

Pengaruh konsentrasi enzim *chitosanase* dan waktu inkubasi terhadap karakteristik chito oligosakarida dan aktivitas prebiotik dari cangkang kepiting bakau

Effect of chitosanase enzyme concentration and incubation time on chito oligosaccharide characteristic and prebiotic activity from mangrove crab shell

Nanda Oktavia^{1)*}, Sri Winarti¹⁾, Anugerah Dany Priyanto¹⁾

¹Program Studi Teknologi Pangan, Universitas Pembangunan Nasional “Veteran” Jawa Timur

*E-mail korespondensi : noktavia817@gmail.com

Informasi Artikel:

Dikirim: 10/03/2022; disetujui: 28/07/2022; diterbitkan: 30/09/2022

ABSTRACT

*Mangrove crab shells are one of the wastes that are poorly utilized because it is usually only used for animal feed mixtures. Mangrove crab shells have a high enough chitin content so that it can be used as chitosan and then used as chito oligosaccharides that have the potential to have prebiotic activity. The study aimed to determine the effect of enzyme concentration and length of incubation time on the prebiotic characteristics and activity of chito oligosaccharides. Completely Randomized Design was used as a design experiment with a variable chitosanase enzyme concentration (0.5%, 1%, and 1.5%) and incubation time (1 hour, 3 hours, and 5 hours). The study shows that there is an interaction between the two variables in the viscosity parameter, degree of deacetylation, molecular weight, and degree of polymerization. The results showed that the best treatments were an enzyme concentration of 0.5% and a long incubation time of 5%, which resulted in chito oligosaccharides with characteristics: viscosity of 2.75 cPs, degree of deacetylation of 97.68%, the molecular weight of 546.99 Da, and degree of polymerization of 2.67. The best treatment tested the prebiotic activity of 1,18 for *Lactobacillus acidophilus* bacteria and 1,33 for *Bifidobacterium breve* bacteria. Hope this research would be an innovation in the production of a crabs shell or chitin's source into prebiotic chito oligosaccharide and could boost the immune system.*

Keywords: *Chitosanase enzyme, Chito oligosaccharide, Prebiotic activity*

ABSTRAK

Cangkang kepiting bakau merupakan salah satu limbah yang kurang dimanfaatkan dengan baik karena biasanya hanya dijadikan untuk campuran pakan ternak. Cangkang kepiting bakau memiliki kandungan kitin yang cukup tinggi, sehingga dapat dimanfaatkan menjadi kitosan kemudian dijadikan chito oligosakarida yang berpotensi memiliki aktivitas prebiotik. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh konsentrasi enzim *chitosanase* dan waktu inkubasi terhadap karakteristik dan aktivitas prebiotik dari chito oligosakarida. Rancangan Acak Lengkap (RAL) digunakan sebagai desain percobaan dengan variabel konsentrasi enzim *chitosanase* (0,5%, 1% dan 1,5%) dan waktu inkubasi (1 jam, 3 jam dan 5 jam). Penelitian menunjukkan terjadi interaksi ($P < 0.05$) antara kedua variabel terhadap parameter rendemen, viskositas, kelarutan, derajat deasetilasi, berat molekul, dan derajat polimerisasi. Perlakuan terbaik diperoleh pada kondisi konsentrasi enzim *chitosanase* 0,5% dan waktu inkubasi 5 jam, yang menghasilkan chito oligosakarida dengan karakteristik: rendemen 8,64%, viskositas

2,75 cPs, kelarutan 93,5%, derajat deasetilasi 97,68%, berat molekul 546,99 Da, dan derajat polimerisasi 2,67. Pada perlakuan terbaik uji aktivitas prebiotik sebesar 1,18 untuk bakteri *Lactobacillus acidophilus* dan 1,33 untuk bakteri *Bifidobacterium breve*. Harapannya dengan adanya penelitian ini menjadi sebuah inovasi dalam mengolah cangkang kepiting atau sumber kitin menjadi chito oligosakarida yang bersifat prebiotik serta dapat meningkatkan sistem imun.

Kata kunci: Enzim *chitosanase*, Chitooligosakarida, Aktivitas prebiotik.

PENDAHULUAN

Industri pengolahan *crustacea* menghasilkan sejumlah besar produk sampingan seperti cangkang *crustacea* yang menyumbang 50–70% dari bahan baku awal. Pembuangan cangkang *crustacea* yang tidak tepat mengakibatkan masalah lingkungan yang parah seperti bau tak sedap dan sedimentasi mineral di tempat pembuangan sampah. Oleh karena itu, konversi bahan limbah cangkang menjadi produk yang bernilai dan bermanfaat adalah salah satu strategi untuk mengurangi masalah lingkungan (Mohan *et al.*, 2021). Cangkang *crustacea* terdiri dari tiga komponen utama yaitu kitin, protein, dan kalsium karbonat serta dengan berbagai komponen minor termasuk proteoglikan, lipid, dan bahan anorganik lainnya (Nagasawa, 2012). Komponen utama pada cangkang *crustacea* (udang, kepiting, lobster, squilla, dan krill) adalah kitin (15–40%), protein (20–40%), kalsium dan magnesium karbonat (20–50%), serta dengan komponen minor lainnya. Komponen tersebut seperti lipid, astaxanthin, dan mineral (Khoushab & Yamabhai, 2010). Kitin merupakan polisakarida yang membentuk arsitektur berserat, yang menjadi scaffold untuk pengendapan kalsium karbonat (Nagasawa, 2012). Kitin dan turunannya merupakan biopolimer yang ditinjau dengan baik dengan banyak aplikasi yang bermanfaat. Preparat kitin dan turunannya sebagai biomaterial bervariasi sesuai dengan kondisi proses dan aplikasi potensial (Abidin *et al.*, 2020), tetapi aplikasi kitin dan kitoooligosakarida lebih potensial karena aplikasi kitin lebih terbatas dibandingkan kitosan karena kitin bersifat inert secara kimia dan bersifat tidak larut baik dalam air maupun asam, sedangkan

kitosan relatif reaktif dan dapat diproduksi dalam berbagai bentuk. Kitosan biasanya tidak larut dalam kondisi pH netral atau basa sedangkan larut dalam pH asam. Kelarutan kitosan tergantung pada distribusi gugus amino dan N-asetil bebas. Dalam asam encer (pH < 6), gugus amino bebas terprotonasi dan molekul menjadi larut (Lodhi *et al.*, 2014).

