

**PRODUKSI N-ASETILGLUKOSAMIN DARI KULIT UDANG MENGGUNAKAN
KITINASE EKSTRASELULER DARI *Providencia stuartii***
**[PRODUCTION OF N-ACETYLGLUCOSAMINE FROM SHRIMP SHELLS USING
EXTRACELLULAR CHITINASE FROM *Providencia stuartii*]**

Yuniwaty Halim^{1*}, Cynthia¹, Hardoko^{1,2}, dan Ratna Handayani¹

¹Program Studi Teknologi Pangan, Universitas Pelita Harapan
Jl. M.H. Thamrin Boulevard, Tangerang 15811, Banten

²Jurusan Teknologi Hasil Perikanan, Universitas Brawijaya
Jl. Veteran No. 1 Malang 65113, Indonesia

*Korespondensi penulis : yuniwaty.halim@uph.edu

ABSTRACT

*Shrimp shells are composed of chitin. One of chitin derivatives, glucosamine, is commonly available in the form of N-acetylglucosamine and can be produced by enzymatic fermentation of chitin using chitinolytic microorganism. One of chitinolytic bacteria is *Providencia stuartii*. This research was conducted to determine the optimum fermentation condition, specifically pH, temperature, substrate concentration and incubation time, to produce N-acetylglucosamine using extracellular chitinase enzyme from *Providencia stuartii*. The pH used in the fermentation were 3, 4, 5, 6, 7, 8 and 9 while the temperature used were 30, 40, 50, 60, 70 and 80°C. Results showed that crude extracellular chitinase has its optimum activity at pH of 5 and temperature of 40°C, i.e. about 3.23 ± 0.06 U/mL and 3.42 ± 0.06 U/mL, respectively. Semi pure extracellular chitinase has its optimum activity at pH of 7 and temperature of 40°C, i.e. about 4.74 ± 0.06 U/mL and 4.44 ± 0.06 U/mL, respectively. Furthermore, substrate concentration of chitin used were 0.5, 1.0, 1.5 and 2.0% with incubation time of 2, 4, 6 and 24 hours. The highest N-acetylglucosamine was obtained after 6 hours of incubation with substrate concentration of 1%, i.e. 933.89 ± 12.55 ppm when crude extracellular chitinase was used and 1050.56 ± 12.54 ppm when semi pure extracellular chitinase was used.*

Keywords : chitin, chitinase, extracellular, N-acetylglucosamine, *Providencia stuartii*

ABSTRAK

Cangkang udang tersusun dari kitin. Salah satu turunan kitin, yaitu glukosamin, biasanya terdapat dalam bentuk N-asetilglukosamin dan dapat diproduksi melalui fermentasi enzimatik terhadap kitin dengan menggunakan mikroorganisme kitinolitik. Salah satu bakteri kitinolitik adalah *Providencia stuartii*. Penelitian ini dilakukan untuk menentukan kondisi fermentasi optimum, yaitu pH, suhu, konsentrasi substrat, dan lama inkubasi, untuk memproduksi N-asetilglukosamin menggunakan kitinase ekstraseluler dari *Providencia stuartii*. pH yang digunakan dalam fermentasi adalah 3, 4, 5, 6, 7, 8, dan 9, sedangkan suhu yang digunakan adalah 30, 40, 50, 60, 70 and 80°C. Hasil penelitian menunjukkan bahwa kitinase ekstraseluler kasar memiliki aktivitas optimum pada pH 5 dan suhu 40°C, yaitu berturut-turut sebesar $3,23 \pm 0,06$ U/mL dan $3,42 \pm 0,06$ U/mL. Kitinase ekstraseluler semi murni memiliki aktivitas optimum pada pH 7 dan suhu 40°C, yaitu berturut-turut sebesar $4,74 \pm 0,06$ U/mL and $4,44 \pm 0,06$ U/mL. Selanjutnya, konsentrasi kitin sebagai substrat yang digunakan adalah sebesar 0,5, 1,0 1,5, dan 2,0% dengan lama inkubasi 2, 4, 6, dan 24 jam. Konsentrasi N-asetilglukosamin tertinggi

diperoleh setelah lama inkubasi 6 jam dengan konsentrasi substrat sebesar 1%, yaitu sebesar $933,89 \pm 12,55$ ppm menggunakan kitinase ekstraseluler kasar dan $1050,56 \pm 12,54$ ppm menggunakan kitinase ekstraseluler semi murni.

