

PRODUKSI N-ASETILGLUKOSAMIN DARI KITIN KULIT UDANG DENGAN FERMENTASI MENGGUNAKAN *Salmonella enterica* STRAIN LT2

[*PRODUCTION OF N-ACETYLGLUCOSAMINE FROM SHRIMP SHELLS' CHITIN BY FERMENTATION USING Salmonella enterica STRAIN LT2*]

Yuniwaty Halim^{1*}, Lucia C. Soedirga², Valentina Michelle³

^{1,2,3}Program Studi Teknologi Pangan, Universitas Pelita Harapan, Tangerang, Indonesia

*Korespondensi penulis: yuniwaty.halim@uph.edu

ABSTRACT

Chitin is found abundantly in shrimp shells and can be converted into N-acetylglucosamine, which has a wide range of uses in the biomedical and industrial fields. Chitin can be produced using chitinase produced by bacteria through the fermentation process. Salmonella enterica strain LT2 was one of the chitinolytic bacteria that was isolated from shrimp shells. This research aimed to determine the best pH (5, 6, 7, 8, and 9) and temperature (32°C, 37°C, and 42°C) of fermentation, as well as fermentation time (2, 3, 4, 5, and 6 days) for the production of N-acetylglucosamine using the S. enterica strain LT2. Results showed that the highest production of N-acetylglucosamine occurred at the temperature of 37°C, pH of 8, and 4 days of fermentation, which produced 69.62 ± 1.00 g/L of N-acetylglucosamine. Furthermore, the highest N-acetylglucosamine production for the fermentation time occurred on the third day which produced 73.19 ± 1.63 g/L of N-acetylglucosamine.

Keywords: *chitin; fermentation; microorganism; P. monodon; S. enterica*

ABSTRAK

Kitin banyak ditemukan pada cangkang udang dan dapat dipecah menjadi N-asetilglukosamin, yang banyak digunakan dalam dunia biomedik maupun industri lainnya. Kitin dapat diproduksi menggunakan kitinase yang dihasilkan oleh bakteri melalui proses fermentasi. *Salmonella enterica* strain LT2 merupakan salah satu bakteri kitinolitik yang diisolasi dari cangkang udang. Penelitian ini bertujuan untuk menentukan pH (5, 6, 7, 8, dan 9) dan suhu fermentasi (32°C, 37°C, dan 42°C) terbaik, serta lama fermentasi terbaik (2, 3, 4, 5, dan 6 hari) untuk produksi N-asetilglukosamin menggunakan *S. enterica* LT12. Hasil penelitian menunjukkan bahwa produksi N-asetilglukosamin diperoleh pada suhu fermentasi 37°C, pH 8, dan waktu fermentasi 4 hari, yang menghasilkan N-asetilglukosamin sebesar $69,62 \pm 1,00$ g/L. Selain itu, produksi N-asetilglukosamin tertinggi terjadi setelah fermentasi pada hari ketiga, yaitu sebesar $73,19 \pm 1,63$ g/L.

Kata kunci: *fermentasi; kitin; mikroorganisme; P. monodon; S. Enterica*

PENDAHULUAN

Kitin merupakan polisakarida alami yang dapat ditemukan pada eksoskeleton hewan *Crustacea*, kutikula pada serangga, dan dinding sel fungi. Kitin merupakan

biopolimer yang paling banyak ditemui setelah selulosa, sehingga banyak aplikasi pada bidang biomedik, bioteknologi, dan industri yang menggunakan kitin. Sumber utama kitin dari sektor industri adalah

limbah cangkang dari udang. Bagian kulit dan kepala udang mengandung kitin sebanyak 15-20%, protein sebesar 25-40%, dan mineral sebesar 45-50%. (Lopez-Cervantes, 2007). Apabila limbah tidak dimanfaatkan dengan baik, industri *seafood* akan kehilangan kesempatan untuk menghasilkan produk dengan bernilai ekonomi tinggi dari kitin, protein, maupun kalsium (Suresh, 2012).

Glukosamin ditemukan pada kitin. Glukosamin dan turunannya yaitu N-asetilglukosamin, dapat disintesis dari organisme seperti bakteri, kapang, khamir, tanaman, maupun hewan. Glukosamin dapat dihasilkan dengan metode kimiawi, enzimatik, maupun mikrobiologis (Chmielowski *et al.*, 2007).

Beberapa kekurangan penggunaan metode kimiawi dalam menghasilkan glukosamin antara lain terjadinya modifikasi pada cincin glukosa, rendemen yang rendah, dan limbah asam yang mencemari lingkungan (Wang *et al.*, 2008). Hidrolisis secara enzimatik memiliki beberapa keunggulan di antaranya kondisi reaksi yang tidak ekstrim dan rendemen yang tinggi, tetapi kekurangannya adalah biaya yang mahal dan ketidakstabilan enzim yang digunakan. Produksi glukosamin menggunakan mikroorganisme lebih menguntungkan karena mengurangi pencemaran

lingkungan, biaya yang relatif lebih murah, dan banyaknya jenis mikroorganisme yang dapat digunakan. Adapun kekurangannya adalah proses fermentasi yang panjang (Chen, 2012).

