

**PENENTUAN KONDISI OPTIMUM PADA PEMBENTUKAN SENYAWA
N-ASETIL-D-GLUKOSAMIN HASIL HIDROLISIS KITIN
NON ENZIMATIS**

**DETERMINATION OF OPTIMUM CONDITION OF N-ACETYL-D-GLUCOSAMINE
BY HYDROLIZED CHITIN NON ENZYMATIC**

*Intan Fitria Pratiwi * dan Nuniek Hedyastuti*

Departement of Chemistry, Faculty of Mathematics and Natural Sains
State University of Surabaya

Jl. Ketintang, Surabaya (60231), telp 031-8298761

* Corresponding author, email : Intanfitria338@gmail.com

Abstrak. Kitin dapat dihidrolisis dengan menggunakan asam klorida (HCl) menghasilkan N-asetil-D-glukosamin (GlcNAc). Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui konsentrasi HCl dan waktu inkubasi optimum pada pembentukan N-Asetil-D-Glukosamin (GlcNAc) hasil hidrolisis kitin. Identifikasi dan Jumlah GlcNAc ditentukan dengan menggunakan High Performance Liquid Chromatography (HPLC). Waktu retensi senyawa GlcNAc pada HPLC ditentukan dengan menggunakan GlcNAc standar. Penentuan konsentrasi HCl optimum dilakukan dengan menghidrolisis kitin dengan variasi konsentrasi HCl 1N – 5N selama 24 jam. Dari hasil penelitian diperoleh konsentrasi HCl optimum adalah 4N. Penentuan waktu inkubasi optimum dilakukan dengan menghidrolisis kitin menggunakan konsentrasi HCl optimum dengan variasi waktu inkubasi (0, 12, 24, 36, 48) jam. Waktu inkubasi optimum yang diperlukan untuk menghasilkan senyawa GlcNAc adalah 36 jam.

Kata kunci: Kitin, N-Asetil-D-Glukosamin, hidrolisis Asam, HPLC

Abstract. Chitin can be hydrolyzed by hydrochloric acid produced N-Acetyl-D-Glukosamine (GlcNAc). The aim of this experiment were to know the concentration of hydrochloric acid and optimum incubation time on formation of N-Acetyl-D-Glukosamin (GlcNAc) from hydrolysis of chitin. The identification and amount of GlcNAc was determined using High Performance Liquid Chromatography (HPLC) analysis. The HPLC retention time of GlcNAc was determined using GlcNAc standard. Determination of concentration of hydrochloric acid to hydrolyze chitin was done at variation of concentration HCl (1N- 5N) during 24 hours. The result showed that the optimum concentration of hydrochloric acid to hydrolyzed chitin is 4N. Determination of incubation time to hydrolyze chitin was done at variation of incubation time (0, 12, 24, 36, 48) hours. The optimum incubation time is 36 hours.

Keyword: Chitin, N-Asetyl-D-Glucosamine, hydrolysis Acid, HPLC

PENDAHULUAN

Indonesia merupakan negara kepulauan yang memiliki wilayah laut yang sangat luas. Indonesia memiliki potensi yang sangat besar sebagai penghasil ikan dan hewan laut lainnya seperti udang dan kepiting. Udang merupakan salah satu komoditas ekspor yang banyak mendatangkan devisa. Proses pengolahan udang yang menghasilkan produk berupa udang beku mentah, udang beku yang sudah dimasak, dan udang kaleng menghasilkan sejumlah limbah padat. Selama

ini limbah tersebut hanya dikeringkan dan dimanfaatkan sebagai pakan atau pupuk dengan nilai jual yang rendah. Pengolahan limbah udang menjadi kitin merupakan salah satu solusi untuk mengurangi pencemaran lingkungan dan memberikan nilai tambah yang cukup tinggi.

Kitin merupakan suatu biopolimer yang tersebar luas dan sangat melimpah di bumi. Kitin terdapat di alam sebagai komponen utama penyusun kulit keras atau cangkang *crustacea* (jenis udang-udangan) dan

serangga, serta dinding sel yeast, alga, dan jamur (22-40%) [1]. Kitin tersusun oleh monomer *N-asetil-D-glukosamin* (GlcNAc) yang dihubungkan dengan ikatan melalui ikatan linear β 1,4. Kitin mempunyai sifat-sifat yang khas antara lain, biodegradabilitas (dapat terurai secara biologis), bioaktivitas, tidak beracun dan sifat liat [2]. Kitin dapat didegradasi secara enzimatis dan non enzimatis pada keadaan yang terkendali. Degradasi kitin non enzimatis dapat dilakukan melalui hidrolisis dengan menggunakan asam kuat, misalnya HCl, H₂SO₄, dan HNO₃. Kelarutan kitin di dalam asam-asam mineral pekat tersebut sangat tergantung pada derajat kristalisasi. Kitin mempunyai ukuran molekul yang relatif besar dan sulit diserap oleh tubuh manusia sehingga aplikasinya terbatas. Berbagai strategi telah dikembangkan untuk mengubah kitin menjadi oligomer kecil yang lebih berguna untuk diaplikasikan dalam obat-obatan, pertanian, pangan, dan industri.

