

PENGARUH KONSENTRASI ENZIM OPTIMUM PADA PEMBENTUKKAN N-ASETILGLUKOSAMIN

EFFECT OF OPTIMUM ENZYME CONCENTRATION IN THE ESTABLISHMENT OF N-ACETYLGLUCOSAMINE

Kartika Vidya Insani dan Nuniek Herdyastuti*

Department of Chemistry, Faculty of Mathematics and Natural Sciences
State University of Surabaya

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

*Corresponding author, email: kartikavins@gmail.com

Abstrak. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui konsentrasi enzim optimum pada pembentukan senyawa N-asetilglukosamin ditentukan berdasarkan jumlah N-asetilglukosamin yang dihasilkan yang dinyatakan dalam presentase. Metode yang digunakan untuk menentukan N-asetilglukosamin berdasarkan kurva standar yang ditentukan spektrofotometer UV-Vis. Hasil yang diperoleh menunjukkan konsentrasi enzim optimum 2,4 U/mL merupakan konsentrasi enzim optimum yang menghasilkan senyawa N-asetilglukosamin sebesar 4 %.

Kata Kunci: kitin, kitinase, konsentrasi enzim, N-asetilglukosamin,

Abstract. The aim of this experiment were to know the optimal enzyme concentration on the formation of N-acetylglucosamine is determined based on the amount of N-acetylglucosamine produced expressed in percentage. The method used to determine the N-acetylglucosamine is based on a standard curve that is determined UV-Vis spectrophotometer. The results showed the optimum enzyme concentration of 2.4 U / mL is the optimum enzyme concentration of N-acetylglucosamine yield of 4 %.

Keywords: chitin, chitinase, enzyme concentration, N-acetylglucosamine

PENDAHULUAN

Kitin adalah biopolimer yang terdiri dari unit-unit N-asetilglukosamin (GlcNAc), termasuk golongan polisakarida, mempunyai berat molekul tinggi dan jumlahnya berlimpah di alam. Kitin berbentuk padat yang tidak mudah larut dalam air, alkohol, pelarut organik tetapi larut dalam asam-asam mineral yang pekat [1].

Kitin dapat didegradasi melalui cara enzimatik menggunakan enzim kitinase. Kitinase termasuk enzim yang aktif mengkatalisis hidrolisis polimer kitin menjadi kitin oligosakarida atau monomer GlcNAc. Teknik ini relatif lebih baik dibanding secara kimiawi, karena mudah dikendalikan, terurai secara biologis (*biodegradable*), ramah lingkungan (*biocompatible*), lebih ekonomis, serta dapat membentuk oligomer atau polimer yang diinginkan. Kitinase dapat dihasilkan oleh bakteri, fungi, khamir,

tumbuhan, insekta, protozoa, manusia dan hewan [2].

Kitin yang banyak dipergunakan sebagai substrat untuk kitinase adalah kitin dalam bentuk kitin koloidal. Penelitian Widhyastuti (2007:3) menggunakan kitin koloidal dapat menghasilkan N-asetil-D-glukosamin dan N-asetilkitooligosakarida membutuhkan waktu inkubasi 48 jam. Pada penelitian Wirawan (2013:4) menyebutkan bahwa kitin jenis amorf memiliki aktivitas yang lebih tinggi terhadap kitinase dibanding kitin jenis lainnya yaitu 0,828 U/mL.

Hasil degradasi kitin dapat dimanfaatkan dalam beberapa bidang seperti pada bidang kedokteran atau kesehatan yaitu dapat digunakan sebagai immuno-adjuvant, bahan dasar pembuatan benang operasi, pengobatan osteoarthritis, gastritis, suplemen makanan dan untuk kosmetika karena memiliki aktivitas antipenuaan. Di negara maju

seperti Jepang, GlcNAc diaplikasikan dalam industri pangan atau minuman seperti yoghurt dan teh hijau [5].

N-asetilglukosamin yang diperoleh dari degradasi kitin dipengaruhi oleh beberapa faktor yaitu konsentrasi enzim dan waktu inkubasi tertentu, sehingga dapat dihasilkan GlcNAc secara maksimal. Pada pembentukan GlcNAc diperlukan enzim kitinase dengan konsentrasi yang optimal. Konsentrasi enzim atau aktivitas enzim yang tinggi menyebabkan kemampuan enzim untuk mendegradasi substrat semakin optimal sehingga produk yang dihasilkan semakin bertambah. Dapat dikatakan bahwa laju reaksi enzimatik (v) berbanding lurus dengan konsentrasi enzim $[E]$. Hal ini dimaksudkan bahwa semakin besar konsentrasi enzim, maka reaksi akan semakin cepat. Seperti penelitian Jamialahmadi *et al.* (2011:6) memproduksi GlcNAc sebesar 79 % dihasilkan konsentrasi enzim sebesar 20 U/mL. Sancharini *et al.* (2012:7), dalam penelitiannya memproduksi GlcNAc sebesar 68 % dihasilkan konsentrasi enzim sebesar 5 U/mL.

