

**Variasi Etanol-Asetonitril pada Pemurnian N-asetilglukosamin
hasil Degradasi Enzimatis Kitin Jenis Amorf**

**Variety of Ethanol-Acetonitril in the Purification of N-acetylglukosamin
Result of Enzymatic Degradation of Amorphous Chitin**

Fitria Dewi Nurrohawati* dan Nuniek Herdyastuti

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

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

*Corresponding author,email: fdewi51@gmail.com

Abstrak. Telah dilakukan penelitian yang bertujuan untuk memurnikan N-asetilglukosamin serta mengetahui persen rendemen yang dihasilkan setelah proses pemurnian. Pemurnian N-asetilglukosamin dilakukan dengan teknik pemurnian bertingkat dengan metode pengendapan menggunakan etanol dan asetonitril. Persen rendemen dihitung dengan membandingkan jumlah N-asetilglukosamin yang terbentuk terhadap kitin amorf mula-mula. Hasil pemurnian menunjukkan bahwa N-asetilglukosamin dapat dimurnikan dengan pemurnian bertingkat menggunakan etanol dan asetonitril menghasilkan kromatogram seperti standar. Rendemen N-asetilglukosamin yang dihasilkan setelah proses pemurnian yaitu sebesar 10,52%.

Kata Kunci: N-asetilglukosamin, pemurnian, persen rendemen

Abstract. Research has been done that aims to purify N-acetylglucosamine and knowing percent rendemen produced after the purification process. N-acetylglucosamine purification was performed using multilevel purification by precipitation method using ethanol and acetonitrile. Percent rendemen is calculated by comparing the number of N-acetylglucosamine formed on the first amorphous chitin. The results showed that the purification of N-acetylglucosamine can be purified by purification using ethanol and acetonitrile graded with the standard approach resulting chromatogram. Percent rendemen produced after the purification process that is 10.52%.

Keywords: N-acetylglucosamine, purification, percent rendemen

PENDAHULUAN

Kitin merupakan biopolimer yang banyak terdapat di alam, yang tersusun atas monomer-monomer N-asetilglukosamin (GlcNac) dan dihubungkan oleh ikatan $\beta(1-4)$. Kitin menempati urutan terbesar kedua setelah selulosa dan banyak ditemukan pada berbagai organism seperti bakteri, serangga, cendawan, tanaman dan hewan. Kitin terdapat sebagai komponen penyusun tubuh udang, kepiting, serangga, kerang, cumi-cumi, hewan antropoda lainnya, dan merupakan komponen dinding, dari fungi dan alga [1]. Kitin merupakan zat padat yang larut dalam asam-asam mineral pekat, tetapi tidak larut di dalam air, pelarut organik, alkali pekat dan asam mineral encer. Kitin tidak larut

dalam air dan membentuk fibril disebabkan karena adanya ikatan hidrogen yang sangat kuat pada rantai kitin [2]. Kitin merupakan sumber karbon dan hidrogen yang dimanfaatkan oleh bakteri kitinolitik [3].

Degradasi kitin untuk menghasilkan N-asetilglukosamin dapat dilakukan dengan dua cara yaitu secara kimiawi dan enzimatis. Menurut Sashiwa *et al.* (2002:4) dan Orikoshi *et al.* (2005:5), degradasi kitin secara kimiawi dapat dilakukan menggunakan HCl, namun cara ini kurang diminati karena rendemen yang dihasilkan rendah serta limbahnya menimbulkan efek pencemaran terhadap lingkungan. Alternatif untuk mengatasi permasalahan tersebut adalah dengan degradasi kitin

secara enzimatik dengan memanfaatkan aktivitas kitinase. Kitinase adalah enzim yang menghidrolisis ikatan polimer kitin menjadi ikatan yang lebih pendek [6]. Degradasi kitin secara enzimatik telah banyak dilakukan karena merupakan metode yang sederhana, cepat, reproduksibel untuk menghasilkan senyawa turunan kitin atau kitin oligosakarida [7].