Hidrolisis kitin dalam larutan asam merupakan metode yang sederhana dengan hasil yang baik dan diperkirakan cukup ekonomis. Hidrolisis kitin dengan menggunakan asam (HCl) dapat terjadi pada ikatan glikosidik. Hidrolisis tersebut melibatkan protonasi O-glikosida dan penambahan H₂O untuk menghasilkan gugus gula pereduksi. Hidrolisis kitin lebih lanjut dapat terjadi melalui pemutusan ikatan *N-Asetil* [3]. Pemutusan ikatan *N-Asetil* menghasilkan glukosamin dan asam asetat.

GlcNAc yang dihasilkan dari hidrolisis kitin menggunakan asam pekat telah digunakan sebagai bahan tambahan makanan di negara Jepang, kosmetik, dan obat-obatan [4]. GlcNAc juga dapat dimanfaatkan sebagai pengawet dan obat reumatik [5].

Pada proses pembentukan GlcNAc diperlukan suatu kondisi optimum tertentu seperti konsentrasi HCl dan waktu inkubasi sehingga dapat dihasilkan GlcNAc dalam jumlah yang maksimal. Hasil penelitian Chang (2000) menunjukkan bahwa GlcNAc yang dihasilkan dari hidrolisis HCl 7 N lebih banyak daripada hasil hidrolisis dengan

menggunakan HCl 4 N. GlcNAc yang dihasilkan dari hidrolisis asam menggunakan HCl dengan konsentrasi 7 N pada suhu 70 °C menjadi 5-6 % lebih banyak dibandingkan dengan menggunakan 4 N HCl pada suhu 70°C dan 4 N HCl pada suhu 90°C.

METODE

Alat

Alat – alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain peralatan gelas yang umum digunakan, inkubator, evaporator, HPLC (*High Performed Liquid Chromatography*) HP1050.

Bahan

Bahan - bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu, kitin dari kulit udang (Rongsheng, China), HCl 37% p.a (Merck), NaOH, air deionisasi, *N-Asetil-D-Glukosamin* standar (Sigma).

PROSEDUR PENELITIAN

Pembuatan Larutan Standar *N-Asetil-D-glukosamin*

Larutan standar dibuat dari GlcNAc standar dengan konsentrasi 0,2 mg/mL – 1 mg/mL kemudian diuji menggunakan HPLC untuk menentukan waktu retensi.

Penentuan konsentrasi HCl optimum

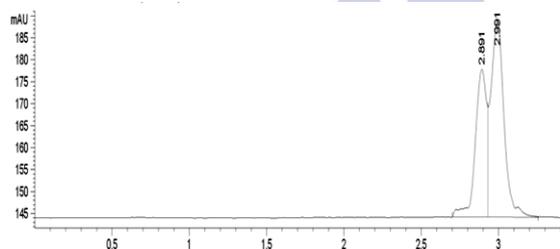
Konsentrasi HCl optimum ditentukan dengan menggunakan cara Chang (2000). Sebanyak 1,6 gram kitin dimasukkan ke dalam gelas kimia yang berisi 100 mL HCl dengan variasi konsentrasi 1N - 5N. Larutan diinkubasi pada suhu 35°C selama 24 jam kemudian didinginkan pada *ice bath*, kemudian dievaporasi. Partikel padat yang diperoleh dilarutkan kembali dalam 50 mL air deionisasi. Proses evaporasi dan pelarutan diulangi 2 kali untuk menghilangkan residu HCl. Kemudian larutan dinetralkan menggunakan NaOH 1 N, dan disaring menggunakan kertas saring Whatman no.41. Filtrat yang diperoleh dievaporasi dan disaring dengan menggunakan kertas saring Whatman dan dianalisis dengan HPLC.

