

ANALISIS GUGUS FUNGSI DENGAN MENGGUNAKAN SPEKTROSKOPI FT-IR DARI VARIASI KITIN SEBAGAI SUBSTRAT KITINASE BAKTERI *Pseudomonas sp.* TNH-54

ANALYSIS FUNCTIONAL GROUPS USING FT-IR SPECTROSCOPY OF CHITIN VARIATION

as *Pseudomonas sp.* TNH-54 SUBSTRATE'S

Mizan Tamimi, Nuniek Herdyastuti

Jurusan Kimia FMIPA, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

Universitas Negeri Surabaya, Jl. Ketintang, Surabaya, 60231

e-mail: 89mizan@gmail.com

Abstrak. Pada penelitian ini dilakukan variasi jenis kitin sebagai substrat enzim kitinase bakteri *Pseudomonas sp.* TNH-54 yang divariasikan dalam bentuk koloidal dengan penambahan HCl pekat dan superfine yang dilarutkan dalam metanol yang dijenuhkan dengan CaCl_2 . Karakterisasi berdasarkan hasil analisis spektra IR dari masing-masing substrat menunjukkan bahwa kitin memiliki daerah serapan gugus fungsi yang khas yaitu gugus $-\text{OH}$ pada daerah 3400 cm^{-1} , pada daerah 3200 cm^{-1} dan 1500 cm^{-1} gugus $-\text{NH}$, daerah 1600 cm^{-1} gugus $\text{C}-\text{O}$, dan daerah 1070 cm^{-1} gugus $\text{C}=\text{O}$, kecuali pada spektra IR superfine yang menunjukkan hilangnya serapan pada daerah fingerprint $1316-1317\text{ cm}^{-1}$ yang merupakan gugus $\text{C}-\text{N}$. Hasil uji aktivitasnya terhadap enzim kitinase bakteri *Pseudomonas sp.* TNH-54 menunjukkan bahwa substrat koloidal memiliki nilai aktivitas yang paling tinggi bila dibandingkan dengan substrat kitin dan kitin superfine yaitu sebesar $0,847\text{ U/mL}$. Berdasarkan analisis spektra IR dari substrat yang telah diinteraksikan dengan enzim kitinase selama 24 jam tidak menunjukkan pergeseran atau pun penghilangan gugus fungsi akibat degradasi enzim kitinase, hanya terjadi penurunan intensitas relatif (%T) dari gugus fungsi $-\text{OH}$, $-\text{NH}$, $\text{C}-\text{O}$, dan $\text{C}=\text{O}$ pada spektra IR kitin serta kitin koloidal dan kenaikan %T pada gugus fungsi yang sama pada spektra IR superfine dibandingkan dengan spektra IR substrat sebelum mengalami degradasi enzimatik.

Kata kunci: aktivitas kitinase, gugus fungsi, kitin

Abstract. This research was conducted on variation of chitin as a substrate of the chitinase enzyme from bacteria *Pseudomonas sp.* TNH-54 that varied in colloidal form by the addition of concentrated HCl and superfine form which is dissolved in methanol saturated with CaCl_2 . Characterization by IR spectra based on the results of each substrate indicated that chitin has the typical functional groups i.e. $-\text{OH}$ groups on the area 3400 cm^{-1} , in the area of 3200 cm^{-1} and 1500 cm^{-1} $-\text{NH}$ groups, the 1600 cm^{-1} $\text{C}-\text{O}$ groups, and 1070 cm^{-1} $\text{C}=\text{O}$ groups, except in superfine's IR spectra showed the absence of absorption in the fingerprint $1316-1317\text{ cm}^{-1}$, which loss the $\text{C}-\text{N}$ groups. The result of chitinase activity assay from bacteria *Pseudomonas sp.* TNH-54 show that colloidal chitin has the highest activity compare with chitin and superfine chitin activity which the values is 0.847 U/mL . Based on the analysis of IR spectra from the substrate that have interacted with enzyme for 24 H it doesn't show the shift of spectra or removal of functional groups due to degradation process of chitinase enzyme, but decrease in relative intensity (%T) in spectra of common functional groups such as $-\text{OH}$, $-\text{NH}$, $\text{C}-\text{O}$, and $\text{C}=\text{O}$ for chitin and colloidal chitin spectra's and increase of %T from the same functional groups for superfine spectra which compare with spectra of each substrate before enzymatic degradation.

