

**PRODUKSI N-ASETILGLUKOSAMIN DENGAN KITINASE INTRASELULER DARI
Providencia stuartii YANG DIIMOBILISASI MENGGUNAKAN κ -KARAGENAN**

**[PRODUCTION OF N-ACETYLGLUCOSAMINE USING INTRACELLULAR CHITINASE
FROM *Providencia stuartii* IMMOBILIZED IN κ -CARRAGEENAN]**

Yuniwaty Halim^{1*}, Freddy Chayadi¹, Hardoko², Ratna Handayani¹

¹Program Studi Teknologi Pangan, Universitas Pelita Harapan, Tangerang, Indonesia

²Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Brawijaya, Malang, Indonesia

*Korespondensi penulis: yuniwaty.halim@uph.edu

ABSTRACT

*β -1,4-N-acetyl-D-glucosamine or N-acetylglucosamine is a product of chitin depolymerization that has been used in health application, one of them is to cure osteoarthritis. In this research, N-acetylglucosamine was obtained from chitin that was isolated from black Tiger shrimp shells using intracellular chitinase of *Providencia stuartii*. The aims of this research were to determine the best ratio between enzyme and support, and optimum fermentation cycle of intracellular chitinase from *Providencia stuartii* that was immobilized by κ -carrageenan using entrapment method. Ratio of enzyme and support used was 1:1; 1.5:1; 2:1, and the best ratio was used in 3 fermentation cycles to determine the optimum enzyme activity and N-acetylglucosamine produced. Results showed that the best ratio between enzyme and support was 2:1 with N-acetylglucosamine produced was $7,573.34 \pm 285.97$ ppm and chitinase activity of 11.41 ± 0.43 U/mL. Chitinase enzyme can be used up to 3 cycles of fermentation, retaining its activity of about 27%.*

Keywords : chitinase, intracellular enzyme, immobilization, κ -carrageenan, *Providencia stuartii*

ABSTRAK

β -1,4-N-asetil-D-glukosamin atau N-asetilglukosamin merupakan hasil depolimerisasi kitin yang telah banyak dimanfaatkan dalam bidang kesehatan, salah satunya untuk mengobati osteoarthritis. Pada penelitian ini, N-asetilglukosamin dihasilkan dari kitin yang diisolasi dari cangkang udang windu menggunakan kitinase intraseluler dari bakteri *Providencia stuartii*. Tujuan dari penelitian ini adalah menentukan rasio terbaik antara enzim dan *support*, dan siklus fermentasi optimum kitinase intraseluler *Providencia stuartii* yang diimobilisasi menggunakan κ -karagenan dengan metode *entrapment*. Rasio enzim dan *support* yang digunakan adalah 1:1; 1,5:1; 2:1, dan rasio terbaik digunakan dalam 3 siklus fermentasi untuk menentukan aktivitas enzim dan produksi N-asetilglukosamin optimum. Hasil menunjukkan bahwa rasio terbaik antara enzim dan *support* adalah 2:1 dengan N-asetilglukosamin yang dihasilkan sebesar $7.573,34 \pm 285,97$ ppm dan aktivitas kitinase sebesar $11,41 \pm 0,43$ U/mL. Enzim kitinase dapat digunakan sampai 3 siklus fermentasi dengan mempertahankan aktivitasnya sebesar 27%.

Kata kunci : enzim intraseluler, imobilisasi, kitinase, κ -karagenan, *Providencia stuartii*

PENDAHULUAN

Udang merupakan salah satu hasil budidaya perikanan yang digemari di Indonesia, dilihat dari kenaikan produksi udang di Indonesia pada tahun 2010-2014 yang mencapai 13,83%. Komoditas udang yang memiliki peningkatan produksi rata-rata terbesar adalah udang windu (3,32%), dan udang vaname (20,49%) (DJPB, 2016). Produksi udang yang tinggi tidak diimbangi dengan pemanfaatan limbah cangkang udang yang besarnya 25% dari total produksi, yaitu hanya 30% limbah cangkang udang yang dimanfaatkan (Dompeipen *et al.*, 2016).

Kitin yang merupakan salah satu komponen utama pada cangkang udang yang tidak dapat diserap oleh tubuh dengan baik karena kelarutannya yang rendah. Walaupun demikian, glukosamin hasil depolimerisasi kitin dapat dimanfaatkan oleh manusia sebagai peringan rasa sakit akibat osteoarthritis, memperbaiki cairan sinovial, dan memperbaiki sendi yang terkena osteoarthritis (Hauselman, 2001).