Kitosan dihasilkan dari deasetilasi kitin yang menghasilkan beberapa manfaat baik karena aspek fisikokimia dan biologinya (Islam *et al.*, 2020). Kelemahan senyawa ini adalah karena kelarutannya dalam air rendah dengan viskositas tinggi (Tanasale *et al.*, 2019). Strategi yang umum dilakukan adalah dengan memotong ikatan -1,4 glikosidik dan produk degradasi kitosan yang dibuat dengan hidrolisis enzimatis atau kimia kitosan, produk ini disebut kitoooligosakarida (COS) (Akbari-Alavijeh *et al.*, 2020; Lodhi *et al.*, 2014), produk terhidrolisisnya dan COS mudah larut dalam air karena panjang rantainya yang lebih pendek dan gugus amino bebas dalam unit D-glukosamin. Viskositas rendah dan kelarutan COS yang lebih besar pada pH netral telah menarik minat banyak peneliti untuk memanfaatkan kitosan dalam bentuk oligosakaridanya. Khususnya penelitian tentang COS di bidang pangan dan gizi telah menekankan kemampuannya untuk meningkatkan kualitas pangan dan kemajuan kesehatan manusia karena COS memiliki manfaat yang baik, dalam hal makanan, kosmetik, biomedis atau farmasi, pertanian, perlindungan lingkungan, dan pengelolaan air limbah (Lodhi *et al.*, 2014; Arias *et al.*, 2018).

Beberapa faktor yang dapat mempengaruhi karakteristik COS, seperti konsentrasi enzim, suhu, dan waktu inkubasi

(Gao *et al.*, 2012). Chito Oligosakarida adalah produk kitosan yang dibuat dengan hidrolisis enzimatis biasanya menggunakan enzim spesifik *chitosanase*. Larutan kitosan 1% dengan enzim *chitosanase* dan waktu inkubasi 180 menit memberikan kondisi optimal untuk produksi COS (Jeon & Kim, 2000). Konsentrasi enzim dan waktu inkubasi dapat mempengaruhi proses hidrolisis (Fawzya *et al.*, 2009). COS mampu bersifat antimikroba, menurunkan kadar kolesterol, imunostimulan, dan prebiotik hewani alami (Harti, 2011). Beberapa penelitian menunjukkan kitooligosakarida dapat menghambat pertumbuhan bakteri patogen dan meningkatkan pertumbuhan bakteri probiotik. Pengaruh oligosakarida kitosan terhadap pertumbuhan *B. bifidum* ATCC 11863 dan *B. breve* ATCC 15700 dan pertumbuhan meningkat secara signifikan dalam waktu 48 jam inkubasi (Nurhayati *et al.*, 2016). Diantara dua strain bakteri Bifidobacterium, *Bifidobacterium bifidum* ATCC 11863 pertumbuhannya lebih tinggi dibandingkan *Bifidobacterium breve* ATCC 15700 tetapi hasilnya tidak menunjukkan perbedaan yang nyata pada jam 0 dan 24 yaitu $5,22 \pm 0,02$ dan $5,18 \pm 0,07$ untuk 0 jam kemudian untuk 24 jam adalah $5,21 \pm 0,1$ dan $4,98 \pm 0,01$. Pertumbuhan pada dua strain bakteri *Lactobacillus* yaitu, *Lactobacillus acidophilus* KCTC 3111 pertumbuhannya lebih tinggi dibandingkan *Lactobacillus brevis* KCTC 3498. Pertumbuhan *Lactobacillus acidophilus* KCTC 3111 adalah $0,576 \pm 0,066$ dan untuk *Lactobacillus brevis* KCTC 3498 adalah

$0,420 \pm 0,012$ (Lee *et al.*, 2002). COS dapat menghambat pertumbuhan *Escherichia coli* karena terjadi penurunan pertumbuhan (Fernandes *et al.*, 2008). Oleh karena itu, tujuan penelitian ini untuk menentukan kombinasi perlakuan terbaik terhadap kecukupan kondisi proses sehingga dapat menghasilkan karakteristik chito oligosakarida dan aktivitas prebiotik yang baik.

METODE

Bahan penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain cangkang kepiting bakau yang diperoleh dari Rumah Makan Seafood Sari Laut Kapasan, Surabaya Jawa Timur, NaOH, HCl, akuades, enzim *chitosanase* (Merk Genofocus, Korea Selatan), dan buffer asetat.

Alat penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain hot plate, thermometer, erlenmeyer, blender, loyang, oven, cabinet dryer, ayakan 100 mesh, neraca analitik, timbangan, gelas ukur, pengaduk, water bath shaker.

Rancangan penelitian

Jumlah perlakuan dalam penelitian ini sebanyak 9 perlakuan. Penelitian ini menggunakan metode Rancangan Acak Lengkap (RAL) yang terdiri dari dua faktor yaitu faktor 1: konsentrasi enzim *chitosanase* 0,5%, 1% dan 1,5% (b/v); faktor 2: waktu inkubasi 1 jam, 3 jam, dan 5 jam.