Keywords: chitin, chitinase activity, functional group

PENDAHULUAN

Kitin merupakan suatu polisakarida, polimer yang tersusun oleh monomer N-asetil-glukosamin dan membentuk ikatan $\beta-1,4$. Kelimpahan kitin di alam menempati urutan kedua setelah selulosa dan terdistribusi luas di lingkungan biosfer seperti pada kulit *Crustaceae* (kepiting, udang, dan lobster),

ubur-ubur, komponen struktural eksoskeleton insekta, dinding sel fungi (22-40%), alga juga terdapat dalam nematoda, binatang ataupun tumbuhan.

Kitinase adalah enzim yang mampu menghidrolisis kitin. Enzim ini dikelompokkan menjadi dua, yaitu endokitinase dan eksokitinase. Endokitinase adalah enzim yang menghidrolisis

kitin secara acak dari bagian dalam menghasilkan kitooligomer. Eksokitinase adalah enzim yang menghidrolisa kitin secara berurutan dari ujung nonreduksi menghasilkan N-asetil-glukosamin[1]. Kitinase dapat dihasilkan dari mikroorganisme yang mampu mendegradasi kitin dan memanfaatkan N-asetil-glukosamin sebagai sumber karbon. Mikroorganisme ini disebut mikroorganisme kitinolitik. Beberapa mikroorganisme kitinolitik dari berbagai sumber seperti rizosphere, air laut, tempat bersuhu tinggi, sumur hidrotermal, tanah, dan lain-lain telah berhasil diisolasi dan dikarakterisasi, diantaranya *Pseudomonas sp.*, *Alcaligenesdentrificans*, *Agrobacterium sp.*, *Aeromonashydrophila*[2].

Enzim kitinase mampu menghidrolisis kitin apabila kitin terikat tepat pada sisi aktif enzim. Kitin pada dasarnya mempunyai struktur yang kompak dan rapat sehingga hal ini mengurangi kemampuan interaksi enzim kitinase dengan substrat kitin karena sisi aktif enzim tidak mampu menjangkau bagian dalam kristal kitin yang rapat. Menurut Coutino[3] proses hidrolisis kitinase lebih cepat menghasilkan senyawa oligosakarida pada substrat kitin yang dimodifikasi. Ilankovan[4] juga menyebutkan bahwa beberapa modifikasi substrat kitin mampu menghasilkan jumlah N-asetil-glukosamin dalam jumlah yang berbeda-beda. Hal ini didukung dengan Suraini[5] yang melaporkan penggunaan substrat kitin dalam bentuk koloidal mampu menghasilkan N-asetil-glukosamin sebesar 86% dibandingkan dengan substrat lainnya dalam bentuk serbuk.

Kitin jenis koloidal sering digunakan oleh para peneliti dalam uji aktivitas kitinase karena mempunyai aktivitas yang tinggi dibanding dengan kitin dalam bentuk serbuk. Sebagai studi lebih lanjut perlu dilakukan modifikasi substrat kitin yang bertujuan untuk mengetahui bentuk kitin lain yang memiliki aktivitas yang tinggi. Hasil modifikasi substrat kitin akan dikarakterisasi gugus fungsinya menggunakan spektroskopi FT-IR. Ini bertujuan untuk melihat adakah perbedaan kitin hasil modifikasi dan kitin dalam bentuk serbuk. Selanjutnya substrat kitin diuji aktivitasnya terhadap enzim kitinase bakteri *Pseudomonas sp.* TNH-54. Substrat yang telah didegradasi diuji kembali menggunakan spektroskopi FT-IR untuk melihat gugus fungsi yang mungkin hilang selama proses degradasi enzim kitinase terhadap substratnya.

METODE

Bahan

Beberapa bahan yang digunakan pada penelitian ini: N-asetil-glukosamin(NAG) standar (sigma), NaOH,

HCl, Metanol, Glukosa, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, asam 3,5-dinitrosalisilat.

Alat

Alat yang digunakan pada penelitian ini adalah: FT-IR Perkin Elmer, UV-Vis Shimadzu 1800, sentrifus dingin, rotary shaker.

Pembuatan substrat

Isolasi kitin

Kitin diisolasi dari cangkang udang kemudian melalui tahap deproteinasi dan demineralisasi.