Beberapa bakteri yang diketahui dapat menghasilkan glukosamin antara lain, *Chitinolyticbacter meiyuanensis* (Zhang *et al.*, 2020), *Bacillus cereus* dan *Bacillus* sp. dengan indeks kitinolitik masing-masing sebesar 0,75 dan 0,94 (Mubarik *et al.*, 2010), *Serratia marcescens* dengan indeks kitinolitik sebesar 2.203 ± 0.59 (Halim^a *et al.*, 2018),

Penelitian sebelumnya oleh Hardoko *et al.* (2020) berhasil mengisolasi beberapa bakteri kitinolitik, salah satunya adalah *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (*S. enterica*) strain LT2. Deng *et al.* (2003) juga menyatakan bahwa *S. enterica* merupakan bakteri yang memiliki gen untuk menghasilkan enzim kitinase yang dapat digunakan untuk produksi N-asetilglukosamin dari kitin yang ditemukan pada kulit udang. Akan tetapi, kondisi fermentasi terbaik dan indeks kitinolitik dari *S. enterica* strain LT2 belum diketahui.

Pada penelitian ini, *S. enterica* strain LT2 digunakan untuk menghasilkan N-asetilglukosamin dari kulit udang dengan menggunakan metode fermentasi. Tujuan penelitian ini adalah untuk

menentukan indeks kitinolitik dari bakteri *S. enterica* strain LT2 dan menentukan kondisi fermentasi terbaik, yaitu suhu dan pH, serta lama fermentasi untuk menghasilkan N-asetilglukosamin menggunakan *S. enterica* strain LT2.

BAHAN DAN METODE

Bahan dan Alat

Bahan-bahan utama yang digunakan dalam penelitian ini adalah cangkang udang *Penaeus monodon* yang diperoleh dari PT Lola Mina dan PT Wirantoro Baru yang terdapat di Muara Baru, Jakarta Utara, dan isolat kultur *S. enterica* strain LT2 yang diperoleh dari penelitian sebelumnya oleh Hardoko *et al.* (2020). Bahan-bahan yang digunakan dalam analisis meliputi HCl 1 M “Merck”, etanol “Merck”, NaOH “Merck”, air destilasi “Amidis”, larutan *buffer* fosfat (pH 7), *Nutrient Agar* “Merck”, *Nutrient Broth* “Merck”, asam tartarat 10%, K₂HPO₄ “Merck”, KH₂PO₄ “Merck”, MgSO₄.7H₂O “Merck”, larutan ninhydrin 0,8%, larutan *buffer* (pH 5, 6, 7, 8, dan 9), dan standar N-asetilglukosamin “Sigma Aldrich”.

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi *miller* “Fomac”, neraca analitik “Mettler Toledo”, spektrofotometer UV-Vis “Hitachi”, incubator “Memmert”, *laminar air flow*

“ESCO ECH-4”, oven “Memmert”, mikroskop “Olympus”, *waterbath* “Memmert”, dan alat-alat gelas “Iwaki”.

Persiapan Isolat Kitin

Isolat kitin dibuat berdasarkan metode Mojarrad *et al.* (2007) dengan modifikasi. Cangkang udang *Penaeus monodon* dibersihkan dan dikeringkan di bawah sinar matahari selama 2 hari, kemudian dikeringkan dengan pengering kabinet pada suhu 50°C selama 24 jam. Cangkang udang yang telah kering kemudian dihancurkan dengan *miller* dan diayak dengan ayakan berukuran 60 *mesh*. Bubuk cangkang udang kemudian dianalisis untuk kadar air, kadar abu, dan kadar proteinnya. Untuk membuat isolat kitin, dilakukan proses demineralisasi dan deproteinasi terhadap bubuk cangkang udang.

Proses demineralisasi dilakukan dengan mencampurkan 100 gram bubuk cangkang udang dengan HCl 1 M pada rasio 1:10 (b/v) dan dipanaskan pada suhu 75°C selama 2 jam. Campuran kemudian dibilas dengan air destilasi hingga pH mencapai 6. Bubuk cangkang udang kemudian dikeringkan dengan pengering kabinet pada suhu 50°C selama 24 jam.

Setelah itu, bubuk cangkang udang akan melalui proses deproteinasi dengan cara mencampurkan bubuk cangkang

udang dengan NaOH 1 M pada rasio 1:10 (b/v) dan dipanaskan pada suhu 75°C selama 2 jam. Campuran disaring, dinetralkan hingga pH mencapai 7, dan dikeringkan dengan pengering kabinet pada suhu 50°C selama 24 jam. Hasil yang diperoleh merupakan isolat kitin, yang kemudian dianalisis untuk rendemen, kadar air, kadar abu, derajat asetilasi, dan kadar proteinnya.

Pembuatan Kitin Koloidal

Kitin koloidal dibuat berdasarkan metode Suresh *et al.* (2011). Sebanyak 10 gram isolat kitin dicampurkan dengan HCl 37% (rasio 1:14) dan diaduk selama 2 jam. Setelah itu, campuran ditambahkan dengan 500 ml etanol dan disaring. Campuran kemudian dinetralkan dengan NaOH 5 M hingga pH mencapai 7. Campuran disaring, kemudian endapan yang diperoleh dipisahkan dan disentrifugasi pada kecepatan 8000 rpm selama 10 menit. Endapan akhir yang diperoleh merupakan kitin koloidal.