Penentuan waktu inkubasi optimum

Waktu inkubasi optimum ditentukan dengan menggunakan metode Chang (2000) dengan variasi inkubasi 0-48 jam.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Kitin dapat didegradasi dengan menggunakan HCl sehingga menghasilkan senyawa monomernya, yaitu *N-Asetil-D-Glukosamin* (GlcNAc). GlcNAc dapat dianalisis dengan menggunakan *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC). Waktu retensi GlcNAc muncul pada range 2,7 – 3,1 (Gambar 2)



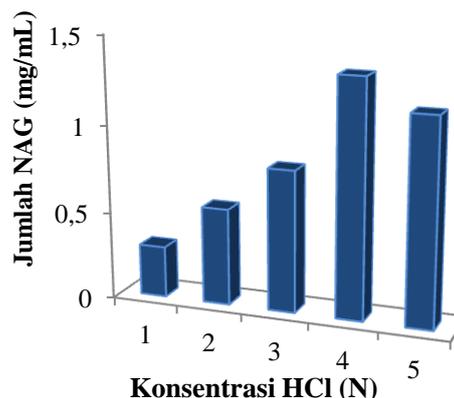
Gambar 2. Kromatogram GlcNAc Standar

Berdasarkan kurva standar diperoleh persamaan garis linier hubungan antara luas area dan konsentrasi GlcNAc standar yaitu $y = 1246,2x + 27,919$, dengan koefisien korelasi (R^2) sebesar 0,9986. Nilai R^2 sebesar 0,9986 berarti kurva tersebut memiliki keakuratan dalam menentukan konsentrasi sebesar 99,86 %. Persamaan garis linier tersebut selanjutnya digunakan untuk menentukan konsentrasi GlcNAc pada sampel.

Penentuan Konsentrasi HCl Pada Pembentukan GlcNAc

Hidrolisis kitin dipengaruhi oleh konsentrasi asam yang digunakan [3]. Hackman (1962) meneliti pengaruh HCl dan asam pekat lain terhadap ukuran rantai kitin, ketika kitin dihidrolisis dengan menggunakan HCl pada suhu 20°C, degradasi terjadi pada beberapa menit pertama menghasilkan oligosakarida. Hasil penentuan konsentrasi HCl untuk pembentukan GlcNAc menunjukkan bahwa konsentrasi 4N

merupakan konsentrasi optimum untuk pembentukan GlcNAc (Gambar 3).

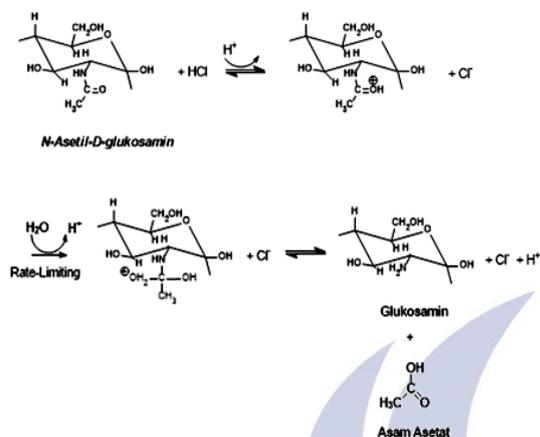


Gambar 3. Jumlah GlcNAc pada variasi konsentrasi HCl

Jumlah GlcNAc semakin meningkat seiring dengan meningkatnya konsentrasi HCl. Jumlah GlcNAc meningkat secara bertahap dari konsentrasi HCl 1 N dan mencapai nilai maksimum pada penambahan HCl dengan konsentrasi 4 N yang dihasilkan sebesar 1,3397 mg/mL. Konsentrasi HCl yang semakin meningkat menyebabkan jumlah ion H^+ yang tersedia semakin banyak untuk membentuk ion *carbonium-oxonium* siklik sehingga ikatan glikosidik semakin mudah terputus. Hal ini menyebabkan kitin dapat didegradasi dengan mudah menjadi monomernya yaitu GlcNAc. Hidrolisis asam pada ikatan glikosidik melibatkan protonasi O-glikosida dan penambahan H_2O untuk menghasilkan gugus gula pereduksi.

Hidrolisis kitin lebih lanjut dapat terjadi melalui pemutusan ikatan *N-Asetil* [3]. Pemutusan ikatan *N-Asetil* menghasilkan glukosamin dan asam asetat. Pada Gambar 4 Jumlah GlcNAc mengalami penurunan pada konsentrasi HCl 5 N. Hal ini kemungkinan dikarenakan GlcNAc yang terbentuk mengalami degradasi lebih lanjut menjadi glukosamin dan asam asetat yang terjadi melalui pemutusan ikatan *N-Asetil* seperti ditunjukkan pada Gambar 4. Hal ini diduga yang menyebabkan terjadinya penurunan jumlah GlcNAc. Chang (2000) menyatakan bahwa GlcNAc yang dihasilkan dari hidrolisis

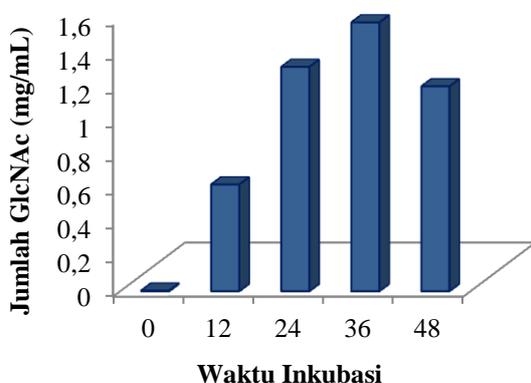
asam menggunakan HCl dengan konsentrasi 7 N pada suhu 70 °C menjadi 5-6 % lebih banyak dibandingkan dengan menggunakan 4 N HCl pada suhu 70°C dan 4 N HCl pada suhu 90°C.