Tabel 1. Kombinasi Perlakuan

Konsentrasi Enzim <i>Chitosanase</i>	Waktu Inkubasi		
	L ₁ 1 jam	L ₂ 3 jam	L ₃ 5 jam
K ₁ 1%	K ₁ L ₁	K ₁ L ₂	K ₁ L ₃
K ₂ 2%	K ₂ L ₁	K ₂ L ₂	K ₂ L ₃
K ₃ 3%	K ₃ L ₁	K ₃ L ₂	K ₃ L ₃

Keterangan:

K₁L₁ : konsentrasi enzim *chitosanase* 0,5%; waktu inkubasi 1 jam
 K₁L₂ : konsentrasi enzim *chitosanase* 0,5%; waktu inkubasi 3 jam
 K₁L₃ : konsentrasi enzim *chitosanase* 0,5%; waktu inkubasi 5 jam
 K₂L₁ : konsentrasi enzim *chitosanase* 1%; waktu inkubasi 1 jam
 K₂L₂ : konsentrasi enzim *chitosanase* 1%; waktu inkubasi 3 jam
 K₂L₃ : konsentrasi enzim *chitosanase* 1%; waktu inkubasi 5 jam

K₃L₁: konsentrasi enzim *chitosanase* 1,5%; waktu inkubasi 1 jam
K₃L₂: konsentrasi enzim *chitosanase* 1,5%; waktu inkubasi 3 jam
K₃L₃: konsentrasi enzim *chitosanase* 1,5%; waktu inkubasi 5 jam

Metode pelaksanaan

Penelitian dilakukan di Laboratorium Program Studi Teknologi Pangan UPN “Veteran” Jawa Timur, Laboratorium Terpadu dan Halal Center Universitas Islam Malang, dan Laboratorium FMIPA Universitas Negeri Malang. Parameter yang diamati meliputi viskositas (Fawzya *et al.*, 2009), derajat deasetilasi (Czechowska, *et al.* 2012), berat molekul (Ridho *et al.*, 2017), derajat polimerisasi (Ridho *et al.*, 2017), serta uji perlakuan terbaik menggunakan analisis aktivitas prebiotik (Huebner *et al.*, 2007).

Proses pembuatan kitosan

Penelitian diawali dengan pengeringan, penghancuran, dan pengayakan 100 mesh, lalu pembuatan kitosan. Kitosan dibuat dengan cara hidrolisis secara kimiawi. Pertama dilakukan deproteinasi dengan NaOH 1M (1:10) lalu diaduk dan dipanaskan dengan suhu 65°C selama 2 jam, kemudian didinginkan dan disaring hingga netral menggunakan aquades. Selanjutnya dikeringkan. Kedua dilakukan demineralisasi dengan HCl 2N (1:10) lalu diaduk dan dipanaskan dengan suhu 30°C selama 1 jam, kemudian didinginkan dan disaring hingga netral menggunakan aquades. Selanjutnya dikeringkan. Ketiga dilakukan deasetilasi dengan NaOH 50% (1:20) lalu diaduk dan dipanaskan dengan suhu 90-100°C selama 2 jam, kemudian didinginkan dan disaring hingga netral menggunakan aquades. Selanjutnya dikeringkan (Yanti *et al.*, 2018, Trisnawati *et al.*, 2013, Sartika *et al.*, 2016).

Proses pembuatan chito oligosakarida

Pembuatan larutan kitosan 1% (kitosan dilarutkan dalam 1M *buffer* asetat pH 4,5) dan ditambahkan enzim *chitosanase* sebanyak 0,5%, 1%, dan 1,5%. Lalu dihidrolisis dalam *waterbath shaker* dengan suhu 45°C selama 1 jam, 3 jam, dan 5 jam. Reaksi dihentikan untuk inaktivasi enzim dengan suhu 80°C selama 10 menit.

Kemudian chito oligosakarida dikeringkan dengan *freeze dryer* suhu -54°C selama 24 jam (Jeon, *et al.*, 2001, Ratanavaraporn dan Damrongsakkul, 2011)

Aktivitas prebiotik

Media MRS *broth* modifikasi dibuat kemudian pada masing-masing media MRS *broth* modifikasi ditambahkan chito oligosakarida atau glukosa. Kemudian pada media-media tersebut di inokulasikan probiotik yakni *Bifidobacterium breve* dan *Lactobacillus acidophilus*, lalu diinkubasi pada suhu 37°C selama 0 dan 24 jam. Selanjutnya diinokulasikan pada media MRS agar untuk *Lactobacillus acidophilus* dan BSA untuk *Bifidobacterium breve*, kemudian koloni bakteri yang tumbuh dihitung.

Perhitungan Skor Aktivitas Prebiotik untuk menggambarkan kemampuan suatu strain bakteri dalam menggunakan substrat tertentu untuk mendukung pertumbuhannya. Skor Aktivitas Prebiotik = $\{(\text{probiotik log cfu mL}^{-1} \text{ pada prebiotik pada 24 jam} - \text{probiotik log cfu mL}^{-1} \text{ pada prebiotik pada 0 jam}) / (\text{probiotik log cfu mL}^{-1} \text{ pada glukosa pada 24 jam} - \text{probiotik log cfu mL}^{-1} \text{ pada glukosa pada 0 jam})\} - \{(\text{enterik log cfu mL}^{-1} \text{ pada prebiotik pada 24 jam} - \text{enterik log cfu mL}^{-1} \text{ pada prebiotik pada 0 jam}) / (\text{enterik log cfu mL}^{-1} \text{ pada glukosa pada 24 jam} - \text{enterik log cfu mL}^{-1} \text{ pada glukosa pada 0 jam})\}$.

Analisis data

Data yang diperoleh dianalisis menggunakan ANOVA (Analysis of Variance) pada α 5%. Apabila terdapat perbedaan nyata maka dilanjutkan dengan uji DMRT (*Duncan's Multiple Range Test*) pada α 5%.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Karakteristik chitooligosakarida

viskositas

Viskositas adalah ukuran kekentalan cairan atau fluida yang dapat menyatakan kecepatan bergerak suatu fluida untuk mengalir. Molekul-molekul yang membentuk suatu fluida tersebut akan saling bergesekan ketika fluida mengalir, hal tersebut disebabkan karena adanya gaya kohesi pada zat cair (Hananto, 2013).