Uji Kitinolitik

Uji kitinolitik dilakukan berdasarkan metode oleh Agrawal *et al.* (2012) dengan modifikasi. Media selektif disiapkan dengan mencampurkan bahan-bahan sesuai dengan komposisi pada Tabel 1. Media kemudian dipanaskan hingga mendidih dan didinginkan. Setelah didinginkan, asam tartarat 10%

ditambahkan hingga pH mencapai 4,7. Selain itu, media juga ditambahkan dengan indikator BCP (*Brom Cresol Purple*) karena aktivitas kitinolitik yang memecah kitin menjadi N-asetilglukosamin juga disertai dengan perubahan pH media dari asam menjadi basa, yang dapat dilihat dari perubahan warna media dari kuning menjadi ungu. Media tersebut kemudian disterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit.

Tabel 1. Komposisi media selektif

Bahan	Jumlah (g/L)
<i>Nutrient Agar</i>	20,0
KH ₂ PO ₄	0,3
K ₂ HPO ₄	0,7
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,5
Kitin koloidal	5,0

Sumber: Widhyastuti (2007)

Uji kitinolitik dilakukan dengan cara menuangkan media selektif yang telah disiapkan pada cawan Petri dan dibiarkan memadat. Setelah itu, pada media dibuat lubang dengan diameter 5 mm dan suspensi bakteri sebanyak 60 µL dimasukkan ke dalam lubang tersebut. Media kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24, 48, dan 72 jam. Indeks kitinolitik dihitung dengan mengukur diameter berwarna ungu yang terbentuk pada media, sesuai dengan rumus berikut:

$$\text{Indeks kitinolitik} = \frac{\text{diameter zona ungu (mm)} - \text{diameter koloni (mm)}}{\text{diameter koloni (mm)}}$$

Penentuan Suhu dan pH Fermentasi Terbaik

Suhu dan pH fermentasi terbaik ditentukan dengan cara melakukan fermentasi pada berbagai suhu (32°C, 37°C dan 42°C) dan pH media (5, 6, 7, 8, dan 9), sesuai dengan metode oleh Ulfa (2016). Komposisi media yang digunakan dalam fermentasi dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Komposisi media fermentasi

Bahan	Jumlah (b/v)
Kitin	2%
K ₂ HPO ₄ .3H ₂ O	0,1%
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,05%
NaNO ₃	0,1%
Glukosa	2%
Air destilasi	Hingga 50 mL

Sumber: Saskiawan and Handayani (2011)

pH media fermentasi disesuaikan dengan menggunakan HCl 1 M atau NaOH 1 M dan larutan *buffer*. Untuk pH media 5 dan 6, larutan *buffer* yang digunakan adalah natrium sitrat, sedangkan untuk pH media 7-9, larutan *buffer* yang digunakan adalah natrium fosfat.

Pada saat proses fermentasi, sebanyak 1 mL kultur *S. enterica* diinokulasikan ke dalam 50 mL media fermentasi yang memiliki pH berbeda-beda. Media kemudian diinkubasikan pada berbagai suhu sesuai perlakuan selama 4 hari. Setelah 4 hari, maka proses fermentasi dihentikan dengan cara memanaskan sampel di dalam *waterbath* pada suhu 75°C selama 45 menit. Hal ini

dilakukan karena *S. enterica* dapat diinaktivasi pada suhu minimal 70°C selama 45 menit (Shachar dan Yaron, 2006). Konsentrasi N-asetilglukosamin yang dihasilkan diukur menggunakan metode spektrofotometri.

Penentuan Lama Fermentasi Terbaik

Suhu dan pH fermentasi terbaik yang diperoleh dari penelitian tahap sebelumnya digunakan untuk menentukan lama fermentasi terbaik. Media yang diinokulasikan dengan kultur *S. enterica* diinkubasikan selama 2, 3, 4, 5, dan 6 hari (Ulfa, 2016). Setelah itu, maka proses fermentasi dihentikan dan konsentrasi N-asetilglukosamin yang dihasilkan diukur menggunakan metode spektrofotometri.

Penentuan Konsentrasi N-asetilglukosamin

Penentuan konsentrasi N-asetilglukosamin dilakukan sesuai metode Ulfa (2016). Sebelumnya, kurva standar N-asetilglukosamin dibuat dengan menggunakan standar N-asetilglukosamin pada berbagai konsentrasi, yaitu 2000, 4000, 6000, 8000, dan 10000 mg/L. Sebanyak 4 ml larutan standar N-asetilglukosamin direaksikan dengan 0,5 mL larutan ninhydrin 0,8% dan 0,5 ml larutan *buffer* pH 7. Campuran kemudian dipanaskan pada suhu 95°C selama 15 menit dan diukur absorbansinya dengan

spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 324 nm.

Konsentrasi N-asetilglukosamin hasil fermentasi diukur setelah fermentasi dihentikan dengan cara memanaskan media fermentasi pada suhu 75°C selama 45 menit. Campuran kemudian disaring dan filtrat yang dihasilkan disentrifugasi pada kecepatan 5000 rpm selama 15 menit. Supernatan yang diperoleh diencerkan 10x. Sebanyak 4 mL sampel yang telah diencerkan direaksikan dengan 0,5 mL larutan ninhidrin 0,8% dan 0,5 ml larutan *buffer* pH 7. Campuran kemudian dipanaskan pada suhu 95°C selama 15 menit. Setelah warna ungu terbentuk, sampel didiamkan hingga mencapai suhu ruang, kemudian diukur absorbansinya dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 324 nm.

