

Produksi Enzim Kitinase Menggunakan isolat jamur lokal *Trichoderma asperellum* TNC52 dengan Pengaruh Laju Aerasi

Noris Saputra¹⁾, Sri Helianty²⁾, Sri Rezeki²⁾

¹⁾Mahasiswa, Program Studi Sarjana Teknik Kimia ²⁾Dosen Teknik Kimia
Laboratorium Teknologi Produk
Program Studi Teknik Kimia S1, Fakultas Teknik, Universitas Riau
Kampus Bina Widya Jl. HR. Soebrantas Km 12,5 Simpang Baru, Panam,
Pekanbaru 28293
Email : noris_saputra@yahoo.com

ABSTRACT

Chitinase is an enzyme that can transform chitin into N-acetylglucosamine (GlcNAc), which is very useful in the pharmaceutical, especially as an agent of anti-tumor and anti-cancer. This research is an enlarged scale of 25 mL enzyme production that already done with enzyme activity 0.0137 U / mL, an enlarged scale is already done in a bioreactor with volume of medium is 1.5 L with aeration, aeration is doing by pumping an air by sparger and assisted by stirrer with a stirring speed motors 40-60 rpm and aeration rate of 0.5 vvm; 1 vvm; 1.5 vvm and without aeration process. The best enzyme activity is produced at a rate of 1 vvm aeration and fermentation time is 8 days with time of inoculation starter is 5 days with the activity of an enzyme produced has analyze through UV-VIS spectrophotometer with a sugar content analysis method, Nelson-Somogyi.

Keywords: aeration, chitinase, enzyme, inoculation, nelson-somogyi, sparger, starter

1. PENDAHULUAN

Seiring dengan perubahan pola dan gaya hidup masyarakat terutama di wilayah perkotaan, menjadi salah satu penyebab utama menurunnya tingkat kesehatan masyarakat yang berdampak pada meningkatnya prevalensi obesitas, paparan bahan kimia, serta tidak teraturnya pola makan sehingga hal ini menjadi penyebab utama meningkatnya jumlah pengidap penyakit kanker di Indonesia terutama di wilayah perkotaan. Peningkatan jumlah penderita kanker menjadi semakin kompleks karena kanker kini tak lagi mengenal batasan usia. Lebih dari 60% kasus baru dan sekitar 70% kematian akibat

kanker di dunia setiap tahunnya terjadi di Afrika, Asia dan Amerika Tengah dan Selatan. Diperkirakan kasus kanker tahunan akan meningkat dari 14 juta pada 2012 menjadi 22 juta dalam dua dekade berikutnya [Kemenkes, 2015].

Secara nasional prevalensi penyakit kanker pada penduduk semua umur di Indonesia tahun 2013 sebesar 0,14% atau diperkirakan sekitar 347.792 orang. Biaya obat umumnya mencapai 30-40% dari total biaya pelayanan kesehatan dan cenderung untuk terus meningkat [Budiharto dan kosen, 2008], sementara itu terkadang BPJS tidak menjamin secara penuh biaya obat-obatan yang dibutuhkan, hal ini tentu

menyulitkan masyarakat yang mengidap penyakit ini dalam proses pengobatannya.

Riset terbaru yang dapat menjadi solusi dari permasalahan ini adalah melalui produksi enzim kitinase dengan menggunakan fungi *Trichoderma sp.* Kitinase merupakan enzim ekstraseluler yang dihasilkan oleh jamur, bakteri, tanaman, dan hewan yang berperan penting dalam pemecahan kitin. Produk turunan kitin seperti kitinolisakarida memiliki aktivitas melawan oksidasi, meningkatkan kekebalan yang sangat membantu untuk pengobatan AIDS, kanker, jantung dan penyakit darah, serta dapat diaplikasikan pada makanan, obat-obatan dan produk kosmetik [Shahidi *et al.*, 1999]. Produk turunan kitin seperti karboksimetil kitin dapat digunakan sebagai bahan dasar pembuatan benang operasi, monomer dari kitin yaitu N-Asetil-D-glukosamin dapat dimanfaatkan sebagai obat untuk mengontrol kadar gula dalam darah, sebagai suplemen, antiinflamasi, dan pengobatan osteoarthritis [Sashiwa *et al.*, 2002].