Struktur kitin yang rapat disebabkan oleh adanya ikatan hidrogen antar dan intermolekul kitin yang menyebabkan kerapatan pada kitin semakin tinggi, sehingga interaksi antara substrat dan enzim kurang maksimal. Interaksi enzim kitinase dengan kitin dapat dipermudah dengan cara memodifikasi kitin dengan penambahan beberapa zat kimia seperti asam klorida, metanol dan detergen berupa *Sodium Dodecyl Sulphate* (SDS) sehingga struktur kitin menjadi lebih terbuka. Kitin jenis amorf adalah salah satu jenis kitin yang sesuai untuk digunakan pada proses degradasi kitin yang akan mempermudah interaksi antara substrat kitin dengan sisi aktif enzim karena struktur kitin menjadi lebih terbuka akibat penambahan *Sodium Dodecyl Sulphate* (SDS) [8].

Hasil degradasi kitin berupa N-asetilglukosamin dapat dimanfaatkan dalam bidang farmasi, diantaranya dapat digunakan sebagai obat untuk mengontrol kadar gula dalam darah, sebagai suplemen, antiinflamasi dan sebagainya. N-asetilglukosamin dalam bidang kosmetik, dapat membantu mengurangi hilangnya hiperpigmentasi karena N-asetilglukosamin dapat membantu mengurangi aktivitas enzim tirosinase yang berperan dalam produksi melanin [1]. Di negara maju seperti Jepang, N-asetilglukosamin telah diaplikasikan dalam industri pangan atau minuman [9].

Penelitian mengenai pemurnian N-asetilglukosamin hasil degradasi kitin secara enzimatik belum banyak dilakukan sehingga perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mendapatkan N-asetilglukosamin dengan tingkat kemurnian tertentu. Pemurnian ini dapat dilakukan dengan metode pengendapan menggunakan beberapa pelarut organik, misalnya etanol, metanol, asetonitril dan aseton. Pelarut-pelarut tersebut akan menurunkan konstanta dielektrik air yang menyebabkan penurunan kelarutan sehingga terjadi pengendapan pada N-asetilglukosamin. Metode pemurnian senyawa N-asetilglukosamin dapat dilakukan dengan

cara pengendapan menggunakan etanol dan kromatografi. Analisis senyawa N-asetilglukosamin hasil pemurnian dapat dilakukan dengan *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC) pada kolom NH2P 50 dengan menggunakan eluen campuran dari asetonitril dan air (7:3)[10].

Air, N-asetilglukosamin dan pelarut yang digunakan merupakan senyawa yang bersifat polar. Pemilihan pelarut polar didasarkan pada adanya interaksi ionik antara N-asetilglukosamin dengan air berkurang karena air berinteraksi dengan pelarut yang digunakan, hal tersebut akan mengakibatkan pengendapan terhadap N-asetilglukosamin. Produksi senyawa N-asetilglukosamin secara enzimatik serta proses pemurniannya ini diharapkan mampu meningkatkan efisiensi dan rendemen serta mengurangi efek pencemaran terhadap lingkungan karena berkurangnya penggunaan bahan kimia berbahaya selama proses produksi. Proses ini juga diharapkan memperoleh senyawa N-asetilglukosamin dengan kemurnian tertentu agar dapat dimanfaatkan secara efisien baik dibidang farmasi, pangan maupun kosmetik.

METODE PENELITIAN

Penelitian dilakukan di laboratorium biokimia, laboratorium jurusan kimia, dan laboratorium IPA terpadu Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Negeri Surabaya.

Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain: peralatan gelas yang sering digunakan, *Centrifuge* 5810 R, *shaker incubator*, *laminar airflow*, neraca analitik, oven, penangas air, autoklaf dan *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC) HP1050.

Bahan

Bahan-bahan yang digunakan antara lain :kitin (Rhongseng,Cina), *Pseudomonas sp.* TNH 54, NaOH, HCl, *Sodium Dodecyl Sulphate* (SDS), KH_2PO_4 , $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, NaCl, *yeast extract* (Merck) , tripton (Merck), agar (Merck), aquadest, aquademin, *aquabidest*, etanol (Merck), aseton (Merck) , asetonitril (Fisher Scientific), dan N-asetilglukosamin (Sigma).

Pembuatan Kitin Amorf

Sebanyak 10 gram kitin dilarutkan kedalam 40 mL larutan NaOH 40% dingin (4°C) yang mengandung 0,2% SDS kemudian disimpan pada suhu -20°C selama semalam. Larutan dinetralkan menggunakan HCl 6 N, difiltrasi, dan endapan yang dihasilkan dicuci dengan etanol, air, etanol, kemudian aseton.