Analisis

Analisis yang dilakukan terhadap bubuk kulit udang dan isolat kitin meliputi kadar air (AOAC, 2005), kadar abu (AOAC, 2005), dan kadar protein dengan metode Bradford (Krueger, 2009). Pada isolat kitin, juga dilakukan uji rendemen (Dompeipen *et al.*, 2016) dan derajat asetilasi menggunakan spektroskopi FTIR (*Fourier-transform Infrared Spectroscopy*) (Benhabiles *et al.*, 2012).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Karakteristik Bubuk Cangkang Udang

Karakteristik dari bubuk cangkang udang yang diperoleh dari hasil pengeringan cangkang udang *P. monodon* dapat dilihat pada Tabel 3. Kadar air bubuk cangkang udang yang dihasilkan pada penelitian ini relatif sama dengan penelitian sebelumnya oleh Rochima (2007) yang memperoleh kadar air sebesar 5,48%.

Kadar abu yang diperoleh sesuai dengan teori oleh Sillanpaa *et al.* (2017) yang menyebutkan bahwa kadar abu bubuk cangkang udang adalah sebesar 30-50%. Penelitian sebelumnya oleh Rochima (2007) dan Suresh (2012) juga melaporkan hasil yang relatif setara, yaitu masing-masing sebesar 42,61% dan 40,5%.

Tabel 3. Karakteristik bubuk cangkang udang *P. monodon*

Parameter	Jumlah (% basis kering)
Kadar air	5,95 ± 0,51
Kadar abu	39,59±0,72
Kadar protein	11,72 ± 0,76

Kadar protein bubuk cangkang udang pada penelitian ini lebih rendah dibandingkan dengan penelitian sebelumnya oleh Hardoko *et al.* (2017), yaitu sebesar 29,17%. Perbedaan ini dapat disebabkan oleh perbedaan metode yang digunakan untuk mengukur kadar protein. Metode Bradford yang digunakan pada penelitian ini lebih akurat dibandingkan dengan metode Kjeldahl karena metode

Kjeldahl mengukur total nitrogen pada sampel, sehingga komponen non-protein yang mengandung nitrogen juga akan ikut terukur (Maehre *et al.*, 2018).

Karakteristik Isolat Kitin

Isolat kitin yang digunakan sebagai substrat pada penelitian ini dianalisis untuk kadar air, kadar abu, kadar protein, rendemen, dan derajat asetilasinya. Adapun hasil analisis tersebut dapat dilihat pada Tabel 4.

Tabel 4. Karakteristik isolat kitin

Parameter	Jumlah (%)
Kadar air (basis kering)	6,90 ± 0,48
Kadar abu (basis kering)	0,18 ± 0,13
Kadar protein (basis kering)	0,07 ± 0,02
Derajat asetilasi	73,42
Rendemen (basis kering)	40,42 ± 1,01

Kadar air isolat kitin pada penelitian ini sesuai dengan penelitian sebelumnya oleh Hardoko *et al.* (2017) yang menghasilkan kadar air kitin sebesar $6,69 \pm 0,21\%$. Kadar air standar untuk kitin komersial adalah 10% (Purwatiningsih *et al.*, 2009), sehingga isolat kitin yang diperoleh pada penelitian ini telah memenuhi standar.

Kadar abu dan kadar protein dari bubuk cangkang udang pada penelitian ini lebih rendah dibandingkan penelitian-penelitian sebelumnya. Liu *et al.* (2013) menyatakan bahwa kadar abu bubuk cangkang udang adalah sekitar 1,59% dan Poeloengasih *et al.* (2008) menyatakan bahwa kadar protein bubuk cangkang

udang adalah sekitar 2,72%. Hasil yang lebih rendah pada penelitian ini dapat disebabkan lama proses demineralisasi dan deproteinasi yang lebih panjang, yaitu masing-masing dua jam dibandingkan dengan penelitian sebelumnya, yaitu masing-masing 30 menit.

Kadar abu dan protein yang lebih rendah menunjukkan proses demineralisasi dan deproteinasi yang lebih efektif. Selain itu, isolat kitin yang dihasilkan juga memenuhi standar kitin komersial, yaitu kadar abu dan kadar protein lebih kecil dari 1% (Struszczyk, 2002).

Berdasarkan derajat asetilasinya, isolat yang diperoleh pada penelitian ini dapat digolongkan sebagai kitin karena memiliki nilai di atas 50%, sedangkan kitosan memiliki derajat asetilasi di bawah 50% (Liu *et al.*, 2006). Rendemen isolat kitin yang diperoleh pada penelitian ini sedikit lebih tinggi dibandingkan dengan penelitian sebelumnya oleh Agustina (2015), yang menghasilkan rendemen kitin sebesar 35,78%. Hasil penelitian ini juga didukung oleh penelitian sebelumnya yang menyatakan bahwa cangkang udang pada umumnya mengandung 20-50% kitin (Dompeipen, 2017).

Indeks Kitinolitik *S. enterica*

Uji kitinolitik dilakukan untuk menentukan indeks kitinolitik dari *S.*

Enterica. Adapun hasilnya dapat dilihat pada Tabel 5.