Kelimpahan kitin di alam menempati urutan terbesar kedua setelah selulosa dan terdistribusi luas di lingkungan biosfer seperti cangkang *crustaseae* (kepiting, udang dan lobster), ubur-ubur, komponen struktural eksoskeleton serangga, dinding sel fungi (22-40%), alga dan nematoda, binatang maupun tumbuhan [Haliza dan Suhartono, 2012]. Salah satu senyawa organik kaya kitin yang sering digunakan untuk produksi kitinase yaitu cangkang udang, komposisi kimia cangkang udang terdiri dari kitin (18,70%), protein kasar (24,03%), serat kasar (26,89%), lemak (5,14%), dan Ca (16,69%) [Mahata *et al.*, 2008].

Penelitian ini mempelajari pengaruh aerasi terhadap proses produksi kitinase

dengan memanfaatkan senyawa organik kitin pada cangkang udang menggunakan jamur lokal *Trichoderma asperellum* TNC52. Penelitian ini melanjutkan penelitian dari Nugroho *et al.* [2009] dengan memperbesar skala produksi menjadi 1,5 L atau 60 kali perbesaran medium dan dengan menambahkan serta mempelajari pengaruh laju aerasi pada bioreaktor terhadap produksi kitinase oleh jamur lokal *Trichoderma asperellum* TNC52 menggunakan limbah cangkang udang ebi sebagai sumber kitin.

2. METODE PENELITIAN

2.1 Bahan dan Alat

2.1.1 Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu kultur *Trichoderma asperellum* TNC52 dari perkebunan coklat yang merupakan isolasi dan koleksi laboratorium Biokimia FMIPA UNRI [Nugroho *et al.*, 1999]. Kultur ini dipelihara pada media *Potato Dextrose Agar* (PDA). Kitin dari cangkang udang, KNO₃, KH₂PO₄, MgSO₄.7H₂O, udara, Dapar Sitrat-Fosfat, Dapar Asetat, Reagen Nelson Somogyi (terlampir) dan Aquades (Brataco, Indonesia).

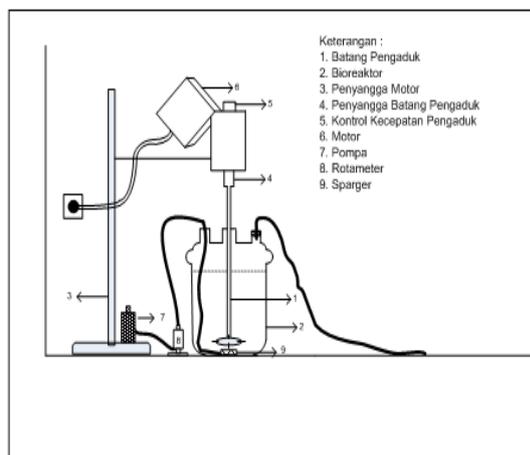
2.1.2 Alat

Alat yang digunakan pada penelitian ini yaitu bioreaktor 2 liter (Pyrex), *autoclave* (LDZX-50FA, China), motor pengaduk (Heidolph, Type RZR1), pompa udara AA-350 (Amara, China), rotameter, *shaker*, pH meter (ATC pH-2011), ayakan 80 *mesh*, erlenmeyer, labu ukur (Merck Pyrex, 50 mL, 100 mL, 250 mL, 1000 mL, dan 2000 mL), termometer digital (TP101), spektrofotometer UV-Vis 1240 keluaran Shimadzu, Japan (No. Seri 04020), lemari pendingin, timbangan analitik, gelas ukur, lemari pendingin, *water bath*, alat

sentrifugal, *Corning syringe filter* 0,45 μm PES filter media (No. Katalog 6780-2504), kertas saring *GF/C whatman* (No. Katalog 1822055) dan peralatan laboratorium standar sesuai prosedur

Variabel Penelitian terdiri dari variabel tetap dan variabel berubah. Variabel tetap pada penelitian ini yaitu berat cangkang udang, berat nutrisi, laju pengadukan, pH 5.5 [Nugroho *et al.*, 2009] dan konsentrasi starter 10% [Shuler dan Kargi, 2002], serta ukuran partikel cangkang udang melewati saringan 80 mesh [Suraini *et al.*, 2007].

