

**PEMANFAATAN EKSTRAK KASAR PROTEASE DARI ISI PERUT IKAN
LEMURU (*Sardinella* sp.) UNTUK DEPROTEINISASI LIMBAH UDANG
SECARA ENZIMATIK DALAM PROSES PRODUKSI KITOSAN**

SKRIPSI

diajukan guna melengkapi tugas akhir dan memenuhi salah satu syarat untuk menyelesaikan Program Studi Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam (S1) dan mencapai gelar Sarjana Sains Universitas Jember

Oleh

**Egik Tri Juniarso
NIM 021810301124**

**JURUSAN KIMIA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS JEMBER
2008**

RINGKASAN

Pemanfaatan ekstrak kasar protease dari isi perut ikan lemuru (*sardinella sp.*) untuk deproteinisasi limbah udang secara enzimatis dalam proses produksi kitosan; Egik Tri Juniarso; 2008; 64 halaman; Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.

Udang merupakan salah satu komoditas ekspor terbesar di Indonesia. Udang di ekspor dalam bentuk beku, dimana sekitar 60-70% adalah limbah. Dalam limbah udang (kulit, kepala dan ekor) terdapat tiga komponen besar yaitu protein, kalsium karbonat dan kitin. Kandungan kitin dalam cangkang udang sekitar 99,1%, kitin dapat dimanfaatkan lebih lanjut menjadi kitosan. Kitosan sangat bermanfaat di berbagai bidang karena dilihat dari strukturnya terdapat amina yang bersifat parsial positif kuat.

Pembuatan kitosan dari cangkang udang meliputi tiga tahap, yaitu pemisahan protein (deproteinisasi), demineralisasi dan deasetilasi. Deproteinisasi dalam penelitian ini dilakukan secara enzimatis menggunakan ekstrak kasar protease dari isi perut ikan lemuru (*Sardinella sp.*). Dilakukan uji aktivitas dan optimasi ekstrak kasar protease menggunakan substrat kasein, untuk mendapatkan kondisi optimal enzim dalam menghidrolisis protein. Ekstrak kasar protease untuk kondisi asam optimum pada pH 3 dan kondisi basa pada pH 9, serta optimum pada temperatur 50°C. Kondisi tersebut digunakan untuk deproteinisasi secara enzimatis dengan waktu inkubasi selama 90 menit. Penentuan waktu inkubasi tersebut diperoleh berdasarkan kandungan protein cangkang udang selama deproteinisasi secara enzimatis, diketahui melalui pengukuran kadar nitrogen total cangkang udang setiap rentang waktu 30 menit menggunakan metode Kjeldahl. Kadar nitrogen cangkang udang sebelum deproteinisasi secara enzimatis 2,10 persen setelah mengalami deproteinisasi secara enzimatis kadar nitrogennya sebesar 0,872 pada suasana asam (pH 3) dan 0,871 untuk suasana basa (pH 9). Demineralisasi adalah pemisahan mineral-mineral terutama kalsium karbonat menggunakan asam klorida. Kitin yang diperoleh selanjutnya

dipisahkan gugus asetilnya atau deasetilasi dengan penambahan natrium klorida, untuk mendapatkan senyawa turunannya yaitu kitosan. Identifikasi kitosan berdasarkan penentuan gugus fungsi menggunakan spektra FTIR. Spektra FTIR kitosan hasil penelitian dibandingkan kitosan pembanding Sigma Aldrich dengan derajat deasetilasi 85%.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa spektra FTIR kitosan memiliki spektra yang sangat identik dibandingkan dengan kitosan pembanding (Sigma Aldrich DD 85%). Terutama ditunjukkan untuk absorpsi gugus amina $-NH_2$ dan ikatan amida C-N yang merupakan absorpsi spesifik dari kitosan. Kitosan hasil deproteinisasi secara enzimatik pada kondisi asam (pH 3), absorpsi $-NH_2$ terdapat pada 3466.08 dan 1597.06 cm^{-1} dengan ikatan C-N pada 1658.78 cm^{-1} . Deproteinisasi pada kondisi basa dengan larutan buffer pH 9 menunjukkan gugus $-NH_2$ yang menyerap pada 3450.65 dan 1597.06 cm^{-1} , sedangkan ikatan C-N menyerap pada 1664.57 cm^{-1} .

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PERSEMBAHAN	ii
HALAMAN MOTTO	iii
HALAMAN PERNYATAAN	iv
HALAMAN PEMBIMBINGAN	v
HALAMAN PENGESAHAN	vi
HALAMAN RINGKASAN	vii
PRAKATA	ix
DAFTAR ISI	xi
DAFTAR TABEL	xiv
DAFTAR GAMBAR	xv
DAFTAR LAMPIRAN	xvi
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Tujuan Penelitian	3
1.4 Batasan Masalah	4
1.5 Manfaat Penelitian	4
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	6
2.1 Ikan Lemuru (<i>Sardinella</i> sp.)	6
2.2 Enzim	7
2.2.1 Klasifikasi Enzim	8
2.2.2 Karakteristik Protein Ikan	9
2.2.3 Mekanisme Katalisis Enzim	11
2.2.4 Enzim Proteolitik (Protease)	11

2.3 Udang	12
2.5 Kitosan	15
2.4.1 Sifat Kimia Kitosan	16
2.4.2 Teknik Isolasi Kitosan Dari Cangkang Udang (Hidrolisis Protein)	17
2.4.3 Deproteinisasi Secara Enzimatik	19
2.4.4 Pemanfaatan Kitosan	21
BAB 3. METODE PENELITIAN	23
3.1 Tempat dan Waktu Penelitian	23
3.2 Sampel Penelitian	23
3.3 Alat dan Bahan	23
3.4 Rancangan Penelitian	24
3.5 Prosedur Penelitian	25
3.5.1 Isolasi Protease Dari Isi Perut Ikan Lemuru (<i>Sardinella</i> sp.)	25
3.5.2 Uji Aktivitas Ekstrak Kasar Protease Dari Isi Perut Ikan Lemuru (<i>Sardinella</i> sp.) Menggunakan Substrat Kasein.	25
3.5.3 Optimasi Ekstrak Kasar Protease Dari Isi Perut Ikan Lemuru (<i>Sardinella</i> sp.) Dengan Variasi pH Dan Temperatur	25
3.5.4 Deproteinisasi secara kimia	26
3.5.5 Demineralisasi/Dekalsifikasi	26
3.5.6 Penentuan Kadar Nitrogen dengan Metode Kjeldahl	26
3.5.7 Dekolorisasi	27
3.5.8 Deasetilasi	27
3.6 Penyajian Dan Metode Analisis Data	28
BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN	29
4.1 Cangkang Udang Putih (<i>Pennaeus vannamei</i>)	29

4.2 Ekstrak Kasar Protease Dari Isi Perut Ikan Lemuru (<i>Sardinella</i> sp.)	30
4.3 Aktivitas dan Optimasi Ekstrak Kasar Protease Dari Isi Perut Ikan Lemuru (<i>Sardinella</i> sp.)	31
4.4 Kadar Nitrogen	34
4.4.1 Kadar Nitrogen Ekstrak Kasar Protease	36
4.4.2 Kadar Nitrogen Cangkang Udang Putih (<i>Pennaeus vannamei</i>)	36
4.4.3 Deproteinisasi Secara Kimia	37
4.4.4 Deproteinisasi Secara Enzimatik	37
4.5 Kitin Hasil Deproteinisasi Secara Enzimatik	39
4.6 Kitin Hasil Demineralisasi/Dekalsifikasi	40
4.7 Kitin Hasil Dekolorisasi	41
4.8 Kitin Terdeasetilasi	42
4.9 Kitosan	44
4.9.1 Karakteristik Spektra FTIR kitosan	44
4.9.2 Karakteristik Spektra FTIR dengan Larutan Buffer pH 3 dan pH 9 dibandingkan dengan kitosan standar	47
BAB 5. PENUTUP	48
5.1 Kesimpulan	48
5.2 Saran	49
DAFTAR PUSTAKA	50
LAMPIRAN	54

BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Budidaya udang saat ini telah berkembang dengan pesat sehingga udang dijadikan komoditas ekspor non migas yang dapat diandalkan dan merupakan biota laut yang bernilai ekonomis tinggi. Udang dimanfaatkan sebagai bahan makanan yang memiliki nilai gizi tinggi. Udang di Indonesia pada umumnya diekspor dalam bentuk beku yang telah dipisahkan bagian kepala, ekor dan kulitnya. Ketiga bagian tersebut merupakan limbah udang yang lebih lanjut lagi dapat dimanfaatkan menjadi senyawa kitosan. Walaupun demikian, hingga saat ini limbah tersebut belum diolah ataupun dimanfaatkan secara optimal sehingga menimbulkan pencemaran lingkungan, khususnya dari aspek bau dan mengurangi nilai estetika lingkungan.

Seperti telah disebutkan sebelumnya bahwa sebagian besar limbah udang yang dihasilkan dari proses pengolahan udang terdiri dari kepala, kulit maupun ekornya. Kulit udang mengandung protein (25%-40%), kitin (15%-20%) dan kalsium karbonat (45%-50%) (Morganof, 2003). Kitin diisolasi dari limbah udang melalui beberapa tahap. Isolasi kitin diawali oleh tahap pemisahan protein menggunakan larutan basa (deproteinisasi) dilanjutkan dengan demineralisasi dan terakhir pemutihan (*bleaching*) menggunakan aseton dan sodium hipoklorit. Kitin yang telah diperoleh ditransformasi menjadi kitosan melalui tahap deasetilasi dengan basa berkonsentrasi tinggi, pencucian, pengeringan dan penepungan hingga menjadi serbuk kitosan. Tahap awal pemisahan protein (deproteinisasi) pada kitin menggunakan larutan basa merupakan tahapan yang umum digunakan dalam pembuatan kitosan dari limbah udang. Deproteinisasi secara kimia yaitu dengan penambahan asam atau basa akan menimbulkan masalah dalam hal netralisasi sisa asam atau basa terhadap lingkungan. Penambahan larutan asam atau basa juga melibatkan temperatur yang cukup tinggi sehingga dapat merusak ikatan polisakarida

pada kitin. Kitin dan kitosan termasuk dalam jenis polisakarida, yaitu karbohidrat kompleks yang tidak larut dalam air. Kitin merupakan suatu jenis polimer kedua terbanyak setelah selulosa. Polisakarida-polisakarida tersebut berbeda dalam jenis monosakarida penyusunnya dan cara monosakarida-monosakarida berikatan membentuk polisakarida.

Terkait dengan hal tersebut, maka dalam penelitian ini, tahap pemisahan protein pada limbah udang menggunakan ekstrak kasar protease dari isi perut ikan lemuru (*Sardinella* sp.). Proses pemisahan yang terjadi nantinya melibatkan reaksi hidrolisis tanpa penggunaan temperatur yang cukup tinggi. Pemilihan isi perut ikan sebagai sumber enzim karena perut ikan mengandung berbagai enzim protease yang dapat menghidrolisis protein untuk menghasilkan produk berupa rantai polipeptida yang lebih sederhana, sehingga memiliki kelarutan yang lebih tinggi dalam pelarut polar.

Salah satu jenis ikan yang merupakan potensi terbesar di perairan Indonesia adalah ikan lemuru (*Sardinella* sp.), dengan kelimpahan terbesarnya di selat Bali, yaitu di Muncar, Banyuwangi, Jawa Timur. Produksi ikan lemuru mencapai 33.937 ton di tahun 2002. Ikan lemuru memiliki nilai ekonomis yang rendah dan tidak disukai konsumen karena berduri banyak, bersisik tebal, berdaging tipis dan mudah rusak. Ikan lemuru pada umumnya digunakan sebagai bahan ikan kaleng, tepung ikan, dan diolah menjadi pindang. Pengolahan ikan lemuru yang dikaleng tersebut akan menghasilkan limbah berupa isi perut ikan lemuru yang masih dapat dimanfaatkan lebih lanjut untuk menghasilkan ekstrak kasar protease.

Isi perut ikan sangat potensial digunakan sebagai sumber protease, karena dalam perut ikan terdapat organ pencernaan (sistem metabolisme) tempat protein dihidrolisis yang mengandung banyak protease. Beberapa protease dari isi perut ikan telah dilaporkan, seperti proteinase dari isi perut ikan *crayfish*, ikan *digfish*, ikan *mackerel* dan dari limpa tuna. Protease yang terdapat dalam isi perut ikan sangat bervariasi, bergantung pada jenis makanan dan spesies ikan tersebut. Bahkan dari

jenis ikan yang sama, terdapat protease yang berbeda (jumlah dan jenisnya) dalam setiap organ yang berlainan dari isi perutnya.

Kitosan adalah produk terdeasetilasi dari kitin yang merupakan biopolimer alami kedua terbanyak di alam setelah selulosa, yang banyak terdapat pada serangga, *crustacea*, dan fungi. Diperkirakan lebih dari 109-1010 ton kitosan diproduksi di alam tiap tahun. Indonesia sebagai negara maritim, sangat berpotensi menghasilkan kitin dan produk derivatnya. Limbah cangkang rajungan di Cirebon saja berkisar 10 ton perhari yang berasal dari sekurangnya 20 industri kecil. Kitosan tersebut masih menjadi limbah yang dibuang dan menimbulkan masalah lingkungan. Data statistik menunjukkan negara yang memiliki industri pengolahan kerang menghasilkan sekitar 56.200 ton limbah. Pasar dunia untuk produk derivat kitin menunjukkan bahwa oligomer kitosan adalah produk yang termahal, yaitu senilai \$ 60.000/ton.

Dilakukan karakterisasi ekstrak kasar protease dari isi perut ikan lemuru untuk mengetahui besarnya aktivitas protease dalam menghidrolisis protein limbah udang (deproteinisasi secara enzimatik), selanjutnya dilakukan tahap demineralisasi, dekolorisasi, deasetilasi untuk mengisolasi kitin dan menghasilkan kitosan.

1.2 Rumusan Masalah

Terdapat beberapa ruang lingkup permasalahan dalam penelitian ini, antara lain:

- 1.2.1 Berapakah aktivitas ekstrak kasar protease dari isi perut ikan lemuru (*Sardinella* sp.)?
- 1.2.2 Berapakah perbandingan kandungan nitrogen total pada limbah udang sebelum dan sesudah proses hidrolisis secara enzimatik menggunakan ekstrak kasar protease dari isi perut ikan lemuru (*Sardinella* sp.)?
- 1.2.3 Bagaimana spektra *infra red* kitosan yang dihasilkan dari limbah udang dengan proses deproteinasi secara enzimatik dibandingkan dengan kitosan pembanding (Sigma-Aldrich, DD 85%)?

1.3 Tujuan Penelitian

Beberapa tujuan yang hendak dicapai dalam serangkaian penelitian ini adalah:

- 1.3.1 Mengetahui besarnya aktivitas ekstrak kasar protease dari isi perut ikan lemuru (*Sardinella* sp.).
- 1.3.2 Mengetahui perbandingan kandungan nitrogen total pada limbah udang sebelum dan sesudah proses hidrolisis secara enzimatik menggunakan ekstrak kasar protease dari isi perut ikan lemuru (*Sardinella* sp.).
- 1.3.3 Mengetahui spektra *infra red* kitosan yang dihasilkan dari limbah udang dengan proses deproteinasi secara enzimatik dibandingkan dengan kitosan pembanding (Sigma-Aldrich, DD 85%).