Kata kunci : ekstraseluler, kitin, kitinase, N-asetilglukosamin, *Providencia stuartii*

PENDAHULUAN

Kitin merupakan komponen utama pada jaringan penyokong *Crustacea*. Struktur kitin berupa polisakarida linear yang terdiri dari N-asetilglukosamin yang dihubungkan dengan ikatan β -1,4. Kitin dan senyawa turunannya memiliki nilai ekonomis yang tinggi karena aktivitas biologisnya yang banyak dimanfaatkan di bidang industri maupun biomedika (Brzezinska *et al.*, 2013).

Kitin biasa digunakan sebagai bahan dasar pembuatan kitosan, oligosakarida, dan glukosamin (Einbu, 2007). Glukosamin dapat diperoleh melalui pemecahan kitin dari cangkang udang menggunakan metode fermentasi, hidrolisis kimiawi, metode enzimatik, atau kombinasi dari metode-metode tersebut (Cahyono *et al.*, 2014).

Pada skala laboratorium, glukosamin biasa diproduksi menggunakan metode fermentasi. Menurut Krithika dan Chellaram (2016), mikroorganisme yang diisolasi dari cangkang udang dapat menghasilkan kitinase. Produksi senyawa turunan kitin menggunakan metode enzimatik lebih efektif jika dibandingkan dengan menggunakan sel

mikroorganisme. Hal ini karena kitinase bersifat stabil sehingga rendemen yang dihasilkan akan lebih tinggi dan reaksi dapat berlangsung lebih cepat (Clark *et al.*, 2014; Renneberg, 2008). Penelitian sebelumnya oleh Hardoko *et al.* (2020) berhasil mengisolasi beberapa bakteri yang bersifat kitinolitik dari cangkang udang, salah satunya adalah bakteri *Providencia stuartii*.

Enzim yang dihasilkan oleh mikroorganisme dapat berupa enzim ekstraseluler maupun enzim intraseluler. Keuntungan dari enzim ekstraseluler adalah enzim disekresikan ke luar sel sehingga lebih mudah untuk diisolasi dan lebih tahan terhadap panas maupun senyawa kimia (Renneberg, 2008).

Enzim bekerja secara optimal tergantung kepada pH, suhu, konsentrasi substrat dan lama inkubasi (Pomeranz 2012). Kokate (2011) menyatakan bahwa stabilitas dan aktivitas optimum enzim ekstraseluler biasanya menyerupai sel mikroorganismenya. Tujuan penelitian ini adalah untuk menentukan kondisi optimum, yaitu pH, suhu, konsentrasi substrat, dan lama inkubasi, untuk memproduksi N-

asetilglukosamin dari kitin yang diisolasi dari cangkang udang windu dengan menggunakan kitinase ekstraseluler dari *Providencia stuartii*.

BAHAN DAN METODE

Bahan dan Alat

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah kitin yang diisolasi dari kulit udang windu (*Penaeus monodon*) yang diperoleh dari PT. Lola Mina, Jakarta, isolat bakteri *Providencia stuartii* dari penelitian sebelumnya (Hardoko *et al.*, 2020), media *Nutrient Agar* dan *Nutrient Broth*, larutan NaOH, HCl, buffer, Na-K-tartarat, K_2HPO_4 , KH_2PO_4 , $(NH_4)_2SO_4$, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, standard N-asetil glukosamin (Sigma Aldrich), *3,5-dinitrosalicylic acid* (DNS), dan akuades.

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah timbangan analitik (Ohaus), *waterbath* (Memmert), mikropipet, spektrofotometer *visible* (Thermo Scientific), centrifuge (MPW), pH meter (Metrohm), kuvet Quartz (Starna), *incubator shaker* (Heidolph 22 Unimax 1010), dan alat-alat gelas. mikropipet, pH meter Metrohm 913), pH indikator universal (Merck), kuvet Quartz (Hellma Analytics), vortex, mikroskop (Olympus), dan alat-alat gelas.