Table 5. Indeks kitinolitik *S. enterica*

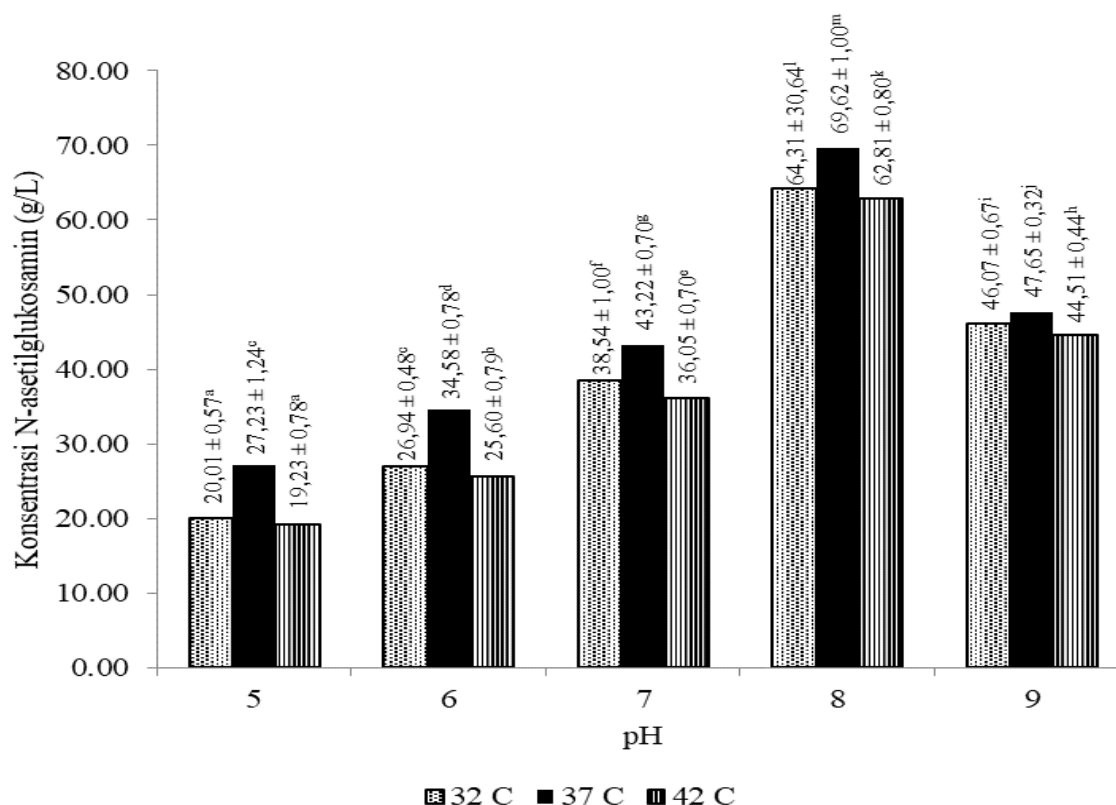
Lama inkubasi (jam)	Indeks Kitinolitik
24	1,52 ± 0,15
48	1,89 ± 0,16
72	1,36 ± 0,02

Tabel 5 menunjukkan bahwa indeks kitinolitik terbesar diperoleh pada inkubasi selama 48 jam pada 27°C, yaitu sebesar 1,89 ± 0,16. Menurut Setia dan Suharjono (2015), indeks kitinolitik tergolong tinggi apabila nilainya di atas 2, dan rendah apabila nilainya kurang dari 2.

Oleh karena itu, dapat disimpulkan bahwa indeks kitinolitik dari *S. enterica* tergolong rendah.

Pengaruh Suhu dan pH Fermentasi terhadap Produksi N-asetilglukosamin

Larsen *et al.* (2011) menyatakan bahwa *S. enterica* tumbuh optimal pada suhu 37°C dan pH antara 6,5-7,5. Oleh karena itu, pada penelitian ini, rentang suhu yang digunakan adalah 32°C, 37°C, dan 42°C, dengan pH media fermentasi adalah 5, 6, 7, 8, dan 9. Seluruh fermentasi berlangsung selama 4 hari.



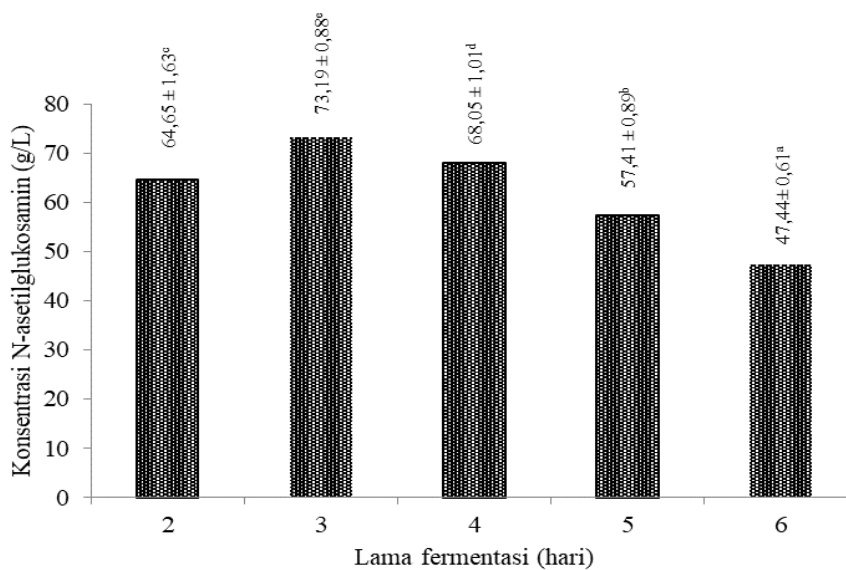
Gambar 1. Pengaruh suhu dan pH fermentasi terhadap konsentrasi N-asetilglukosamin
Keterangan: notasi yang berbeda menunjukkan perbedaan signifikan ($p < 0,05$)