1.4 Batasan Masalah

Batasan masalah dalam penelitian ini adalah:

- 1.4.1 Isi perut ikan yang digunakan dalam penelitian ini adalah isi perut ikan lemuru (*Sardinella* sp.), yang akan digunakan sebagai sumber ekstrak kasar protease dalam hidrolisis protein limbah udang. Isi perut ikan lemuru diperoleh dari tempat pelelangan ikan (TPI) di Kecamatan Puger, Kabupaten Jember.
- 1.4.2 Pada pengujian aktivitas ekstrak kasar protease dari isi perut ikan lemuru (*Sardinella* sp.) digunakan larutan standar kasein.
- 1.4.3 Limbah udang yang digunakan merupakan jenis limbah udang galah yang diperoleh dari tempat penjualan udang di Jember.
- 1.4.4 Dilakukan pula tahap deproteinisasi secara kimia menggunakan larutan NaOH 3, 5 %, sesuai metode Prasetyo (2004).
- 1.4.5 Kitosan pembanding yang digunakan dalam penelitian ini adalah kitosan cangkang udang dengan derajat deasetilasi 85 % (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA).

1.5 Manfaat Penelitian

Penelitian ini dilakukan untuk memberikan informasi mengenai aktivitas ekstrak kasar protease yang terkandung dalam isi perut ikan lemuru (*Sardinella* sp.) sebagai enzim yang mengkatalisis proses hidrolisis protein dalam limbah udang. Setelah pemisahan protein secara enzimatik (deproteinisasi) dilakukan beberapa proses selanjutnya untuk menghasilkan kitosan yang memiliki aplikasi tinggi.

BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Ikan Lemuru (*Sardinella sp.*)

Ikan-ikan lemuru yang tertangkap di perairan Indonesia terdiri dari beberapa jenis yang dalam statistik perikanan Indonesia digabung menjadi satu dengan nama lemuru (*S. longiceps* Valenciennes). Jenis-jenis ikan tersebut adalah *S. longiceps* Valenciennes, *S. aurita* non Valenciennes, *S. leiogaster*, *S. clupeoides*, *S. sirm*, *S. fimbriata* dan *S. lemuru* (Sinonim: *Amblygaster posterus* Whitley, *Clupea nymphaea* Richardson, *S. aurita* non Valenciennes, *S. longiceps* non Valenciennes, *S. samarensis* Roxas). Berdasarkan hasil revisi nama yang digunakan untuk *S. longiceps* Valenciennes adalah *S. lemuru* Bleeker, 1853, sedangkan nama internasionalnya adalah *Bali Sardinella*. Ikan lemuru banyak ditangkap di perairan laut Jawa dan selat Bali (Burhanuddin *et al*, 1984). Ikan lemuru memiliki nilai ekonomis yang relatif rendah karena mudah membusuk dan bersisik banyak sehingga kurang disukai untuk dikonsumsi dalam bentuk segar.



Sumber: Anonim, 2007

Gambar 2.1 Ikan Lemuru (*Sardinella lemuru* Bleeker, 1853)

Secara ilmiah ikan lemuru diklasifikasikan dalam:

Kingdom : Animalia
 Philum : Chordata
 Subphilum : Vertebrata

Kelas	: Actinopterygii
Orde	: Clupeiformes
Famili	: Clupeidae
Genus	: Sardinella
Spesies	: <i>Sardinella lemuru</i> Bleeker, 1853

Ikan lemuru memiliki bentuk badan memanjang dan bagian perut sebelum sirip perut membulat. Badan berwarna keperakan dengan biru gelap pada bagian belakang, tidak terdapat bercak gelap pada dasar sirip punggung, pinggiran tepi sirip ekor berwarna gelap.

Ikan lemuru terdapat di perairan pantai dan pelagis, memakan phytoplanton dan zooplankton. Panjang maksimum dapat mencapai 20 cm. Daerah penyebarannya terdapat di samudra Hindia bagian timur dan Pasifik bagian barat, laut cina selatan, Indonesia bagian barat, Australia bagian barat, Filipina, China, Taiwan dan Jepang bagian selatan. *Sardinella lemuru* mudah dibedakan dari semua *clupeid* lainnya dengan 9 jari-jari sirip perutnya. Kandungan ikan lemuru dalam 100 gram ikan dapat dijelaskan pada tabel 2.1 di bawah ini:

Tabel 2.1. Komposisi Kimia Lemuru tiap 100 gram

Komponen	Jumlah
Air (gram)	76
Protein (gram)	20
Lemak (gram)	3
Karbohidrat (gram)	0
Ca ²⁺ (mg)	20
Fosfor (mg)	100
Fe (mg)	1
Vitamin A (SI)	100
Vitamin B1 (mg)	0,05

Sumber: Direktorat Gizi Departemen Kesehatan R.I., 1992; Sasangka, 1997.

2.2 Enzim

Enzim merupakan unit fungsional dari metabolisme sel yang bekerja dengan urutan-urutan yang teratur. Enzim memiliki tenaga katalitik yang besar, biasanya jauh

lebih besar dari katalisator sintetik. Enzim mengkatalisis reaksi kimia spesifik dengan cara menurunkan energi bebas aktivasi. Spesifitas enzim amat sangat tinggi terhadap substratnya. Enzim mempercepat reaksi kimiawi spesifik tanpa pembentukan produk samping dan molekul ini berfungsi dalam larutan encer pada keadaan suhu dan pH normal (Lehninger, 1998:235).

2.2.1 Klasifikasi Enzim

Enzim digolongkan berdasarkan reaksi yang dikatalisis, banyak enzim yang telah dinamakan dengan menambahkan akhiran -ase- kepada nam substratnya. Urase mengkatalisis hidrolisis urea, arginase mengkatalisis hidrolisis arginin dan protease mengkatalisis hidrolisis protein. Banyak juga enzim yang telah dinamakan dengan tidak menerangkan substratnya, seperti pepsin dan tripsin. Terdapat pula satu enzim yang sama dikenal dengan dua atau lebih nama, sehingga untuk hal-hal tersebut dan juga terus meningkatnya jumlah enzim yang baru ditemukan, suatu dasar penemuan da penggolongan enzim secara sistematis telah dikemukakan oleh persetujuan internasional. Sistem ini menempatkan semua enzim ke dalam enam kelas utama, masing-masing dengan subkelas, berdasarkan atas jenis reaksi yang dikatalisis, sesuai tabel 2.2. Tiap-tiap enzim ditetapkan ke dalam empat tingkat nomor kelas dan diberikan suatu nama sistematis, yang mengidentifikasi reaksi yang dikatalisis (Lehninger, 1998:238).

Tabel 2.2. Klasifikasi Enzim secara Berdasarkan atas Reaksi yang Dikatalisis

Kelas	Jenis Reaksi Yang Dikatalisis
Oksidoreduktase	Pemindahan elektron
Transferase	Reaksi pemindahan gugus fungsional
Hidrolase	Reaksi hidrolisis (pemindahan gugus fungsional ke air)

Kelas	Jenis Reaksi Yang Dikatalisis
Isomerase	Pemindahan gugus di dalam molekul, menghasilkan bentuk isomer
Ligase	Pembentukan ikatan C-C, C-S dan C-N oleh reaksi kondensasi yang berkaitan dengan penguraian ATP

2.2.2 Aktivitas Enzim

Holme dan Peck (1998:280) menyatakan bahwa aktivitas enzim merupakan banyaknya mol substrat yang diubah/dikatalisis oleh enzim per satuan waktu. Aktivitas enzim dapat menggambarkan besarnya konsentrasi enzim dalam suatu medium. Terdapat beberapa istilah yang menjelaskan tentang aktivitas enzim, yaitu: unit aktivitas enzim, aktivitas spesifik dan angka pergantian (*turnover number*). Menurut perjanjian internasional, satu unit aktivitas enzim adalah jumlah enzim yang menyebabkan perubahan 1 μmol (10^{-6} mol) substrat per menit pada suhu 25 °C dalam kondisi optimumnya. Aktivitas spesifik adalah jumlah unit aktivitas enzim per miligram protein. Aktivitas spesifik merupakan suatu ukuran kemurnian enzim, nilainya meningkat selama kemurnian suatu enzim dan menjadi maksimal serta konstan jika enzim sudah berada pada keadaan murni (Lehninger, 1998). Angka pergantian (*turnover number*) adalah angka yang menunjukkan jumlah molekul substrat yang diubah menjadi produk per satuan waktu oleh satu molekul enzim (Wirahadikusumah, 1989:62).

Penentuan aktivitas enzim dapat dilakukan dengan menggunakan berbagai metode. Metode yang akan digunakan harus menyesuaikan dengan reaksi yang berlangsung dalam katalisis enzim bersangkutan. Menurut Holme dan Peck (1998:282-294) ada beberapa metode yang dapat digunakan untuk memonitoring katalisis enzim (menentukan aktivitas enzim), yaitu: metode gasometri, spektrofotometri, fluorimetri, luminescence, elektrokimia dan mikrokalorimetri. Metode yang paling banyak digunakan untuk pengukuran aktivitas enzim protease

pada daerah pengukuran ultraviolet yaitu 280 nm. Absorbansi ini akibat adanya absorbansi oleh asam amino aromatik. Pengukuran aktivitas enzim protease dapat juga pada daerah tampak atau visible yaitu panjang gelombang 500-750 nm, dimana penyerapannya didasarkan pada kompleks warna yang dihasilkan dari reduksi reagen Folin oleh tirosin.

Faktor-faktor yang mempengaruhi aktivitas enzim antara lain konsentrasi enzim, waktu inkubasi, konsentrasi ion hidrogen (H^+), kadar air dan temperatur.

1. Pengaruh konsentrasi enzim

Konsentrasi enzim rendah tidak semua substrat diikat oleh enzim sehingga aktivitas enzim menurun. Konsentrasi enzim berbanding lurus dengan kecepatan reaksi, jika konsentrasi enzim dinaikkan maka semakin banyak substrat yang terikat sehingga kecepatan reaksi bertambah. Keadaan ini berlangsung sampai mencapai tingkat kecepatan reaksi maksimum, dimana semua enzim mengikat substrat atau semua enzim telah jenuh. Enzim dikatakan jenuh apabila produk yang dihasilkan menurun.

2. Pengaruh waktu inkubasi

Semakin waktu inkubasi menyebabkan daya kerja enzim untuk mengkatalisis lebih lama sehingga produk yang dihasilkan semakin besar.

3. Pengaruh pH

Enzim adalah protein yang tersusun atas asam amino maka pengaruh pH berhubungan erat dengan sifat asam basa yang dimiliki protein, secara umum enzim menunjukkan aktivitas optimal pada kisaran pH optimal spesifik untuk jenis enzim tertentu. Penggunaan pH yang terlalu tinggi atau rendah akan menyebabkan terjadinya perubahan yang disebut denaturasi protein.

4. Pengaruh suhu

Kenaikan suhu akan meningkatkan kecepatan reaksi sampai batas tertentu. Tiap naik $10\text{ }^{\circ}\text{C}$ kecepatan reaksinya naik dua kali lipat. Kenaikan suhu di atas suhu optimum akan menyebabkan denaturasi enzim. Setiap enzim memiliki suhu

optimum, diatas dan dibawah suhu tersebut aktivitas enzim berkurang karena energi kinetik yang diperlukan untuk interaksi substrat dan enzim rendah.

2.2.3 Mekanisme Katalisis Enzim

Enzim adalah suatu katalisator, molekul ini meningkatkan dengan nyata kecepatan reaksi kimia spesifik yang tanpa enzim akan berlangsung lebih lambat. Enzim tidak dapat mengubah titik kesetimbangan reaksi yang dikatalisisnya, enzim juga tidak akan habis dipakai atau diubah secara permanen oleh reaksi-reaksi tersebut.

Salah satu faktor yang mempengaruhi kecepatan reaksi adalah dengan menambahkan katalisator. Katalisator termasuk enzim dapat meningkatkan kecepatan reaksi dengan cara menurunkan batas penghalang energi. Kerja enzim juga membentuk kompleks enzim-substrat, tetapi memiliki energi aktivasi yang lebih rendah dalam keadaan transisi dibandingkan dengan keadaan transisi tanpa enzim. Kompleks enzim-substrat lalu bereaksi membentuk produk, dengan cara demikian mekanisme katalisis enzim sebagai katalisator menurunkan energi aktivasi reaksi-reaksi kimia dan meningkatkan fraksi molekul di dalam suatu populasi molekul katalisator (Stryer Lubert, 1995:207).

2.2.4 Enzim Proteolitik (Protease)

Enzim protease memiliki variasi pemilihan substrat yang lebih luas atau berbeda dalam hal aktivitasnya terhadap ikatan-ikatan peptida protein. Protease adalah enzim dengan massa molekuler kecil berkisar $15 \times 10^3 - 35 \times 10^3$ Dalton, kecuali untuk leusin aminopeptidase dengan molekul $\sim 250 \times 10^3$ Dalton (Winarno, 1995).

Bergman dan Futon (Winarno, 1995) merekomendasikan dua kelompok utama enzim protease yaitu golongan eksopeptidase (eksoprotease) dan endopeptidase (endoprotease). Eksopeptidase dibagi menjadi karboksi(ekso)peptidase dan amino(ekso)peptidase yang berturut-turut memotong peptida dari arah gugus

karbonil terminal dan gugus amino terminal, sedangkan endopeptidase memecah protein atau ikatan peptida dari dalam (internal) peptida.

Berdasarkan sumbernya, enzim protease dikategorikan menjadi tiga yaitu hewani, nabati dan mikroba (bakteri, ragi dan kapang). Enzim protease nabati meliputi papain, fisin dan bromelin, sedangkan pepsin, rennin, kolagenase hewan, tripsin, kimotripsinogen dan elastase bersumber dari hewani, serta yang bersumber dari mikroba seperti kimopapain, elastase, keratinasew, kolagenase bakteri, subtilisin, scytilidopepsin B ragi dan rennet mikroba (Winarno, 1995).

2.3 Udang

Udang merupakan anggota filum Arthropoda, sub filum Mandibulata dan tergolong dalam kelas Crustacea. Seluruh tubuh terdiri dari ruas ruas yang terbungkus oleh kerangka luar atau *eksoskeleton* dari zat tanduk atau kitin dan diperkuat oleh bahan kapur kalsium karbonat (Soetomo, 1990). Sebagian besar limbah udang yang dihasilkan oleh usaha pengolahan udang berasal dari kepala, kulit dan ekornya. Kulit udang mengandung protein (25%-40%), kitin (15%-20%) dan kalsium karbonat (45%-50%) (Marganof, 2003).

Crustacea merupakan sumber utama kitin, telah dilaporkan beberapa jenis *crustacea* yang merupakan sumber kitin seperti udang kecil *Panulirus japonicus* Kishinouye dan *Panulirus penicillatus*, udang laut *Orconectes obscurus*, *Artemia salina* dan *Orconectes virilis*, udang *Astacus fluviatilis*, *spiny lobster*, udang-udangan antartika, kepiting *dungeness crab (Cancer magister)*, udang Pasifik (*Pandalus borealis*), kepiting *purple shorecrab (Hemigrapsus nudus, Maja* dan *Cancer magister)*, kepiting batu (*Menippe mercenaria*), kepiting biru (*Callinectes sapidus*), kepiting merah (*Geryon quirkedons*), kepiting *horseshoe (Limulus polyphemus)*.