Kitin koloidal

40 g kitin dilarutkan dalam HCl pekat (37%) selama 40 menit. Larutan diendapkan dengan ditambah aquades dingin (5-10°C). Endapan kemudian disaring dan dicuci hingga netral, kemudian dikeringkan[2,6].

Kitin superfine

Kitin *superfine* dibuat menggunakan metode Ilankovan[4] yang dimodifikasi yaitu sebanyak 1 g kitin dilarutkan dalam 150 mL metanol berisi $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 83% (w/v) dan glukosa 2% (b/v). Kitin diendapkan dengan penambahan metanol secara perlahan. Setelah didekantasi endapan disentrifus dan dicuci. Endapan kemudian disuspensi dalam 18% asam format. Selanjutnya larutan diatur pH hingga 6 menggunakan NaOH. Endapan disaring dan dikeringkan.

Karakterisasi Substrat Kitin

Hasil variasi kitin yang didapat kemudian dikarakterisasi menggunakan FT-IR.

Produksi Enzim Kitinase

Koloni tunggal bakteri *Pseudomonas sp.* TNH-54 ditumbuhkan dalam media media cair yang mengandung kitin 0,1 (b/v). Larutan dikocok selama 40 jam pada 120 rpm. Kemudian kultur disentrifus dingin (4°C) pada 4000 rpm selama 15 menit. Supernatan merupakan enzim kitinase.

Penentuan Aktivitas Enzim Kitinase

Aktivitas enzim ditentukan dengan menghitung banyaknya NAG yang dilepaskan selama proses degradasi kitin dan diukur menggunakan UV-Vis.

Pembuatan kurva standar

Larutan NAG 1% (b/v) dimasukkan kedalam 5 tabung berbeda sebanyak 0,1; 0,2; 0,3; 0,4 mL, kemudian ditambahkan air bebas ion sampai volume 3 mL. Kemudian masing-masing tabung ditambah 1,5 mL reagen pewarna yang dibuat dari campuran reagen A dan reagen B. Reagen A dibuat dengan melarutkan 12 g natrium kalium tartrat dalam 8 mL NaOH 2 M dan dilarutkan dalam penangas air mendidih. Reagen B dibuat dengan melarutkan 438

mg asam 3,5-dinitrosalisilat dalam 20 mL aquades dan dilarutkan dalam penangas air mendidih. Kedua reagen dicampur dan ditambah lagi dengan 40 mL aquades.

Larutan NAG yang sudah dicampur dengan reagen pewarna kemudian diukur absorbansinya menggunakan UV-Vis pada 540 nm.

Penentuan aktivitas enzim

Sebagai larutan sampel, 2 mL larutan substrat kitin 0,1% (b/v) dalam larutan buffer kalium fosfat pH 6 diinteraksikan dengan 0,5 mL enzim kitinase selama 2 jam pada suhu ruang dan pengocokan 120 rpm, sedangkan sebagai larutan blanko 2 mL larutan substrat dalam buffer ditambah 0,5 mL air bebas ion dan dikocok selama 2 jam dengan kecepatan 120 rpm. Setelah 2 jam pengocokan larutan diletakkan dalam penangas air mendidih, larutan kemudian disentrifus dan diambil supernatan. Supernatan diukur serapannya pada 540 nm. Hasil absorbansi dimasukkan dalam persamaan linear kurva standar dan diperoleh konsentrasi NAG yang dihasilkan.

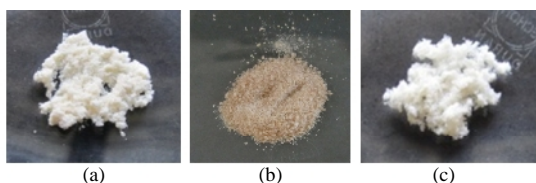
Konsentrasi NAG kemudian dihitung aktivitasnya menggunakan persamaan:

$$\text{Aktivitas (U/mL)} = \text{-----} \quad (1)$$

HASIL DAN PEMBAHASAN

Variasi Bentuk Substrat Kitin

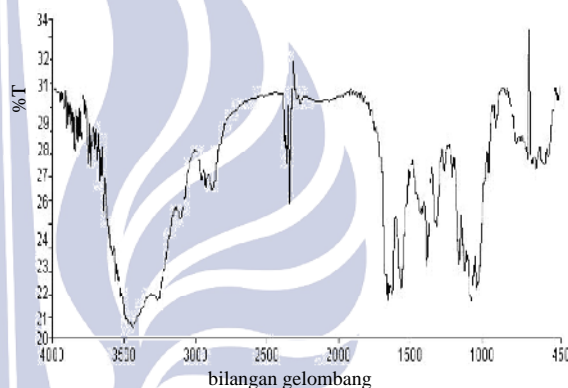
Kitin divariasi mejadi bentuk koloidal dan *superfine*. Hasil dari variasi bentuk substrat yang dilakukan, diperoleh kitin koloidal dengan randemen sekitar 85% dan kitin *superfine* sekitar 70% dari berat total kitin yang digunakan. Berdasarkan tampilan fisik substrat seperti pada Gambar 1 terlihat perbedaan antara kitin, kitin koloidal dan kitin *superfine*. Kitin koloidal berwarna kecoklatan, dan mempunyai tekstur yang lebih kasar dibanding kitin. Kitin *superfine* berwarna lebih putih bila dibandingkan dengan kitin, butirannya lebih halus dan sedikit menggumpal.



Gambar 1. Variasi Kitin (a) yang dibuat dalam bentuk koloidal (b) dan *superfine* (c)

Karakterisasi Gugus Fungsi Substrat

Kitin mempunyai karakteristik daerah serapan yang khusus, dimana serapan ini mewakili gugus fungsi yang ada pada kitin. Berdasarkan spektra IR kitin (Gambar 2), dapat dilihat bahwa kitin mempunyai serapan pada daerah $3446,26 \text{ cm}^{-1}$ yang menandakan gugus $-\text{OH}$ intermolekuler, daerah 3200 cm^{-1} mewakili $-\text{NH}$ pada amida (NHCOCH_3) dan serapan ini diperkuat dengan munculnya puncak di daerah 1562 cm^{-1} , $1316,61 \text{ cm}^{-1}$ menunjukkan gugus C-N (NHCOCH_3), daerah 1651 cm^{-1} mewakili vibrasi ulur gugus C=O (NHCOCH_3 , amida). Gugus C-H dan C-C ditunjukkan melalui puncak pada 1379 cm^{-1} sedangkan vibrasi C-O alkohol primer memberikan serapan tajam pada daerah $1072,9 \text{ cm}^{-1}$ sesuai dengan yang dilaporkan [7,8].

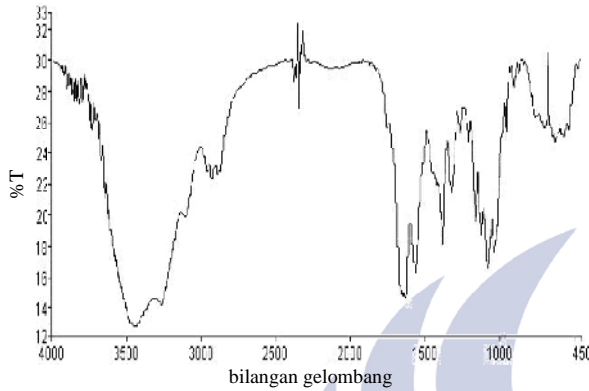


Gambar 2. Spektra IR Kitin

Spektra IR dari kitin koloidal menunjukkan hasil yang hampir sama dengan spektra kitin seperti pada Gambar 3. Serapan yang muncul masih menunjukkan gugus fungsi yang khas dari kitin. Serapan pada daerah $3446,48 \text{ cm}^{-1}$ yang menandakan adanya gugus $-\text{OH}$ intermolekuler, pada daerah 3200 cm^{-1} muncul serapan $-\text{NH}$ (amida) yang diperkuat dengan spektra $1562,26 \text{ cm}^{-1}$, C-H muncul sebagai spektra pada 2931 cm^{-1} sebagai regangan dan terlihat serapannya di daerah 1379 cm^{-1} sebagai C-H tekuk, vibrasi gugus ulur C=O pada amida ditunjukkan oleh spektra pada $1635,54 \text{ cm}^{-1}$, sedangkan vibrasi C-O alkohol primer memeri serapan pada daerah $1073,1 \text{ cm}^{-1}$.

