pada dasar bahan kering (*dry basis*), sedangkan *yield* dari semua bagian yang tak dapat dimakan jauh lebih rendah, yaitu 13,56%.

Tabel 4. Penyusun komposisi kimia *kitin* cangkang udang (*Penaeus merguensis*) dan *kitin* komersial

	Protein (% DB)	Abu (%DB)	Kalsium (%DB)	Fosfor (%DB)	Derajat Deasetilasi (%)	Berat Molekul*
<i>Kitin P. merguensis</i>	0.06	0.30	0.22	0.02	11.29	> 800.000
<i>Kitin</i> komersial	0.06	0.10	0.17	0.03	10.72	> 50.000
CCA**					11.96	
CCAF***					12.70	

* Dalam bentuk *kitin* yang dapat larut dalam air (regenerasi dari *kitin* alkali, lihat teks)

** *Kitin* komersial diinkubasi dengan *Actinase E*

*** *Kitin* komersial diberi perlakuan dalam 0,5% (v/v) antiformine selama lima jam

4. Komposisi Kimia Kitin

Residu protein, abu, kalsium, dan fosfor serta derajat deasetilasi dan berat molekul *kitin* yang diperoleh dengan prosedur dalam penelitian ini terlihat pada Tabel 4, beserta pembandingnya *kitin* komersial. Residu protein pada *kitin P. merguensis* sangat rendah, sama dengan residu protein pada *kitin* komer-

sial. Pada percobaan ini, deproteinisasi cangkang udang (*P. merguensis*) dengan *Actinase E* selama 60 jam dan dilakukan dua kali dapat menghilangkan kandungan protein dari mula-mula 23,75% menjadi 0,06%. Ini dapat dibandingkan dengan hasil penelitian Herzog et al. (1975) bahwa deproteinisasi cangkang udang karang (*Astacus fluviatilis*) dengan *papaine* selama 20 jam

menurunkan kadar protein dari 20,76% menjadi 0,76%. Sementara itu Shimahara *et al* (1984) menemukan bahwa deproteinisasi cangkang udang (*P. japonicus*) dengan inkubasi oleh *Pseudomonas maltophilia* LC-102 selama tujuh hari menurunkan kandungan protein dari mula-mula 25,4% menjadi 0,3%.

Pada percobaan ini, demineralisasi dengan 0,1 M EDTA pada pH 7,5 selama 6 hari menurunkan kandungan abu dari mula-mula 37,24% menjadi 0,3%. Ini tak jauh berbeda dengan hasil penelitian Shimahara *et al* (1984) bahwa demineralisasi cangkang udang (*P. japonicus*) dengan EDTA pada pH 7,5 selama 6 hari dapat menurunkan kandungan abu dari mula-mula 21% menjadi 0,5%.

Foster and Hackman (1957) menemukan bahwa demineralisasi cangkang kepiting (*Cancer pagurus*) dua kali masing-masing pada pH 9 dan pH 3 dapat menurunkan kandungan abu dari 45% menjadi 2,6%.

5. Derajat Deasetilasi dan Berat Molekul

Derajat deasetilasi *kitin P. merguensis* yang diperoleh dengan prosedur dalam penelitian ini dan *kitin* komersial masing-masing adalah 11,29% dan 10,72% (Tabel 4). Harga-harga ini relatif rendah dalam pandangan bahwa *kitin-kitin* di alam umumnya tak komplet asetilasi (Muzzarelli, 1977; _____, 1985; Berkeley, 1979) dan bahwa sifat-sifat *kitin* termasuk derajat deasetilasinya bervariasi tidak saja tergantung cara/metode isolasinya, namun juga tergantung sumbernya (Brine & Austin, 1981a; _____, 1981b; Austin *et al*, 1981; Austin, 1988). Penelitian sebelumnya menemukan bahwa deproteinisasi cangkang *P. japonicus* dengan inkubasi oleh *Pseudomonas maltophilia* LC-102 dan demineralisasi dalam EDTA menghasilkan *kitin* isolat dengan derajat deasetilasi 9,9%, sementara *kitin*

yang disiapkan dengan metode HCl dan NaOH mempunyai derajat deasetilasi 17,1% (Shimahara *et al*, 1984).