Produksi Enzim Kitinase

Enzim kitinase diperoleh dari bakteri *Pseudomonas sp.* TNH 54 yang diproduksi pada 150 mL media Luria Bertani yang mengandung 0,1% kitin jenis amorf (b/v). Media diinkubasi selama 36 jam dengan pengocokan pada 120 rpm. Setelah itu disentrifugasi pada 4000 rpm, suhu 4°C selama 15 menit. Supernatan yang dihasilkan merupakan enzim kitinase.

Produksi N-asetilglukosamin

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pembuatan Kitin Amorf

Kitin merupakan zat padat yang larut dalam asam-asam mineral pekat, tetapi tidak larut didalam air, pelarut organik, alkali pekat dan asam mineral encer. Kitin mempunyai struktur yang kompak dan rapat disebabkan oleh adanya ikatan hidrogen antar dan intramolekul kitin yang menyebabkan kerapatan pada kitin semakin tinggi, sehingga menyebabkan interaksi enzim dan substrat tidak maksimal. Menurut Wirawan dan Herdyastuti (2013), dalam penelitiannya menyatakan bahwa kitin jenis amorf adalah salah satu jenis kitin yang sesuai untuk digunakan pada proses degradasi kitin yang akan mempermudah interaksi antara substrat kitin dengan sisi aktif enzim karena struktur kitin menjadi lebih terbuka akibat penambahan *Sodium Dodecyl Sulphate* (SDS). Hal tersebut dapat dilihat dari nilai aktivitas enzim kitinase yang paling tinggi yaitu sebesar 0,828 U/ml. Pembuatan kitin amorf dilakukan dengan cara melarutkan kitin kedalam NaOH pekat yang mengandung 2% *Sodium Dodecyl Sulphate* (SDS) dan dinetralkan dengan HCl.

Kitin jenis amorf konsentrasi 1,2 % dilarutkan dalam 2 mL buffer fosfat dan ditambahkan dengan 0,5 mL enzim kitinase kemudian diinkubasi selama 6 jam dengan pengocokan 120 rpm pada suhu 30°C. Campran kemudian diinaktivasi dalam air mendidih selama 5 menit. Larutan kemudian disentrifugasi pada 4000 rpm selama 10 menit dan diambil supernatannya.

Pemurnian N-asetilglukosamin

Supernatan yang dihasilkan ditambahkan dengan etanol dan didiamkan sampai mengendap. Endapan yang dihasilkan dilarutkan dengan air dan ditambahkan dengan asetonitril dengan perbandingan 1:1 (v/v). Langkah tersebut diulangi sebanyak 2 kali dengan penambahan asetonitril dan hasil yang diperoleh diuji dengan *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC) dan dihitung persen rendemennya.



Gambar 2. Kitin Jenis Amorf

Produksi N-asetilglukosamin

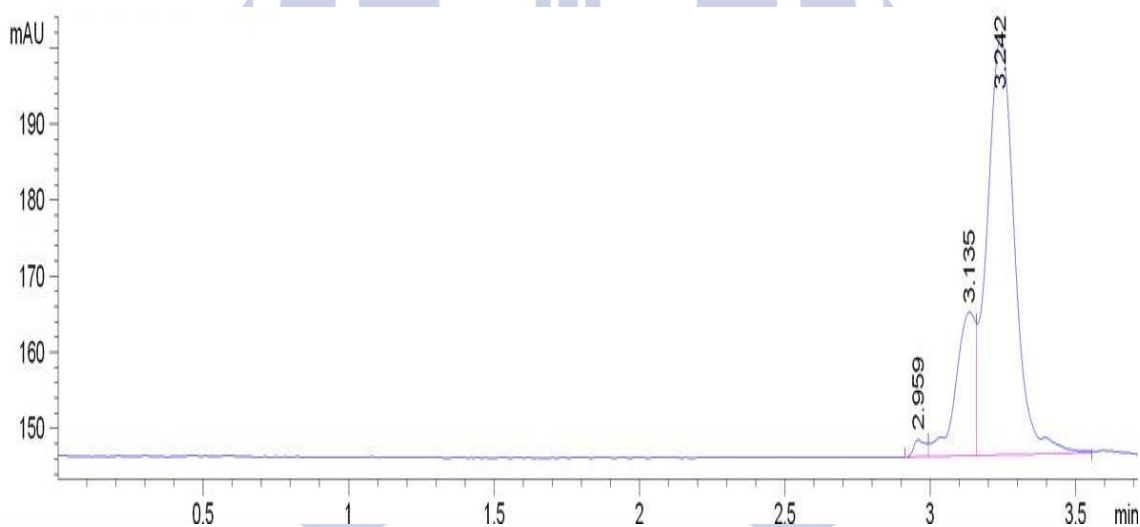
Produksi N-asetilglukosamin dengan menggunakan ekstrak kasar enzim kitinase dilakukan pada keadaan optimum yaitu dengan konsentrasi 1,2% dengan waktu inkubasi selama 6 jam. N-asetilglukosamin yang dihasilkan dalam supernatan diuji menggunakan *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC) dan didapatkan hasil yang masih belum murni sehingga perlu dilakukan proses pemurnian. *Peak* yang muncul masih banyak kemungkinan disebabkan karena masih banyaknya komponen yang terkandung dalam supernatan yang tidak terpisahkan. Hasil degradasi kitin dapat menghasilkan oligomer, trimer, maupun dimer, sehingga menimbulkan banyak *peak*. Filtrat N-asetilglukosamin yang diperoleh kemungkinan masih mengandung media produksi sehingga masih