Budidaya udang saat ini telah berkembang dengan pesat sehingga udang dijadikan komoditas ekspor non migas yang dapat diandalkan dan merupakan biota laut yang bernilai ekonomis tinggi. Udang pada umumnya dimanfaatkan sebagai bahan makanan yang memiliki nilai gizi tinggi. Udang di Indonesia pada umumnya

diekspor dalam bentuk beku yang telah dibuang kepala, ekor dan kulitnya. Limbah udang dapat dimanfaatkan menjadi senyawa kitosa, namun sampai saat ini limbah tersebut belum diolah dan dimanfaatkan secara maksimal sehingga menyebabkan pencemaran lingkungan khususnya bau dan estetika lingkungan yang buruk.

Cangkang udang sebagai sumber potensial kitin mengandung 30-40% protein, 30-50% kalsium karbonat (CaCO_3), dan 20-30% kitin, dimana kandungan tersebut bervariasi tergantung spesies dan musim (Cho *et al.*, 1998); sedangkan menurut Prasetyo (2004) cangkang udang mengandung sekitar 99,1% kitin.

Kandungan kitin dari kulit udang lebih sedikit dibandingkan dengan kulit atau cangkang kepiting. Kandungan kitin pada limbah kepiting mencapai 50%-60%, sementara limbah udang menghasilkan 42%-57%, sedangkan cumi-cumi dan kerang, masing-masing 40% dan 14%-35%. Komponen-komponen tersebut bahan baku yang mudah diperoleh adalah udang, maka proses kitin dan kitosan biasanya lebih memanfaatkan limbah udang (Anonymous, 2003).

Usaha pengolahan udang menghasilkan limbah udang sebesar 30% - 75% yang terbuang percuma tanpa diolah bahkan menyebabkan pencemaran. Jumlah tersebut sangat besar untuk ukuran limbah industri. Udang bukan merupakan satu-satunya sumber kitin. Rajungan merupakan hewan laut yang cangkangnya juga mengandung kitin bahkan lebih besar daripada udang. Namun ada beberapa faktor yang mendasari pemilihan udang sebagai bahan baku pembuatan kitosan. Perbandingan antara udang dan rajungan sebagai bahan baku pembuatan kitosan ditunjukkan pada tabel 2.3.

Tabel 2.3. Perbandingan Produksi Kitosan Dari Udang dan Rajungan

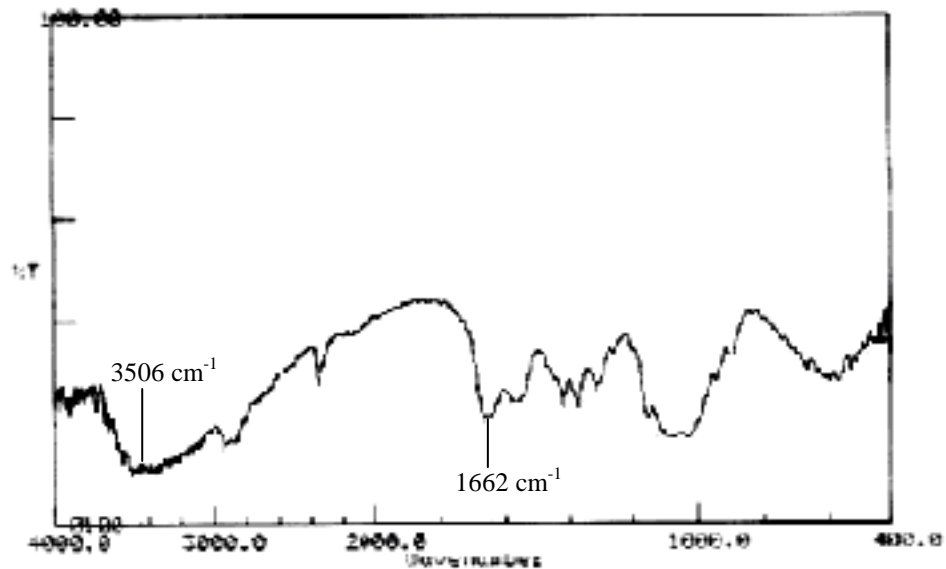
Parameter	Udang	Rajungan
Jumlah produksi tahun 1997	398.190 ton*	16.433 ton*
Kandungan kitin	42%-57%**	50%-60%**
Limbah yang dihasilkan industri pengolahan	30%-75%***	25%-50%***

Sumber: * BPS, ** Marganof, (2003), *** Hartati, Tri,Rakhmadioni, dan Loekito, (2002) .

Proses pengolahan udang lebih mudah daripada rajungan walaupun rajungan memiliki kandungan kitin lebih besar daripada udang. Persediaan bahan baku yaitu limbah udang yang besar dengan kandungan kitin yang rendah dapat menghasilkan kitosan yang lebih banyak daripada dengan menggunakan limbah rajungan yang bahan baku yaitu limbahnya sedikit walaupun kitin yang dihasilkan lebih banyak dari udang. Mempertimbangkan faktor-faktor pada tabel 2.2. diatas tentang perbandingan kitosan dari udang dan rajungan di atas, maka dapat diketahui bahwa limbah udang sangat berpotensi untuk diolah menjadi kitosan.

Kitosan yang ada di pasar Indonesia berasal dari Korea, India dan Jepang. Melihat besarnya potensi limbah udang untuk dimanfaatkan, Indonesia sebagai negara penyedia udang seharusnya mampu mengolah limbah udang yang dihasilkan secara maksimal menjadi kitosan Kitosan dapat dimanfaatkan dalam pengolahan limbah cair industri, karena kitosan memiliki sifat dapat menyerap logam berat dan menjernihkan limbah cair industri.

Penelitian sebelumnya melakukan isolasi kitin dari cangkang udang air tawar (*Macrobrachium sintangense* de man.). Spektra FTIR dari kitin tersebut ditunjukkan pada gambar 2.2 berikut



Gambar 2.2. Spektra FTIR kitin hasil isolasi dari cangkang udang

Gambar tersebut menunjukkan bahwa suatu amina sekunder akan memperlihatkan sebuah pita absorpsi kuat pada daerah $3500\text{-}3100\text{ cm}^{-1}$ atau pada $3506,90\text{ cm}^{-1}$. Pita ini menunjukkan jenis regangan N-H. Ikatan amida C-N menyerap pada bilangan gelombang 1662 cm^{-1} . Regang C-H terlihat pada bilangan gelombang $2935, 1377,$ dan 1321 cm^{-1} , sedangkan regang hidroksil -OH (sekunder) pada 1419 cm^{-1} (Erfani, D.A, 2005).

2.4 Kitosan

Kitosan adalah produk terdeasetilasi dari kitin yang merupakan biopolimer alami kedua terbanyak di alam setelah selulosa, yang banyak terdapat pada serangga, krustasea, dan fungi. Kitosan merupakan suatu polimer yang tersusun dari beberapa monomer yaitu D-glukosamin.

Diperkirakan lebih dari 109-1010 ton kitosan diproduksi di alam tiap tahun. Sebagai negara maritim, Indonesia sangat berpotensi menghasilkan kitin dan produk turunannya. Limbah cangkang rajungan di Cirebon saja berkisar 10 ton perhari yang berasal dari sekurangnya 20 industri kecil. Kitosan tersebut masih menjadi limbah yang dibuang dan menimbulkan masalah lingkungan. Data statistik menunjukkan

negara yang memiliki industri pengolahan kerang menghasilkan sekitar 56.200 ton limbah. Pasar dunia untuk produk turunan kitin menunjukkan bahwa oligomer kitosan adalah produk yang termahal, yaitu senilai \$ 60.000/ton (Meidina *et.al*, 2006).

2.4.1 Sifat Kimia Kitosan

Kitin dan kitosan adalah salah satu dari polisakarida di dalam unit dasar suatu gula amino. Polisakarida ini adalah suatu struktural unsur yang memberikan kekuatan mekanik organisme. Kitin tidak dapat larut dalam air, pelarut organik alkali atau asam mineral encer, tetapi dapat larut dan terurai dengan adanya enzim atau dengan pengolahan asam mineral padat. Struktur kitin terdiri dari sebuah rantai panjang dari N-asetilglukosamin. Rumus empirisnya adalah $C_6H_6CNHCOCH_3$ dan berisi campuran murni 6,9 % Nitrogen. Polimer ini adalah serupa selulosa diganti oleh suatu asetil amino ($NHCOCH_3$) unit.

Kitosan atau kitin terdeasetilasi terbentuk apabila sebagian besar gugus asetil pada kitin disubstitusikan oleh hidrogen menjadi gugus amino dengan persen bahan larutan hasil kuat berkonsentrasi tinggi. Kitosan bukan merupakan senyawa tunggal, tetapi merupakan kelompok yang terdeasetilasi sebagian dengan derajat polimerasi yang beragam.

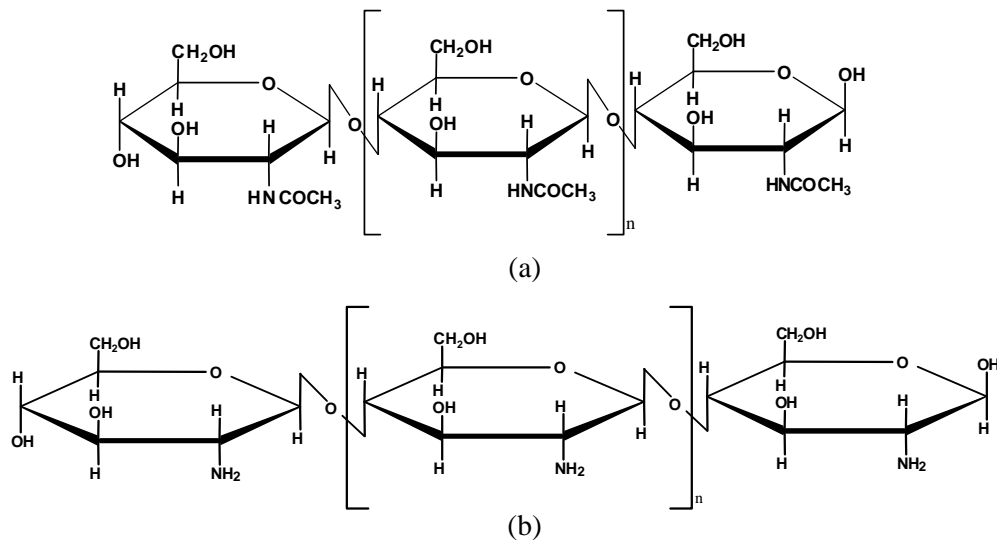
Kitin dan kitosan adalah nama untuk dua kelompok senyawa yang tidak dibatasi dengan stoikiometri pasti, kitin adalah poli N-asetil glukosamin yang terdeasetilasi sedikit, sedang kitosan adalah kitin yang terdeasetilasi sebanyak mungkin, tetapi tidak cukup sempurna untuk dinamakan poli glukosamin.

. Kitosan yang disebut juga dengan β -1,4-2 amino-2-dioksi-D-glukosa merupakan senyawa yang tidak larut dalam air, larutan basa kuat, sedikit larut dalam HCl, HNO₃, dan 0,5% H₃PO₄ dan tidak larut dalam H₂SO₄. Kitosan juga tidak larut dalam beberapa pelarut organik seperti alkohol, aseton, dimetil formamida dan dimetilsulfoksida tetapi kitosan larut baik dalam asam format berkonsentrasi (0,2 - 100)% dalam air. Kitosan tidak beracun, mudah mengalami biodegradasi dan bersifat polielektrolitik. Disamping itu kitosan dapat dengan mudah berinteraksi dengan zat-

zat organik lainnya seperti protein. Oleh karena itu, kitosan relatif lebih banyak digunakan pada berbagai bidang industri terapan dan industri kesehatan.

Berat molekul kitosan adalah sekitar $1,2 \times 10^5$, bergantung pada degradasi yang terjadi selama proses deasetilasi. Sifat-sifat kitosan dihubungkan dengan adanya gugus-gugus amino dan hidroksil yang terikat. Adanya gugus tersebut menyebabkan kitosan mempunyai reaktifitas kimia yang tinggi dan penyumbang sifat polielektrolit kation, sehingga dapat berperan sebagai amino pengganti (amino exchanger).

Beberapa kitin mempunyai kemampuan yang sama dengan kitosan. Kitosan adalah sama dengan kitin tetapi beberapa kelompok acetyl ($-\text{COCH}_3$), juga didapat cincin pada mata rantai unit glukosamin ($\text{C}_6\text{H}_9\text{O}_6\text{NH}_2$) bersama-sama seperti kitin, yang ditunjukkan oleh gambar 2.3. berikut



Gambar 2.3. Struktur molekul dari kitin (a) dan kitosan (b)

2.4.2 Teknik Isolasi Kitosan dari Cangkang Udang

Isolasi kitin dari limbah udang dilakukan secara bertahap. Tahap awal dimulai dengan pemisahan protein dengan larutan basa, demineralisasi, pemutihan (*bleaching*) dengan aseton dan natrium hipoklorit. Transformasi kitin menjadi kitosan dilakukan tahap deasetilasi dengan basa berkonsentrasi tinggi, pencucian,

pengeringan dan penepungan hingga menjadi kitosan bubuk. Kitin merupakan zat padat yang tak berbentuk (*amorphous*), tak larut dalam air, asam anorganik encer, alkali encer dan pekat, alkohol, dan pelarut organik lainnya dan bersifat polikationik. Secara kimiawi kitin merupakan polimer (1-4)-2-asetamido-2 deoksi-B-D-glukosamin yang dapat dicerna oleh mamalia.

Secara spesifik isolasi kitin hanya melibatkan dua tahap yaitu demineralisasi dan deproteinisasi yang meliputi pelarutan kalsium karbonat (CaCO_3) dengan asam klorida (HCl) 1,0 N serta pelepasan protein dengan NaOH 3% (Prasetyo, 2004).

Demineralisasi merupakan proses yang dilakukan untuk menyingkirkan kalsium karbonat sebagai kalsium klorida melalui penambahan asam klorida (HCl) pada konsentrasi tinggi atau asam format (HCOOH) 90%. Terbentuk busa berlebih yang tidak diinginkan selama proses demineralisasi, berkaitan dengan terbebasnya karbon dioksida CO_2 ($\text{CaCO}_3 + 2 \text{HCl} \rightarrow \text{CaCl}_2 + \text{CO}_2 \uparrow + \text{H}_2\text{O}$). Hal tersebut akan menimbulkan problem seperti berkurangnya produk, reduksi kapasitas ruang wadah karena meningkatnya kebutuhan ruang wadah kosong, hingga lambatnya laju proses (Prasetyo, 2004).