Rata-rata viskositas chito oligosakarida dengan perlakuan konsentrasi enzim *chitosanase* dan waktu inkubasi antara 2,75 cPs hingga 3,35 cPs (Tabel 2). Hasil pengujian viskositas menunjukkan bahwa semakin tinggi konsentrasi enzim *chitosanase* dari 0,5% hingga 1,5% dan semakin lama waktu inkubasi dari 1 jam hingga 3 jam memiliki kemampuan baik dalam menurunkan viskositas. Penurunan viskositas terjadi akibat aktivitas enzim yang tinggi dan lamanya proses hidrolisis memberikan kesempatan enzim untuk bereaksi dengan substrat sehingga semakin banyak substrat kitosan yang terhidrolisis menjadi senyawa yang lebih kecil. Secara otomatis, bertambahnya enzim maka semakin banyak terbentuk kompleks dan semakin banyak ikatan polimer yang terpotong maka berat molekul semakin turun, sehingga kekuatan tarik-menarik antar ikatan juga menurun dan ditandai dengan menurunnya viskositas senyawa tersebut (Handayani *et al.*, 2013; Rokhati *et al.*, 2015). Selain itu, semakin lama waktu inkubasi yang diberikan akan menyebabkan daya kerja enzim untuk melakukan proses hidrolisis semakin panjang dan akan menghasilkan glukosamin dengan berat molekul yang lebih rendah, dan mengakibatkan penurunan viskositas (Anggraini & Yuniarta, 2015).

Konsentrasi enzim yang terlalu tinggi serta diiringi dengan waktu inkubasi yang lama dapat membuat proses hidrolisis mengalami kejenuhan karena seluruh substrat telah terhidrolisis sehingga tidak terdapat lagi substrat yang dapat menempel pada sisi aktif enzim dan menghasilkan viskositas yang

cenderung konstan pada perlakuan enzim *chitosanase* 0,5% hingga 1,5% dan waktu inkubasi 5 jam. Sesuai dalam penelitian Yuniarta *et al.* (2010) dan Fennema (2006), bahwa jika produk yang dihasilkan sudah sampai titik batas dan setelah itu terlampaui maka produk yang dihasilkan tidak akan bertambah atau konstan meskipun konsentrasi enzim ditambahkan. Hal ini terjadi karena sisi aktif enzim telah jenuh oleh substrat sehingga tidak ada lagi substrat yang dapat melekat pada sisi aktif dan waktu inkubasi terlalu lama menghasilkan produk yang cenderung konstan karena enzim mengalami kejenuhan (Kurniadewi, 2016).

Derajat deasetilasi

Derajat deasetilasi merupakan proses penghilangan gugus asetil yang besar pada gugus asetamida (Mursida & Tasir, 2018). Rata-rata derajat deasetilasi chito oligosakarida dengan perlakuan konsentrasi enzim *chitosanase* dan waktu inkubasi antara 86,16% hingga 97,68% (Tabel 2).

Hasil pengujian derajat deasetilasi menunjukkan bahwa semakin tinggi konsentrasi enzim *chitosanase* dari 0,5% hingga 1,5% dan semakin lama waktu inkubasi dari 1 jam hingga 3 jam mampu meningkatkan derajat deasetilasi. Hal ini disebabkan semakin tinggi konsentrasi enzim yang ditambahkan dan semakin lama waktu inkubasi memberikan kesempatan enzim untuk bereaksi dengan substrat maka semakin banyak gugus asetil pada substrat kitosan yang dihidrolisis. Menurut Rahmawati & Yuniarta (2015) dan Ridhay (2016), semakin banyak konsentrasi enzim, substrat yang dipecah dan terhidrolisis juga semakin banyak. Kemudian, semakin lama waktu yang digunakan dalam proses, maka semakin lama proses reaksi, yang menyebabkan semakin banyak gugus asetil yang tereduksi.

Konsentrasi enzim yang terlalu tinggi serta diiringi dengan waktu inkubasi yang lama dapat membuat proses hidrolisis mengalami kejenuhan karena seluruh substrat telah terhidrolisis sehingga tidak terdapat lagi substrat yang dapat menempel pada sisi aktif enzim dan menghasilkan

viskositas yang cenderung konstan pada perlakuan enzim *chitosanase* 0,5% hingga 1,5% dan waktu inkubasi 5 jam. Sesuai dalam penelitian Yuniarta *et al.* (2010) dan Fennema (2006), bahwa jika produk yang dihasilkan sudah sampai titik batas dan setelah itu terlampaui maka produk yang dihasilkan tidak akan bertambah atau konstan

meskipun konsentrasi enzim ditambahkan. Hal ini terjadi karena sisi aktif enzim telah jenuh oleh substrat sehingga tidak ada lagi substrat yang dapat melekat pada sisi aktif dan waktu inkubasi terlalu lama menghasilkan produk yang cenderung konstan karena enzim mengalami kejenuhan (Kurniadewi, 2016).

Tabel 2. Analisa karakteristik chitooligosakarida pada berbagai kombinasi perlakuan