Metode Penelitian

Ekstraksi Kitinase Ekstraseluler dari *Providencia stuartii*

Proses ekstraksi enzim ekstraseluler *P. stuartii* dilakukan sesuai dengan metode Narendrakumar *et al.* (2015). Sebanyak 1 ose kultur kerja bakteri diinokulasikan ke dalam 60 mL media *Nutrient Broth* dan diinkubasi selama 18 jam pada suhu $37^\circ C$. Setelah inkubasi, sebanyak 60 mL inokulum dipindahkan ke dalam 300 mL media selektif. Dalam media selektif ini mengandung 1% kitin, 0,03% K_2HPO_4 , 0,07% KH_2PO_4 , 0,7% $(NH_4)_2SO_4$, dan 0,01% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$. Campuran ini kemudian diinkubasi selama 18 jam pada suhu $37^\circ C$ di atas *incubator shaker* dengan kecepatan 120 rpm. Setelah inkubasi, campuran ini kemudian disentrifugasi pada kecepatan 3500 rpm selama 15 menit. Supernatan yang diperoleh dari sentrifugasi merupakan enzim ekstraseluler kasar.

Untuk memurnikan enzim kasar ini, endapan yang diperoleh ditambahkan dengan larutan ammonium sulfat 70% dengan rasio 1:1 dan diaduk. Campuran kemudian didinginkan pada suhu $4^\circ C$ selama 18 jam dan disentrifugasi pada kecepatan 3500 rpm selama 15 menit. Endapan yang diperoleh ditambahkan dengan larutan buffer fosfat sebanyak 8 mL

per 150 mL campuran. Supernatan diperoleh merupakan enzim ekstraseluler semi murni.

Penentuan Suhu dan pH Fermentasi Optimum

Suhu dan pH fermentasi optimum untuk aktivitas kitinase ekstraseluler kasar maupun semi murni ditentukan berdasarkan metode oleh Cheba *et al.* (2016). Reaksi dilakukan dengan mencampurkan 1 mL kitinase ekstraseluler dengan 1 mL substrat yang mengandung 1% kitin. Substrat yang mengandung kitin tersebut disiapkan pada berbagai pH, yaitu dari pH 3-9.

Campuran ini kemudian diinkubasi selama 1 jam pada suhu ruang dan kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 3500 rpm selama 15 menit. pH optimum ditentukan berdasarkan aktivitas enzim tertinggi, yang diukur dengan menggunakan metode DNS.

Suhu optimum fermentasi dilakukan dengan mencampurkan 1 mL kitinase ekstraseluler dengan 1 mL substrat yang mengandung 1% kitin berdasarkan pH optimum yang telah diperoleh. Campuran ini kemudian diinkubasikan pada berbagai suhu, yaitu 30, 40, 50, 60, 70 and 80°C selama 2 jam. Hasil reaksi kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 3500 rpm selama 15 menit. Suhu optimum fermentasi ditentukan berdasarkan aktivitas enzim

tertinggi yang diukur menggunakan metode DNS.

Penentuan Konsentrasi Substrat dan Lama Inkubasi Optimum untuk Produksi N-asetilglukosamin

Lama inkubasi dan konsentrasi substrat optimum ditentukan dengan menggunakan pH dan suhu optimum yang telah diperoleh, berdasarkan metode oleh Narendrakumar *et al.* (2015).

Substrat yang mengandung kitin dengan berbagai konsentrasi (0,5%, 1,0%, 1,5%, dan 2,0%) disiapkan pada pH optimum yang telah diperoleh. Setelah disterilisasi, masing-masing substrat direaksikan dengan 1 mL kitinase ekstraseluler pada suhu optimum yang telah diperoleh. Lama inkubasi yang digunakan adalah 2, 4, 6, dan 24 jam.

Setelah inkubasi, masing-masing campuran disentrifugasi pada kecepatan 3500 rpm selama 15 menit. Konsentrasi substrat dan lama inkubasi optimum ditentukan berdasarkan konsentrasi N-asetilglukosamin tertinggi yang dihasilkan.