Bakteri *Providencia stuartii* merupakan salah satu bakteri yang dapat dimanfaatkan untuk mendegradasi kitin menjadi glukosamin secara alami. Kelebihan dari fermentasi enzimatik dibandingkan fermentasi dengan

mikroorganisme adalah waktunya yang lebih singkat, reaksinya spesifik dengan rendemen glukosamin yang lebih tinggi, yaitu sebesar 91,3% menggunakan enzim α -amilase komersial dan 86,2% menggunakan enzim glukamilase komersial (Pan *et al.*, 2011). Selanjutnya, untuk meningkatkan efisiensi dan produktivitas kitinase dalam memproduksi glukosamin, salah satu metode yang dapat dilakukan adalah dengan melakukan imobilisasi enzim.

Imobilisasi enzim dapat dilakukan dengan berbagai metode seperti adsorpsi, *entrapment*, enkapsulasi, dan ikatan silang (*cross-linking*) (Datta *et al.*, 2013). Metode *entrapment* merupakan salah satu metode yang umum digunakan, yaitu dengan memerangkap enzim melalui ikatan kovalen maupun non-kovalen menggunakan gel atau serat (Singh, 2009). Metode ini menggunakan beberapa polisakarida, seperti κ -karagenan, alginat, dan agarosa, namun salah satu yang paling sering digunakan adalah κ -karagenan (Girigowda *et al.*, 2007). κ -karagenan merupakan *support* untuk imobilisasi yang murah dan telah diketahui dapat meningkatkan stabilitas lipase, yaitu dapat digunakan hingga 40 kali siklus reaksi dengan aktivitas enzim tersisa sebesar 22% (Tümtürk *et al.*, 2007) dan β -galaktosidase, yaitu dapat digunakan hingga

20 kali siklus reaksi dengan aktivitas enzim tersisa sebesar 60% (Elnashar *et al.*, 2014). Selain itu, penelitian sebelumnya juga melaporkan bahwa lipase yang diimmobilisasi dengan κ -karagenan menggunakan metode *entrapment* bersifat termostabil dan tahan terhadap pelarut organik, yaitu metanol (Tümtürk *et al.*, 2007; Jegannathan *et al.*, 2010).

Penelitian ini dilakukan untuk untuk menentukan rasio enzim : *support* terbaik untuk imobilisasi kitinase dari *Providencia stuartii* dengan metode *entrapment*. Selain itu, penelitian ini juga bertujuan untuk menentukan jumlah siklus fermentasi optimum yang dapat dilakukan dengan menggunakan kitinase yang diimmobilisasi dengan κ -karagenan.

BAHAN DAN METODE

Bahan dan Alat

Bahan utama yang digunakan dalam penelitian ini adalah kitin yang diisolasi dari cangkang udang windu (*Penaeus monodon*) yang diperoleh dari PT. Lola Mina, Muara Baru, Jakarta Utara, Indonesia, kultur *Providencia stuartii*, κ -karagenan, dan standar N-asetilglukosamin (Sigma Aldrich). Bahan-bahan lain yang digunakan dalam analisis adalah kalium dihidrogen fosfat (KH_2PO_4), di-kalium fosfat

(K_2HPO_4), magnesium sulfat heptahidrat ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), amonium sulfat ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$), buffer sitrat pH 5, buffer lisis, buffer fosfat, buffer kalium fosfat pH 8, KCl, DNS (3,5- *Dinitrosalicylic acid*) (Sigma Aldrich), dan kalium natrium tartarat (Na-K-Tartarat).

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah neraca analitik (Ohaus), *sieve shaker* (Retsch), *shaker incubator* (Heidolph 22 Unimax 1010), mikropipet, *centrifuge* (Hettich), inkubator (Memmert BE600), *laminar air flow* (ESCO ECH-4), sonikator (Krisbow), spektrofotometer UV-VIS (Hitachi U-1800), pH meter (Metrohm 913), suntikan medis, dan alat-alat gelas.

Metode Penelitian

Produksi dan Isolasi Enzim Kitinase Intraseluler

Produksi enzim kitinase dilakukan dengan menggunakan media *Nutrient Broth* yang sudah difortifikasi dengan 1% kitin, 0,03% KH_2PO_4 , 0,07% K_2HPO_4 , 0,01% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, dan 0,7% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Volume media fermentasi yang digunakan adalah 300 mL. Media kemudian diinokulasi dengan kultur kerja *Providencia stuartii* sebanyak 60 mL dan diinkubasi pada suhu 40°C selama 18 jam menggunakan *shaker incubator*. Pemisahan

sel bakteri dilakukan dengan menggunakan *centrifuge* pada kecepatan 3500 rpm selama 15 menit pada suhu 4°C untuk mencegah denaturasi enzim. Supernatan yang diperoleh merupakan enzim ekstraseluler kasar, dan endapan yang didapatkan adalah sel bakteri yang mengandung kitinase intraseluler (Lestari *et al.*, 2017; Kubota *et al.*, 2004).