Kombinasi Perlakuan	Viskositas (cPs)	Derajat Deasetilasi (%)	Berat Molekul (Da)	Derajat Polimerisasi
K ₁ L ₁	3,05 ± 0,071 ^c	91,06 ± 0,002 ^b	1150,01 ± 79,355 ^f	4,81 ± 0,014 ^g
K ₁ L ₂	3,05 ± 0,071 ^c	91,23 ± 0,000 ^b	1039,87 ± 25,360 ^e	4,70 ± 0,000 ^f
K ₁ L ₃	2,75 ± 0,071 ^a	97,68 ± 0,000 ^g	546,99 ± 44,653 ^a	2,67 ± 0,000 ^a
K ₂ L ₁	3,35 ± 0,071 ^d	86,16 ± 0,000 ^a	1909,39 ± 149,878 ^g	10,70 ± 0,007 ^h
K ₂ L ₂	2,80 ± 0,141 ^a	96,20 ± 0,004 ^f	658,59 ± 23,977 ^a	3,31 ± 0,007 ^b
K ₂ L ₃	3,00 ± 0,141 ^b	92,72 ± 0,002 ^c	787,18 ± 18,441 ^c	4,07 ± 0,000 ^d
K ₃ L ₁	2,95 ± 0,071 ^a	96,12 ± 0,000 ^e	691,80 ± 22,985 ^b	3,51 ± 0,014 ^c
K ₃ L ₂	3,05 ± 0,071 ^c	94,63 ± 0,002 ^d	860,64 ± 24,225 ^d	4,51 ± 0,014 ^e
K ₃ L ₃	2,75 ± 0,071 ^a	97,59 ± 0,007 ^g	562,24 ± 23,087 ^a	2,69 ± 0,000 ^a

Keterangan: Angka yang diikuti dengan huruf berbeda pada satu kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang signifikan ($\alpha = 5\%$)

Berat molekul

Rata-rata berat molekul chito oligosakarida dengan perlakuan konsentrasi enzim *chitosanase* dan waktu inkubasi antara 546,99 Da hingga 1909,39 Da (Tabel 2). Hasil pengujian berat molekul menunjukkan bahwa semakin tinggi konsentrasi enzim *chitosanase* dari 0,5% hingga 1,5% dan semakin lama waktu inkubasi dari 1 jam hingga 3 jam memiliki kemampuan dalam menurunkan berat molekul. Hal ini disebabkan karena aktivitas enzim yang tinggi dan lama inkubasi dapat memberikan kesempatan enzim dalam proses pemutusan ikatan polimer semakin tinggi dan semakin banyak ikatan polimer yang terpotong menjadi monomer. Menurut Putri (2016) dan Rokhati *et al.* (2015), semakin tinggi konsentrasi enzim maka kecepatan reaksi akan meningkat. Bertambah banyak enzim yang mengkatalis reaksi pemutusan ikatan glikosida pada rantai kitosan. Semakin banyak ikatan polimer yang terpotong maka semakin turun berat molekul dari kitosan oligomer. Waktu inkubasi yang lebih lama menyebabkan hidrolisis berlangsung lebih lama

sehingga semakin banyak ikatan polimer yang terhidrolisis (Wijaya & Yuniarta, 2015).

Konsentrasi enzim yang terlalu tinggi serta diiringi dengan waktu inkubasi yang lama dapat membuat proses hidrolisis mengalami kejenuhan karena seluruh substrat telah terhidrolisis sehingga tidak terdapat lagi substrat yang dapat menempel pada sisi aktif enzim dan menghasilkan viskositas yang cenderung konstan pada perlakuan enzim *chitosanase* 0,5% hingga 1,5% dan waktu inkubasi 5 jam. Sesuai dalam penelitian Yuniarta *et al.* (2010) dan Fennema (2006), bahwa jika produk yang dihasilkan sudah sampai titik batas dan setelah itu terlampaui maka produk yang dihasilkan tidak akan bertambah atau konstan meskipun konsentrasi enzim ditambahkan. Hal ini terjadi karena sisi aktif enzim telah jenuh oleh substrat sehingga tidak ada lagi substrat yang dapat melekat pada sisi aktif dan waktu inkubasi terlalu lama menghasilkan produk yang cenderung konstan karena enzim mengalami kejenuhan (Kurniadewi, 2016).

Derajat polimerisasi

Derajat polimerisasi adalah jumlah unit monomer pada makromolekul atau molekul oligomer dalam suatu blok atau rantai. Nilai derajat polimerisasi diperoleh dari kadar total gula per kadar gula pereduksi (Mangunwidjaja *et al.*, 2014).

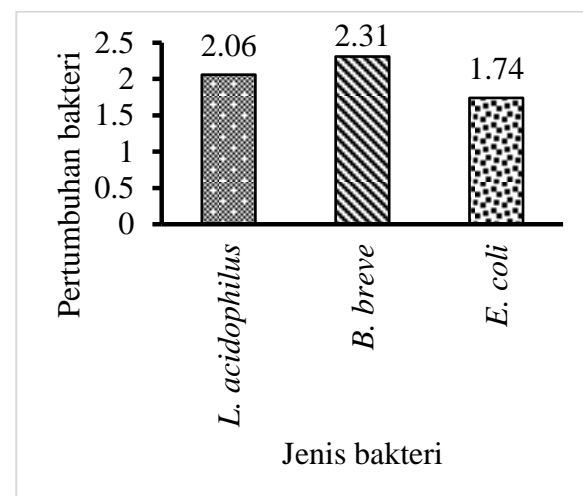
Rata-rata berat molekul chito oligosakarida dengan perlakuan konsentrasi enzim *chitosanase* dan waktu inkubasi antara 2,67 hingga 10,70 (Tabel 2). Hasil pengujian derajat polimerisasi menunjukkan bahwa semakin tinggi konsentrasi enzim *chitosanase* dari 0,5% hingga 1,5% dan semakin lama waktu inkubasi dari 1 jam hingga 3 jam mampu menurunkan derajat deasetilasi. Penurunan derajat polimerisasi terjadi akibat aktivitas enzim yang tinggi dan lamanya waktu inkubasi memberikan kesempatan enzim dalam proses hidrolisis kitosan yang berupa polimer menjadi COS yang memiliki 2 hingga 10 monomer karena banyaknya ikatan polimer yang terpotong. Secara tidak langsung, semakin tinggi aktivitas enzim yang ditambahkan dalam produksi oligosakarida maka semakin tinggi retensi yang dihasilkan dan semakin kecil nilai DP dan penambahan enzim dari berbagai konsentrasi enzim berhasil menghasilkan oligosakarida dengan nilai DP tidak lebih dari 10 monosakarida (Afni *et al.*, 2017). Selain itu, semakin lama waktu inkubasi menghasilkan rantai monomer yang pendek, semakin lama hidrolisis makin rendah nilai DP yang dihasilkan (Sarni *et al.*, 2016; Yeni *et al.*, 2018). Semakin banyak ikatan yang terpotong maka semakin turun DP (Handayani L *et al.*, 2013).