Kitin yang dilarutkan dalam campuran metanol dan $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ membentuk kitin *superfine*. Spektra dari kitin *superfine* seperti pada Gambar 4 menunjukkan kemiripan dengan spektra IR kitin dan kitin koloidal. Pada spektra

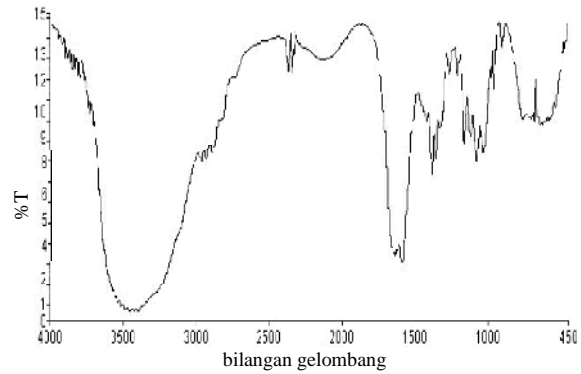
munculnya puncak di beberapa daerah serapan dari gugus fungsi yang sama dengan kitin seperti adanya gugus $-OH$ (3433 cm^{-1}), $-NH$ (amida) pada $1587,54\text{ cm}^{-1}$, vibrasi C-H tekuk pada $1378,7\text{ cm}^{-1}$, vibrasi ulur gugus C=O pada amida $-NHCOCH_3$ ($1633,09\text{ cm}^{-1}$) dan C-O alkohol pada $1072,92\text{ cm}^{-1}$.



Gambar 3. Spektra IR Kitin Koloidal

Selain adanya serapan yang khas pada kitin dan kitin koloidal, pada kitin *superfine* ciri khas serapan kitin masih tetap nampak akan tetapi puncak pada daerah serapan 1316 cm^{-1} pada spektra kitin serbuk dan 1317 cm^{-1} pada spektra kitin koloidal menjadi tidak nampak. Diduga Ca^{2+} dari $CaCl_2$ berikatan silang dengan atom oksigen pada gugus asetil kitin sehingga keberadaan ikatan tersebut mengurangi kemampuan gugus fungsional C-N dalam memberi serapan pada 1316 dan 1317 cm^{-1} .

Berdasarkan analisa diatas, pada dasarnya variasi bentuk substrat kitin tidak merubah struktur kitin. Hal ini mengacu pada penampakan serapan gugus fungsi seperti $-OH$, $-NH$, C-H, C=O, dan C-O pada daerah-daerah serapan yang sama antara kitin, kitin koloidal dan kitin *superfine* akan tetapi puncak pada daerah serapan 1316 cm^{-1} pada spektra kitin serbuk dan 1317 cm^{-1} pada spektra kitin koloidal menjadi tidak nampak



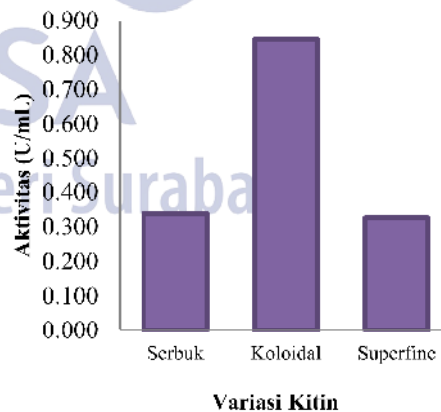
Gambar 4. Spektra Kitin *superfine*

Uji Aktivitas Kitinase

Aktivitas kitinase ditentukan dari banyaknya N-asetil-glukosamin (NAG) yang dihasilkan selama proses degradasi enzim menurut metode [9]. Penentuan aktivitas enzim kitinase dilakukan untuk mengetahui seberapa besar kemampuan enzim kitinase mendegradasi kitin. Berdasarkan kurva standar NAG yang dilakukan, diperoleh persamaan garis $y = 2,92212x - 0,19779$ dengan nilai $R^2 = 0,9929$.

Hasil uji aktivitas dapat dilihat dalam Gambar 5. Berdasarkan perhitungan menggunakan persamaan (1), kitin koloidal mempunyai aktivitas yang tinggi yaitu sebesar $0,847\text{ U/mL}$, sedangkan kitin $0,337\text{ U/mL}$ dan kitin *superfine* sebesar $0,326$.