Analisis Aktivitas Kitinase

Aktivitas kitinase ekstraseluler kasar maupun semi murni diukur dengan metode DNS berdasarkan Zbircea *et al.* (2016). Sebanyak 1 mL substrat dengan 1 mL

kitinase direaksikan dengan 2 mL DNS dan 1 mL larutan Na-K-tartarat 4%. Campuran kemudian dihomogenisasi menggunakan *vortex* dan dipanaskan pada suhu 100°C selama 15 menit. Setelah itu, campuran didinginkan dan dilarutkan dengan akuades (rasio 1:4) sebelum diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer *visible* pada panjang gelombang 540 nm. 1 unit aktivitas kitinase didefinisikan sebagai 1 μ mol N-asetilglukosamin yang dihasilkan dalam 1 jam. Adapun aktivitas kitinase dihitung dengan menggunakan formula di bawah ini.

$$\text{Aktivitas Kitinase (U/mL)} = \frac{\text{konsentrasi N-asetilglukosamin } \left(\frac{\text{mg}}{\text{mL}}\right) \times 1000 \times \text{amount of enzyme (mL)}}{221.2 \left(\frac{\text{g}}{\text{mol}}\right) \times \text{lama inkubasi (jam)}}$$

Analisis Konsentrasi N-asetilglukosamin

Konsentrasi N-asetilglukosamin diukur menggunakan metode DNS berdasarkan Ramansyah dan Sudiana (2003). Kurva standar N-asetilglukosamin dibuat dengan membuat larutan standar dengan berbagai konsentrasi, yaitu 200, 400, 600, 800, dan 1000 ppm. Sebanyak 1 mL larutan standar direaksikan dengan dengan 2 mL DNS dan 1 mL larutan Na-K-tartarat 4%. Campuran kemudian dihomogenisasi menggunakan *vortex* dan dipanaskan pada suhu 100°C selama 15 menit. Setelah itu, campuran didinginkan dan diukur absorbansinya pada panjang gelombang 540 nm menggunakan spektrofotometer.

Konsentrasi N-asetilglukosamin pada sampel hasil fermentasi pada berbagai perlakuan ditentukan dengan cara yang sama.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Suhu dan pH Optimum untuk Aktivitas Kitinase Ekstraseluler *P. stuartii*

Kitinase ekstraseluler kasar maupun semi murni dari *P. stuartii* diukur pada berbagai pH dan suhu untuk mengetahui aktivitas maksimum kitinase. Adapun pH fermentasi yang digunakan adalah 3, 4, 5, 6, 7, 8, dan 9 karena Jolles and Muzzarelli (2012) menyatakan bahwa kitinase dari mikroorganisme dapat aktif pada kisaran pH 3,5-8,0. Hasil fermentasi menggunakan kitinase ekstraseluler *P. stuartii* pada berbagai pH dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1 menunjukkan bahwa aktivitas kitinase ekstraseluler kasar tertinggi adalah pada pH 5, yaitu sebesar 3,23 \pm 0,06 U/mL. Aktivitas kitinase tertinggi pada pH 5 juga ditemukan pada kitinase intraseluler kasar dari *P. stuartii*, yaitu sebesar 6,03 U/mL (Hardoko *et al.*, 2019). Hasil ini menunjukkan bahwa kitinase ekstraseluler kasar *P. stuartii* memiliki aktivitas enzim yang lebih rendah jika dibandingkan dengan kitinase intraselulernya.

Tabel 1. Pengaruh pH fermentasi terhadap aktivitas kitinase ekstraseluler *P. stuartii*

pH	Aktivitas kitinase ekstraseluler kasar (U/mL)	Aktivitas kitinase ekstraseluler semi murni (U/mL)
3	2,97±0,06	3,88±0,06
4	2,99±0,07	4,12±0,06
5	3,23±0,06	4,21±0,06
6	2,78±0,04	4,35±0,04
7	2,69±0,04	4,74±0,06
8	2,60±0,06	4,41±0,06
9	2,54±0,04	4,28±0,08

Kitinase ekstraseluler semi murni *P. stuartii* mencapai aktivitas optimumnya pada pH 7, yaitu sebesar 4,74±0,06 U/mL. Hasil ini menunjukkan purifikasi enzim berjalan dengan baik karena aktivitas enzim yang dihasilkan lebih tinggi. Aktivitas enzim yang lebih tinggi menunjukkan tingkat kemurnian enzim yang semakin tinggi (Haliza dan Suhartono, 2012).

