

# DEMINERALISASI DAN DEPROTEINASI KULIT UDANG SECARA KONTINYU PADA TAHAPAN EKSTRAKSI KITIN SECARA BIOLOGIS

Deden Rosid Waltam<sup>a</sup>, Heri Hermansyah<sup>b</sup>, Siswa Setyahadi<sup>c</sup>

<sup>a</sup>Mahasiswa Program Magister Teknik Kimia, Fakultas Teknik, Universitas Indonesia

<sup>b</sup>Grup Riset Bioproses, Departemen Teknik Kimia, Fakultas Teknik, Universitas Indonesia

<sup>c</sup>Bidang Teknologi Produksi Biokatalis, Pusat Teknologi Bioindustri, BPPT

## Abstract

*Chitin extraction in industry has been conducted by chemical process. The process has been known as a harsh treatment that badly affected to chitin quality, equipment and the environment. Since the last decade biologically chitin extraction has more attracted attention. The biologically chitin extraction was conducted by batch fermentation or subsequent-batch fermentation. Continuous demineralization and deproteinization is a new innovation on biologically chitin production technology. This system promises as an alternative technology for overcoming problems of batch fermentation process and chemical process. The objectives of the experiment was to obtain the optimal condition for continuous demineralization and deproteinization for producing chitin from *Panaeus vannamei* shrimp shells. *Lactobacillus acidophilus* FNCC 116 and *Bacillus licheniformis* F11.1 was used for demineralization and deproteinization process respectively. The results showed that the best condition for continuous demineralization was 6,5% glucose feed, with 16 hours retention time. For continuous deproteinization, the best condition was with 12 hours retention time. The process could remove 92.95% ash and 91.40% protein. The chitin, ash, and protein content of chitin product was 96.69%, 1.44% and 1,76% respectively.*

**Kata kunci :** chitin, continuous demineralization and deproteinization, microbiology process

## 1. PENDAHULUAN

Menurut Bursa Produk Perikanan-DKP, produksi udang Shrimp Club Indonesia per Agustus 2008, total mencapai 290.000 – 470.000 ton. Jika prediksi produksi udang tahun ini mencapai target maka Indonesia masuk sebagai produsen udang ke-4 di dunia setelah Cina, Thailand dan Vietnam, dengan data tersebut Indonesia sangat berpotensi untuk mengembangkan industri kitin dari kulit udang yang diprediksi sekitar 325.000 ton per tahun (Teknologi-dkp.go.id, 2006).

Kitin diperoleh dari kulit udang melalui proses deproteinasi menggunakan Natrium Hidroksida (NaOH) dan demineralisasi menggunakan Asam Klorida (HCl) (Steven et al., 1998). Proses kimiawi mempunyai menyebabkan korosi pada peralatan dan depolimerisasi pada rantai  $\alpha$ -glukosida, (Toan et al., 2006; Aye K.N).

Ekstraksi kitin dapat dilakukan secara biologis, dengan memanfaatkan bakteri asam laktat untuk

proses demineralisasi, dan bakteri proteolitik pada proses deproteinasi.

Beberapa penelitian ekstraksi kitin melalui sistem fermentasi *batch* telah banyak dilakukan, diantaranya Jung et al., (2005), menggunakan konsorsia *L. Paracasei* subsp. *Tolerans* KCTC-3074 dan *Serratia marcescens*, tingkat demineralisasi 97,2%. dan deproteinasi 52,6%.

Rao dan Stevens (2006), menggunakan *L. Plantarum*, demineralisasi 81,4%, dan deproteinasi 52,2% - 59,8%. Sini et al., (2007) menggunakan *B.subtilis* dapat menurunkan mineral 72% dan protein 84%. Jung et al., (2007) menggunakan *Serratia marcescens* FS-3 dapat menurunkan protein 68,9%

Sistem fermentasi *subsequent-batch* menggunakan *L. acidophilus* FNCC 116 dan *B. licheniformis* F11.1, dapat menurunkan mineral 95,69% dan protein 92,42%.

Tingkat penyisihan mineral dan protein dengan sistem fermentasi *batch*, seperti diuraikan di atas

masih relatif rendah yaitu sekitar 95%. Berdasarkan fakta tersebut, maka penelitian ekstraksi kitin dengan sistem fermentasi kontinyu merupakan inovasi baru untuk mengatasi kekurangan pada sistem fermentasi *batch* maupun proses kimiawi.

Pada penelitian ini akan dilakukan proses demineralisasi dan deproteinasi kulit udang vannamei secara kontinyu, menggunakan *L. acidophilus* FNCC 116 dan *B. licheniformis* F11.1, dengan tujuan diperolehnya kondisi optimum fermentasi agar tingkat penyisihan mineral dan protein dapat mencapai minimal 97%, dengan kandungan abu dan protein pada produk akhir maksimal 1,5%.