Sebagai *kitin* yang dapat larut dalam air, yaitu *kitin* yang diregenerasi dari *kitin* alkali (Sannan *et al.*, 1975; _____, 1976) *kitin P. merguensis* dalam percobaan ini mempunyai berat molekul > 800.000. Sedangkan *kitin* komersial mempunyai berat molekul > 50.000, berdasar penggunaan HPLC. Angka-angka tersebut dapat menggambarkan berat molekul *kitin-kitin* aslinya (sebelum dibuat/diregenerasi dari *kitin* alkali); kalau tidak demikian, rendahnya berat molekul *kitin* komersial mungkin karena tingginya kepekaan untuk depolimerisasi (misalnya terhadap perlakuan dengan alkali) karena penyediaannya dengan perlakuan kasar (*harsh treatment*). Sementara *kitin* yang disiapkan secara enzimatik kurang peka untuk depolimerisasi terhadap suatu perlakuan.

Tabel 5. Daya mereduksi suspensi *kitin* hasil berbagai perlakuan

Sampel dan Perlakuan	Serapan Sinar 680 nm
<i>Kitin</i> komersial, inkubasi dengan <i>Actinase E</i>	0,078
<i>Kitin</i> komersial, inkubasi dengan <i>kitinase</i>	0,625
<i>Kitin</i> komersial, inkubasi dengan <i>lysozyme</i>	0,497
<i>Kitin</i> komersial, perlakuan dengan 0,5% (v/v) antiformine selama lima jam	0,065
<i>Kitin</i> komersial, inkubasi tanpa enzim (kontrol)	0,054
<i>Kitin P. merguensis</i> , inkubasi dengan <i>kitinase</i>	0,630
<i>Kitin P. merguensis</i> , inkubasi dengan <i>lysozyme</i>	0,502
<i>Kitin P. merguensis</i> , inkubasi tanpa enzim (kontrol)	0,061
N-asetil-D-glukosamin (10 U μ g/ml)	0,710

6. Aktivitas Deasetilitik dan Kitinolitik *Actinase E*

Seperti terlihat pada Tabel 4, derajat deasetilasi *kitin* komersial dan *kitin* komersial setelah inkubasi dengan *Actinase E* masing-masing adalah 10,72% dan 11,96%. Kenaikan derajat deasetilasi ini relatif kecil mengingat bahwa zat dengan derajat deasetilasi 11,96% tersebut masih tergolong *kitin*, bukan *kitosan*,

karena kitosan umumnya mempunyai derajat deasetilasi lebih dari 60% (Muzzarelli, 1985). Kenaikan itu mungkin disebabkan oleh inkubasi yang relatif lama (dua kali 60 jam) pada suhu relatif tinggi (50°C), dan bukan karena aktivitas deasetilitik *Actinase E*.

Tabel 5 menunjukkan bahwa *kitin-kitin* setelah inkubasi dengan *kitinase* atau dengan *lysozyme* menunjukkan daya mereduksi, yang ditunjukkan oleh besarnya serapan sinar pada 690 nm. Sedangkan *kitin* komersial yang setelah inkubasi dengan *Actinase E* tidak menunjukkan daya mereduksi. (Daya mereduksi menunjukkan keberadaan monomer atau oligomer *kitin* sebagai hasil hidrolisis). Dengan demikian, *Actinase E* dianggap tidak mempunyai sifat atau aktivitas *kitinolitik*.

Hidrolisis *kitin* oleh *kitinase* menghasilkan *kito-oligosakarida*, dan hidrolisis sempurna dengan *kitobiase* (*chitobiase*) menghasilkan N-asetil-D-glukosamin (Jeuniaux, 1966). Dalam penelitian ini, *lysozyme* putih telur juga dapat menguraikan *kitin* menghasilkan senyawa-senyawa yang mempunyai daya mereduksi, dan ini sesuai dengan temuan Berger and Weiser (1957).

Kesimpulan

Dari penelitian ini dapat ditarik kesimpulan :

- 1) pH, suhu dan konsentrasi optimum *Actinase E* dalam deproteinisasi cangkang udang (*Penaeus merguensis*) berturut-turut adalah 6,0; 50°C dan 4,0 mg/ml (4000 tyrosine unit/ml) untuk substrat 40 mg/ml.
- 2) *Kitin* cangkang udang (*Penaeus merguensis*) yang dipisahkan dengan *Actinase E* dan EDTA mengandung protein, abu, kalsium dan fosfor residual serta derajat deasetilasi relatif sama dengan *kitin* komersial; namun

demikian, dalam bentuk *kitin* yang dapat larut dalam air (regenerasi *kitin* alkali) *kitin* cangkang *P. merguensis* mempunyai berat molekul jauh lebih besar daripada *kitin* komersial.

- 3) *Actinase E* tidak menampakkan adanya aktivitas deasetilitik maupun *kitinolitik*.