Sel yang mengendap dipisahkan dari supernatan dengan dekantasi. Endapan yang diperoleh (sel bakteri) kemudian dilarutkan kembali dalam 4 mL larutan *buffer* lisis (per 80 mL kultur bakteri yang digunakan). Sel bakteri kemudian dipecah secara sonikasi pada frekuensi 47KHz selama 10 menit, kemudian disentrifugasi. Supernatan yang didapatkan dari sentrifugasi kemudian diendapkan dengan penambahan ammonium sulfat 70% pada suhu rendah. Suspensi kemudian didiamkan selama 18 jam pada suhu 4°C. Suspensi kemudian dipisahkan dengan sentrifugasi. Endapan kemudian dilarutkan kembali dengan 8 mL *buffer* kalium fosfat 0,05 M pH 8 (per 150mL kultur bakteri yang digunakan). Endapan akhir yang diperoleh merupakan kitinase intraseluler semi murni.

Imobilisasi Kitinase Intraseluler Semi Murni dan Fermentasi Enzimatis untuk Produksi N-asetilglukosamin

Imobilisasi enzim kitinase (*entrapment*) dengan κ -karagenan sebagai *support* dilakukan dengan menggunakan metode yang dilakukan oleh Sankalia *et al.* (2006) yang dimodifikasi. Sebanyak 3,5% κ -karagenan dilarutkan dalam 100 mL akuades pada suhu 70-80°C. Larutan κ -karagenan kemudian didinginkan hingga suhunya menjadi 40°C. Setelah suhunya turun, larutan κ -karagenan ditambahkan dengan enzim dan *support* pada rasio 1:1; 1,5:1; dan 2:1 dengan total volume sebesar 2 mL. Penentuan rasio ini berdasarkan penelitian sebelumnya oleh Zusfahair *et al.* (2017). Campuran kemudian diteteskan pada larutan KCl 2% secara konstan dengan menggunakan suntikan medis. Gel yang terbentuk kemudian digunakan untuk fermentasi enzimatis.

Media fermentasi enzimatis yang digunakan sebanyak 5 mL yang terdiri dari 1% isolat kitin dalam 0,2 M buffer sitrat pH 5. Inkubasi dilakukan selama 6 jam pada suhu 40°C. Setelah inkubasi, dilakukan filtrasi dengan kertas saring untuk memisahkan gel kitinase dari hasil fermentasi enzimatis. Filtrat kemudian dianalisis kadar N-asetilglukosamin dan

aktivitas enzimnya (Rahmansyah dan Sudiana, 2003 dengan modifikasi).

Rasio enzim dan *support* terbaik yang diperoleh kemudian digunakan untuk menentukan pengaruh jumlah siklus fermentasi terhadap aktivitas kitinase dan produksi N-asetilglukosamin. Penentuan pengaruh jumlah siklus dilakukan dengan cara menambahkan gel kitinase sebanyak ± 72 beads ke dalam media fermentasi enzimatik. Inkubasi dilakukan selama 6 jam pada suhu 40°C dan prosedur ini dilakukan sebanyak 3x untuk menentukan aktivitas enzim dari gel kitinase yang digunakan sebanyak 3x. Setiap selesai inkubasi, dilakukan filtrasi dengan kertas saring untuk memisahkan gel kitinase dengan media fermentasi enzimatik. Filtrat kemudian dianalisis kadar N-asetilglukosamin dan aktivitas enzimnya (Rahmansyah dan Sudiana, 2003 dengan modifikasi).

Analisis Kadar N-asetilglukosamin dan Aktivitas Kitinase Intraseluler Semi Murni

Analisis aktivitas enzim ditentukan dengan menggunakan metode Rahmansyah dan Sudiana (2003) yang dimodifikasi. Aktivitas kitinase dihitung berdasarkan konsentrasi N-asetilglukosamin (NAG) yang terbentuk, sehingga dilakukan juga

pembuatan kurva standar N-asetilglukosamin.

Sebanyak 1 mL larutan N-asetilglukosamin standar (konsentrasi 200, 400, 600, 800, dan 1000 ppm) ditambahkan 2 mL reagen DNS modifikasi, dan Na-K-tartarat 4% sebanyak 1 mL. Campuran tersebut dipanaskan selama 15 menit pada suhu 100°C. Setelah pemanasan, campuran didinginkan dan diencerkan 5-10 kali dengan akuades. Absorbansi campuran yang sudah diencerkan kemudian diukur pada panjang gelombang 540 nm.