Kerapatan yang rendah antar ikatan kitin pada substrat kitin koloidal mengakibatkan interaksi enzim kitinase dan substrat menjadi lebih mudah.



Gambar 5. Grafik Uji Aktivitas Kitinase

Diduga akibat perlakuan penambahan HCl pekat pada kitin dalam variasi substrat kitin, menyebabkan kitin terhidrolisis secara acak sehingga pada pengendapan kitin dari larutan

HCl memungkinkan terbentuknya ikatan kitin yang baru dengan tingkat kerapatan ikatan yang lebih rendah daripada kitin. Kitin koloidal diduga memiliki luas dan volume pori yang lebih besar daripada kitin sehingga enzim lebih mudah masuk dan mengikat pada sisi aktif kitin yaitu pada ikatan β -(1,4) glikosida. Kemudahan enzim mendegradasi substrat ini lah yang menjadikan kitin koloidal memiliki aktivitas yang tinggi.

Setelah diinteraksikan selama 24 jam, substrat kitin diuji kembali menggunakan spektroskopi FT-IR dan menunjukkan penurunan transmisi (%T) pada beberapa gugus fungsi kitin, seperti pada gugus -OH , gugus -NH , gugus C-O. Pada kitin koloidal juga mengalami penurunan intensitas yaitu pada spektra gugus -OH , gugus -NH , gugus C-O, dan gugus C=O. Hal yang berbeda ditunjukkan spektra IR kitin *superfine* yang mengalami kenaikan intensitas (%T) pada beberapa gugus fungsi yaitu pada gugus -OH , gugus -NH , C-O, dan C=O.

PENUTUP

Simpulan

Berdasarkan hasil analisis gugus fungsi dapat dinyatakan bahwa tidak terdapat perbedaan gugus fungsi antara kitin, kitin koloidal dan kitin *superfine*. Hal ini sesuai dengan hasil spektra IR dari masing-masing substrat yang menunjukkan adanya serapan gugus fungsi dari -OH , -NH , C-H, C=O, dan C-O pada daerah yang hampir sama kecuali pada kitin *superfine* yang menunjukkan hilangnya puncak serapan pada daerah *fingerprint* yaitu pada daerah $1316\text{-}1317\text{ cm}^{-1}$ yang terdapat pada spektra IR kitin dan kitin koloidal yang menandakan hilangnya gugus C-N pada kitin *superfine*.

Saran

Perlu dikaji lebih lanjut tentang struktur substrat *superfine* yang menyebabkan kecilnya nilai aktivitas enzim kitinase.

DAFTAR PUSTAKA

1. Widhyastuti, N. 2007. *Produksi Kitinase Ekstraseluler Aspergillus rugulosus 501 Secara Optimal Pada Media Cair*. Berita Biologi 8(6): 547-553.
2. Herdyastuti, N., et al. 2009. *Chitinase and Chitinolytic Microorganism : Isolation, Characterization and Potential*. Indo. J. Chem., 2009, 9 (1) : 37-47.
3. Countino, et al. 2005. *Enzymatic Hydrolysis of Chitin In The Production of Oligosaccharides Using Lecanicillium Fungicola Chitinases*. Elsevier Ltd.
4. Ilankovan, P., et al. 2005. *Production of N-acetyl Chitobiose from Various Chitin Substrates Using Commercial Enzymes*. Elsevier Ltd.
5. Suraini, A.A., et al. 2008. *Microbial Degradation of Chitin Materials by Trichoderma virens UKM1*. Journal of Biological Science 8 (1): 52-59.
6. Hsu S.C and Lockwood J.L. 1975. *Powdered Chitin Agar as a Selective Medium for Enumeration of Acynomycetes in Water and Soil*. Applied Microbial, 29: 422-426.
7. Junaidi, Budi A. dkk. 2009. *Chitosan Preparation With Multistage Deacetylation of Chitin and Investigation of Its Physicochemical Properties*. Indo. J. Chem., 9 (3) : 369-372
8. Rifai, Dewi N. 2007. *Isolasi dan Identifikasi Kitin, Kitosan dari Cangkang Hewan Mimi (Horseshoe Crab) Menggunakan Spektrofotometri Infra Merah*. UIN-Malang.
9. Monreal J. and Reese, E.T. 1969. *The Chitinase of Serratia marcescens*. Can.J.Microbiol., 15:689-696