Hasil analisis statistik menggunakan *Univariate* menunjukkan bahwa terdapat interaksi antara suhu dan pH fermentasi berpengaruh signifikan terhadap konsentrasi N-asetilglukosamin yang dihasilkan ($p < 0,05$). Adapun hasil uji lanjut dengan Duncan dapat dilihat pada Gambar 1.

Gambar 1 menunjukkan bahwa produksi N-asetilglukosamin tertinggi oleh *S. enterica* adalah pada saat fermentasi dilakukan di suhu 37°C dengan pH media 8, yaitu sebesar $69,62 \pm 1,00$ g/L. Hasil ini lebih tinggi jika dibandingkan dengan kapang *Trichoderma virens* yang menghasilkan N-asetilglukosamin tertinggi pada konsentrasi $23.413,33 \pm 201,039$ mg/L atau $23,41 \pm 20,10$ g/L (Halim *et al.*, 2018), bakteri *S. marcescens* dengan konsentrasi N-asetilglukosamin tertinggi

yang dihasilkan adalah $41.166,11 \pm 4.480,59$ mg/L atau $41,17 \pm 4,48$ g/L (Halim *et al.*, 2018), maupun bakteri *B. subtilis* dengan konsentrasi N-asetilglukosamin tertinggi yang dihasilkan adalah 10.923 mg/L atau 10,92 g/L (Cheng dan Yin, 2007).

Jika dibandingkan dengan penelitian sebelumnya oleh Liu *et al.* (2013), N-asetilglukosamin yang dihasilkan oleh *S. enterica* pada penelitian ini lebih rendah. Liu *et al.* (2013) menyatakan bahwa *E. coli* yang direkayasa secara genetik mampu menghasilkan N-asetilglukosamin hingga konsentrasi 100.000 mg/L.



Gambar 2. Pengaruh lama fermentasi terhadap konsentrasi N-asetilglukosamin
Keterangan: notasi yang berbeda menunjukkan perbedaan signifikan ($p < 0,05$)

Pengaruh Lama Fermentasi terhadap Produksi N-asetilglukosamin

Suhu dan pH fermentasi terbaik dari penelitian sebelumnya digunakan untuk menentukan lama fermentasi optimum bagi *S. enterica*. Adapun lama fermentasi yang digunakan adalah 2, 3, 4, 5, dan 6 hari. Hal ini dikarenakan indeks kitinolitik tertinggi diperoleh setelah 48 jam (2 hari), tetapi lama fermentasi yang dilakukan pada tahap sebelumnya adalah 4 hari.

Hasil analisis statistik menggunakan *One-Way ANOVA* menunjukkan bahwa terdapat pengaruh lama fermentasi terhadap konsentrasi N-asetilglukosamin yang dihasilkan ($p < 0,05$). Adapun hasil uji lanjut dengan Duncan dapat dilihat pada Gambar 2.

Gambar 2 menunjukkan bahwa produksi N-asetilglukosamin tertinggi oleh *S. enterica* diperoleh setelah lama fermentasi 3 hari, yaitu sebesar $73,19 \pm 1,63$ g/L. Hasil yang diperoleh ini lebih tinggi jika dibandingkan dengan penelitian sebelumnya oleh Liu *et al.* (2013) yang menyatakan bahwa *B. subtilis* yang dimodifikasi secara genetic mampu menghasilkan 2.450 mg/L atau 2,35 g/L N-asetilglukosamin dalam waktu 20 jam. Hal ini dapat dikarenakan lama fermentasi yang lebih panjang dalam penelitian ini. *S. enterica* pada penelitian ini juga

menghasilkan N-asetilglukosamin dengan konsentrasi yang lebih tinggi dibandingkan *S. marcescens* yang memerlukan waktu fermentasi selama 6 hari untuk menghasilkan N-asetilglukosamin optimum (Halim^a *et al.*, 2018).

Hasil penelitian ini juga didukung oleh Wirawan dan Herdyastuti (2013) yang menyatakan bahwa kitinase membutuhkan waktu 12 jam untuk mulai mendegradasi kitin menjadi N-asetilglukosamin, dengan aktivitas tertinggi setelah 36 jam dan aktivitasnya akan berlanjut hingga 60-72 jam setelah fermentasi dimulai. Hal ini sesuai dengan penelitian ini, yaitu setelah 3 hari, produksi N-asetilglukosamin mulai menurun secara signifikan.