Variabel berubah pada penelitian ini adalah variasi laju aerasi : 0 vvm, 0.5 vvm, 1 vvm, dan 1.5 vvm; waktu inokulasi dari starter : 5 hari dan waktu fermentasi : 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, dan 9 hari.



Gambar 1. Rangkaian Alat Produksi Enzim

2.2 Prosedur Penelitian

Penelitian ini dilakukan dengan beberapa tahapan dalam pengerjaannya, yakni dimulai dengan persiapan bahan dan alat, preparasi bahan, penyegaran isolat, pembuatan starter, proses fermentasi, pemurnian enzim kitinase, uji aktifitas kitinase dan terakhir analisis data.

2.2.1 Tahap Persiapan

Bahan baku yang digunakan pada

penelitian ini berupa cangkang udang lokal, yang dicuci dengan air bersih, dikeringkan, lalu dihaluskan dan kemudian diayak menggunakan ayakan 80 mesh.

Medium fermentasi yang digunakan berupa substrat kitin dengan komposisi medium cair di dalam bioreaktor 2 L terlihat pada tabel 2.1

Tabel 2.1 Komposisi Medium

Susunan Nutrisi	Berat atau Volume
KNO_3	15 g
KH_2PO_4	7,5 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	3,75 g
Cangkang udang	16,04 g
Dapar Sitrat Fosfat	1,5 L

Untuk proses analisa diperlukan substrat yang nantinya akan dikonversi menjadi glukosa oleh enzim kitinase, substrat yang digunakan adalah kitin dari cangkang udang yang telah di *treatment* menjadi larutan koloidal kitin 2 %.

Jamur yang digunakan terlebih dahulu diremajakan, proses peremajaan jamur pada penelitian ini dibantu oleh staff teknisi lab Biokimia FMIPA Universitas Riau. Jamur-jamur ditanam pada medium padat (PDA) agar miring, selama 4-5 hari yang ada kitin 1 % sebagai sumber karbon. Jamur diambil secara aseptik menggunakan jarum ose dari permukaan plat agar dan disuspensikan dalam media cair yang steril, ini sebagai starter

2.2.2 Tahap Sterilisasi

Alat-alat yang akan digunakan pada proses pembuatan medium dan proses fermentasi harus disterilisasi terlebih dahulu untuk mencegah terjadinya kontaminasi yang dapat mempengaruhi hasil fermentasi. Sterilisasi dilakukan pada suhu 121 $^{\circ}\text{C}$ selama 15 menit dengan menggunakan *autoclave*

2.2.3 Tahap Penelitian

a. Pembuatan starter

Pembuatan starter dilakukan dengan menginokulasikan jamur dari media agar miring secara aseptik ke dalam erlenmeyer berisi 150 mL media produksi enzim, komposisi media starter 10 % dari media produksi [Shuler dan Kargi, 2002], yang telah disterilisasi menggunakan *autoclave* dan selanjutnya didinginkan hingga sama dengan suhu ruang. Starter tersebut kemudian diinkubasi sesuai variasi (5 dan 7 hari) dan diaduk menggunakan *shaker* dengan kecepatan 180 rpm pada suhu ruang [Nugroho dkk., 2009], setelah masa inkubasi selesai, starter siap diinokulasikan ke dalam bioreaktor.

b. Tahap Fermentasi

Media fermentasi beserta nutrisinya dimasukkan ke dalam bioreaktor 2 liter dan disterilisasikan dengan *autoclave* pada suhu 121°C selama 15 menit lalu didinginkan hingga sama dengan suhu ruang. Medium siap diinokulasi dengan suspensi spora *T. asperellum* TNC 52 (150 ml starter yang telah selesai diinkubasi), kemudian dilakukan setting pengaduk dan laju aerasi sesuai variasi (0,5; 1; 1,5vvm dan tanpa aerasi). Fermentasi dilakukan secara batch dengan suhu ruang, selama 9 hari. Pada setiap hari dilakukan pengambilan sampel dan isolasi ekstrak kasar enzim.