Konsentrasi enzim yang terlalu tinggi serta diiringi dengan waktu inkubasi yang lama dapat membuat proses hidrolisis mengalami kejenuhan karena seluruh substrat telah terhidrolisis sehingga tidak terdapat lagi substrat yang dapat menempel pada sisi aktif enzim dan menghasilkan viskositas yang cenderung konstan pada perlakuan enzim *chitosanase* 0,5% hingga 1,5% dan waktu inkubasi 5 jam. Sesuai dalam penelitian Yunianta *et al.* (2010) dan Fennema (2006), bahwa jika produk yang dihasilkan sudah

sampai titik batas dan setelah itu terlampaui maka produk yang dihasilkan tidak akan bertambah atau konstan meskipun konsentrasi enzim ditambahkan. Hal ini terjadi karena sisi aktif enzim telah jenuh oleh substrat sehingga tidak ada lagi substrat yang dapat melekat pada sisi aktif dan waktu inkubasi terlalu lama menghasilkan produk yang cenderung konstan karena enzim mengalami kejenuhan (Kurniadewi, 2016).

Aktivitas prebiotik

Aktivitas prebiotik merupakan kemampuan prebiotik untuk membantu pertumbuhan organisme yang dihubungkan dengan organisme lain dan dibandingkan dengan glukosa (Roberfroid, 2007). Pertumbuhan bakteri probiotik dan patogen dapat dilihat pada Gambar 1, sedangkan aktivitas prebiotik chito oligosakarida dengan perlakuan konsentrasi enzim 0,5% dan waktu inkubasi 5 jam disajikan pada Tabel 3.



Gambar 1. Pertumbuhan bakteri probiotik dan patogen

Tabel 3. Hasil analisa aktivitas prebiotik

Bakteri	Aktivitas prebiotik
<i>L. acidophilus</i>	1,18
<i>B. breve</i>	1,33

Gambar 1 menunjukkan bahwa media yang ditambah dengan chito oligosakarida dapat menumbuhkan bakteri probiotik dan menghambat pertumbuhan bakteri patogen. Nilai dari pertumbuhan bakteri tersebut menghasilkan aktivitas prebiotik sebesar

1,18 pada bakteri *L. acidophilus* dan sebesar 1,33 *B. Breve*. Aktivitas prebiotik pada bakteri probiotik *B. breve* lebih tinggi dibandingkan *L. acidophilus*, hal ini disebabkan *B. breve* memiliki enzim N-asetil glukosamida sehingga dapat memetabolisme N-asetilglukosamin pada chito oligosakarida dan menjadi sumber energi pada pertumbuhan. Sesuai dengan pernyataan Zuniga *et al.* (2018), bahwa *B. breve* memiliki gen yang mengkode N-asetil glukosamidase dalam metabolisme N-asetil glukosamin yang merupakan sumber karbon dan energi bagi bakteri, sedangkan pada bakteri *L. acidophilus* dengan genus *lactobacillus* tidak memiliki enzim tersebut.

Penghambatan pertumbuhan pada bakteri *E.coli* disebabkan bahwa salah satu monomer COS yaitu N-asetil glukosamin melekat pada lektin bakteri sehingga dapat mengganggu adanya pelekatan ligan target pada reseptor. Hal ini sesuai dengan pernyataan Quintero-Villegas *et al.* (2013), bahwa mekanisme COS dapat menghambat pertumbuhan bakteri *EPEC* (*Enteropathogenic Escherichia Coli*), secara khusus salah satu monomer COS yaitu GlcNAc atau N-asetilglukosamin mengganggu pelekatan ligan target pada reseptor (lektin bakteri) untuk melakukan adhesi atau pertahanan hidup.

KESIMPULAN

Chito Oligosakarida dengan perlakuan konsentrasi enzim 0,5% dan lama waktu inkubasi 5 jam menunjukkan hasil karakteristik terbaik, dengan memiliki nilai viskositas 2,75 cPs, nilai berat molekul 546,99 Da, nilai derajat polimerisasi 2,67, dan derajat deasetilasi 97,68%. Chito Oligosakarida ini memiliki aktivitas prebiotik pada *Lactobacillus acidophilus* dengan nilai sebesar 1,18 dan sebesar 1,33 pada bakteri *Bifidobacterium breve*.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terimakasih ditujukan kepada Universitas Pembangunan Nasional "Vete-

ran" Jawa Timur yang telah berkenan menyediakan tempat untuk pelaksanaan penelitian selama pandemi COVID-19 dan kepada pembimbing tugas akhir, serta keluarga dan teman-teman yang sudah memberikan motivasi dalam pelaksanaan tugas akhir ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Abidin, N. A. Z., Kormin, F., Abidin, N. A. Z., Anuar, N. A. F. M., & Bakar, M. F. A. (2020). The potential of insects as alternative sources of chitin: An overview on the chemical method of extraction from various sources. *International Journal of Molecular Sciences*. 21(14), 1–25.
- Afni, F. S., Purwaningsih, S., Nurilmala, M., dan Peranginangin, R. (2017). Produksi alginate oligosaccharides (aos) sebagai bahan probiotik menggunakan enzim alginat lyase. *Jphpi*. 20, 109–122.
- Akbari-Alavijeh, S., Shaddel, R., & Jafari, S. M. (2020). Encapsulation of food bioactives and nutraceuticals by various chitosan-based nanocarriers. *Food Hydrocolloids*. 105.
- Arias, J. L. de O., Schneider, A., Batista-Andrade, J. A., Vieira, A. A., Caldas, S. S., & Primel, E. G. (2018). Chitosan from shrimp shells: A renewable sorbent applied to the clean-up step of the method in order to determine multi-residues of veterinary drugs in different types of milk. *Food Chemistry*. 240, 1243–1253.
- Atma Y, Ramdhani H, Mustopa AZ, Pertiwi M, Maisarah R. (2018). Karakteristik fisikokimia gelatin tulang ikan patin (*Pangasius sutchi*) hasil ekstraksi menggunakan limbah buah nanas (*Ananas comosus*). *Agritech*. 38(1):56-63.
- Czechowska-Biskup, D., Jarosinska, D., Rokita, B., Ulanski, P., Rosiak, J.M. (2012). Determination of degree of deacetylation of chitosan-comparison of methods. *Progress on Chemistry*