Aktivitas kitinase maupun kitinase yang diimobilisasi ditentukan dengan cara mencampurkan 1mL cairan hasil fermentasi dengan 2 mL reagen DNS modifikasi, dan 1 mL Na-K-tartrat 4%, lalu diinkubasi selama 15 menit pada suhu 100°C. Campuran kemudian diencerkan sebanyak 5-10 kali dan diukur absorbansinya pada panjang gelombang 540 nm dengan spektrofotometer. Penentuan aktivitas kitinase semi murni dan kitinase semi murni yang diimobilisasi dihitung dengan menggunakan rumus sebagai berikut.

Aktivitas enzim (U/mL) =

$$\frac{\text{konsentrasi NAG } \left(\frac{\text{mg}}{\text{mL}}\right) \times 1000 \times \text{jumlah enzim yang direaksikan (mL)}}{\text{berat molekul NAG (221,2)} \times \text{waktu inkubasi (jam)}}$$

Rancangan Percobaan dan Analisis Data

Rancangan percobaan yang digunakan dalam penelitian ini adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) 1 faktor dengan tiga kali pengulangan. Faktor yang digunakan adalah jumlah siklus fermentasi dengan 3 level, yaitu 1 kali, 2 kali, dan 3 kali. Data yang diperoleh kemudian dianalisis dengan ANOVA dan uji lanjut Duncan dengan menggunakan *software* SPSS versi 22.0.

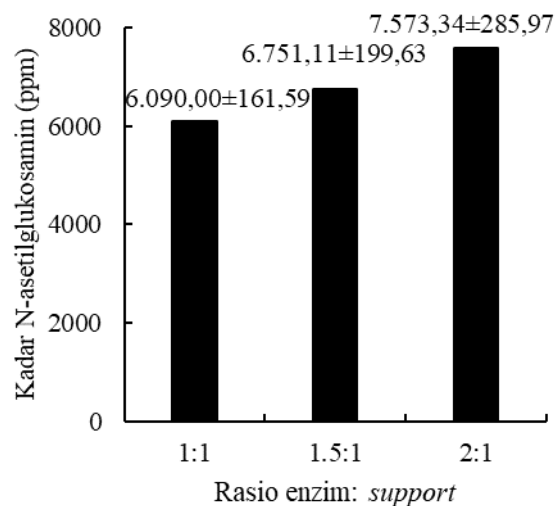
HASIL DAN PEMBAHASAN

Pengaruh Rasio Enzim: *Support* Terhadap Aktivitas Kitinase dan Produksi N-asetilglukosamin

Pengukuran aktivitas kitinase intraseluler semi murni dilakukan untuk membandingkan aktivitas enzim sebelum dan sesudah diimobilisasi. Penentuan aktivitas kitinase dilakukan pada pH 5 dan suhu 40°C, karena merupakan kondisi optimum bagi kitinase dari bakteri (Cheba *et al.*, 2015). Adapun aktivitas kitinase intraseluler semi murni yang diperoleh pada penelitian ini adalah $4,95 \pm 0,20$ U/mL.

Penentuan rasio enzim dan *support* terbaik diperlukan karena *support* yang digunakan untuk imobilisasi memiliki kapasitas tertentu untuk mengikat enzim. Penggunaan formulasi pada penelitian ini

dilakukan dengan menggunakan metode yang dilakukan oleh Zusfahair *et al.* (2017). Kadar N-asetilglukosamin dan aktivitas enzim yang dihasilkan dengan berbagai rasio enzim : *support* dapat dilihat pada Gambar 1 dan Gambar 2.



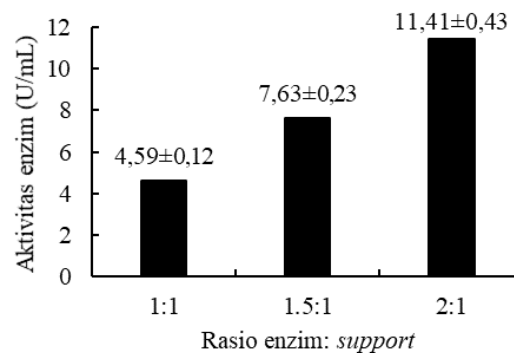
Gambar 1. Pengaruh rasio enzim: *support* terhadap kadar N-asetilglukosamin

Gambar 1 menunjukkan rasio enzim : *support* berpengaruh terhadap kadar N-asetilglukosamin yang diproduksi. Semakin tinggi rasio enzim : *support* yang digunakan maka semakin tinggi juga kadar N-asetilglukosamin yang diproduksi. Hal ini disebabkan oleh semakin banyak enzim kitinase intraseluler kasar yang diimobilisasi oleh κ -karagenan. Menurut Chen *et al.* (2013), semakin tinggi konsentrasi enzim

yang diimobilisasi maka semakin tinggi juga aktivitas enzim yang diperoleh yang berdampak pada meningkatnya produk yang diperoleh dari reaksi enzimatik yang dilakukan selama fermentasi.