KESIMPULAN

Indeks kitinolitik dari bakteri *S. enterica* strain LT2 adalah $1,89 \pm 0,16$ dan dapat dikategorikan memiliki daya kitinolitik yang rendah. Kondisi fermentasi terbaik bagi *S. enterica* strain LT2 untuk menghasilkan N-asetilglukosamin adalah pada suhu 37°C dengan pH media 8 dan lama fermentasi 3 hari, dengan konsentrasi N-asetilglukosamin yang dihasilkan adalah $73,19 \pm 1,63$ g/L.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada LPPM UPH yang telah mendanai

penelitian ini berdasarkan skema penelitian internal no. P-023-FaST/I/2019. Penulis juga mengucapkan terima kasih kepada Laboratorium Mikrobiologi dan Laboratorium Pengawasan Mutu Pangan UPH yang telah menyediakan fasilitas yang dibutuhkan untuk penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Agrawal, T., & Kotasthane, A. S. (2012). Chitinolytic assay of indigenous *Trichoderma* isolates collected from different geographical locations of Chhattisgarh in Central India. *Springerplus*, 1(1), 65-73. <https://doi.org/10.1186/2193-1801-1-73>
- Agustina, S., Swantara, I. M. D., & Suarta, I. N. (2015). Isolasi kitin, karakterisasi, dan sintesis kitosan dari kulit udang. *Jurnal Kimia*, 9 (2), 271-278.
- Association of Official Analytical Chemistry (AOAC). (2005). *Official methods of analysis of the association of official analytical chemistry*. AOAC International.
- Benhabiles, M. S., Salah, R., Lounici, H., Drouiche, N., Goosen, M. F. A., & Mameri, N. (2012). Antibacterial activity of chitin, chitosan and its oligomers prepared from shrimp shell waste. *Food Hydrocolloids*, 29(1), 48-56. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2012.02.013>
- Chen, X., Liu, L., Li, J., Liu, J., Du, G., & Chen, J. (2012). Optimization of glucose feeding approaches for enhanced glucosamine and N-acetylglucosamine production by an engineered *Escherichia coli*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 39(2), 359-365. <https://doi.org/10.1007/s10295-011-1046-0>
- Cheng, H., & Yin, L. (2007). Medium effects on the increase of protease and cellulose activities of *Bacillus subtilis* BCRC14716. *Journal of the Fisheries Society of Taiwan*, 34 (3), 291-298. <https://doi.org/10.29822/JFST.200709.0005>
- Chmielowski, R. A., Wu, H. S., & Wang, S. S. (2007). Scale-up of upstream and downstream operations for the production of glucosamine using microbial fermentation. *Biotechnology*, 2(8), 996-1006. <https://doi.org/10.1002/biot.200600237>
- Deng, W., Liou, S. R., Plunkett III, G., Mayhew, G. F., Rose, D. J., Burland, V., Kodoyjanni, V., Schwartz, D. C., & Blattner, F. R. (2003). Comparative genomics of *Salmonella enterica* serovar Typhi strains Ty2 and CT18. *Journal of Bacteriology*, 185(7), 2330-2337. <https://doi.org/10.1128/jb.185.7.2330-2337.2003>
- Dompeipen, E. J. (2017). Isolation and identification of chitin and chitosan from windu shrimp (*Penaeus monodon*) with infrared spectroscopy. *Majalah Biam*, 13(1), 31-41.
- Dompeipen, E. J., Kaimudin, M., & Dewa, R. P. (2016). Isolasi kitin dan kitosan dari limbah kulit udang. *Majalah Biam*, 12(1), 32-38.
- Halim, Y., Hardoko, Handayani, R., & Lucida, V. (2018). Optimum conditions for N-acetyl glucosamine production from tiger shrimp shell (*Penaeus monodon*) by *Serratia marcescens*. *Asian Journal of Pharmaceutical and*