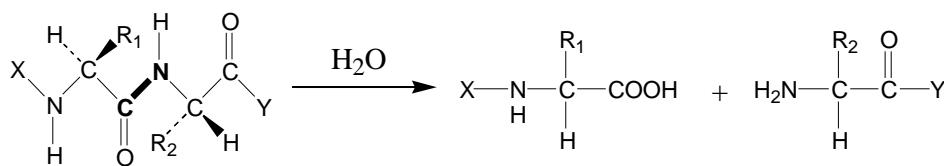
Deproteinisasi merupakan proses berikutnya yang bertujuan untuk memisahkan kitin dari kompleksnya dengan protein (kitinoprotein). Umumnya proses ini dilakukan dengan menambahkan natrium hidroksida (NaOH) 1-10% pada temperatur tinggi ($65\text{-}100^\circ\text{C}$) untuk melarutkan protein yang terkandung dalam kitin (Prasetyo, 2004).

Dekolorasi merupakan tahap eliminasi pigmen dari cangkang udang. Spesies-spesies *crustacea* bercangkang memiliki pigmen yang menyebabkan cangkangnya tampak berwarna. Pigmen tersebut berikatan dengan kitin cangkang melalui pembentukan suatu kompleks, yaitu derivat 4-keto dan 4,4'-diketo- β -karoten dengan derajat kompleksasi yang bervariasi antar spesies *crustacea* (Fernandez-Kim, S.O, 2004).

Tahap selanjutnya adalah deasetilasi kitin, merupakan proses perubahan kitin menjadi kitosan melalui pelepasan gugus asetilnya. Beberapa faktor penting yang mempengaruhi tingginya derajat deasetilasi seperti temperatur dan waktu deasetilasi, konsentrasi alkali, perlakuan awal pada isolasi kitin, kondisi atmosfer (udara atau nitrogen), rasio kitin terhadap larutan alkali, densitas kitin dan ukuran partikel (Fernandez-Kim, S.O, 2004). Pelepasan gugus asetil merupakan suatu proses yang keras yang umumnya dilakukan dengan natrium hidroksida (NaOH) pekat. Nitrogen atau sodium borohidrida (NaBH₄) ditambahkan ke dalam larutan alkali jika diperlukan untuk menghindari reaksi yang tidak diinginkan seperti depolimerisasi dan dihasilkannya spesi reaktif akibat adanya oksigen yang masuk (Anonymous, 2003).

2.4.3 Deproteinisasi Secara Enzimatik (Hidrolisis Protein)

Menurut Mathews dan Holde (1990:147) ikatan peptida yang membangun rantai polipeptida dalam protein dapat diputus (dihidrolisis) menggunakan asam, basa atau enzim. Pemecahan ikatan peptida dalam kondisi asam atau basa kuat merupakan proses hidrolisis kimia dan pemecahan ikatan peptida menggunakan enzim merupakan proses hidrolisis biokimia (Kristinnson dan Rasco, 2000). Reaksi hidrolisis peptida akan menghasilkan produk reaksi yang berupa satu molekul dengan gugus karboksil dan molekul lainnya memiliki gugus amina (lihat Gambar 2.4) (Whitaker, 1994:469).



Gambar 2.4 Reaksi Hidrolisis Protein

a. Hidrolisis Asam/Basa

Metode hidrolisis protein secara kimia dapat dilakukan menggunakan asam kuat atau basa kuat dalam konsentrasi tinggi. Penggunaan asam dalam proses pengolahan makanan lebih sering dilakukan daripada penggunaan basa. Metode hidrolisis seperti ini telah lama dikenal dan diterapkan dalam industri makanan, namun cukup sulit untuk mengontrol proses hidrolisisnya. Hidrolisis protein menggunakan asam atau basa dalam industri makanan sangat tidak menguntungkan. Bahan makanan yang diproses menggunakan metode asam atau basa akan menghasilkan produk yang memiliki nilai nutrisi dan sifat fungsional yang rendah (Kristinnson dan Rasco, 2000).

Hidrolisis menggunakan asam menghasilkan produk (hidrolisat) yang memiliki kelarutan tinggi. Asam yang sering digunakan adalah asam klorida atau asam sulfat pekat (6 N) pada temperatur dan tekanan tinggi untuk mendapatkan hidrolisis protein yang sempurna (Kristinnson dan Rasco, 2000). Protein tersebut selanjutnya, perlu dilakukan netralisasi sisa asam dan dalam hidrolisat terkandung kadar garam (NaCl) yang tinggi sehingga dapat mempengaruhi sifat fungsional makanan, selain itu hidrolisis asam juga dapat merusak triptofan yang merupakan salah satu jenis asam amino yang dibutuhkan oleh tubuh (Kristinnson dan Rasco, 2000).

Penggunaan basa dalam hidrolisis protein menghasilkan produk (hidrolisat) yang memiliki kelarutan rendah. Kelarutan hidrolisat yang rendah ini berkaitan dengan hasil hidrolisis yang berupa molekul polipeptida yang cukup besar, selain itu hidrolisat yang dihasilkan juga memiliki sifat fungsional yang rendah. Beberapa asam amino, seperti sistein, serin dan treonin, dapat hilang selama proses hidrolisis protein (Kristinnson dan Rasco, 2000).

b. Hidrolisis Enzimatis

Hidrolisis protein secara enzimatis dapat dilakukan dengan penambahan enzim spesifik untuk hidrolisis ikatan peptida, yaitu enzim proteolitik (protease).

Pemotongan ikatan peptida yang dilakukan oleh protease sangat spesifik pada daerah residu asam amino tertentu. Beberapa protease disekresikan dalam sistem pencernaan hewan untuk mendegradasi protein menjadi molekul polipeptida atau asam amino yang mudah untuk diserap (Mathews dan Holde, 1990:147). Beberapa contoh protease yang telah banyak dikenal adalah papain, tripsin, kimotripsin, bromelin dan pepsin.

Pemisahan protein dari cangkang udang yang terjadi nantinya melibatkan reaksi hidrolisis tanpa penggunaan temperatur yang cukup tinggi. Pemilihan isi perut ikan sebagai sumber enzim karena perut ikan mengandung berbagai enzim protease yang dapat menghidrolisis protein untuk menghasilkan produk reaksi berupa gugus karboksil dan gugus amina. Kelebihan pemisahan protein secara enzimatik selain untuk pemanfaatan lain dari limbah ikan, dan juga reaksi enzim tersebut sangat khas dalam hal ini enzim protease dalam menghidrolisis protein. Deproteinisasi secara enzimatik juga dilakukan pada temperatur yang tidak terlalu tinggi sehingga ikatan kitin pada cangkang udang tidak rusak

2.4.4 Pemanfaatan Kitosan

Kitosan mempunyai potensi yang dapat digunakan baik pada berbagai jenis industri maupun pada bidang kesehatan, sehingga kualitasnya bergantung pada keperluannya, misalnya untuk penjernihan air diperlukan mutu kitin dan kitosan yang tinggi sedangkan untuk penggunaan di bidang kesehatan diperlukan kemurnian yang tinggi. Besarnya nilai parameter standar yang dikehendaki untuk kitosan dalam dunia perdagangan dapat dilihat pada tabel 2.4

Tabel 2.4 Kualitas standar kitosan

Sifat – sifat kitosan	Nilai yang dikehendaki
Ukuran partikel	Butiran – bubuk
Kadar Air (% W/W)	< 10,0
Kadar Abu (% W/W)	> 2,0
Derajat deasetilasi	> 70,0
Viskositas	
• Rendah	< 200
• Sedang	200 – 799
• Tinggi	800 – 2000
• Paling tinggi (eps)	> 2000

sumber : Protan Laboratories Inc

Kitosan dapat berfungsi sebagai pengikat bahan-bahan untuk pembentukan alat-alat gelas, plastik, karet dan selulosa sehingga sering disebut " specialily adhesif formulations." Selain itu kitosan dapat digunakan sebagai perekat (misalnya kitosan yang berkonsentrasi rendah dan sedang yang berkonsentrasi (3 - 4) % dalam asam asetat 2 % pada bahan untuk pembuatan *rayon cotton*).

Di bidang industri, kitosan dapat meningkatkan kekuatan mekanik pada kertas, memperbaiki ikatan antara warna dengan makanan, menghilangkan kelebihan penggunaan perekat dan dapat mencegah kelarutan hasil dari kertas, plup dan tekstil. Penerapan lain di bidang biokimia, kitin dan kitosan digunakan sebagai zat mempercepat dalam penyembuhan luka. Sifat lain adalah kitosan dapat berfungsi sebagai zat koagulan, adanya sifat ini menyebabkan ia banyak dimanfaatkan untuk memperoleh senyawa-senyawa organik dari limbah bekas media tumbuh seafood.

BAB 3. METODE PENELITIAN

3.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian telah dilaksanakan di Laboratorium Biokimia dan Organik Jurusan Kimia Fakultas Matematika Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember pada bulan Juni sampai September 2007.

3.2 Sampel Penelitian

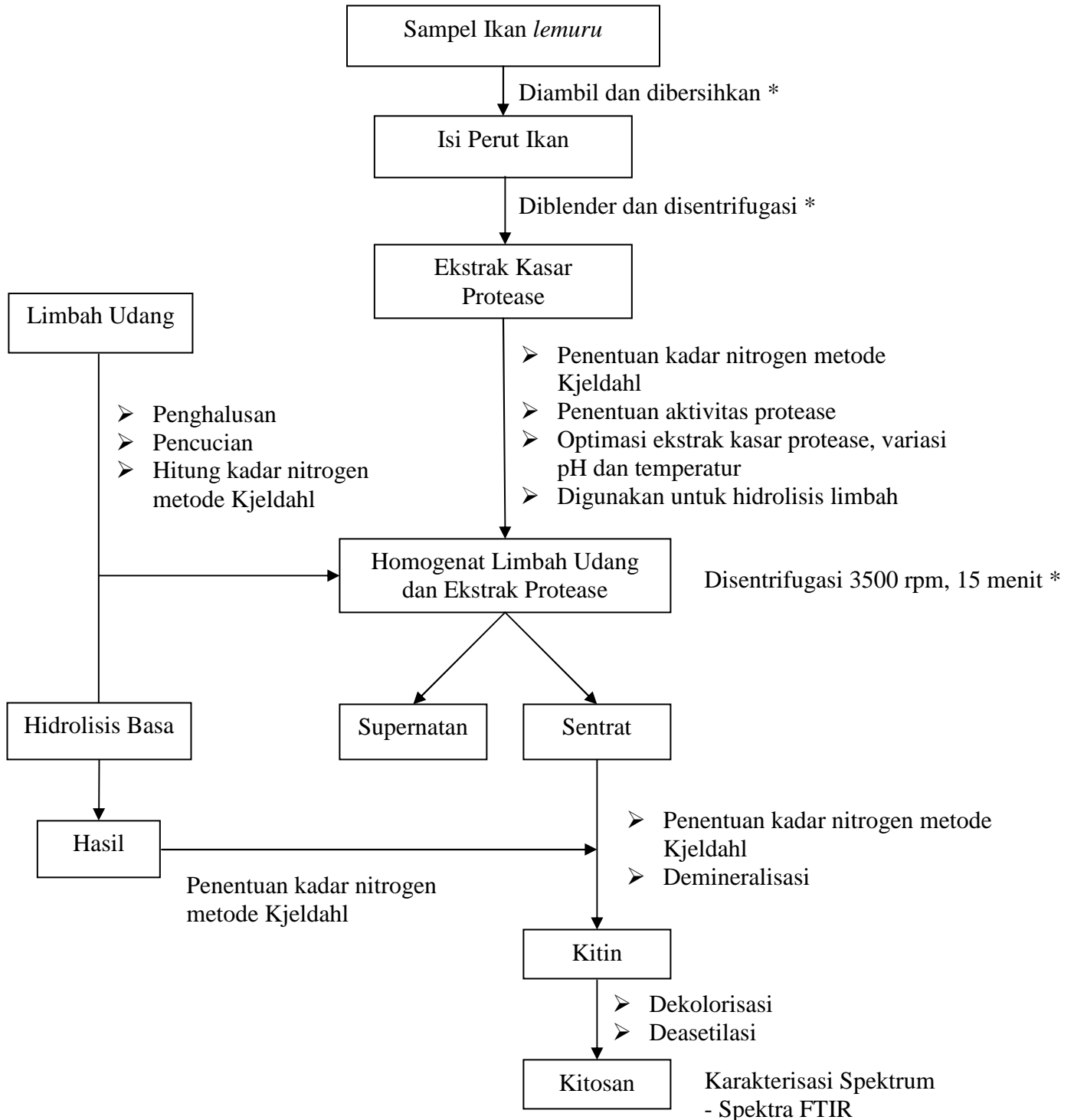
Isi perut ikan lemuru yang digunakan diperoleh dari industri pengalengan ikan dengan ukuran lebih dari 20 cm. Isi perut ikan disimpan pada temperatur < 4°C selama dibawa dari industri pengalengan ikan menuju ke laboratorium.

3.3 Alat dan Bahan

Alat yang digunakan adalah beberapa jenis alat ukur gelas (pipet Mohr, pipet volume, labu ukur, gelas ukur, buret), neraca analitik, termometer, blender, sentrifuse, spektrofotometer ultraviolet-visible, spektrofotometer *Fourier transform infra red* FTIR, penangas es, lemari es, pH-meter, *cool box*, beaker glass, seperangkat micro Kjeldahl, *hot plate*, erlenmeyer *stirrer magnetic* dan *spinbar*.

Bahan kimia yang digunakan meliputi larutan Kalium oksalat ($K_2C_2O_4$), Natrium klorida (NaCl), kasein, Buffer KCl-HCl, Buffer sitrat, Buffer fosfat, Buffer tris-HCl, Buffer Borak-NaOH, Natrium hidroksida (NaOH), Asam trikloroasetat/TCA, Asam sulfat (H_2SO_4), Kalium sulfat anhydrous (K_2SO_4), Tembaga sulfat pentahidrat ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$), aseton, kitosan cangkang udang (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA).

3.4 Rancangan Penelitian



* Dilakukan pada temperatur 4-10°C.

3.5 Prosedur Penelitian

3.5.1 Isolasi Protease Dari Isi Perut Ikan Lemuru (*Sardinella* sp.)

Sebanyak 50 gram isi perut ikan lemuru dihomogenasi dengan ditambahkan buffer fosfat (pH 7,3), dengan perbandingan 1:3 pada temperatur 4-10°C. Homogenat yang diperoleh disentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm selama 20 menit. Endapan hasil sentrifugasi dibuang dan supernatannya digunakan sebagai ekstrak kasar protease. Ekstrak kasar protease yang digunakan adalah ekstrak kasar protease total dari isi perut ikan lemuru.

3.5.2 Uji Aktivitas Ekstrak Kasar Protease Dari Isi Perut Ikan Lemuru (*Sardinella* sp.) Menggunakan Substrat Kasein.

Aktivitas protease dari isi perut ikan lemuru (*Sardinella* sp.) ditentukan dengan menggunakan substrat kasein. Sebanyak 0,9 mL substrat kasein ditambah 0,9 mL buffer natrium-sitrat dan 0,2 mL ekstrak kasar protease ikan lemuru. Setelah 30 menit, reaksi dihentikan dengan penambahan 0,2 mL TCA 10% (w/v). Campuran disentrifugasi selama 15 menit pada kecepatan 8000 rpm untuk menghilangkan endapan. Supernatan yang diperoleh diencerkan menjadi 10 mL dan dibaca absorbansinya dengan spektrofotometer UV pada panjang gelombang 280 nm. Ekstrak kasar protease ikan lemuru diganti dengan akuades dan diberikan perlakuan yang sama, digunakan sebagai kontrol.