## 2. BAHAN DAN METODE

### Kulit udang

Kulit udang vannamei (*Penaeus vannamei*) diperoleh dari industri pengolahan udang beku PT Wirontono Baru, Jakarta Utara.

### Mikroba

Mikroba yang digunakan adalah *Lactobacillus acidophilus* FNCC 116 dan *Bacillus licheniformis* F11.1, ke dua galur mikroba tersebut disimpan di suhu -80°C pada gliserol 10% (v/v).

Inokulum, di-subkultur selama 16-24 jam pada media *Luria-Bertani* (LB) untuk *B. licheniformis* F11.1 dan media *deMann Rogosa Sharpe* (MRS) untuk *L.acidophilus* FNCC 116, diinkubasi pada suhu 37°C, sampai diperoleh jumlah sel 10<sup>7</sup>-10<sup>9</sup> CFU/ml.

### Media Fermentasi

Komposisi media fermentasi untuk proses demineralisasi oleh mikroba *L.acidophilus* FNCC 116 pada proses *batch* adalah: Glukosa 6% (b/v), *Yeast extract* 0.05% (b/v), dan Kulit udang 30% (b/v). Deproteinasi oleh *B. licheniformis* F11.1, menggunakan media *yeast extract* 0.5% (b/v); KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.5% (b/v); CaCl<sub>2</sub> 0.1% (b/v); NaCl 0.5% (b/v); dan MgSO<sub>4</sub> 0,05 (b/v).

Kondisi proses demineralisasi dilakukan pada pH 7; temperatur 30 °C; dengan agitasi 50 rpm. Kondisi proses deproteinasi adalah pH 7,3; temperatur 37 °C; agitasi 250 rpm; dengan aerasi 2 vvm.

### Bioreaktor

Menggunakan fermentor berpengaduk *flat blade disk turbine*, volume 12 liter (Biostat, B. Braun Biotech International, Germany) dengan volume kerja 5 liter.

### Prosedur percobaan

Percobaan demineralisasi dan deproteinasi kulit udang secara kontinyu oleh *L.acidophilus* FNCC 116 dan *B. licheniformis* F11.1, didahului dengan percobaan demineralisasi dan deproteinasi secara *batch*, untuk menentukan parameter waktu dimulainya proses kontinyu, konsentrasi glukosa

umpan, dan waktu tinggal pada proses fermentasi kontinyu.

Konsentrasi glukosa umpan pada demineralisasi kontinyu, ditentukan berdasarkan rendemen mikroba (Y<sub>X/S</sub>) dan jumlah mikroba maksimum (X<sub>max</sub>) yang diharapkan selama proses berlangsung digunakan persamaan 1 dan 2. Sedangkan waktu tinggal (R<sub>t</sub>) selama proses kontinyu, ditentukan berdasarkan persamaan 3:

$$Y_{X/S} = -\frac{\Delta X}{\Delta S} \quad (1)$$

$$X_{max} = X_0 + Y_{X/S}S_0 \quad (2)$$

$$F = \frac{V}{R_t} \quad (3)$$

### Analisa glukosa dan asam laktat

Analisa glukosa dan asam laktat menggunakan HPLC (Merck-Hitachi), dengan kolom Aminex HPX-87H (300mm x 7,8mm), 65 °C (L-5025-Column Thermostat), fasa gerak isokratik H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,005 N, laju alir 0.6 ml/menit (L-6200A-Pump, Merck-Hitachi), detektor *Diferential Refractometer* RI-71 (Merck). Standar yang digunakan adalah Glukosa 1% (Glucose, Sigma-Aldrich) Asam laktat 10% (L-Lactic Acid, Oxoid).

### Analisa abu dan protein kulit udang

Abu kulit udang dianalisa menggunakan metoda AOAC (1984), 1 gram contoh kulit udang dimasukan ke cawan crucible dan dibakar di dalam furnace pada suhu 800°C selama 3 jam, abu yang tersisa ditimbang. Kandungan dan tingkat penyisihan abu dihitung menggunakan persamaan 4:

$$\text{Abu (\%)} = \frac{m_2 - m}{m_1 - m} \times 100\% \quad (4)$$

Keterangan:

- m<sub>1</sub> = Berat cawan crucible dan contoh
- m<sub>2</sub> (g)
- m = Berat cawan crucible dan abu (g)
- = Berat cawan (g)

$$\text{Tingkat penghilangan abu (\%)} = \frac{\text{kadar abu awal} - \text{kadar abu akhir}}{\text{kadar abu awal}} \times 100\% \quad (5)$$

Kadar protein kulit udang diukur dengan metode Lowry yang dimodifikasi (Waldeck et al. 2006), 0,5 g kulit udang kering, ditambah 7,5 ml NaOH 1 M dan diinkubasi pada suhu 55°C selama 24 jam. Filtrat protein sebanyak 30 μl direaksikan dengan 270 μl larutan PBS (Phosphate Buffered Saline), dan 3 ml larutan Lowry, ditambahkan 100 ml reagen Folin-Ciocalteaus, ukur absorbansi pada λ 750 nm.