Xun *et al.* (2012) melaporkan bahwa jika jumlah enzim yang terikat pada *support* terlalu banyak, yaitu lebih dari rasio 3:1, aktivitas enzim dapat menurun, sehingga produk yang dihasilkan juga menurun. Pada penelitian ini, rasio enzim : *support* terbaik untuk menghasilkan N-asetilglukosamin adalah 2:1, dengan kadar N-asetilglukosamin yang dihasilkan adalah sebesar $7573,34 \pm 285,97$ ppm. Hasil ini lebih tinggi dibandingkan dengan imobilisasi kitinase menggunakan kalsium alginat dengan kadar N-asetilglukosamin yang dihasilkan adalah $1347,78 \pm 27,22$ ppm (Halim *et al.*, 2019).

Gambar 2 menunjukkan rasio enzim: *support* juga berpengaruh terhadap aktivitas kitinase. Rasio enzim : *support* sebesar 2:1 memberikan aktivitas enzim yang tertinggi karena semakin tinggi konsentrasi enzim yang diimobilisasi, maka aktivitas enzim yang diperoleh juga semakin tinggi (Chen *et al.*, 2013).



Gambar 2. Pengaruh rasio enzim: *support* terhadap aktivitas kitinase

Penelitian sebelumnya oleh Rathan dan Thayumanavan (2017) menunjukkan bahwa imobilisasi kitinase dari *Pseudomonas putida* dengan kitosan pada konsentrasi 7% (w/v) memiliki aktivitas enzim sebesar 3,5 U/mL. Hal ini menunjukkan bahwa imobilisasi enzim dengan κ -karagenan pada penelitian ini pada rasio terendah hingga tertinggi memiliki nilai aktivitas enzim yang lebih besar.

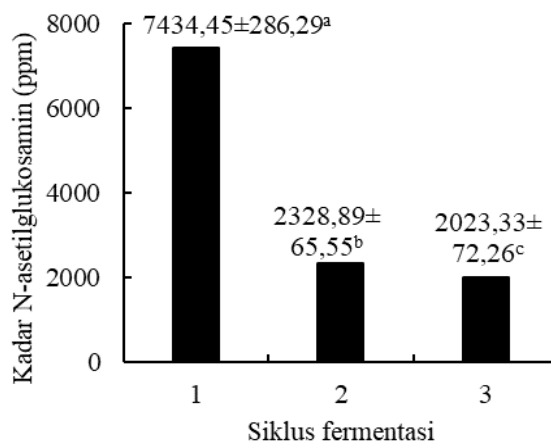
Hasil penelitian juga menunjukkan bahwa proses imobilisasi menghasilkan kitinase dengan aktivitas yang lebih tinggi, yaitu sekitar 3 kali lipat jika dibandingkan dengan kitinase yang tidak diimobilisasi. Hal ini sesuai dengan penelitian oleh Zhang *et al.* (2016) bahwa imobilisasi dapat meningkatkan aktivitas β -galaktosidase hingga 2-3 kali lipat dibandingkan dengan enzim yang tidak diimobilisasi.

Pengaruh Jumlah Siklus Fermentasi Terhadap Aktivitas Kitinase dan Produksi N-asetilglukosamin

Penentuan siklus fermentasi optimum dilakukan dengan mengimobilisasi kitinase dari *Providencia stuartii* pada rasio terbaik, yaitu 2:1. Pada penelitian ini, dilakukan siklus fermentasi sebanyak 3 kali sesuai dengan penelitian sebelumnya oleh Won *et al.* (2005). Hasil uji statistik menggunakan ANOVA menunjukkan bahwa jumlah siklus fermentasi memberikan pengaruh signifikan terhadap kadar N-asetilglukosamin yang dihasilkan dan aktivitas kitinase ($p < 0,05$). Gambar 3 menunjukkan hasil uji lanjut Duncan dari pengaruh siklus fermentasi terhadap kadar N-asetilglukosamin yang dihasilkan.