pH optimum yang berbeda antara kitinase ekstraseluler kasar dan semi murni dapat disebabkan kitinase dapat bekerja optimum pada kisaran pH 5-7 dan stabil pada pH 4-8 (Pratiwi *et al.*, 2015; Maggadani *et al.*, 2017). Haedar *et al.* (2017) menyatakan bahwa aktivitas enzim akan meningkat hingga mencapai pH optimumnya, kemudian akan menurun aktivitasnya karena pH memengaruhi sifat ionik dari gugus karboksil dan gugus amino enzim sehingga akan menyebabkan

perubahan pada sisi katalitik dan konformasi enzim.

pH optimum yang diperoleh kemudian digunakan untuk menentukan suhu optimum fermentasi. Adapun suhu fermentasi yang digunakan adalah 30, 40, 50, 60, 70, dan 80°C. Hal ini karena *P. stuartii* dapat memproduksi kitinase secara optimum pada suhu 37°C (Hamid, 2013) dan kitinase yang dihasilkan oleh mikroorganisme resisten terhadap suhu tinggi hingga suhu mencapai 80°C (Jolles and Muzzarelli, 2012). Hasil fermentasi menggunakan kitinase ekstraseluler *P. stuartii* pada berbagai suhu dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Pengaruh suhu fermentasi terhadap aktivitas kitinase ekstraseluler *P. stuartii*

Suhu (°C)	Aktivitas kitinase ekstraseluler kasar (U/mL)	Aktivitas kitinase ekstraseluler semi murni (U/mL)
30	3,22 ±0,00	3,98±0,06
40	3,42±0,04	4,44±0,06
50	3,24±0,04	4,26±0,06
60	3,07±0,00	4,23±0,04
70	3,00±0,06	3,96±0,06
80	2,93±0,06	3,91±0,06

Tabel 2 menunjukkan bahwa kitinase ekstraseluler kasar maupun semi murni *P. stuartii* memiliki aktivitas tertinggi pada suhu 40°C, yaitu berturut-turut sebesar 3,42±0,04 U/mL dan 4,44±0,06 U/mL. Hasil penelitian ini sesuai dengan penelitian

sebelumnya oleh Hardoko *et al.* (2019) menyatakan bahwa kitinase intraseluler kasar *P. stuartii* mencapai aktivitas optimum pada suhu 40°C.

Penelitian sebelumnya oleh Pratiwi *et al.* (2015) dan Maggadani *et al.* (2017) menyatakan bahwa kitinase memiliki aktivitas optimum pada suhu 30-40°C dan stabil pada suhu 30-45°C. Zhao (2017) juga menyatakan bahwa kitinase pada umumnya memiliki aktivitas optimum pada suhu 30-50°C, tetapi tidak stabil pada suhu di atas 60°C.

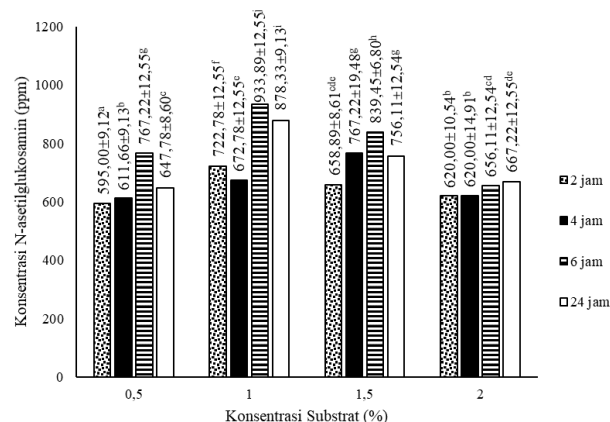
Aktivitas kitinase ekstraseluler *P. stuartii* mengalami penurunan pada saat suhu fermentasi ditingkatkan. Hardi *et al.* (2017) menyatakan bahwa aktivitas enzim meningkat hingga suhu optimumnya karena suhu meningkatkan energi kinetic. Setelah itu, aktivitas enzim akan mengalami penurunan karena suhu yang terlalu tinggi juga dapat mendenaturasi enzim (Zhao, 2017; Bettelheim *et al.*, 2009).