banyak pengotor yang mempengaruhi hasil kromatografi.

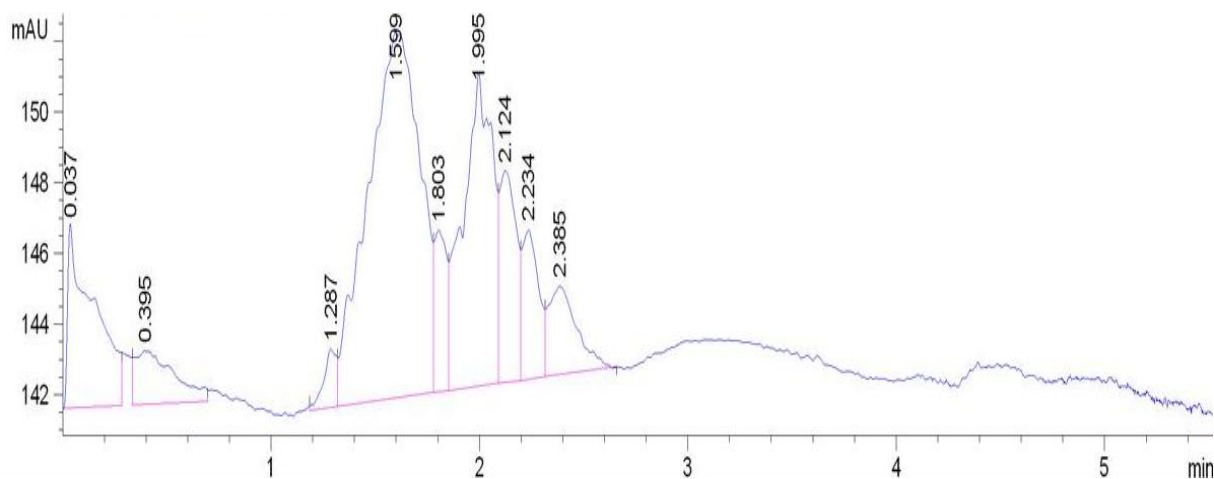
Pemurnian N-asetilglukosamin

Pemurnian adalah proses pemisahan dua zat atau lebih yang saling bercampur serta untuk mendapatkan zat murni dari suatu zat yang telah tercemar atau tercampur[11]. Dalam penelitian ini, senyawa N-asetilglukosamin dimurnikan dengan metode pengendapan menggunakan pelarut polar yaitu etanol dan asetonitril, pelarut-pelarut tersebut mengakibatkan interaksi ionik antara N-asetilglukosamin dengan air berkurang yang menyebabkan pengendapan pada N-asetilglukosamin [10]. Pemurnian dilakukan secara bertahap dengan