- Clinical Research*, 11(12), 488-493.
- Halim, Y., Hardoko, & Christy, A. (2018). Optimum conditions for N-acetyl glucosamine production from *Penaeus monodon* shrimp shells by solid state fermentation using *Trichoderma virens*. *Asian Journal of Microbiology, Biotechnology and Environmental Science*, 20(4), 1081-1088.
- Hardoko, Sasmito, B. B., Puspitasari, Y. E., Afandi, H. M., & Maulia, N. (2017). Study of glucosamine production from shrimp shells by fermentation using *Trichoderma harzianum*. *The Journal of Experimental Life Science*, 7(2), 115-121.
<https://doi.org/10.21776/ub.jels.2017.007.02.10>
- Hardoko, Josephine, C., Handayani, R., & Halim, Y. (2020). Isolation, identification and chitinolytic index of bacteria from rotten tiger shrimp (*Penaeus monodon*) shells. *AAFL Bioflux*, 13(1), 360-371.
- Krueger, N. J. (2009). *The Protein Protocols Handbook*. Humana Totowa Publishers.
- Larsen, T., Petersen, B. O., Storgaard, B. G., Duus, J. O., Palcic, M. M., & Leisner, J. J. (2011). Characterization of a novel *Salmonella* Typhimurium chitinase which hydrolyzes chitin, chitoologosaccharide, and an N-acetyllactosamine conjugate. *Glycobiology*, 21(4), 426-436.
<https://doi.org/10.1093/glycob/cwq174>
- Liu, D., Wei, Y., Yao, P., & Jiang, L. (2006). Determination of the degree of acetylation of chitosan by UV spectrophotometry using dual standards. *Carbohydrate Research*, 341(6), 782-785.
<https://doi.org/10.1016/j.carres.2006.01.008>
- Liu, L., Liu, Y., Shin, H. D., Chen, R., Li, J., Du, G., & Chen, J. (2013). Microbial production of glucosamine and N-acetylglucosamine: advances and perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(14), 6149-6158.
<https://doi.org/10.1007/s00253-013-4995-6>
- Lopez-Cervantes, J., Sanchez-Machado, D. I., & Delgado-Rosas, K. E. (2007). Quantitation of glucosamine from shrimp waste using HPLC. *Journal of Chromatographic Science*, 45(4), 195-199.
<https://doi.org/10.1093/chromsci/45.4.195>
- Maehre, H. K., Dalheim, L., Edvinsen, G. K., Elvevoll, E. O., & Jensen, I. (2018). Protein determination – method matters. *Foods*, 7(1), 2-11.
<https://doi.org/10.3390%2Ffoods7010005>
- Mojarrad, J. S., Nemati, M., Valizadeh, H., Ansarin, M., & Bourbour, S. (2007). Preparation of glucosamine from exoskeleton of shrimp and predicting production yield by response surface methodology. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(6), 2246-2250.
<https://doi.org/10.1021/jf062983a>
- Mubarik, N. S., Mahagiani, I., Anindyaputi, A., Santoso, S., & Rusmana, I. (2010). Chitinolytic bacteria isolated from chili rhizosphere: chitinase characterization and its application as biocontrol for whitefly (*Bemisia tabaci* Genn.). *Journal of Agricultural and Biological Sciences*, 5(4), 430-435.
<https://doi.org/10.3844/ajabssp.2010.430.435>

- Poeloengasih, C. D., Hernawan, & Angwar, M. (2008). Isolation and characterization of chitin and chitosan prepared under various processing times. *Indonesian Journal of Chemistry*, 8(2), 189-192.
<https://doi.org/10.22146/ijc.21635>
- Purwatiningsih, S., Wukirsari, T., Sjahriza, A., & Wahyono, D. (2009). *Kitosan Sumber Biomaterial Masa Depan*. Penerbit IPB Press.
- Rochima, E. (2007). Karakterisasi kitin dan kitosan asal limbah rajungan Cirebon Jawa Barat. *Buletin Teknologi Hasil Perikanan*, 10(1), 9-22.
- Saskiawan, I., & Handayani, R. (2011). Production of N-acetyl-D-glucosamine by submerged fermentation from chitin. *Berita Biologi*, 10(6), 20-28.
- Shachar, D., & Yaron, S. (2006). Heat tolerance of *Salmonella enterica* serovars Agona, Enteritidis, and Typhimurium in peanut butter. *Journal of Food Protection*, 69(11), 2687-2691.
<https://doi.org/10.4315/0362-028x-69.11.2687>
- Setia, I. N., & Suharjo. (2015). Diversitas dan uji potensi bakteri kitinolitik dari limbah udang. *Jurnal Biotropika*, 3(2), 95-98.
- Sillanpaa, M., & Ncibbi, C. (2017). *A Sustainable Bioeconomy: The Green Industrial Revolution*. Springer International Publishing.
- Struszczyk, M. H. (2002). Chitin and chitosan: Applications of chitosan. *Polimery*, 47(6), 396-403.
- Suresh, P.V. (2012). Biodegradation of shrimp processing bio-waste and concomitant production of chitinase enzyme and N-acetyl-D-glucosamine by marine bacteria: production and process optimization. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28(10), 2945-2962.
<https://doi.org/10.1007/s11274-012-1106-2>
- Suresh, P. V., Sachindra, N. M., & Bhaskar, N. (2011). Solid state fermentation production of chitin deacetylase by *Colletotrichum lindemuthianum* ATCC 56676 using different substrates. *Journal of Food Science and Technology*, 48(3), 349-356.
<https://doi.org/10.1007%2Fs13197-011-0252-0>
- Ulfa, M. (2016). *Penentuan kadar glukosamin dari fermentasi kulit udang oleh *Mucor michei* dengan metode uji ninhidrin dan spektrofotometri UV-Vis* (Undergraduate Thesis). Universitas Lampung, Lampung, Indonesia
- Wang, W. P., Dua, Y. M., Qiu, Y. L., Wang, X. Y., & Hu, Y. J. (2008). A new green technology for direct production of low molecular weight chitosan. *Carbohydrate Polymers* 74(1), 127-132.
<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2008.01.025>
- Widhyastuti, N. (2007). Produksi kitinase ekstraseluler *Aspergillus rugulosus* 501 secara optimal pada media cair. *Berita Biologi*, 8(6), 547-553.
- Wirawan, A., & Herdyastuti, N. (2013). Determination of incubation time on formation of N-acetylglucosamine by enzymatic degradation from chitin. *UNESA Journal of Chemistry*, 2(3), 11-13.
- Zhang, A., Mo, X., Zhou, N., Wang, Y., Wei, G., Hao, Z., & Chen, K. (2020). Identification of chitinolytic enzymes in *Chitinolyticbacter meiyuanensis* and mechanism of

efficiently hydrolyzing chitin to N-acetyl glucosamine. *Frontiers in Microbiology*, 11, 572053. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.572053>