Daftar Acuan

- AOAC, 1984. "Official Method of Analysis", 14th edition (Centennial edition). Association of official analytical chemists. Airlington, Virginia.
- Austin, P.R., Brine, C.J., Castle, J.E. and Zikakis, J.P., 1981. Chitin: new facet of research. *Science*, 212 : 749.
- Austin, P.R. 1988. Chitin solutions and purification of chitin. In "Methods in Enzymology, Vol. 161. Biomass part B, p. 403. Wood, W.A. and Kellog, S.T. (ed). Academic Press Inc., San Diego, New York.
- Berger, L.R. and Weiser, R.S., 1957. The *beta-glucosaminidase* activity of egg-white lysozyme. *Biochim. Biophys. Acta*, 26 : 517.
- Berkeley, R.C.W., 1979. Chitin, chitosan and their degradative enzymes. In "Microbial Polysaccharides and Polysaccharases" p. 205. Berkeley, R.C.W., Gooday, G.W. and Elwood, D.C. (ed). Academic Press, London, New York.
- Brine, C.J. and Austin, P.R. 1981^a. Chitin variability with species and method of preparation. *Com. Biochem. Physiol.* Vol. 69 B : 283.
- Brine, C.J. and Austin, P.R. 1981^b. Chitin isolates : species variation and residual amino acids. *Com. Biochem. Physiol.* Vol 70 B : 171.
- Foster, A.B. and Hackman, R.H., 1957. Application of ethylenediaminetetraacetic acid in the isolation of crustacean chitin. *Nature*, 180 : 4575.
- Hackman, R.H., 1954. Studies on chitin. *Aust. J. Biol. Sci.* 7 : 168.

- Hartree, E.F., 1972. Determination of protein, a modification of the Lowry method that gives a linear photometric responses. *Anal. Biochem.* 48 : 422.
- Herzog, K.H., Grossman, H. and Lieflander, M., 1975. Zur Chemie eines Chitin-Proteids aus Flubkreb (*Astacus fluviatilis*). *Z. Physiol Chem.* 356 S : 1067.
- Ilyas, S. and Djajadiredja, R., 1979. Research activities support the shrimp export industry. *Indonesian Agricultural Research & Development Journal*, Vol. 1 No. 1 & 2 : 13.
- Jeuniaux, O., 1966. Chitinases. In "Methods in Enzymology", 8, p. 644. Academic Press Inc., New York.
- Johnson, E.L. and Peniston, Q.P., 1982. Utilization of shellfish waste for chitin and chitosan production. In "Chemistry and Biochemistry of Marine Food Products", p. 415. Martin, R.E., Flick, G.J., Hebard, C.E. and Ward, D.R. (ed). Avi Pub. Co. Ltd., Westport, Connecticut.
- Knorr, D., 1982. Functional properties of chitin and chitosan. *J. Food Sci.* 47 : 593.
- Knorr, D., 1983. Dye binding properties of chitin and chitosan. *J. Food Sci.* 48 : 36.
- 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.
- Reissig, J.L., Strominger, J.L. and Leloir, L.F., 1955. A modified colorimetric method for the estimation of N-acetyl amino sugars. *J. Biol. Chem.* 277 : 959.
- Rupley, J.A., 1964. The hydrolysis of chitin by concentrated hydro-chloride and the preparation of low-molecular weight substrate for lysozyme. *Biochim. Biophys. Acta.* 83 : 245.
- Sannan, T., Kurita, K. and Iwakura, J., 1975. Studies on chitin, I : Solubility changes by alkaline treatment and film casting. *Makromol. Chem.* 176 : 1191.
- Sannan, T., Kurita, K. and Iwakura, J., 1976. Studies on Chitin II : Effect of deacetylation on solubility. *Makromol. Chem.* 177 : 3589.
- Shimahara, K., Takiguchi, Y., Ohkuchi, K., Kitamura, K. and Okada, O. 1984. Chemical composition and some properties of crustacean chitin, prepared use of proteolytic of *Pseudomonas maltophilia* LC-102. In "Chitin, Chitosan and Related Enzymes", p. 239. Zikakis, J.P. (ed). Academic Press. Inc., Orlando, San Diego, New York.
- Sugano, M., Watanabe, S., Kishi, A., Izume, M., and Ohtakara, K., 1982. *Lipids*, Vol. 23, No. 3 : 187.
- Takeda, M. and Ebe, E., 1962. On isolation of crustacean chitin I, deacetylation by EDTA-2Na solution and enzymatic hydrolysis of incidental protein. *Norinsho Suisan Konshusho Kenkyu Hokoku* 13 : 399.
- Takeda, M. and Katsuura, H., 1964. On isolation of chitin II, removing of protein by some proteases, organic solvents, and surface active agents. *Suisan Daigakko Kenkyu Hokoku*, 13 : 109.