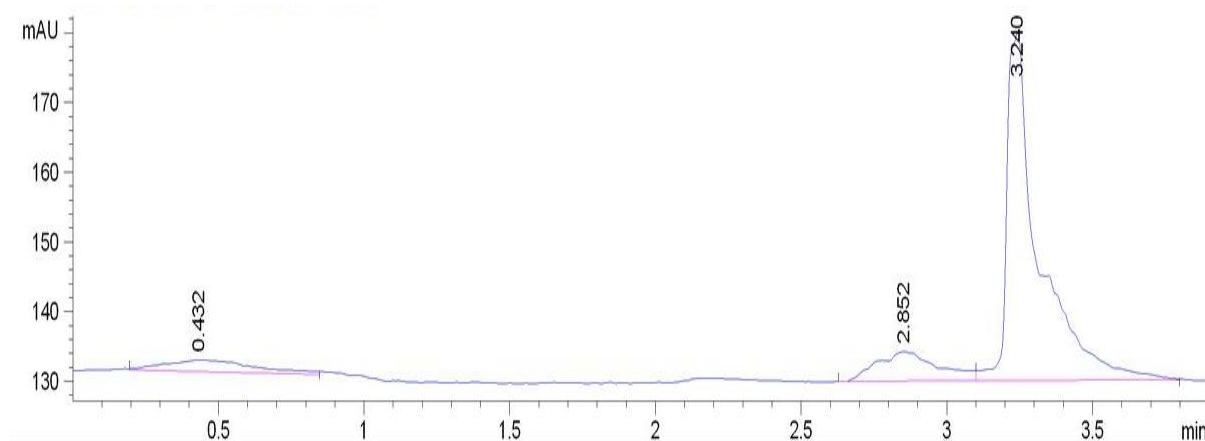
menggunakan variasi etanol-asetonitril. Hasil pemurnian menggunakan etanol masih menghasilkan *peak* yang banyak seperti terlihat pada Gambar 3. Penelitian Widhyastuti (2010), menyebutkan bahwa pemurnian N-asetilglukosamin dapat dilakukan dengan metode pengendapan menggunakan etanol, dimana *peak* yang dihasilkan cukup bagus namun masih terdapat *peak* lain yang muncul selain N-asetilglukosamin. N-asetilglukosamin tersebut dihasilkan dari degradasi kitin koloidal secara enzimatik menggunakan enzim kitinase yang berasal dari jamur *Aspergillus sp.* 501. Berdasarkan data pada Gambar 3., maka proses pemurnian dilanjutkan dengan pemurnian bertingkat menggunakan etanol-asetonitril seperti pada Gambar 4.



Gambar 1. Kromatogram N-asetilglukosamin standar



Gambar 3. Kromatogram pemurnian N-asetilglukosamin dengan etanol



Gambar 4. Kromatogram N-asetilglukosamin hasil pemurnian tahap

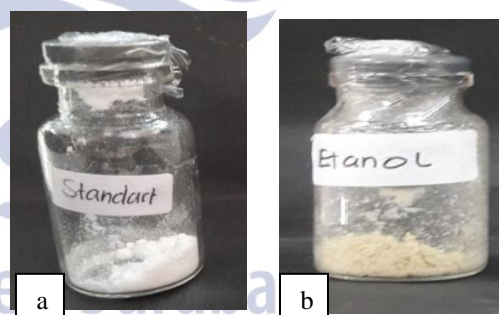
Pada Gambar 4. menunjukkan bahwa asetonitril mempunyai peran yang baik dalam proses pemurnian N-asetilglukosamin. Hal tersebut nampak dari hasil kromatogram yang menghasilkan 2 *peak* dengan waktu retensi sama dengan standar yaitu 3,24. Hal ini sangat berbeda dengan kromatogram pada pemurnian yang hanya menggunakan etanol, *peak* yang dihasilkan masih dalam jumlah yang cukup banyak. Berdasarkan nilai konstanta dielektrik, asetonitril memiliki kepolaran yang lebih tinggi dibandingkan dengan etanol, sehingga interaksi dengan air lebih tinggi dan lebih banyak menghilangkan pengotor yang mengganggu N-asetilglukosamin karena zat pengotor lebih banyak tertahan dalam fase larutan.

Rendemen N-asetilglukosamin hasil pemurnian

Hasil degradasi kitin jenis amorf menggunakan enzim kitinase diperoleh rendemen sebesar 10,52%. Rendemen tersebut ditentukan berdasarkan jumlah N-asetilglukosamin yang diperoleh dibandingkan terhadap jumlah kitin jenis amorf mula-mula. Rendemen yang dihasilkan masih sangat kecil, hal tersebut kemungkinan disebabkan karena banyaknya N-asetilglukosamin yang terlarut pada proses pemurnian sebelumnya.