Konsentrasi Substrat dan Lama Inkubasi Optimum untuk Produksi N-asetilglukosamin

Suhu dan pH fermentasi optimum yang diperoleh digunakan untuk menentukan konsenstrasi substrat dan lama inkubasi optimum bagi kitinase ekstraseluler *P. stuartii* dalam menghasilkan N-asetilglukosamin. Fermentasi kitinase

ekstraseluler kasar dilakukan pada suhu 40°C dan pH 5, sedangkan fermentasi kitinase ekstraseluler semi murni dilakukan pada suhu 40°C dan pH 7.

Adapun konsentrasi substrat yang digunakan adalah 0,5%, 1,0%, 1,5%, dan 2,0%, sedangkan lama inkubasi yang digunakan adalah 2, 4, 6, dan 24 jam. Hasil fermentasi ini dapat dilihat pada Gambar 1 (kitinase ekstraseluler kasar) dan Gambar 2 (kitinase ekstraseluler semi murni).

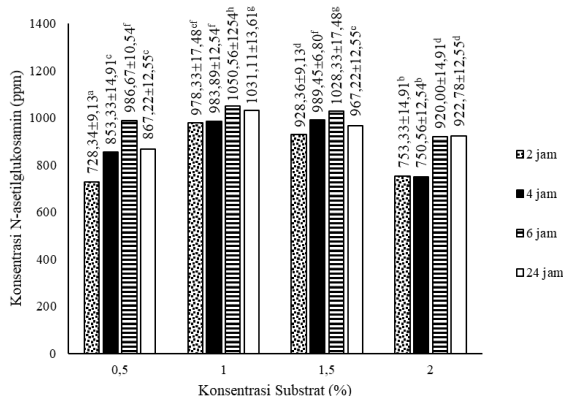


Keterangan: notasi yang berbeda menunjukkan perbedaan signifikan ($p < 0,05$)

Gambar 1. Pengaruh konsentrasi substrat dan lama inkubasi terhadap konsentrasi N-asetilglukosamin (kitinase ekstraseluler kasar)

Hasil uji statistik menggunakan *Univariate Analysis* dan uji lanjut menggunakan *Duncan test* menunjukkan bahwa ada pengaruh signifikan dari konsentrasi substrat dan lama inkubasi maupun interaksi keduanya terhadap

konsentrasi N-asetilglukosamin yang dihasilkan ($p < 0,05$).



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

Gambar 2. Pengaruh konsentrasi substrat dan lama inkubasi terhadap konsentrasi N-asetilglukosamin (kitinase ekstraseluler semi murni)

Gambar 1 dan Gambar 2 menunjukkan bahwa konsentrasi substrat dan lama inkubasi optimum untuk menghasilkan N-asetilglukosamin oleh kitinase ekstraseluler kasar maupun semi murni *P. stuartii* adalah pada konsentrasi substrat 1% dan lama inkubasi 6 jam.

Penelitian sebelumnya oleh Soeka *et al.* (2010) menyatakan bahwa aktivitas kitinase tertinggi diperoleh pada saat konsentrasi substrat 1%. Selain itu, penelitian oleh Herdyastuti dan Cahyaningrum (2017) menyatakan bahwa pada konsentrasi substrat 1,2% dihasilkan konsentrasi N-asetilglukosamin tertinggi dan

semakin menurun pada saat konsentrasi substrat mencapai 1,6%. Konsentrasi substrat yang terlalu tinggi akan menurunkan aktivitas kitinase (Hamid *et al.*, 2013). Kecepatan reaksi enzim meningkat seiring dengan penambahan konsentrasi substrat hingga reaksi mencapai kecepatan maksimum. Setelah itu, seluruh sisi aktif enzim akan dipenuhi oleh substrat, sehingga penambahan konsentrasi substrat tidak akan memengaruhi kecepatan reaksi (Kent, 2000).

Hasil penelitian ini juga menunjukkan bahwa lama inkubasi optimum adalah 6 jam. Hamid *et al.* (2013) menyatakan bahwa semakin lama waktu inkubasi maka aktivitas kitinase akan semakin tinggi. Hal ini karena dibutuhkan waktu untuk memecah struktur kitin yang kompleks menjadi N-asetilglukosamin. Pada saat lama inkubasi lebih dari 8 jam, konsentrasi N-asetilglukosamin yang dihasilkan akan menurun karena enzim telah mengalami denaturasi (Herdyastuti dan Cahyaningrum, 2017).