3.5.3 Optimasi Ekstrak Kasar Protease Dari Isi Perut Ikan Lemuru (*Sardinella* sp.) Dengan Variasi pH Dan Temperatur.

Optimasi protease dari isi perut ikan lemuru (*Sardinella* sp.) diukur dengan menggunakan substrat kasein. Optimasi yang dilakukan meliputi optimasi pH dan optimasi temperatur, pada optimasi pH digunakan buffer berbeda untuk pH yang berbeda, pH 1,0 dan 2,0 digunakan buffer KCl-HCl, pH 3,0 dan 4,0 digunakan buffer sitrat, pH 5,0 dan 6,0 buffer fosfat, pH 7,0; 8,0 dan 9,0 digunakan buffer tris-HCl dan untuk pH 10 dan 11 digunakan buffer Borak-NaOH. Reaksi enzimatik dihentikan

dengan penambahan 0,2 ml TCA 10% (w/v). Campuran disentrifugasi selama 15 menit pada kecepatan 3500 rpm untuk menghilangkan endapan. Supernatan diencerkan dengan akuades menjadi 10 ml dan dibaca absorbansinya pada panjang gelombang 280 nm. Ekstrak kasar protease ikan lemuru diganti dengan akuades dan diberikan perlakuan yang sama, digunakan sebagai kontrol.

pH optimum yang diperoleh optimal digunakan untuk menentukan temperatur optimal, dengan variasi temperatur 30°C, 40°C, 50°C, dan 60°C.

3.5.4 Deproteinisasi secara kimia

Tahap pemisahan protein atau deproteinisasi secara kimia sesuai dengan metode Prasetyo (2004). Produk cangkang udang yang telah dihaluskan dicampur dengan sodium hidroksida 3,5 persen (NaOH 3,5 persen) dengan perbandingan antara pelarut dan cangkang udang 6 : 1. Aduk sampai merata selama satu jam. Selanjutnya biarkan sebentar, lalu dipanaskan pada suhu 90°C selama satu jam. Larutan lalu disaring dan didinginkan sehingga diperoleh residu padatan yang kemudian dicuci dengan air sampai pH netral.

3.5.5 Demineralisasi/Dekalsifikasi

Tahap demineralisasi dilakukan berdasarkan metode No dan Meyer (1995) serta Prasetyo (2004). Produk dari deproteinasi selanjutnya ditambahkan HCl 1,0 N. Campuran tersebut kemudian dipanaskan sambil diaduk pada temperatur 90°C selama 1 jam. Setelah dingin campuran kemudian dipisahkan dan residu yang diperoleh selanjutnya dinetralkan dengan akuades, selanjutnya dilakukan pengeringan pada temperatur 80°C selama 24 jam.

3.5.6 Penentuan Kadar Nitrogen dengan Metode Kjeldahl.

Timbang sampel sebanyak 0,2 sampai 0,5 gram dan masukkan ke dalam labu Kjeldahl. Selanjutnya tambahkan secara hati-hati dengan 15 mL asam sulfat pekat dengan menggunakan pipet hisap yang dilengkapi karet penghisap dan 10 gram

campuran $\text{CuSO}_4 : \text{K}_2\text{SO}_4$ (1 : 8). Penambahan asam sulfat pekat harus dilakukan di dalam ruang asam. Lakukan destruksi dalam lemari asam hingga cairan berwarna biru atau hijau jernih. Dinginkan labu Kjeldahl dengan air (suhu $< 25^\circ\text{C}$), larutan yang telah jernih diencerkan dengan aquades dalam labu ukur hingga 100 mL. Diambil 10 ml destruat lalu didestilasi dengan dirangkaikan ke alat destilasi Kjeldahl yang sebelumnya telah ditambah NaOH 40 % sampai terbentuk larutan coklat. Destilasi dilakukan selama sekitar 20 menit dan destilat ditampung dalam erlenmeyer yang telah berisi 25 mL HCl 0,1 M. Lalu destilat yang didapatkan ditambah indikator pp, kelebihan HCl selanjutnya dititrasi dengan NaOH 0,1 N. Buat blanko dengan cara yang sama tanpa menggunakan sampel.

3.5.7 Dekolorisasi

Metode dekolorisasi dilakukan berdasarkan metode Fernandez-Kim (2004) yang dimodifikasi. Kitin dilarutkan dalam aseton teknis sambil diaduk selama 10 menit dan dikeringkan selama 120 menit pada temperatur ruang.

3.5.8 Deasetilasi

Tahap deasetilasi dilakukan berdasarkan metode Prasetiyo (2004) yang dimodifikasi. Proses deasetilasi kitin menjadi kitosan dilakukan dengan menambahkan NaOH 12,5 N pada residu kitin. Penambahan tersebut dilakukan pada temperatur 120° selama 30 menit. Selanjutnya dilakukan penyaringan dan residunya didinginkan. Residu kemudian dinetralkan dan dikeringkan pada temperatur 70°C selama 24 jam. Hasil deasetilasi selanjutnya disebut kitosan.

3.6 Penyajian Dan Metode Analisis Data

Penyajian data merupakan salah satu agenda penelitian dalam pembuatan laporan hasil penelitian yang telah dilakukan agar dapat dipahami dan dianalisis

sesuai dengan tujuan yang diinginkan. Bentuk penyajian data dalam hasil penelitian ini berupa tulisan (textular presentation), tabel (table presentation), dan grafik (graphical presentation).

Penentuan kadar protein dilakukan perhitungan dengan metode Kjeldahl, menggunakan rumus sebagai berikut :

$$KN(\%) = \frac{(V_{titrasi.blanko} - V_{titrasi.sampel}) ml \times N.NaOH \times BM_{Nitrogen} 14,008 \frac{gr}{mol}}{massa.sampel.gr} \times 100\%$$

$$KP(\%) = KN(\%) \times Faktor.Konversi(6,25)$$

Keterangan :

KN = Kadar Nitrogen (%)

KP = Kadar Protein (%)

BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Cangkang Udang Putih (*Pennaeus vannamei*)

Cangkang merupakan lapisan protektif terluar yang berkapur pada hewan-hewan invertebrata seperti filum arthropoda dan mollusca. Cangkang mengandung beberapa komponen seperti kitin, matriks kalsium karbonat CaCO_3 , dan protein-protein. Salah satu kelas arthropoda yang terkenal adalah crustacea dimana cangkangnya mengandung protein 30,0-40,0%, kalsium karbonat 30,0-50,0%, serta kitin 20,0-30,0%.

Penelitian ini menggunakan cangkang yang diperoleh dari jenis udang putih (*Pennaeus vannamei*) yang ditangkap pada perairan laut disekitar Kabupaten Banyuwangi. Sebanyak $\pm 542,48$ gram cangkang udang dicuci dengan air mengalir dan dibilas dengan akuades. Cangkang udang yang diperoleh ditambahkan pelarut akuades dengan perbandingan 3:1 antara pelarut dan cangkang udang kemudian dihaluskan menggunakan blender. Tahap ini menghasilkan produk berwarna merah kecoklatan sebanyak 275,60 gram. Cangkang udang terdapat kitin yang merupakan komponen utama untuk sintesis kitosan. Sampel udang putih (*Pennaeus vannamei*) yang digunakan dalam penelitian ini ditunjukkan pada gambar 4.1



Gambar 4.1 Sampel Udang Putih (*Pennaeus vannamei*)

4.2 Ekstrak Kasar Protease Dari Isi Perut Ikan Lemuru (*Sardinella sp.*)

Ekstrak kasar protease diperoleh melalui ekstraksi isi perut ikan lemuru (*Sardinella sp.*) yang berasal dari Tempat Pelelangan Ikan (TPI) di Kecamatan Puger, Kabupaten Jember. Tahap awal ekstraksi, sebanyak 100,22 gram isi perut ikan lemuru (*Sardinella sp.*) yang telah dipisahkan dari bagian atau organ tubuhnya yang lain, ditambahkan buffer fosfat pH 7. Penambahan buffer fosfat bertujuan untuk mempertahankan pH, sedangkan penggunaan fosfat sendiri karena fosfat merupakan unsur pokok yang alami dalam sel. Isi perut ikan lemuru ditambahkan pelarut buffer fosfat dengan perbandingan 1:3 antar isi perut dengan buffer fosfat, sehingga dihasilkan sampel total 400,88 mL. Ekstrak kasar protease dari isi perut ikan lemuru (*Sardinella sp.*) tergolong enzim intraseluler (terletak didalam sel), sehingga untuk mengekstraknya perlu dilakukan penghancuran sel-sel pada isi perut ikan lemuru (*Sardinella sp.*) dengan blender (Whitaker, 1994). Ikan lemuru merupakan salah satu ikan yang berlemak (fatty fish), maka akan terdapat lemak setelah proses sehingga perlu dilakukan pemisahan terlebih dahulu. Dilakukan proses sentrifugasi dengan kecepatan 8000 rpm (putaran per menit) pada suhu 4°C-10°C selama 20 menit untuk memisahkan supernatan sebagai ekstrak kasar protease dari komponen-komponen yang lain. Perlakuan pada suhu 4°C-10°C karena pada suhu tersebut kondisi enzim (protein) akan lebih stabil.

Ekstrak kasar protease dari isi perut ikan lemuru (*Sardinella sp.*) yang diperoleh setelah proses sentrifugasi, ditunjukkan sesuai gambar 4.2



Gambar 4.2 Ekstrak kasar protease dari isi perut ikan lemuru (*Sardinella* sp.)

Tahap ini menghasilkan ekstrak kasar protease sebanyak 220 mL, ekstrak kasar protease yang diperoleh selanjutnya dilakukan karakterisasi meliputi optimasi pH dan suhu.

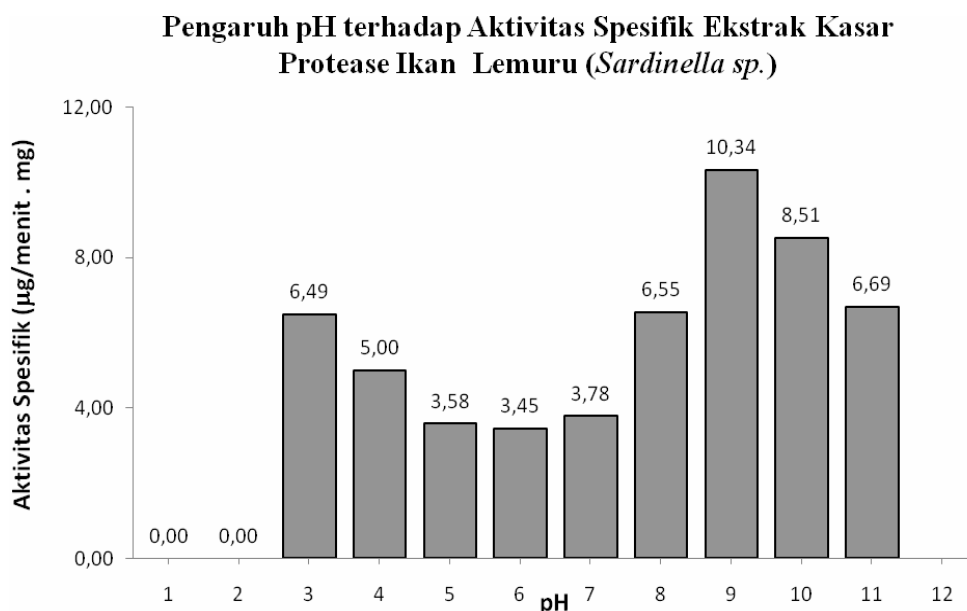
4.3 Aktivitas dan Optimasi Ekstrak Kasar Protease Dalam Menghidrolisis Protein

Aktivitas enzim adalah banyaknya produk yang dihasilkan tiap satuan waktu. Pengujian aktivitas serta optimasi ekstrak kasar protease dari isi perut ikan lemuru (*Sardinella* sp.) dalam menghidrolisis protein pada penelitian ini menggunakan substrat kasein. Hal ini dilakukan karena kasein memiliki struktur yang sederhana sehingga pemotongan oleh enzim dimungkinkan lebih mudah. Terjadi reaksi enzimatik antara substrat dengan ekstrak kasar protease, dan ditambahkan TCA yang berfungsi untuk menghentikan aktivitas enzim dan mengendapkan protein, sedangkan sentrifugasi dengan kecepatan 8000 rpm pada temperatur ruang selama 15 menit akan memisahkan supernatan dari sentratnya, lalu diukur absorbansinya pada panjang gelombang 280 nm.

Optimasi ekstrak kasar protease dari isi perut ikan lemuru (*Sardinella* sp.) dalam menghidrolisis protein (substrat) dilakukan dengan dua variabel yaitu optimasi pH dan suhu. Variabel pH dilakukan pada variasi pH 1,0 sampai pH 11,0 sedangkan untuk variabel suhu dilakukan masing-masing pada suhu 40, 45, 50 dan 55°C. Aktivitas enzim optimum pada masing-masing variabel, diketahui

dengan melakukan pengukuran aktivitas ekstrak kasar protease terhadap substrat kasein menggunakan standar tirosin, diketahui absorbansinya pada daerah pengukuran ultraviolet yaitu 280 nm. Hasil absorbansi yang didapatkan disubstitusikan dalam persamaan standar tirosin sehingga aktivitas total, aktivitas spesifik enzim dapat diketahui.