- and Application of Chitin*. 17:5-20.
- Fawzya, Y. N., Sihotang, M. Y., Syarmalina, S., & Pratitis, A. (2009). Produksi kitooligosakarida menggunakan selulase dari trichoderma reesei dan bioaktivitasnya sebagai antibakteri. In *Jurnal Pascapanen dan Bioteknologi Kelautan dan Perikanan*. 4(2), 105.
- Fawzya, Y. N., Sihotang, M. Y., Syarmalina, S., & Pratitis, A. (2009). Produksi kitooligosakarida menggunakan selulase dari Trichoderma reesei dan bioaktivitasnya sebagai antibakteri. In *Jurnal Pascapanen dan Bioteknologi Kelautan dan Perikanan* 4(2), 105.
- Fernandes, J. C., Tavarina, F. K., Soares, J. C., Ramos, Ó. S., João Monteiro, M., Pintado, M. E., & Xavier Malcata, F. (2008). Antimicrobial effects of chitosans and kitooligosaccharides, upon Staphylococcus aureus and Escherichia coli, in food model systems. *Food Microbiology*. 25(7), 922–928.
- Fiamingo A, Delezuk JADM, Trombotto S, David L, Campana-Filho SP. (2016). Extensively deacetylated high molecular weight chitosan from the multistep ultrasound-assisted deacetylation of beta-chitin. *Ultrasonics Sonochemistry*. 32:79–85.
- Gao, X. A., Zhang, Y. F., Park, R. D., Huang, X., Zhao, X. Y., Xie, J., & Jin, R. De. (2012). Preparation of kitooligosaccharides from chitosan using crude enzyme of Bacillus cereus D-11. *Journal of Applied Biological Chemistry*. 55(1), 13–17.
- Hananto, F. H. (2013). Rancang bangun sensor viskositas cairan menggunakan strain gauge dengan prinsip silinder konsentris. *Jurnal Neutrino*. 87–94.
- Handayani L, H. P., Siwi, P. R., & Rokhati, N. (2013). Depolimerisasi kitosan dengan hidrolisis enzimatis menggunakan enzim α -amilase. *Jurnal Teknologi Kimia Dan Industri*. 2(4), 55–64.
- Harti, A. S. (2011). Kajian efek sinergik antara chito-oligosakarida (cos) dan probiotik (Lactobacillus acidophilus FNCC 0051) terhadap penurunan kadar kolesterol secara *in vivo*. *Jurnal Teknologi Hasil Pertanian Universitas Setia Budi Surakarta*. 4(1).
- Huebner, J., Wehling, R. L., & Hutkins, R. W. (2007). Functional activity of commercial prebiotics. *International Dairy Journal*. 17(7), 770–775.
- Islam, M. M., Shahruzzaman, M., Biswas, S., Nurus Sakib, M., & Rashid, T. U. (2020). Chitosan based bioactive materials in tissue engineering applications-A review. *Bioactive Materials*. 5(1), 164–183.
- Jeon, Y. J., & Kim, S. K. (2000). Production of kitooligosaccharides using an ultrafiltration membrane reactor and their antibacterial activity. *Progressive Fish-Culturist*. 41(11), 133–141.
- Khoushab, F., & Yamabhai, M. (2010). Chitin research revisited. *Marine Drugs*. 8(7), 1988–2012.
- Lee, H.W, Park, Y.S, Jung, J.S, & Shin, W.S. (2002). Chitosan Oligosaccharides, dp 2-8, have a prebiotic effect on the Bifidobacterium bifidum and Lactobacillus sp. *Anaerobe*. 8 319.
- Lodhi, G., Kim, Y., Hwang, J., Kim, S., Jeon, Y., Je, J., Ahn, C., Moon, S., Jeon, B., & Park, P. (2014). Kitooligosaccharide and its derivatives : preparation and biological applications. *IBoMed Research International*. 2014.
- Mangunwidjaja, D., Rahayuningsih, M., & Suparwati, R. (2014). Pengaruh konsentrasi enzim dan waktu hidrolisis enzimatis terhadap mutu frukto-oligosakarida dari inulin umbi dahlia (Dahlia pinata). *Agroindustri Indonesia*. 3(1), 190–199.
- Mohan, K., Muralisankar, T., Jayakumar, R., & Rajeevgandhi, C. (2021). A study on structural comparisons of α -chitin extracted from marine crustacean shell waste. *Carbohydrate Polymer Technologies and Applications*. 2(May 2020), 100037.