Konsentrasi N-asetilglukosamin tertinggi pada lama inkubasi 6 jam dan konsentrasi substrat 1% juga diperoleh dari penelitian sebelumnya oleh Hardoko *et al.* (2019) dengan menggunakan kitinase intraseluler kasar *P. stuartii*, yaitu sebesar 1680.00 ± 58.49 ppm. Pada penelitian ini,

konsentrasi N-asetilglukosamin tertinggi yang dihasilkan oleh kitinase ekstraseluler kasar adalah $933,89 \pm 12,55$ ppm, sedangkan kitinase ekstraseluler semi murni adalah $1050,56 \pm 12,56$ ppm. Hasil ini menunjukkan bahwa kitinase ekstraseluler dari *P. stuartii* menghasilkan N-asetilglukosamin yang lebih rendah dibandingkan dengan kitinase intraselulernya.

Hasil penelitian ini juga menunjukkan bahwa purifikasi enzim penting untuk dilakukan karena dapat meningkatkan aktivitas kitinase sehingga konsentrasi N-asetilglukosamin yang dihasilkan juga lebih tinggi. Hal ini sesuai dengan penelitian sebelumnya oleh Gangwar *et al.* (2016) yang menyatakan bahwa kitinase *Streptomyces violascens* yang dipurifikasi menunjukkan aktivitas enzim yang lebih tinggi terhadap substrat kitin.

KESIMPULAN

Kondisi fermentasi optimum bagi kitinase ekstraseluler kasar dari bakteri *P. stuartii* adalah pada pH 5 dan suhu 40°C. Aktivitas enzim pada pH 5 adalah sebesar $3,23 \pm 0,06$ U/mL dan pada suhu 40°C adalah sebesar $3,42 \pm 0,06$ U/mL. Konsentrasi substrat optimum diperoleh pada konsentrasi 1% dengan lama inkubasi 6 jam

yang menghasilkan konsentrasi N-asetilglukosamin sebesar $933,89 \pm 12,55$ ppm.

Kondisi fermentasi optimum bagi kitinase ekstraseluler semi murni dari bakteri *P. stuartii* adalah pada pH 7 dan suhu 40°C. Aktivitas enzim pada pH 7 adalah sebesar $4,74 \pm 0,06$ U/mL dan pada suhu 40°C adalah sebesar $4,44 \pm 0,06$ U/mL. Konsentrasi substrat optimum diperoleh pada konsentrasi 1% dengan lama inkubasi 6 jam yang menghasilkan konsentrasi N-asetilglukosamin sebesar $1050,56 \pm 12,54$ ppm.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis ingin mengucapkan terima kasih kepada LPPM UPH yang telah mendanai penelitian ini berdasarkan skema penelitian No. P-008-FaST/VI/2018.

DAFTAR PUSTAKA

- Bettelheim, F.A., Brown, W.H., Campbell, M.K., and Farrell, S.O. 2009. Introduction to General, Organic and Biochemistry. Canada: Cengage Learning.
- Brzezinska, M.S., Jankiewicz, U., Burkowska, A., and Walczak, M. 2013. Chitinolytic microorganisms and their possible application in environmental protection. Current Microbiology 68 (1) : 71-81.
- Cahyono, E., Suptijah, P., and Wientarsih, I. 2014. Development of a pressurized