METODE PENELITIAN

Alat : peralatan gelas yang sering digunakan, *Centrifuge* 5810 R, *shaker incubator*, *laminar airflow*, neraca analitik, oven, penangas air, autoklaf dan spektrofotometer SHIMADZU UV-Vis 1800.

Bahan: kitin (Rhongseng, Cina), *Pseudomonas sp.* TNH 54, NaOH, HCl, *Sodium Dodecyl Sulphate* (Merck), KH_2PO_4 , $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, NaCl, *yeast extract* (Merck), tripton (Merck), agar (Merck), asam 3,5-dinitrosalisilat (Sigma), natrium kalium tartrat, etanol (Merck), aseton (Merck) dan N-asetilglukosamin (Sigma).

PROSEDUR PENELITIAN

Pembuatan Kitin Jenis Amorf

10 gram kitin dilarutkan kedalam 20 mL larutan NaOH 40% dingin (4°C) yang terdapat 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 cair yang diinkubasi selama 16 jam. Setelah itu ditambahkan kitin jenis amorf dan inkubasi dilanjutkan kembali sampai 24 jam. Selanjutnya disentrifugasi pada 4000 rpm, suhu 4°C selama 15 menit. Supernatan yang dihasilkan merupakan enzim kitinase.

Uji Aktivitas Enzim (Monreal and Reese, 1969)

Pengukuran aktivitas kitinase dilakukan dengan menyiapkan dua buah tabung masing-masing untuk uji sampel dan blanko. Dimasukkan 2 mL larutan kitin 1% (b/v) yang dilarutkan dalam buffer kalium fosfat dan ditambahkan 0,5 mL enzim kitinase. Pada kedua tabung blanko dimasukkan 2 mL larutan kitin 1% (b/v) yang dilarutkan dalam buffer kalium fosfat dan 0,5 mL air bebas ion. Kedua tabung tersebut ditutup dengan alat penyumbat dan ditempatkan pada *rotary shaker* dengan kecepatan 150 rpm untuk menjaga kitin dalam suspensi, kemudian diinkubasi 2 jam pada suhu kamar. Setelah 2 jam tabung-tabung tersebut ditempatkan ke dalam air panas pada penangas air selama 5 menit. Tabung didinginkan pada suhu kamar dengan menempatkan pada penangas air dingin. Kemudian suspensi disentrifugasi selama 10 menit pada kecepatan 4000 rpm lalu diambil supernatannya.

Selanjutnya tabung sampel berisi 1 mL supernatan ditambahkan 2 mL aquades dan 1,5 mL reagen pewarna, sedangkan tabung blanko terdapat 2 mL supernatan, 1 mL aquades dan 1,5 mL reagen pewarna. Ditempatkan ke dalam penangas air yang berisi air panas selama 5 menit dan didinginkan pada suhu kamar. Diukur serapannya dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 496 nm.

Untuk larutan standar disiapkan dari N-asetilglukosamin 0,1% (b/v) dalam air bebas ion. Disiapkan 5 buah tabung dan masing-masing dimasukkan larutan N-asetilglukosamin 0,1; 0,2; 0,3; 0,4 dan 0,5 mL. Selanjutnya pada tabung masing-masing ditambahkan air bebas ion 2,9; 2,8; 2,7; 2,6 dan 2,5 mL dan ditambahkan reagen pewarna masing-masing 1,5 mL. Sebagai blanko ditambahkan 3 mL air bebas ion dan 1,5 mL reagen pewarna.

Penentuan Konsentrasi Enzim

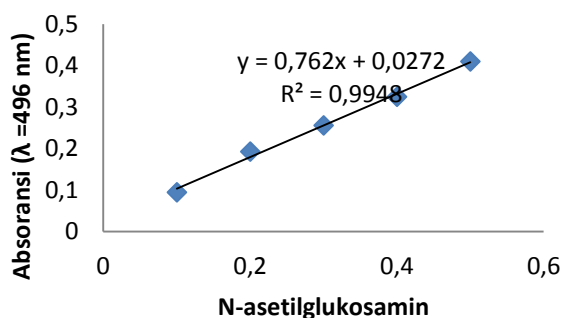
Variasi konsentrasi dibuat dengan membuat masing-masing diambil 0,5 mL dengan konsentrasi 0,75 U/mL; 2,0 U/mL; 2,25 U/mL; 2,4 U/mL dan 2

mL substrat kemudian diinkubasi selama 2 jam. Selanjutnya konsentrasi N-asetilglukosamin ditentukan menggunakan metode Monreal and Reese.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pembuatan Kurva Standar

Hasil pengukuran jumlah N-asetilglukosamin yang dilepaskan ditentukan berdasarkan kurva standar dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 496 nm.