N-asetilglukosamin yang dihasilkan memiliki tekstur yang halus tetapi warnanya berbeda dengan standar, yaitu berwarna *cream*, seperti yang terlihat pada Gambar 5. Perbedaan warna yang pertama kemungkinan disebabkan karena pengaruh asetonitril yang tidak mampu mengikat suatu

senyawa yang terikat pada N-asetilglukosamin sehingga menyebabkannya teroksidasi, kedua kemungkinan disebabkan karena terjadinya proses *browning* terutama pada proses pemanasan. Ketiga kemungkinan adanya media produksi yang berwarna kuning kecoklatan yang terikat pada N-asetilglukosamin pada saat produksi. Widhyastuti (2010) dalam penelitiannya juga memperoleh N-asetilglukosamin dengan warna kuning kecoklatan. Alternatif yang dapat dilakukan yaitu menggunakan karbon aktif untuk menghilangkan warna kekuningan.



Gambar 5. Endapan N-asetilglukosamin standar (a), endapan N-asetilglukosamin hasil pemurnian (b).

PENUTUP

Simpulan

N-asetilglukosamin dapat dimurnikan dengan menggunakan etanol-asetonitril dalam pemurnian bertingkat dengan metode pengendapan yang menghasilkan *peak* pada waktu retensi 3,24. Rendemen pada proses degradasi kitin jenis amorf sebesar 10,52%

Saran

Untuk memperbaiki dan mengembangkan penelitian ini perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai optimasi volume pelarut yang digunakan untuk proses pemurnian N-asetilglukosamin dan adsorpsi untuk menghasilkan endapan yang berwarna putih.

DAFTAR PUSTAKA

1. Halizah, W.dan Suhartono M.T. 2012. Karakteristik Kitinase dari Mikrobial. *Bulletin Teknologi Pascapanen Pertanian*. 8(1).
2. Dewi, Iche Marina.2008. *Isolasi bakteri dan Uji Aktivitas Kitinase Termofilik Kasar dari Sumber Air Panas Tinggi Raja, Saimalungun Sumatera Utara*. Skripsi. Medan: Universitas Sumatera Utara
3. Poernomo.2004.*Kitinase dalam Pengendalian Hayati*. Majalah Farmasi Airlangga. Jakarta. 4(2):24-27
4. Sashiwa H *et al.* 2002. Production of Nacetyl-D-glucosamine from α -chitin by crude enzymes from *Aeromonas hydrophyla* H-2330. *Carbohydrate Research* 337:761-763.
5. Orikoshi H, Nakayama S, Miyamoto K, Hanato C, Yasuda M, Inamori Y, and Tsujibo H. 2005. Roles of Four Chitinases (ChiA, ChiB, ChiC, and ChiD) Chitin Degradation System of Marine Bacterium *Alteromonas* sp. Strain 0-7. *Applied and Environmental Microbiology*,71 (4):1811-1815.
6. Dahiya, N, Tewari R, Hoondal GS. 2006. Biotechnological aspects of Chitinolytic Enzymes: A Review. *Applied Microbial Biotechnology* , 71 (6): 773-782.
7. Krokeide, I.M., Eijsink, V.G.H., and Sorlie. 2007. Enzyme Assay For Chitinase Catalyzed Hydrolysis Of Tetra- N -Acetylchitotetraose By IsothermalTitration Calorimetry. *Thermochemica Acta*. Vol 454: 144-146
8. Wirawan,A., dan Herdyastuti, N.2013. Penentuan waktu Inkubasi pada Pembentukan Senyawa N-asetilglukosamin yang Didegradasi Secara Enzimatis dari kitin. *UNESA Journal of Chemistry*. 2(3).
9. Aiba S. 2009. Chemical and enzymatic modification of chitin and chitosan towards functional materials. [Laporan Penelitian]. Ibaraki: Environmentally Degradable Polymer Research Group, Institute for Biology
10. Widhyastuti,N. 2010. Purifikasi N-Asetil-D-Glukosamin Hasil Sintesa Secara Enzimatis untuk Bahan Obat dan Pangan Fungsional. Laporan Akhir. Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia
11. Petrucci, Ralph H. 1987. *Kimia Dasar*. Jilid 1. Jakarta: Erlangga