- Mursida, & Tasir, S. (2018). Efektifitas larutan alkali pada proses deasetilasi dari berbagai bahan baku kitosan. *JPHPI*. 21, 356–366.
- Nagasawa, H. (2012). The crustacean cuticle: Structure, composition and mineralization. *Frontiers in Bioscience – Elite*. 4 E(2), 711–720.
- Noviary, H. (2013). Pengaruh derajat deasetilasi kitosan dari cangkang belangkas (*tachypleus gigas*) yang diikat silang dengan modifikasi genipin. [Tesis]. Medan: Universitas Sumatera Utara.
- Nugraheni, N. T., Kusuma, K. N., Sari, R. Y., Sugiharto, A., Janah, R., Nisa, K., & Humam, A. Z. (2014). Penentuan berat molekul (Mn) polimer dengan metode viskositas. *Fisika Eksperimental Lanjut (Berat Molekul)*. 1-18.
- Nurhayati, Y., Abdul, A., Osman, H., Bakar, A., & Abdullah, C. (2016). Effect of chitosan oligosaccharides on the growth of *Bifidobacterium* species. *Malaysian Journal of Applied Sciences*. 1(1), 13–23.
- Putri, S. (2016). Karakterisasi enzim selulase yang dihasilkan oleh *Lactobacillus plantarum* pada variasi suhu, ph, dan konsentrasi substrat. [Tugas Akhir]. Malang: Universitas Islam Malang.
- Quintero-Villegas, M. I., Aam, B. B., Rupnow, J., Sørli, M., Eijsink, V. G. H., & Hutkins, R. W. (2013). Adherence inhibition of enteropathogenic *Escherichia coli* by chitooligosaccharides with specific degrees of acetylation and polymerization. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(11), 2748–2754.
- Rahmawati, A., & Yuniarta. (2015). hidrolisis enzimatik pati jahe emprit (*Zingiber officinale* var . *rubrum*) dengan enzim alfa amilase (kajian pengaruh konsentrasi enzim dan waktu inkubasi terhadap sifat fisik dan kimia dekstrin) enzymatically hydrolysis of emprit ginger (*Zingiber office*). *Jurnal Pangan Dan Agroindustri*. 3(3), 1252–1262.
- Ratanavaraporn, J., & Damrongsakkul, S. (2011). Osteogenic differentiation of bone-marrow-derived stem cells cultured with mixed gelatin and chitooligosaccharide scaffolds. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*. 22(November 2014), 1083–1098.
- Ridhay, A. (2016). Pengaruh waktu proses deasetilasi kitin dari cangkang bekicot (*Achatina fulica*) terhadap derajat deasetilasi [effect of chitin deacetylation processing times from shells of snails (*Achatina fulica*) to degree of deacetylation]. *Kovalen*. 2(1), 1–7.
- Ridho, F.A., Bambang R., Uju. (2017). Kitoooligosakarida melalui depolimerisasi kitosan dengan hidrogen peroksida untuk aplikasi biopreservatif pindang tradisional. *JPHPI*. 20(3).
- Roberfroid, M. (2007). Prebiotics: The concept revisited. *Journal of Nutrition*. 137(3).
- Rokhati, N., Pramudono, B., Istirokhatun, T., Sulchan, M., Dyah, Kresnianingrum, A., & Dewi, L. K. (2015). Enzim endo-glucanase dan cellobiohidrolase. *Reaktor*. 15(4), 261–267.
- Sarni, Natsir, H., & Dali, S., (2016). Produksi oligomer kitosan dari limbah udang windu (*Penaeus monodon*) menggunakan enzim kitosanase dari isolat bakteri *Klebsiella* sp. *Jurnal Techno* 4(2).
- Sartika, I. D., Amin, M., Noor, A., Nasution, E., Perikanan, F., & Airlangga, U. (2016). Isolasi dan karakterisasi kitosan dari cangkang rajungan (*Portunus pelagicus*). *Jurnal Biosains Pascasarjana*. 18(2), 98–112.
- Souripet, A. (2016). Potensi prebiotik nasi ungu. *AGRITEKNO: Jurnal Teknologi Pertanian*, 5(1), 18.
- Tanasale, M. F. J. D. P., Bijang, C. M., & Rumpakwara, E. (2019). Preparation of chitosan with various molecular

- weight and its effect on depolymerization of chitosan with hydrogen peroxide using conventional technique. *International Journal of ChemTech Research*. 12(1), 112–120.
- Trisnawati, E., Andesti, D., & Saleh, A. (2013). Pembuatan kitosan dari limbah cangkang kepiting sebagai bahan pengawet buah duku dengan variasi lama pengawetan. *Jurnal Teknik Kimia*, 19(2), 17–26.
- Van Der Meulen, T., Schipper, H., Van Den Boogaart, J. G. M., Huisling, M. O., Kranenbarg, S., & Van Leeuwen, J. L. (2006). Endurance exercise differentially stimulates heart and axial muscle development in zebrafish (*Danio rerio*). *American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology*. 291(4), 1040–1048.
- Wahyuni, I., Rojul, A. B., Nasocha, E., Rosyi, N. F., Nurul, Khusnia, & Ningsih, O. R. (2013). Penentuan berat molekul (Mn) polimer dengan metode viskositas. 1–5.
- Wijaya, J. C., & Yuniarta, Y. (2015). Pengaruh penambahan enzim bromelin terhadap sifat kimia dan organoleptik tempe gembus (kajian konsentrasi dan waktu inkubasi dengan enzim). *Jurnal Pangan Dan Agroindustri*. 3(1), 96–106.
- Yanti, R., Drastinawati, & Yusminar. (2018). Sintesis kitosan dari limbah cangkang kepiting dengan variasi suhu dan waktu pada proses deasetilasi. *Jom FTEKNIK*, 5(2), 1–7.
- Yeni, G., Silfia, S., & Hermianti, W. (2018). Pengembangan potensi tepung bengkuang (*Pachyrhizus erosus*) sebagai matriks enkapsulasi yang dimodifikasi melalui proses lintnerisasi untuk bahan baku kosmetik. *Prosiding Seminar Nasional I Hasil Litbangyasa Industri, Issn 2654-8550*, 155–161.
- Yuniarta, Sulistyoto, T., Estiasih, T., & Wulan, N. (2010). Hidrolisis secara sinergis pati garut (*Maranta arundinacea* L.) oleh enzim α -amilase, glukamilase, dan pullulanase untuk produksi sirup glukosa. *Jurnal Teknologi Pertanian*. 11(2), 78–86.
- Zuniga, M., Monedero, V., & Yebra, M. J. (2018). Utilization of host-derived glycans by intestinal *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species. *Frontiers in Microbiology*, 9(AUG), 1–23.