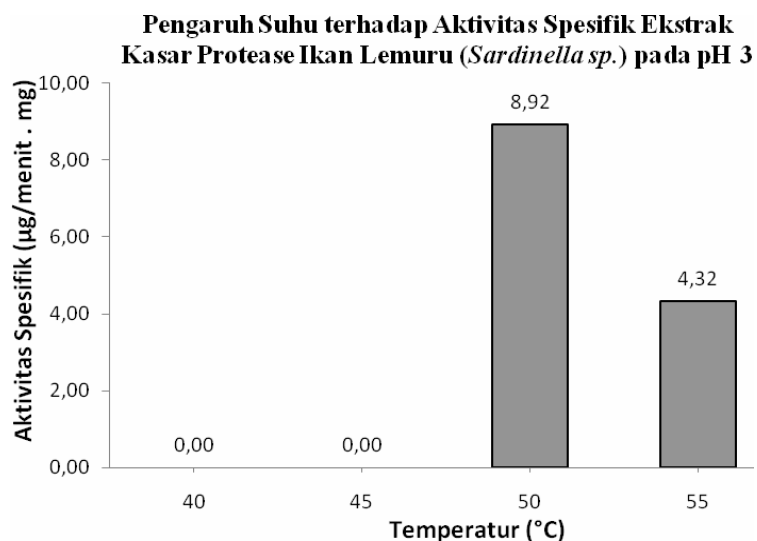
Optimasi pH dalam penelitian ini menggunakan buffer antara pH 1,0-11,0 dengan substrat kasein. Hasil optimasi pH dengan rentang pH 1,0-11,0 ditunjukkan sesuai grafik 4.3



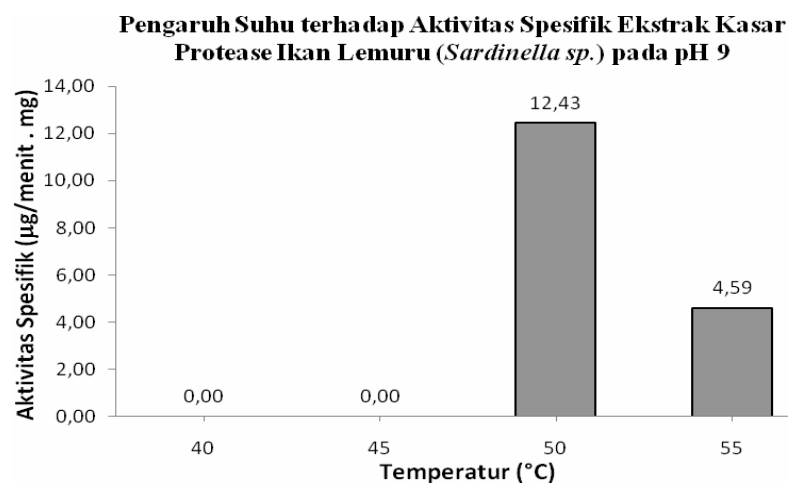
Grafik 4.3 Pengaruh pH terhadap aktivitas Ekstrak Kasar Protease dari isi perut ikan lemuru (*Sardinella sp.*)

Grafik tersebut memperlihatkan bahwa ekstrak kasar protease dari isi perut ikan lemuru (*Sardinella sp.*) optimum untuk kondisi asam pada pH 3,0 sedangkan untuk kondisi basa pada pH 9,0. Dilakukan optimasi pada daerah asam dan daerah basa, karena enzim protease pada isi perut ikan berasal dari usus yang bersifat basa dan juga lambung yang bersifat asam. Hasil optimasi pH yang diperoleh digunakan untuk menentukan suhu optimum.

Salah satu faktor lain yang mempengaruhi aktivitas enzim adalah faktor suhu. Suhu merupakan mempengaruhi kecepatan reaksi, kelarutan dan stabilitas enzim (Whitaker, 1994). Kondisi suhu dalam penentuan aktivitas ekstrak kasar protease ditentukan antara 40°C hingga 55 °C dengan interval 5°C. Aktivitas spesifik ekstrak kasar protease pada pH 3 dan pH 9 dengan rentang suhu 40, 45, 50 dan 55°C, ditunjukkan pada grafik 4.4 dan 4.5



Grafik 4.4 Pengaruh temperatur terhadap aktivitas Spesifik Ekstrak Kasar Protease dari isi perut ikan lemuru (*Sardinella sp.*) pada pH 3



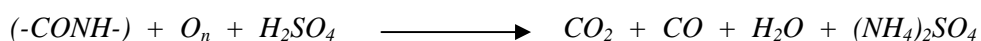
Grafik 4.5 Pengaruh suhu terhadap aktivitas Spesifik Ekstrak Kasar Protease dari isi perut ikan lemuru (*Sardinella sp.*) pada pH 9

Grafik di atas memperlihatkan bahwa ekstrak kasar protease dari isi perut ikan lemuru (*Sardinella* sp.) memiliki kondisi optimum pada suhu 50 °C, baik pada kondisi asam dengan larutan buffer pH 3 maupun pada kondisi basa dengan larutan buffer pH 9. Selanjutnya hasil optimasi pH dan temperatur yang telah didapatkan digunakan untuk regulasi kondisi deproteinisasi secara enzimatik pada cangkang udang yang merupakan salah satu tahap dalam proses pembuatan kitosan.

4.4 Kadar Nitrogen

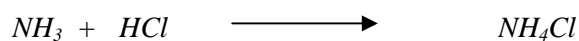
Penentuan kadar nitrogen pada penelitian ini dilakukan berdasarkan metode Kjeldahl. Dalam metode Kjeldahl, nitrogen yang terukur adalah semua unsur nitrogen, termasuk yang berasal dari protein maupun dari asam nukleat, lipida-lipida tertentu, kreatinin, urea, atau senyawaan nitrogen non protein.

Metode Kjeldahl meliputi tiga tahap: destruksi atau dekomposisi, destilasi dan titrasi. Tahap destruksi, sampel terurai menjadi unsur-unsur penyusunnya oleh adanya pemanasan, oksidasi dan digesti oleh asam sulfat H₂SO₄ pekat, sesuai reaksi berikut:

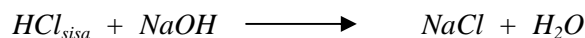


Penambahan K₂SO₄ dan CuSO₄ (8 : 1) berfungsi mengkatalisis reaksi karena pengaruhnya untuk menaikkan titik didih asam sulfat hingga 3°C tiap gramnya, sehingga estimasi temperatur pada tahap ini mencapai 370-410°C.

Tahap yang kedua adalah destilasi menggunakan prinsip perbedaan tekanan, dimana ammonium sulfat dikonversi menjadi amonia NH₃ akibat penambahan sodium hidroksida (NaOH). Amonia kemudian diikat oleh larutan reservoir yaitu larutan asam klorida, sesuai reaksi berikut:



Tahap ketiga titrasi, kelebihan asam yang tidak bereaksi dengan amonia kemudian dititrasi sodium hidroksida (NaOH), sesuai dengan reaksi metatesis atau pertukaran hidrogen berikut:



Sehingga bisa diketahui selisih volume sodium hidroksida yang dibutuhkan pada blanko dan kontrol, kadar nitrogen (% N) dapat ditentukan dengan rumus :

$$\% N = \frac{(ts - tb) \times N \text{ HCl} \times 14,008}{\text{mg sampel}} \times 100 \%$$

dengan ts : volume titrasi sampel

tb : volume titrasi blanko

% protein (wb) = % N x fk

dengan fk : faktor konversi / perkalian = 6,25

Kadar protein dapat ditentukan dari kadar nitrogen yang dikalikan dengan suatu bilangan atau faktor konversi. Dasar perhitungan penentuan protein menurut metode ini adalah hasil penelitian dan pengamatan yang menyatakan bahwa umumnya protein alamiah mengandung unsur N rata-rata 16 % (dalam protein murni), karena pada bahan belum diketahui komposisi unsur-unsur penyusunnya secara pasti maka faktor konversi yang digunakan adalah 100/16 atau 6,25. Apabila pada bahan telah diketahui komposisinya dengan lebih tepat maka faktor konversi yang digunakan adalah faktor konversi yang lebih tepat (telah diketahui per bahan) (Sudarmadji dkk., 1996). Kadar nitrogen yang diukur dalam penelitian ini meliputi: kadar nitrogen pada ekstrak kasar protease, cangkang udang, kadar nitrogen setelah proses deproteinisasi secara kimia dan kadar nitrogen setelah proses deproteinisasi enzimatik.

4.4.1 Kadar Nitrogen Ekstrak Kasar Protease

Kadar nitrogen pada ekstrak kasar protease ditentukan berdasarkan metode Kjeldahl sesuai uraian tentang kadar nitrogen di atas. Hasil proses titrasi diketahui bahwa volume natrium hidroksida yang dibutuhkan untuk mentitrasi sisa asam klorida yang tidak bereaksi pada ekstrak kasar protease sebesar 17,21 mL dan kontrol 19,61 mL. Diperoleh kadar nitrogen (%N) pada ekstrak kasar protease 0,98 persen dan kadar protein sebesar 6,10 persen.

Penelitian tentang kadar nitrogen protease sebelumnya telah dilakukan oleh (Hordur g. kristinsson and Barbara a. rasco) menggunakan ikan salmon sebagai bahan baku yang menghasilkan protease dengan kadar protein 9,12 persen. Dari penelitian didapatkan bahwa ekstrak kasar protease dari ikan lemuru memiliki kadar protein yang relatif lebih kecil.

4.4.2 Kadar Nitrogen Cangkang Udang Putih (*Pennaeus vannamei*)

Keberadaan nitrogen secara kuantitatif pada cangkang udang diketahui menggunakan metode Kjeldahl, sesuai uraian diatas. Didapatkan data dari proses titrasi bahwa volume sodium hidroksida yang dibutuhkan untuk mentitrasi sisa asam klorida pada cangkang udang sebesar 16,54 mL dengan volume kontrol yang dibutuhkan 21,72 mL, sehingga didapatkan kadar nitrogen 2,10 persen dan kadar protein 13,14 persen.

Kandungan protein pada cangkang salah satu kelas arthropoda yang terkenal seperti *crustacea* mengandung protein 30,0-40,0% dan komponen lain seperti kalsium karbonat serta kitin. Kadar protein pada penelitian ini relatif lebih kecil daripada penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Johnson and Peniston (1982).

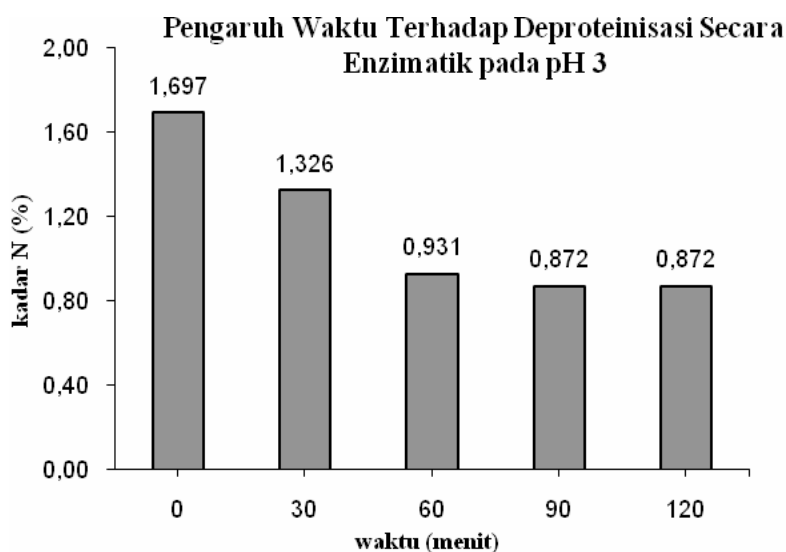
4.4.3 Deproteinisasi Secara Kimia

Pemisahan protein secara kimia dilakukan sesuai metode yang digunakan (Prasetyo, 2004), yaitu limbah cangkang udang yang sudah dihaluskan dicampur dengan larutan natrium hidroksida 3,5 persen (NaOH 3,5%) dengan perbandingan antara pelarut dan cangkang udang 6:1, dipanaskan pada suhu 90°C selama satu jam. Larutan lalu disentrifugasi dan didinginkan sehingga diperoleh residu padatan yang kemudian dicuci dengan air sampai pH netral. Residu padatan yang dihasilkan selanjutnya ditentukan kadar Nitrogen total menggunakan metode Kjeldahl, diperoleh kadar nitrogen total pada residu tersebut sebesar 0,871 persen.

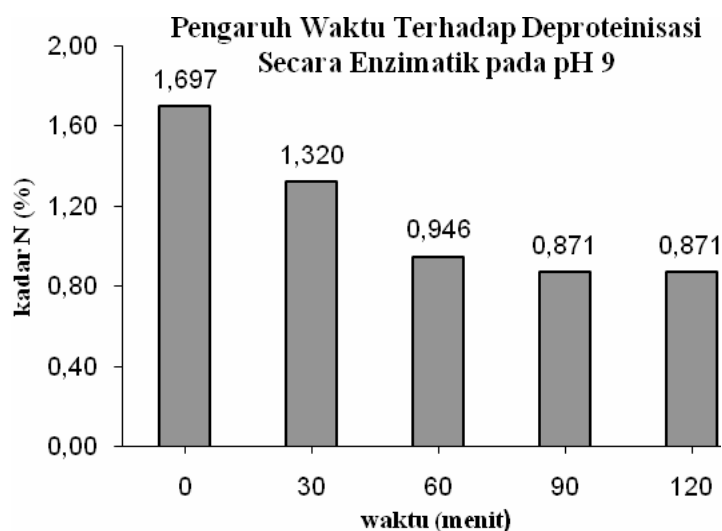
4.4.4 Deproteinisasi Secara Enzimatik

Deproteinisasi secara enzimatik atau biokimia dalam penelitian ini yaitu dilakukan dengan memanfaatkan isi perut ikan lemuru sebagai ekstrak kasar protease, yang akan menghidrolisis protein pada cangkang udang. Penambahan larutan buffer dengan pH 3 dan 9 pada suhu 50°C, sesuai kondisi optimasi. Pemisahan protein secara enzimatik lebih efektif karena reaksi enzim spesifik dalam hal ini adalah menghidrolisis protein dalam cangkang udang, selain itu deproteinisasi secara enzimatik tidak menggunakan temperatur yang cukup tinggi sehingga dapat dimungkinkan ikatan polisakarida yaitu kitin tidak rusak.

Keberadaan nitrogen secara kuantitatif setelah proses deproteinisasi ditentukan berdasarkan metode Kjeldahl. Besarnya pengaruh waktu terhadap proses deproteinisasi secara enzimatik menggunakan ekstrak kasar protease pada sampel limbah udang dengan larutan buffer pH 3 dan pH 9, sesuai grafik 4.6 dan 4.7



Grafik 4.6 Grafik pengaruh waktu terhadap proses deproteinisasi dalam limbah udang secara enzimatis menggunakan ekstrak kasar protease dari isi perut ikan lemuru (*Sardinella sp.*) pada pH 3



Grafik 4.7 Grafik pengaruh waktu terhadap proses deproteinisasi dalam limbah udang secara enzimatis menggunakan ekstrak kasar protease dari isi perut ikan lemuru (*Sardinella sp.*) pada pH 9

Berdasarkan kedua grafik diatas diketahui bahwa deproteinisasi secara enzimatis mencapai kestabilan pada menit ke-90 sejak penambahan enzim dalam sampel, dengan kadar nitrogen total metode Kjeldahl pada pH 3 sebesar 0,872

persen dan pada pH 9 sebesar 0,871 persen. Penelitian sesuai metode (Prasetyo, 2004) yaitu proses deproteinisasi dilakukan secara kimia dengan penambahan larutan natrium hidroksida dan diperoleh kadar nitrogen total metode Kjeldahl sebesar 0,871 persen. Kadar nitrogen total pada cangkang udang setelah deproteinisasi secara kimia dan deproteinisasi secara enzimatik sangat identik. Dapat diasumsikan bahwa proses deproteinisasi secara enzimatik pada pH 3 dan pH 9 selama 90 menit telah menghidrolisis protein cangkang udang hingga habis. Kadar nitrogen yang telah mencapai kestabilan menunjukkan nilai nitrogen sisa, yaitu nitrogen dari cangkang udang tanpa nitrogen dari protein.

4.5 Kitin Hasil Deproteinisasi Secara Enzimatik

Limbah cangkang udang yang didapatkan lalu dicuci dengan air mengalir, selanjutnya dilakukan proses deproteinisasi menggunakan ekstrak kasar protease sesuai kondisi optimum selama 90 menit. Proses ini disebut deproteinisasi secara enzimatik, penambahan ekstrak kasar protease tersebut dimaksudkan untuk melepaskan protein, dengan suatu proses yang disebut hidrolisis protein. Keberadaan protein tidak diharapkan karena akan mengganggu atau dapat mengurangi efektifitas dalam proses deasetilasi. Kitosan yang dihasilkan tanpa deproteinisasi mempunyai derajat deasetilasi yang rendah.