- hydrolysis method for producing glucosamine. *Asian Journal of Agriculture and Food Sciences* 2 (5) : 390-396.
- Cheba, B.A., Zaghoul, T.I., El-Mahdy, A.R., and El-Massry, M.H. 2016. Effect of pH and temperature on *Bacillus* sp. R2 chitinase activity and stability. *Procedia Technology* 22:471-477.
- Clark, S., Jung, S., and Lamsal, B. 2014. *Food Processing: Principles and Applications*, 2nd ed. West Sussex: John Wiley & Sons.
- Einbu, A. 2007. Characterisation of chitin and a study of its acid-catalysed hydrolysis. *Biotechnology, Trondheim, Norwegia: Norwegian University of Science and Technology*, Ph.D. Dissertation.
- Gangwar, M., Singh, V., Pandey, A.K., Tripathi, C.K.M., and Mishra, B.N. 2016. Purification and characterization of chitinase from *Streptomyces violascens* NRRL B2700. *Indian Journal of Experimental Biology* 54 (1): 64-71.
- Haliza, W. dan Suhartono, M.T. 2012. Karakteristik kitinase dari mikroba. *Buletin Teknologi Pascapanen Pertanian* 8 : 1-14.
- Hamid, R. 2013. Isolation and characterization of microbial chitinases. New Delhi: Jamia Hamdard.
- Hamid, R., Khan, M.A., Ahmad, M., Ahmad, M.M., Abdin, M.Z., Musarrat, J. and Javed, S. 2013. Chitinases: an update. *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences* 5 (1) : 21-29.
- Hardi, J., Rusian, Razak, A.R., and Silva. 2017. Karakterisasi enzim kitinase dari isolat bakteri termofilik B1211 asal air panas bora. *Jurnal Riset Kimia* 3 (2) : 172-179.
- Hardoko, Mastuti, T.S., Puspasari, D., and Halim, Y. 2019. Utilization of crude intracellular chitinase enzyme from *Providencia stuartii* for glucosamine production from shrimp shells. *Reaktor* 19 (2) : 62-67.
- Hardoko, Josephine, C., Handayani, R., and Halim, Y. 2020. Isolation, identification and chitinolytic index of bacteria from rotten tiger shrimp (*Penaeus monodon*) shells. *AAAL Bioflux* 13 (1) : 360-371.
- Herdyausti, N. and Cahyaningrum, S.E. 2017. Analysis of N-acetylglucosamine from enzymatic degradation of amorphous chitin. *Rayasan Journal Chemistry* 10 (1) : 226-233.
- Jolles, P. and Muzzarelli, R.A.A. 2012. *Chitin and Chitinases*. Basel: Birkhauser Basel.
- Kokate, C. 2011. *Textbook of Pharmaceutical Biotechnology*. New Delhi: Elsevier.
- Krithika, S. and Chellaram, C. 2016. Isolation, screening and characterization of chitinase producing bacteria from marine wastes. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* 8 (5) : 34-36.
- Maggadani, B.P., Setyahadi, S., dan Harmita. 2017. Skrining dan evaluasi aktivitas kitinase dari sembilan isolat bakteri lokal. *Pharmaceutical Sciences and Research* 4 (1) : 13-24.

- Narendrakumar, G., Namasivayam, S.K.R, and Singh, R.A.I.S. 2015. Production and optimization of extracellular fungal chitinase produced by *Metarhizium anisopliae* sorokin through submerged and solid state fermentation. *Research Journal of Pharmacy and Technology* 8 (3) : 280-284.
- Pomeranz, Y. 2012. *Functional Properties of Food Components*. Florida: Elsevier.
- Pratiwi, R.S., Susanto, T.E., Wardani, Y.A.K., dan Sutrisno, A. 2015. Enzim kitinase dan aplikasi di bidang industri: kajian pustaka. *Jurnal Pangan dan Agroindustri* 3 (3) : 878-887.
- Ramansyah, M. dan Sudiana, I.M. 2003. Optimasi analisis amilase dan glukukanase yang diekstrak dari miselium *Pleurotus ostreatus* dengan asam 3,5 dinitrosalisilat. *Berkala Penelitian Hayati* 9 : 7-12.
- Renneberg, R. 2008. *Biotechnology for Beginners*. Massachusetts: Elsevier.
- Soeka, Y.S., Triana, E., dan Setianingrum, N. 2010. Aktivitas aktinomisetes dari Bangka Belitung koleksi bidang mikrobiologi, Puslit Biologi-LIPI dalam memproduksi enzim kitinase. *Jurnal Teknik Lingkungan* 11 (3) : 417-423.
- Thacker, U., Parikh, R., Shouche, Y., and Madamwar, D. 2006. Hexavalent chromium reduction by *Providencia* sp. *Process Biochemistry* 41 : 1332-1337.
- Zbircea, R.I., Menghiu, G., Matica, A., and Ostafe, V. 2016. Use of 3,5-dinitrosalicylic acid reaction to study the chitosan hydrolysis. *New Frontiers in Chemistry* 25 : 145-153.
- Zhao, G. 2017. *Mineral Containing Proteins: Roles in Nutrition*. Singapore: Springer.