c. Isolasi ekstrak kasar enzim

Media produksi enzim hasil fermentasi didinginkan dalam lemari pendingin bersuhu 5°C selama 1 jam. Media dingin ini kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 8000

rpm selama 10 menit untuk mengendapkan sisa substrat padat dan biomassa *T. asperellum*. Partikel sisa dipisahkan dari filtrat dengan penyaringan melalui kertas saring *GF/C* whatman dan selanjutnya menggunakan *corning syringe filter* 0,45 µm. Filtrat yang diperoleh didinginkan lagi (-5°C) selama 1 jam, filtrat steril berupa ekstrak kasar enzim ditambahkan 0,02% NaN₃ sehingga enzim dapat disimpan pada lemari pendingin selama 2 minggu. Ekstrak kasar enzim selanjutnya akan ditentukan aktivitas kitinasenya sebagai ukuran produksi kitinase per liter media produksi.

d. Uji aktivitas kitinase *Trichoderma asperellum* TNC 52.

Aktivitas kitinase ditentukan berdasarkan jumlah produksi gula pereduksi yang dibebaskan permenit per ml ekstrak enzim dengan kitin 2% sebagai substrat.. Sebagai standar dibuat larutan glukosa berbagai konsentrasi antara 0,01-0,1 mg/ml dengan metode Nelson-Somogyi. Absorbansi masing-masing larutan diukur dengan spektrofotometer pada λ 527 nm.

3 . HASIL DAN PEMBAHASAN

3.1 Pengaruh Laju Aerasi dan Waktu Fermentasi terhadap Produksi Kitinase

Dari penelitian yang telah dilakukan dapat diketahui bahwa perubahan aktivitas enzim dihasilkan pada setiap laju aerasi yang digunakan cenderung meningkat hingga hari ke-8 sampai akhirnya pada hari ke-9 aktifitas enzim mulai menurun pada setiap laju aerasi. Aktifitas enzim kitinase yang dihasilkan pada setiap waktu pengambilan sampel dapat menunjukkan bagaimana pertumbuhan jamur *T.*

asperellum mulai dari hari pertama hingga hari terakhir. Kurva aktifitas enzim yang dihasilkan identik dengan kurva pertumbuhan jamur, dimana pada awalnya jamur akan beradaptasi di dalam medium, lalu jamur akan terus tumbuh hingga pada akhirnya akan mengalami fase kematian atau berkurangnya populasi dikarenakan sumber karbon dari kitin yang merupakan sumber makanan utama tidak lagi mencukupi dan semakin berkurang [Ahmad, 2009].

Aktifitas kitinase terbaik yang dihasilkan pada inokulasi dari starter selama 5 hari, didapatkan pada laju aerasi 1 vvm, dengan aktifitas enzim yang lebih tinggi dibandingkan dengan laju aerasi lainnya, mulai dari hari pertama hingga hari terakhir fermentasi. Aktifitas kitinase tertinggi diperoleh dengan lama waktu fermentasi 8 hari. Pertumbuhan jamur pada laju aerasi 1 vvm juga lebih baik, terlihat dengan jumlah flok berupa gumpalan jamur seperti bulu domba dengan diameter sekitar 1-3 cm yang terbentuk selama proses.