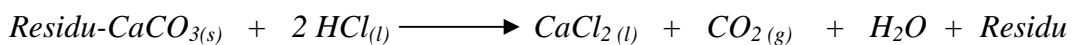
Kitin hasil deproteinisasi secara enzimatik yang diperoleh pada pH 3 sebesar 25,64 gram dan pH 9 sebesar 26,17 gram, berwarna merah kecoklatan. Kadar nitrogen kitin diketahui melalui penentuan kadar nitrogen menggunakan metode Kjeldahl. Cangkang udang setelah mengalami proses deproteinisasi secara enzimatik menggunakan ekstrak kasar protease dari isi perut ikan lemuru (*Sardinella sp.*) ditunjukkan pada gambar 4.8



Gambar 4.8 Kitin hasil proses Deproteinisasi secara enzimatik

4.6 Kitin Hasil Demineralisasi/Dekalsifikasi

Limbah cangkang udang yang telah mengalami proses deproteinisasi kemudian dicampur dengan larutan asam klorida 1,25 N dengan perbandingan 10:1 untuk pelarut dibanding kulit udang. Produk yang dihasilkan kemudian dinetralisasi menggunakan akuades. Reaksi yang terjadi dapat dituliskan sebagai berikut.



Selama proses demineralisasi akan terbentuk busa berlebih yang tidak diinginkan berkaitan dengan terbebasnya karbon dioksida CO_2 . Residu yang dihasilkan setelah proses ini pada pH 3 sebesar 24,01 gram sedangkan pada pH 9 sebesar 24,83 gram. Gambar cangkang udang setelah mengalami demineralisasi sesuai pada gambar 4.9



Gambar 4.9 Sampel cangkang setelah mengalami proses Demineralisasi

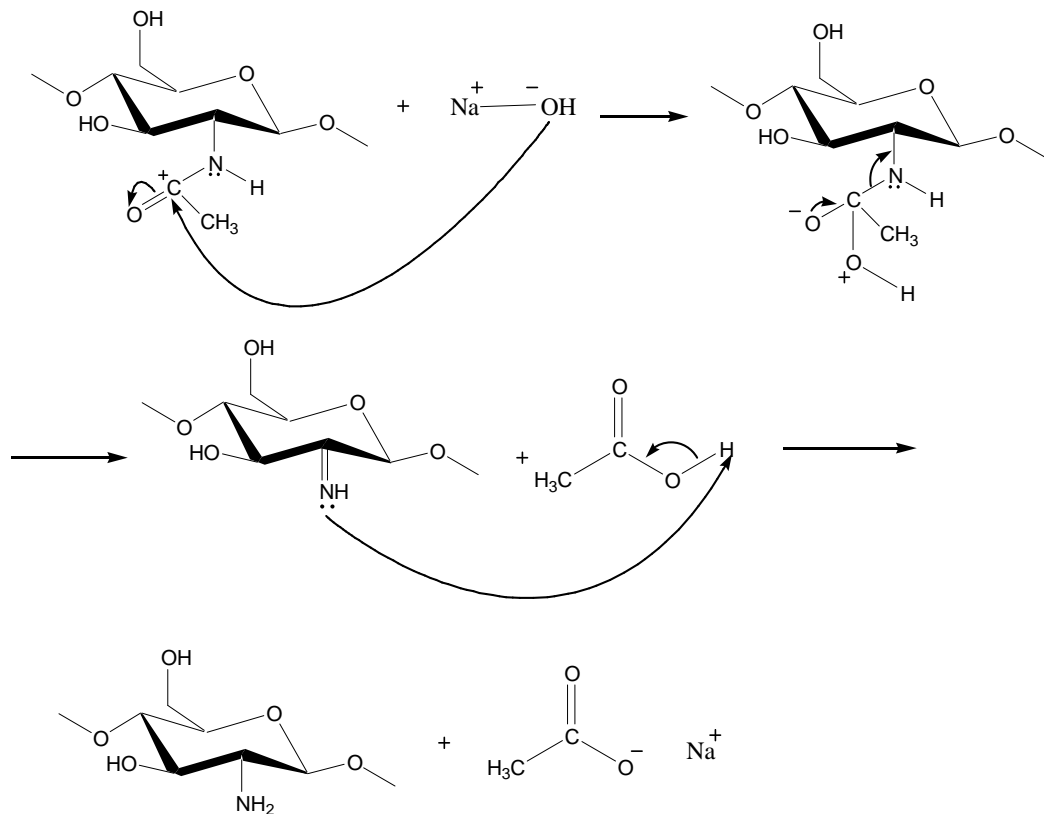
4.7 Kitin Hasil Dekolorisasi

Serbuk kitosan di alam bersifat sangat lembek dengan warna yang bervariasi antara kuning pucat hingga putih. Bila dibandingkan dengan selulosa dan pati sebagai biopolimer, maka keduanya memiliki tekstur yang lembut dan berwarna putih (Fernandez-Kim, 2004). Timbulnya pemikiran untuk skala penggunaan yang lebih luas misalnya kebutuhan komersialisasi, maka dibutuhkan produk dengan performa yang lebih baik dan menarik.

Berdasarkan hal tersebut maka diharapkan kitin yang diperoleh pada penelitian ini agar menunjukkan warna putih dan produk kitosan berwarna lebih cerah, sehingga dilakukan dekolorisasi berupa depigmentasi terhadap produk demineralisasi yaitu kitin melalui perlakuan dengan penambahan aseton. Hal ini perlu dilakukan karena setiap perlakuan yang melibatkan baik senyawa asam maupun basa akan menghasilkan produk kitin yang berwarna. Metode dekolorisasi dalam penelitian ini diadopsi dari Prasetyo, (2004) yang menggunakan aseton. Berdasarkan metode tersebut akan dihasilkan variasi warna kitin antara putih hingga krem. Pada penelitian ini tidak dilakukan *bleaching* yang didasarkan pada karakteristik reagen-reagen *bleaching* yang berupa oksidator. Selain itu Moorjani *et al.* (1975) merekomendasikan bahwa tahap *bleaching* tidak perlu dilakukan untuk produk tiap-tiap perlakuan karena akan menurunkan viskositas produk kitosan akhir.

4.8 Kitin Terdeasetilasi

Kitin diubah menjadi kitosan dengan melepaskan gugus asetilnya menggunakan larutan basa kuat. Proses deasetilasi kitin pada penelitian ini dilakukan menggunakan larutan NaOH 60 % dengan perbandingan 20:1 (pelarut dengan kitin) lalu dipanaskan pada temperatur 140°C selama 90 menit. Pelepasan gugus asetil pada kitin menggunakan NaOH pekat untuk memperoleh hasil yang maksimum. Prasetyo (2004) melakukan deasetilasi dengan konsentrasi NaOH (40,0-50,0%) pada temperatur 100°C selama 30 menit untuk merubah gugus asetil dari polimer kitin. Fernandez-Kim (2004) melakukan deasetilasi dengan konsentrasi NaOH 50,0% pada temperatur 121°C selama 30 menit. Mekanisme reaksi proses deasetilasi kitin dengan NaOH menghasilkan kitosan sesuai gambar 4.10



Gambar 4.10 Mekanisme reaksi deasetilasi kitin hasil isolasi dari cangkang udang

Reaksi tersebut memperlihatkan bahwa terdapatnya basa atau gugus hidroksil OH^- akan menyerang posisi karbonil dari asetil dan berikatan untuk membentuk intermediet. Atom hidrogen H akan diikat oleh NH^+ yang mengakibatkan lepasnya ikatan karbonil dari asetil oleh NH^+ , yang mana produk samping akan terbentuk berupa garam asetat (CH_3COONa). Larutan yang dihasilkan kemudian disaring untuk mendapatkan residu berupa padatan, lalu dilakukan pencucian dengan air sampai pH netral, dan dikeringkan dengan oven suhu 70°C selama 24 jam atau dijemur sampai kering. Diperoleh kitin yang telah terdeasetilasi pada pH 3 sebesar 22,90 gram dan pH 9 sebesar 23,02 gram, bentuk akhir dari kitosan bisa berbentuk serbuk maupun serpihan, berwarna putih. Hasil proses deasetilasi ini selanjutnya dapat disebut sebagai kitosan, yang ditunjukkan sesuai gambar 4.11



Gambar 4.11 Kitin setelah mengalami proses Deasetilasi (kitosan)

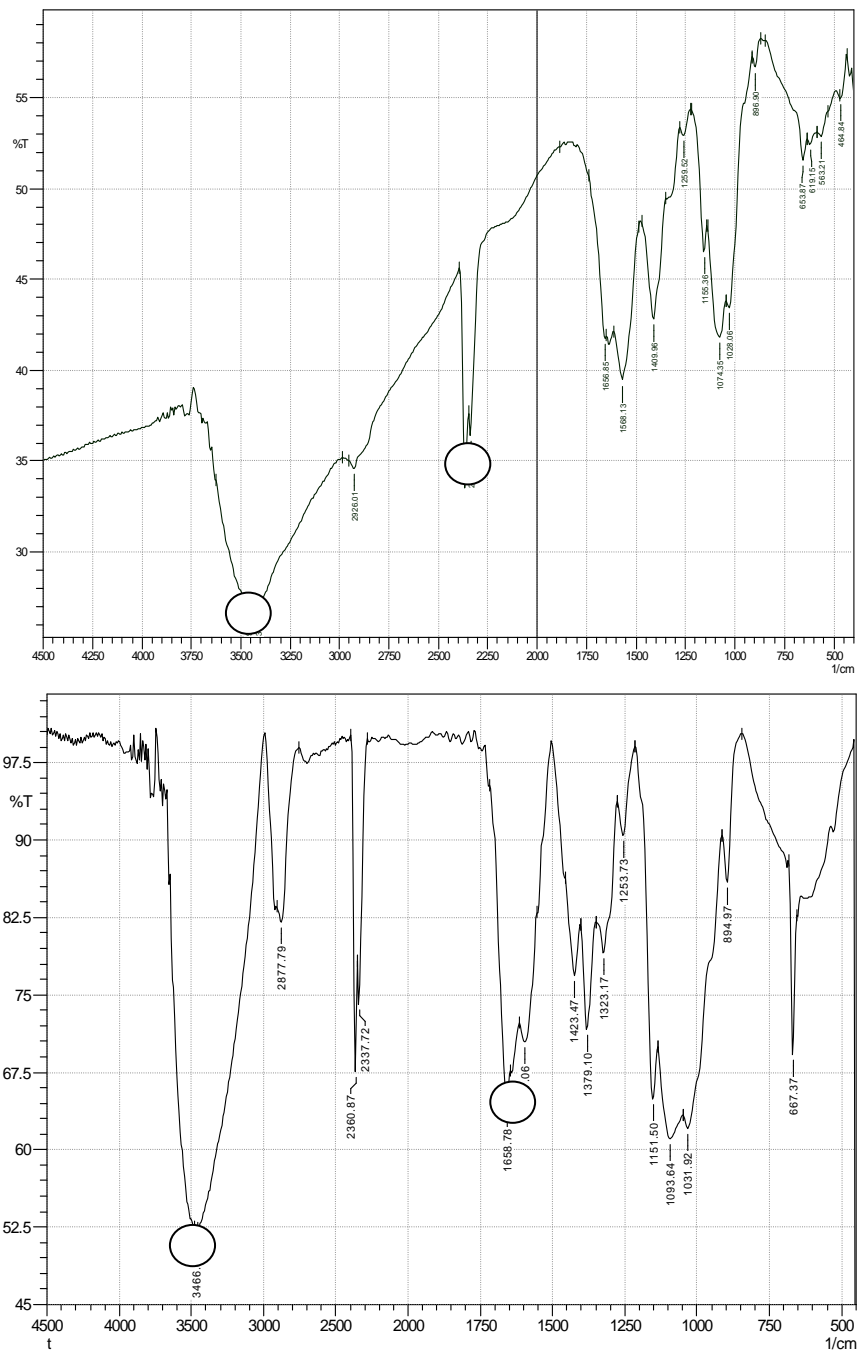
4.9 Kitosan

Kitosan banyak dimanfaatkan dalam bidang industri, perikanan, dan kesehatan, seperti untuk bahan pelapis, perekat, penstabil, serta sebagai polimer

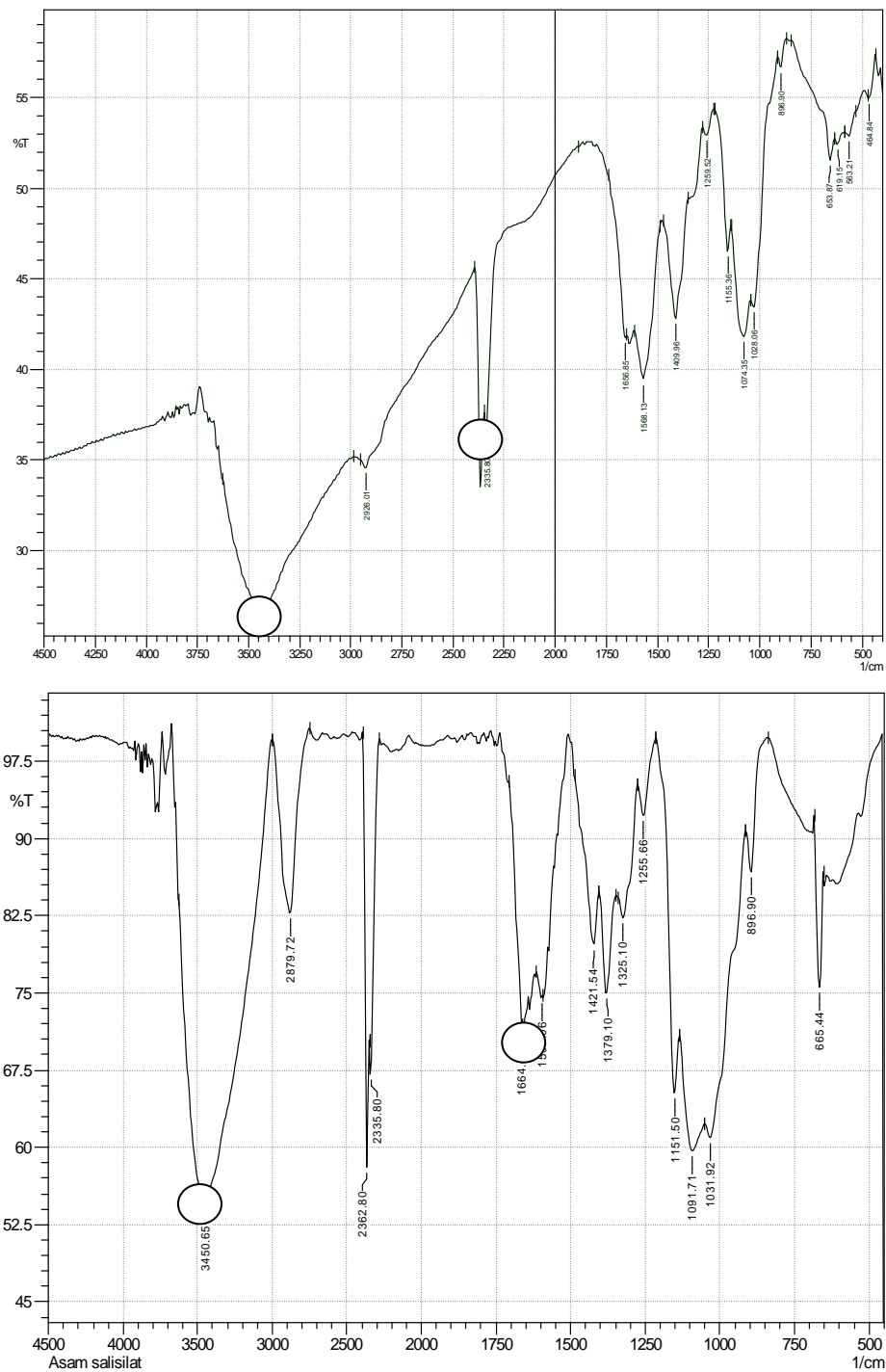
dalam bidang teknologi polimer. Kitosan pada penelitian ini yang diperoleh dari cangkang udang hasil proses deproteinisasi secara enzimatik diidentifikasi berdasarkan metode spektroskopi *infra red* FTIR menggunakan pellet potassium bromida KBr, dengan rentang bilangan gelombang 4500-500 cm^{-1} . Pada penelitian ini uji keberhasilan dilakukan perbandingan spektra FTIR antara kitosan hasil penelitian dengan kitosan pembanding Sigma Aldrich DD 85%.