Hasil uji lanjut Duncan menunjukkan adanya perbedaan signifikan pada hasil dari tiap siklus fermentasi. Siklus fermentasi optimum dari enzim kitinase intraseluler kasar dari *Providencia stuartii* yang diimobilisasi dengan κ -karagenan adalah 1 siklus walaupun kitinase intraseluler ini masih dapat digunakan hingga 3 siklus reaksi, dilihat dari masih adanya N-asetilglukosamin yang diproduksi hingga akhir siklus reaksi. Akan tetapi, penurunan kadar N-asetilglukosamin yang signifikan ini menunjukkan ketidakstabilan

κ -karagenan dalam mengimobilisasi kitinase intraseluler semi murni.



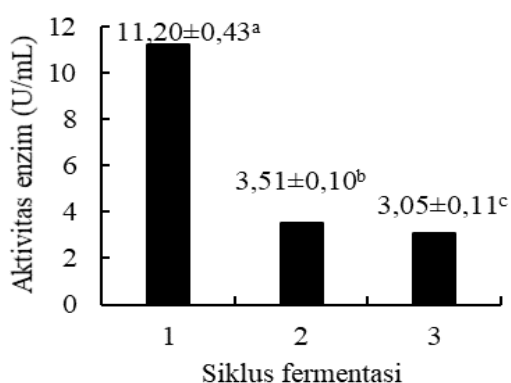
Keterangan: Notasi yang berbeda menunjukkan adanya perbedaan signifikan ($p < 0,05$)

Gambar 3. Pengaruh jumlah siklus penggunaan enzim terhadap kadar N-asetilglukosamin

Penurunan signifikan dari kadar N-asetilglukosamin yang diproduksi dapat disebabkan oleh terjadinya sineresis pada gel κ -karagenan yang menyebabkan keluarnya enzim dan cairan yang terperangkap di dalam matriks *beads* κ -karagenan. κ -karagenan dapat digunakan untuk enkapsulasi enzim, akan tetapi kebocoran enzim dapat terjadi (Zhang *et al.*, 2016).

Jumlah siklus fermentasi optimum yang didapatkan dari penelitian ini juga lebih rendah jika dibandingkan dengan penelitian Elnashar *et al.* (2014) yang menunjukkan bahwa imobilisasi enzim β -galaktosidase ke dalam gel *beads* κ -

karagenan dapat digunakan sebanyak 20 siklus dan dapat mempertahankan 60% aktivitas enzim semula. Akan tetapi, pada penelitian Elnashar *et al.* (2014), metode imobilisasi yang digunakan adalah metode kimiawi dengan aktivasi gel κ -karagenan secara 2 tahap, yaitu menggunakan larutan *polyethyleneimine* dan glutaraldehid.



Keterangan: Notasi yang berbeda menunjukkan adanya perbedaan signifikan ($p < 0,05$)

Gambar 4. Pengaruh jumlah siklus penggunaan enzim terhadap aktivitas kitinase

Gambar 4 menunjukkan hasil uji lanjut Duncan dari pengaruh siklus fermentasi terhadap aktivitas kitinase. Hasil uji Duncan menunjukkan semakin banyak siklus fermentasi yang dilakukan, maka aktivitas kitinase juga semakin menurun. Hal ini dapat disebabkan sineresis gel κ -karagenan, sehingga menyebabkan keluarnya enzim dari sistem gel. Jumlah siklus fermentasi optimum dari kitinase

intraseluler semi murni dari *Providencia stuartii* yang diimobilisasi dengan κ -karagenan adalah 1 siklus, tetapi enzim masih menunjukkan aktivitasnya hingga 3 siklus fermentasi.

Aktivitas enzim antar siklus kemudian dihitung dengan cara mengasumsikan pada siklus 1 aktivitas enzim adalah 100% untuk digunakan sebagai pembandingan (Sharma *et al.*, 2014). Pada siklus fermentasi ke-2, aktivitas enzim kitinase yang diimobilisasi turun menjadi 31% dan pada siklus ke-3 menjadi 27%. Hal ini dapat disebabkan oleh diameter dari *beads* imobilisasi yang $>0,71$ mm. Menurut Sharma *et al.* (2014) jika diameter *beads* yang digunakan untuk imobilisasi adalah sebesar 0,71–1,40 mm akan menyebabkan penurunan aktivitas enzim secara cepat.

Penelitian lain oleh Desai *et al.* (2004) juga menunjukkan bahwa enzim lipase yang diimobilisasi dengan karagenan dapat digunakan hingga 5 siklus fermentasi dengan mempertahankan 50% dari aktivitas enzimnya. Hal ini menunjukkan walaupun kitinase yang diimobilisasi dapat digunakan hingga 3 siklus fermentasi, diperlukan metode imobilisasi lain selain metode *entrapment* apabila *support* yang digunakan adalah κ -karagenan untuk mempertahankan aktivitas enzimnya.