3.2 Pengamatan Pengaruh Laju Aerasi terhadap Pertumbuhan Jamur

Pada proses fermentasi terutama proses yang menggunakan jamur, salah satu kondisi yang bisa diamati dan menggambarkan bagaimana pertumbuhan jamur selama proses fermentasi adalah berat biomassa yang dihasilkan. Semakin berat biomassa yang dihasilkan maka semakin baik pertumbuhan jamur di dalam medium fermentasi, karena jumlah biomassa yang dihasilkan sebanding dengan jumlah jamur di dalam medium cair [Nauman, 2002]. Pada penelitian ini dilakukan penghitungan berat akhir dari biomassa di dalam medium, perbandingan berat biomassa yang dihasilkan terhadap laju aerasi dan lama waktu inokulasi.

terlihat pada proses dengan laju aerasi 1 vvm lebih baik dibandingkan dengan laju aerasi lainnya,. Terlihat bahwa proses dengan laju aerasi 1 vvm menghasilkan berat biomassa yang paling banyak, sehingga dapat disimpulkan kondisi ini merupakan kondisi proses terbaik, dikarenakan biomassa akhir yang dihasilkan merupakan yang terberat dibandingkan kondisi proses lainnya. Hal ini sejalan dengan aktifitas enzim yang didapatkan yaitu kondisi dengan aktifitas enzim maksimum yaitu dengan laju aerasi 1 vvm

4. KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian yang dilakukan, maka dapat laju aerasi memberikan pengaruh yang sangat signifikan terhadap produksi enzim yang dihasilkan, kitinase dapat diproduksi dengan menggunakan isolat jamur lokal *Trichoderma asperellum* TNC52 dan cangkang udang lokal sebagai sumber kitin. kondisi terbaik penelitian ini didapatkan pada Laju aerasi 1 vvm dan lama waktu fermentasi selama 8 hari.

DAFTAR PUSTAKA

- Ahmad, A. (2009). *Teknologi Fermentasi*. Jurusan Teknik Kimia Universitas Riau: Pekanbaru.
- Budiharto, M. dan S. Kosen. 2008. Peran Farmako Ekonomi Dalam Sistem Pelayanan Kesehatan. *Buletin Penelitian Sistem Kesehatan*. 11(4): 337-340.
- Haliza, W. dan M.T. Suhartono. 2012. Karakteristik Kitinase dari Mikrobial. *Buletin Teknologi Pascapanen Pertanian*.8:1.
- Mahata, M.E., A. Dharma., H.I. Riyanto., dan Y Rizal. 2008. Effect of Substituting Shrimp Waste

- Hydrolysate of *Penaeus merguensis* for Fish Meal in Broiler Performance. *Pakistan Journal Nutrition*. 7 (6):806-810
- Nauman, E.B., 2002. *Chemical Reactor design, optimization, and scale up*. McGraw-Hill. New York.
- Nugroho, T.T., C. Ginting., dan M. Ali. 2000. Isolation of chitinase active *Trichoderma* spp. and *Gliocladium* spp. From Citrus and Cacao orchid soil in Riau, Sumatera. *Laporan penelitian*. Pekanbaru: Lembaga Penelitian Universitas Riau.
- Nugroho, T.T., Y. Nurulita., dan S. Devi. 2009. Produksi Kitinase *Trichoderma asprellum* TNC52 dan TNJ63 Galur Lokal Riau Menggunakan Limbah Kulit Udang. *Laporan Penelitian Unggulan Lokal*. Pekanbaru: Lembaga Penelitian Universitas Riau.
- Sashiwa H., S. Fujishima., N. Yamano., N. Kawasaki., A. Nakayam., E. Muraki., K. Hiraga., K. Oda., dan S. Aiba. 2002. Production of N-acetyl-D-glucosamine from co-chitin by Crude Enzymes from *Aeromonas hydrophila* H-2330. *Carbohydrate Research*.337: 761-763.
- Shahidi F., J.K.V. Arachchi., dan Y.J. Jeon. Food Applications of chitin and chitosans. *Trends in Food Science and Technology*. 10. 37-517(2), 64-69.
- Shuler, M. L. dan F. Kargi. 2002. *Bioprocess engineering basic concepts*. 2nd ed. USA: Prentice Hall.
- Suraini, A.A., C.F. Christine., M.S. Madihah., M.I. Rosli., dan M.H. Ali. 2008. Effect of Agitation and Aeration Rates on Chitinase Production Using *Trichoderma virens* UKM1 in 2-1 Stirred Tank Reactor. *Appl Biochem Biotechnol*. 150: 193-204.