Gambar 4. Mekanisme Reaksi hidrolisis ikatan glikosida pada N-Asetil-D-Glukosamin (Stryer, 1995)

Penentuan Waktu Inkubasi Optimum

Pada proses pembentukan GlcNAc diperlukan waktu inkubasi optimum, yaitu waktu yang diperlukan HCl untuk mendegradasi kitin secara maksimal sehingga dihasilkan GlcNAc dengan jumlah yang tinggi. Penentuan waktu inkubasi pada hidrolisis kitin dilakukan pada rentang 0 - 48 jam yang diambil pada selang waktu 12 jam. Hasil penentuan konsentrasi HCl untuk pembentukan GlcNAc ditunjukkan pada Gambar 5.



Gambar 5. Jumlah GlcNAc pada variasi waktu inkubasi.

Pada penentuan waktu inkubasi optimum menunjukkan bahwa jumlah GlcNAc meningkat seiring dengan meningkatnya waktu inkubasi. Peningkatan terjadi mulai dari waktu inkubasi 12 jam hingga mencapai titik optimum 36 jam dengan jumlah GlcNAc sebesar 1,5880 mg/mL. Adanya peningkatan jumlah GlcNAc dari 12 jam sampai dengan 36 jam dikarenakan HCl mulai mendegradasi kitin dengan memutus ikatan glikosida yang menghubungkan antar monomer pada kitin sehingga terbentuk senyawa kitin sederhana dalam bentuk oligomer kitin dan monomer GlcNAc. Pada waktu inkubasi 48 jam mulai terjadi penurunan jumlah GlcNAc. Hal ini kemungkinan dikarenakan GlcNAc terdegradasi lebih lanjut menjadi glukosamin dan asam asetat yang terjadi melalui pemutusan ikatan *N-Asetil* (Gambar 4). Hal ini diduga yang menyebabkan jumlah GlcNAc menjadi berkurang. Penelitian Chang (2000) menunjukkan bahwa waktu inkubasi optimum pada pembentukan senyawa GlcNAc dengan menggunakan HCl 4N pada suhu 70°C adalah 120 menit dan mengalami penurunan pada waktu inkubasi 180, 240, dan 300 menit.

PENUTUP

Simpulan

Berdasarkan hasil penelitian di atas, dapat disimpulkan bahwa konsentrasi HCl dan waktu inkubasi optimum yang diperlukan untuk menghasilkan senyawa GlcNAc dalam jumlah yang maksimal adalah 4N dengan waktu inkubasi 36 jam.

Saran

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut tentang kondisi optimum seperti suhu dan karakteristik senyawa *N-Asetil-D-Glukosamin*.

DAFTAR PUSTAKA

- Kuddus S.M. and Ahmad R.I.Z. 2013. Isolation of novel chitinolytic bacteria and production optimization of extracellular chitinase. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*. 11/(1): 39–46

2. Holan Z., Votruba J., Vlasakova V. 1980. New Method of Chitin Determination Based on Deacetylation and Gas-Liquid-Chromatographic Assay of Liberated Acetic-Acid. *Journal of Chromatography* **190** (1): 67-76.
3. Einbu, A., 2007. *Characterisation of Chitin and a Study of its Acid-Catalysed Hydrolysis*. PhD Thesis, Department of Biotechnology Faculty of Natural Science and Technology. Norwegian University of Science and Technology. Trondheim 7. 5 pp.
4. Chen, K. S., Huang, P. F., Chen, T. S. and Chen, H.C. 1996. Investigation of hydrolytic condition on the preparation of N-Acetylchitooligosaccharides. *Food Sci.* **23**:874-883.
5. Peter MG. 2005. Chitin and chitosan from animal sources. Di dalam: Steinbuchel A dan SK Rhee, editor. *Polysaccharides and Polyamides in the Food Industry*. Volume ke-1. Wernheim: Wiley-VCH.
6. Rupley J. A. 1964. Hydrolysis of Chitin by Concentrated Hydrochloric Acid + Preparation of Low Molecular-Weight Substrates for Lysozyme. *Biochimica Et Biophysica Acta* **83** (3): 245-251.
7. Chang, Ke Liang B, *et.al.* 2000. HPLC Analysis of N-Acetyl-chitooligosaccharides during the acid Hydrolysis of Chitin. *Journal of Food and Drug Analysis*. **8**(2):75-83.