KESIMPULAN

Rasio enzim : *support* terbaik untuk imobilisasi kitinase intraseluler *Providencia stuartii* adalah sebesar rasio 2:1 dengan aktivitas enzim sebesar $11,41 \pm 0,43$ U/mL dan menghasilkan kadar N-asetilglukosamin sebesar $7573,34 \pm 285,97$ ppm. Imobilisasi menghasilkan aktivitas kitinase yang lebih tinggi dibandingkan dengan kitinase yang tidak diimobilisasi, yaitu sebesar $4,95 \pm 0,20$ U/mL. Siklus fermentasi memengaruhi aktivitas kitinase dan kadar N-asetilglukosamin yang dihasilkan. Produksi N-asetilglukosamin tertinggi diperoleh setelah 1 siklus fermentasi, yaitu $7434,45 \pm 286,29$ ppm dengan aktivitas kitinase sebesar $11,20 \pm 0,43$ U/mL. Kitinase intraseluler semi murni dari *Providencia stuartii* dapat digunakan hingga 3 siklus fermentasi dengan mempertahankan 27% dari aktivitas enzim semula.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis ingin mengucapkan terima kasih kepada Laboratorium Mikrobiologi, Laboratorium Penelitian dan Inovasi Pangan, Universitas Pelita Harapan yang memfasilitasi penelitian ini. Penulis juga ingin mengucapkan terima kasih kepada Lembaga Penelitian dan Pengabdian Masyarakat (LPPM), Universitas Pelita

Harapan yang telah mendanai penelitian ini berdasarkan skema penelitian No. P-008-FaST/VI/2018.

DAFTAR PUSTAKA

- Cheba, B. A., Zaghloul, T. I., El-Mahdy, A. R. and El-Massry, M. H. 2015. Effect of pH and temperature on *Bacillus* sp. R2 chitinase activity and stability. *Procedia Technology* 22 : 471-477.
- Chen, J. K., Shen, C. R. and Liu, C. L. 2010. N-acetylglucosamine: production and applications. *Marine Drugs* 8 (9) : 2493-2516. DOI: 10.3390/md8092493.
- Datta, S., Christena, L. R. and Rajaram, Y. R. S. 2013. Enzyme immobilization: an overview on techniques and support materials. *Biotech* 3 (1) : 1-9. DOI: 10.1007/s13205-012-0071-7.
- Desai, P. D., Dave, A. M. and Devi. S. 2004. Entrapment of lipase into K-carrageenan beads and its use in hydrolysis of olive oil in biphasic system. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 31 (4-6) : 143-150.
- Direktorat Jenderal Perikanan Budidaya (DJPB). 2016. Udang vaname dan udang windu masih andalan ekspor Indonesia. Pakan. Downloaded from http://www.djpb.kkp.go.id/arsip/c/246/Udang-Vanamei-dan-Udang-Windu-Masih-AndalanEkspor-Indonesia/?category_id=13 on 14/7/2018.
- Dompeipen, E. J., Kaimudin, M. dan Dewa, R. P. 2016. Isolasi kitin dan kitosan dari limbah kulit udang. *Majalah Biam* 12 (1) : 32-29. DOI: 10.29360/mb.v12i1.2326