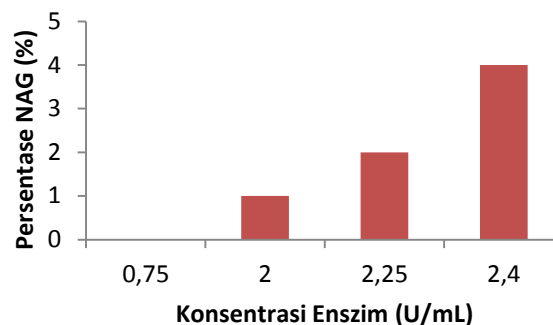


Gambar 1. Grafik kurva standar N-asetilglukosamin

Kurva standar tersebut menghasilkan persamaan garis yaitu $y = 0,762x + 0,027$ dan $R^2 = 0,994$. Selanjutnya persamaan di atas digunakan untuk menentukan konsentrasi N-asetilglukosamin dalam sampel. 1 U aktivitas enzim kitinase dapat diartikan sebagai jumlah enzim kitinase yang dibutuhkan untuk menghasilkan produk berupa satu μmol N-asetilglukosamin.

Penentuan Konsentrasi Enzim

Aktivitas enzim kitinase dipengaruhi oleh beberapa faktor, salah satunya adalah konsentrasi enzim. Pada penelitian ini dilakukan variasi konsentrasi enzim sebesar 0,75 - 2,4 U/mL. Persentase N-asetilglukosamin yang diperoleh ditentukan dari jumlah N-asetilglukosamin yang dilepaskan dibagi dengan massa kitin mula-mula dikalikan dengan 100%.



Gambar 2. Grafik pengaruh konsentrasi enzim pada pembentukan N-asetilglukosamin

Berdasarkan Gambar 2, terlihat bahwa jumlah N-asetilglukosamin meningkat seiring dengan bertambahnya konsentrasi enzim yang ditambahkan. Jumlah N-asetilglukosamin meningkat secara bertahap dari konsentrasi 0,75 U/mL dan mencapai nilai maksimum saat penambahan konsentrasi enzim 2,4 U/mL dengan N-asetilglukosamin yang dihasilkan mencapai 4 %. Hasil yang didapat merupakan produk N-asetilglukosamin yang optimum dari berbagai konsentrasi enzim.

Konsentrasi enzim atau aktivitas enzim yang tinggi mengakibatkan kemampuan enzim untuk mendegradasi substrat semakin optimal, hal tersebut mengakibatkan produk yang dihasilkan semakin bertambah. Dapat dikatakan bahwa kecepatan reaksi enzimatik (v) berbanding lurus dengan konsentrasi enzim $[E]$. Sedangkan konsentrasi enzim atau aktivitas enzim yang rendah mengakibatkan kemampuan enzim untuk mendegradasi substrat tidak berlangsung secara optimal, hal tersebut mengakibatkan produk N-asetilglukosamin yang dihasilkan rendah Lehninger (1993:8).

PENUTUP

Simpulan

Berdasarkan penelitian di atas yang dapat disimpulkan adalah konsentrasi enzim optimum yang diperoleh adalah 2,4 U/mL yang menghasilkan produksi N-asetilglukosamin sebanyak 4 %

Saran

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk memproduksi enzim dengan aktivitas tinggi sehingga dapat mendegradasi substrat secara optimal dan dapat memproduksi N-asetilglukosamin maksimal.

DAFTAR PUSTAKA

1. Gohel, V., Singh, A., Vimal, M., Ashwini, P., and Chhatpar, H. S. 2006. Bioprospecting and antifungal potential of chitinolytic microorganism. *African. J. Biotechnol.* 5(2):54–72.
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. Aiba, S. 2009. Chemical and enzymatic modification of chitin and chitosan towards functional materials. [Laporan Penelitian]. Ibaraki: Environmentally Degradable Polymer Research Group, Institute for Biolog.
4. 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).
5. Widhyastuti, Nunuk. 2007. Produksi Kitinase Ekstraseluler *Aspergillus rugulosus* 501 secara Optimal pada Media Cair. *Jurnal Berita Biologi* 8(6): 547-553.
6. Jamialahmadi K., J. Behravan, M. Fathi Najafi, M. Tabatabatei Yazdi, A.R. Shahverdi and 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.
7. Sancharini D, et al. 2012. Enzymatic Processing Of Chitinaceous Wastes For N-Acetyl-D-Glucosamine Production: An Example Of Green And Efficient Environmental Management. *Environmental Engineering and Management Journal* 11 (2012), 10, 1849-1855
8. Lehninger, Albert L. 1993. Dasar-dasar Biokimia Jilid I. Jakarta: Erlangga.