4.9.1 Karakteristik Spektra FTIR kitin dan kitosan

Gugus fungsional yang terdapat pada membran kitosan hasil deasetilasi dengan larutan buffer pH 3 dan pH 9 dikarakterisasi menggunakan spektrofotometer FTIR. Puncak-puncak absorpsi yang terjadi dari gugus fungsional disebabkan oleh vibrasi molekul dari gugus tersebut. Vibrasi pada setiap molekul sangat spesifik sehingga mudah untuk dibedakan karena menyerap pada bilangan gelombang tertentu. Spektra FTIR kitosan hasil penelitian ini masing-masing dibandingkan dengan spektra FTIR kitosan komersial yang ditunjukkan pada gambar 4.12 dan 4.13 (data spektra pada lampiran F).



Gambar 4.12. Perbandingan spektra FTIR kitosan komersial (DD 85,0%, Sigma Aldrich, St. Louis, USA) dengan kitosan hasil penelitian pada pH 3



Gambar 4.13. Perbandingan spektra FTIR kitosan komersial (DD 85,0%, Sigma Aldrich, St. Louis, USA) dengan kitosan hasil penelitian pada pH 9

4.9.2 Karakteristik Spektra FTIR dengan Larutan Buffer pH 3 dan pH 9 dibandingkan dengan kitosan pembanding

Terdapat kemiripan pada spektra yang diperoleh dari tiap perlakuan (gambar 4.14-4.16), perbedaan hanya terdapat pada intensitas absorpsi atau kuat tidaknya absorpsi. Absorpsi dominan terjadi untuk regang C-H pada 2877.79 cm^{-1} untuk larutan buffer pH 3, dan pada 2879.72 cm^{-1} untuk larutan buffer pH 9. Regang OH (sekunder) menyerap pada 1423.47 dan 1379.10 cm^{-1} untuk larutan buffer pH 3, 1421.54 dan 1379.10 cm^{-1} untuk larutan buffer pH 9.

Absorpsi yang paling penting untuk kitosan yaitu absorpsi gugus amina $-\text{NH}_2$ dan ikatan amida C-N yang merupakan ciri khas kitosan. Perlakuan dengan penambahan larutan buffer pH 3, absorpsi $-\text{NH}_2$ terdapat pada 3466.08 dan 1597.06 cm^{-1} dengan ikatan C-N pada 1658.78 cm^{-1} . Dengan larutan buffer pH 9 menunjukkan gugus $-\text{NH}_2$ yang menyerap pada 3450.65 dan 1597.06 cm^{-1} , sedangkan ikatan C-N menyerap pada 1664.57 cm^{-1} . Spektra FTIR dari kedua perlakuan dengan larutan buffer pH optimasi seperti pada gambar berikut.

Hasil penelitian sebelumnya yaitu kitosan dengan derajat deasetilasi 85,0% dari cangkang kepiting yang dilakukan oleh Khan *et al.* (2002) mempunyai karakteristik spektra FTIR yang memperlihatkan absorpsi amina $-\text{NH}_2$ pada bilangan gelombang 3450 cm^{-1} dan ikatan amida C-N pada 1655 cm^{-1} . Hasil spektra pada penelitian ini identik namun berbeda pada tingkat absorbansinya. Perbedaan ini berhubungan dengan derajat deasetilasi kitosan dan sumber untuk isolasi kitosan.

BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Dari hasil penelitian yang dilakukan dan pembahasan yang telah dibuat, dapat ditarik kesimpulan sebagai berikut:

- a. Ekstrak kasar protease dari isi perut ikan lemuru (*Sardinella* sp.) pada larutan buffer pH 3 dengan substrat kasein memiliki aktivitas sebesar 39,51 μ gram/menit.mg.
- b. Ekstrak kasar protease dari isi perut ikan lemuru (*Sardinella* sp.) memiliki aktivitas optimum dalam menghidrolisis protein untuk kondisi asam optimum pada pH 3 dan kondisi basa pada pH 9, sedangkan suhu optimum untuk pH 3 maupun pH 9 yaitu pada suhu 50°C.
- c. Ekstrak kasar protease dari isi perut ikan lemuru (*Sardinella* sp.) bermanfaat dalam deproteinisasi secara enzimatik pada cangkang udang, dimana kadar nitrogen cangkang udang sebelum deproteinisasi secara enzimatik sebesar 2,10 persen sedangkan setelah deproteinisasi secara enzimatik pada kondisi asam (pH 3) kadar nitrogennya 0,872 persen dan pada kondisi basa (pH 9) sebesar 0,871 persen.
- d. Deproteinisasi secara enzimatik pada cangkang udang menggunakan ekstrak kasar protease dari isi perut ikan lemuru (*Sardinella* sp.) dengan waktu inkubasi 90 menit memberikan hasil yang maksimal.
- e. Karakterisasi spektra IR kitosan yang dihasilkan dari proses deproteinisasi secara enzimatik dibandingkan dengan spektra IR kitosan pembanding dan memiliki puncak-puncak spektra yang identik, khususnya pada absorpsi gugus amina $-NH_2$ dan ikatan amida C-N yang merupakan ciri khas kitosan. Pada perlakuan dengan larutan buffer pH 3, absorpsi $-NH_2$ terdapat pada 3466.08 dan 1597.06 cm^{-1} dan C-N pada 1658.78 cm^{-1} , dengan larutan buffer pH 9

gugus $-NH_2$ yang menyerap pada 3450.65 dan 1597.06 cm^{-1} dan C-N menyerap pada 1664.57 cm^{-1} . Sedangkan pada kitosan standar absorpsi $-NH_2$ terdapat pada 3450.59 dan 1568.13 cm^{-1} dan C-N pada 1656.85 cm^{-1} .

5.2 Saran

Diperlukan penelitian lebih lanjut mengenai hidrolisis protein secara enzimatik dengan menggunakan perbandingan antara substrat dan ekstrak kasar protease serta perlu dilakukan pemurnian pada ekstrak kasar protease dari isi perut ikan lemuru (*Sardinella* sp.) sehingga proses deproteinisasi lebih efektif dengan waktu yang relatif singkat.

DAFTAR PUSTAKA

- Anonim. 2007. *Katsuwonus pelamis* (Linnaeus, 1758), Skipjack tuna: [serial on line] [http://research.kahaku.go.jp/zoology/Fishes_of Bitung/data/p211_01b.html](http://research.kahaku.go.jp/zoology/Fishes_of_Bitung/data/p211_01b.html) [8 Januari 2007]
- Anonymous. 2003. Overview of Chitin/Chitosan. AGROFOOD Industry Hitech (September/October) : 30-31 (accessed online from url [http : //www.teknoscienze.com/agro/](http://www.teknoscienze.com/agro/)).
- Blair, H. S., Guthrie, J., Law, T. K., and Turkington, P. 1987. Chitosan and Modified Chitosan Membranes. I. Preparation and Characterization. Journal of Applied Polymer Science 33 : 641-656 (accessed online from url [http : //www3.interscience.wiley.com/](http://www3.interscience.wiley.com/)).
- Burhanuddin, Hutomo, M., Martosewojo, S., dan Moejanto, R. 1984. *Sumberdaya Ikan Lemuru*. Jakarta: LON-LIPI. 70 hal.
- Cho, Y. I., No, H. K., and Meyers, S. P. 1998. Physicochemical Characteristics and Functional Properties of Various Commercial Chitin and Chitosan Products. Journal of Agricultural and Food Chemistry 46 (9, September) : 3839-3843 (accessed online from url [http : //pubs.acs.org/](http://pubs.acs.org/)).
- Direktorat Gizi Departemen Kesehatan R. I. 1992. *Daftar Komposisi Bahan Makanan*. Jakarta: Bhratara.
- Erfani, D. A. 2005. Isolasi dan karakterisasi fisikokimia-fungsional kitosan udang air tawar (*Macrobrachium sintangense* de man.). Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam: Jurusan Kimia Universitas Jember.
- Fernandez-Kim, S. O. 2004. Thesis : Physicochemical and Functional Properties of Crawfish Chitosan as Affected by Different Processing Protocols. Baton Rouge : The Department of Food Science, Agricultural and Mechanical College, Graduate Faculty of the Louisiana State University (accessed online from url [http : //etd.lsu.edu/](http://etd.lsu.edu/)).
- Holme, D. J. and Peck, H. 1998. *Analytical Biochemistry*. Third Edition. New York: Addison Wesley Longman, Ltd.

- Kamasastri,, P. V., and Prabhu, P. V. 1961. Preparation of Chitin and Glucosamine from Prawn Shell Waste. *Journal of Science of the Indian Research D* 20 : 466.
- Khan, T. A., Peh, K. K., and Ch'ng, H. S. 2002. Reporting Degree of Deacetylation Values of Chitosan : the Influence of Analytical Methods. *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* 5 (3, September-December) : 205-212 (accessed online from url [http : //www.ualberta.ca/~csps/](http://www.ualberta.ca/~csps/)).
- Khopkar, S. M. 1985. *Basic Concepts of Analytical Chemistry*. New York : Wiley Eastern Limited.
- Kristinsson, H. G. and Rasco, B. A. 2000. Fish Protein Hydrolysates: Production, Biochemical, and Functional. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 40(1):43-81. CRC Press LLC.
- Lehninger, A. L. 1998. *Dasar-dasar Biokimia jilid 1*(Cetakan kelima). Terjemahan: Thenawijaya, M. dari *Principles of Biochemistry* (1982). Jakarta: Erlangga.
- Marganof. (2003). Potensi Limbah Udang Sebagai Penyerap Logam Berat (Timbal, Kadmiun dan Tembaga) di Perairan. [[http://rudycr.topcities.com/ppp702_71034/ marganof.htm](http://rudycr.topcities.com/ppp702_71034/marganof.htm)] dikunjungi 10 April 2005.
- Mathews, C. K. and van Holde, K. E. 1990. *Biochemistry*. Redwood City, California: The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc.
- Meidina., Sugiyono., Jenie, B. Sri. Laksmi., Suhartono,M.T. 2006. Aktivitas Antibakteri Oligomer Kitosan Yang Diproduksi Menggunakan Kitonase Dari Isolat *B. Licheniformis* MB-2. Departemen Teknologi Pangan dan Gizi, Institut Pertanian Bogor, Kampus Darmaga,Bogor
- Pedroni, V. I., Gschaidler, M. E., and Schulz, P. C. 2003. UV Spectrophotometry : Improvements in the Study of the Degree of Acetylation of Chitosan. *Macromolecular Biosciences* 3 (10, October) : 531-534 (accessed online from url [http : //www3.interscience.wiley.com/](http://www3.interscience.wiley.com/)).
- Prasetyo, K. W. 2004. Pemanfaatan Limbah Cangkang Udang Sebagai Bahan Pengawet Kayu Ramah Lingkungan. *Harian Kompas* (Kamis, 15 Juli 2004) (diakses online dari url [http : //www.kompas.com/](http://www.kompas.com/)).

- Rismana, E. 2003. Serat Kitosan Mengikat Lemak. *Harian Kompas* (Kamis, 09 Januari 2003) (diakses online dari url [http : //www.kompas.com/](http://www.kompas.com/)).
- Sannan, T., Kurita, K., Ogura, K., and Iwakura, Y. 1978. Studies on Chitin. 7. I. R. Spectroscopic Determination of Degree of Deacetylation. *Polymer* 19 : 458-459 (accessed online from url [http : //www.elsevier.com/](http://www.elsevier.com/); [//www.sciencedirect.com/](http://www.sciencedirect.com/)).
- Sasangka, V. A. F. 1997. Hidrolisis Enzimatik Ikan Lemuru (*Sardinella* sp) dengan Variasi Konsentrasi Bahan dan Lama Hidrolisis. *Skripsi*. Jember: Fakultas Pertanian Universitas Jember.
- Sjaifullah, A., Winata, I. N. A., & Santoso, A. B. 2006. Eksplorasi Hidrolisis Protein Ikan Lemuru Menggunakan Enzim dari Isi Perut Ikan Tuna. *Proposal Program Intensif Riset Dasar*. Jember: Lembaga Penelitian Universitas Jember.
- Soetomo, M. (1990). Teknik Budidaya Udang Windu. Sinar Baru. Bandung.
- Solomon, T. W. G. 1990. *Fundamentals of Organic Chemistry*. Fourth Edition. New York: John Wiley & Sons, Inc.
- Stryer Lubert. 1995. "Biokimia" (edisi keempat volume pertama). New York. Stanford University.
- Sudarmadji, S., Haryono, B., dan Suhardi. 1997. "Prosedur Analisa Untuk Bahan Makanan Dan Pertanian" (edisi keempat cetakan pertama). Yogyakarta : Liberty.
- Synowiecki, J., and Al-Khateeb, N. A. 2003. Production, Properties, and Some New Applications of Chitin and its Derivatives. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 43 (2) : 145-171 (accessed online from url [http : //www.crcjournals.com/](http://www.crcjournals.com/)).
- Tan, S. C., Khor, E., Tan, T. K., and Wong, S. M. 1998. The Degree of Deacetylation of Chitosan : Advocating the First Derivative UV-Spectrophotometry Method of Determination. *Talanta* 45 : 713-719 (accessed online from url [http : //www.elsevier.com/](http://www.elsevier.com/) ; [//www.sciencedirect.com/](http://www.sciencedirect.com/)).
- Voet, D. and Voet, J. G. 2004. *Biochemistry*. Third Edition. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc.

- Whitaker, J. R. 1994. *Principles of Enzymology for the Food Sciences, second edition*. New York: Marcel Dekker, Inc.
- Winarno, F. G. 1995. *Enzim pangan, cetakan ketiga*. Jakarta: Gramedia Pustaka Utama.
- Wirahadikusumah, M. 1989. *Biokimia: Protein, Enzim, dan Asam Nukleat*. Bandung: Penerbit ITB.