- Ehiowemwenguan, G., Emoghene, A. O. and Inetianbor, J.E. 2014. Antibacterial and phytochemical analysis of banana fruit peel. *IOSR Journal of Pharmacy* 4 (8) : 18-25. DOI: 10.9790/3013-0408018025.
- Elnashar, M. M., Awad, G. E., Hassan, M. E., Eldin, M. S. M., Haroun, B. M. and El-Diwany, A. I. 2014. Optimal immobilization of β -galactosidase onto κ -carrageenan gel beads using response surface methodology and its applications. *The Scientific World Journal* : 1-7. DOI: 10.1155/2014/571682
- Girigowda, K., Kapnoor, S. S., Kulkarni, D. and Mulimani, V. H. 2007. Degradation of raffinose oligosaccharides in soymilk by immobilized α -galactosidase of *Aspergillus oryzae*. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 17 (9) : 1430-1436.
- Halim, Y., Hendarlim, B. D., Hardoko, Handayani, R. and Rosa, D. 2019. Imobilisasi kitinase *Providencia stuartii* dengan kalsium alginat dan aplikasinya dalam produksi N-asetilglukosamin. *FaST-Jurnal Sains dan Teknologi* 3 (2) : 35-44.
- Hauselman, H. J. 2001. Nutripharmaceuticals for osteoarthritis. *Best Practice & Research Clinical Rheumatology* 15 (4) : 595-607.
- Jegannathan, K. R., Jun-Ye, L., Chan, E. S. and Ravindra, P. 2010. Production of biodiesel from palm oil using liquid core lipase encapsulated in κ -carrageenan. *Fuel* 89 : 2272-2277. DOI: 10.1016/j.fuel.2010.03.016
- Kubota, T., Miyamoto, K., Yasuda, M., Inamori, Y. and Tsujibo, H. 2004. Molecular characterization of an intracellular β -N-acetylglucosaminidase involved in the chitin degradation system of *Streptomyces thermoviolaceus* OPC-520. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 68 (6) : 1306-1314. DOI: 10.1271/bbb.68.1306.
- Lestari, P., Prihatiningsih, N. and Djatmiko, H. A. 2017. Partial biochemical characterization of crude extract extracellular chitinase enzyme from *Bacillus subtilis* B298. *Proceeding 11th Joint Conference on Chemistry in Conjunction with the 4th Regional Biomaterials Scientific Meeting*, p. 1-9. Purwokerto, Indonesia: FMIPA, Universitas Jenderal Soedirman.
- Pan, S., Wu, S. J. and Kim, J. M. 2011. Preparation of glucosamine by hydrolysis of chitosan with commercial α -amylase and glucoamylase. *Journal of Zhejiang University* 12 (11) : 931-934. DOI: 10.1631/jzus.B1100065
- Rahmansyah, M. dan Sudiana, I.M. 2003. Optimasi analisis amilase dan glukonase yang diekstrak dari miselium *Pleurotus ostreatus* dengan asam 3,5 dinitrosalisilat. *Berkalah Penelitian Hayati* 9 : 7-12. DOI: 10.23869/bphjbr.9.1.20032.
- Rathan, S. and Thayumanavan, T. 2017. Immobilization of chitinase from *Pseudomonas putida* on biocompatible chitosan beads and the properties of the immobilized enzyme. *Journal of Global Biosciences* 6 (5) : 5032-5045.
- Sankalia, M. G., Mashru, R. C., Sankalia, J. M. and Sutariya, V. B. 2006. Stability improvement of alpha-amylase entrapped in kappa-carrageenan beads: physicochemical characterization and optimization using composite index. *International Journal of Pharmaceutics* 312 (1-2) : 1-14. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2005.11.048

- Sharma, M., Sharma, V. and Majumdar, D.K. 2014. Entrapment of α -amylase in agar beads for biocatalysis of macromolecular substrate. *Hindawi: International Scholarly Research Notices* 2014 : 1-8. DOI: 10.1155/2014/936129
- Singh, B. D. 2009. *Biotechnology Expanding Horizons*. India: Kalyani Publishers.
- Tümtürk, H., Karaca, N., Demirel, G. and Sahin, F. 2007. Preparation and application of poly (N, N-dimethylacrylamide-co-acrylamide) and poly (N-isopropylacrylamide-co-acrylamide)/ κ -Carrageenan hydrogels for immobilization of lipase. *International Journal of Biological Macromolecules* 40 (3) : 281–285. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2006.07.004
- Won, K., Kim, S., Kim, K. J., Park, H. W. and Moon, S. J. 2005. Optimization of lipase entrapment in Ca-alginate gel beads. *Process Biochemistry* 40 (6) : 2149-2154. DOI: 10.1016/j.procbio.2004.08.014.
- Xun, E., Lu, X., Kang, W., Wang, J., Zhang, H., Wang, L. and Wang, Z. 2012. Immobilization of *Pseudomonas fluorescens* lipase onto magnetic nanoparticles for resolution of 2-octanol. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 168 : 697-707. DOI: 10.1007/s12010-012-9810-9.
- Zhang, Z., Zhang, R., Chen, L. and McClements, D. J. 2016. Encapsulation of lactase (β -galactosidase) into κ -carrageenan-based hydrogel beads: Impact of environmental conditions on enzyme activity. *Food Chemistry* 200 (6) : 69-75. DOI: 10.1016/j.foodchem.2016.01.014.
- Zusfahair, Ningsih, D. R., Fatoni, Kartika, D., Fatoni, A. and Zuliana, A. L. 2017. *Bacillus thuringiensis* HCB6 amylase immobilization by chitosan beads. Proceeding 11th Joint Conference on Chemistry in Conjunction with the 4th Regional Biomaterials Scientific Meeting, p. 1-9. Purwokerto, Indonesia: FMIPA, Universitas Jenderal Soedirman.