Kadar dan tingkat penyisihan protein dihitung berdasarkan persamaan 6 dan 7:

$$P = \frac{\text{Konsentrasi protein} \times V_{\text{NaOH}} \times F_P}{1000 \times S} \times 100\% \quad (6)$$

Keterangan:

- P = Kadar Protein (%)
- $V_{NaOH}$  = Volume NaOH (7,5 ml)
- $F_P$  = Faktor Pengenceran
- S = Berat Contoh (0,5 g)

$$\text{Tingkat penghilangan protein (\%)} = \frac{\text{Protein awal} - \text{Protein akhir}}{\text{Protein awal}} \times 100\% \quad (7)$$

### Analisa aktivitas protease

Aktivitas protease diukur dengan metode azokasein (Waldeck et al, 2006), pada suhu 37 °C selama 10 menit, absorbansi diukur pada  $\lambda$  440 nm.

### Analisa kitin

Kulit udang hasil proses demineralisasi dan deproteinasi ditentukan kandungan kitinnya (Waldeck et al. 2006), 5 g kulit udang kering, ditambah 7,5 ml NaOH 1 M, inkubasikan pada suhu 50 °C selama 24 jam, saring dan buang supernatan, contoh dibilas dengan aquades, pindahkan seluruh contoh ke dalam labu Kjeldahl, tentukan kandungan nitrogen total contoh menggunakan metode Kjeldahl, kandungan kitin ditentukan menggunakan persamaan 8:

$$\% \text{ (kitin)} = w(N) \times 14,5 \times 100 \quad (8)$$

Keterangan:

$$w(N) = \text{Fraksi berat nitrogen}$$

## 3. HASIL DAN PEMBAHASAN

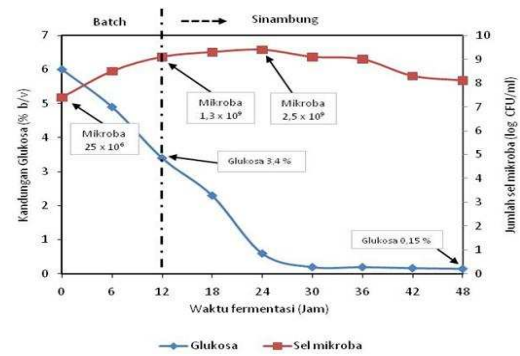
### Penentuan Awal Dimulainya Proses Kontinyu

Penentuan awal proses demineralisasi secara kontinyu, mengacu pola pertumbuhan mikroba *L. acidophilus* FNCC 116, dan penurunan kandungan glukosa selama percobaan proses demineralisasi secara *batch*, seperti pada Gambar 1.

Hasil percobaan tersebut, menunjukkan pertumbuhan mikroba mengalami fase eksponensial dari jam ke 0 sampai akhir jam ke 12, fase stasioner mulai jam ke 16 sampai jam ke 30, dan fase kematian mulai jam ke 35 sampai jam ke 48.

Berdasarkan analisis pola tersebut maka awal dimulainya proses demineralisasi secara kontinyu adalah jam ke 12 jam, karena pada jam tersebut pertumbuhan sel akan memasuki akhir fase eksponensial dan glukosa mulai berkurang yang tersisa sekitar 30%.

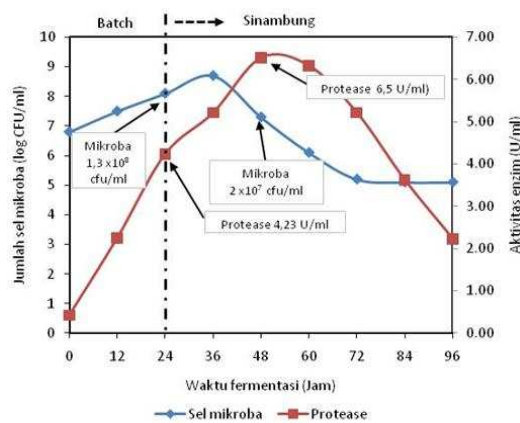
Sedangkan awal proses deproteinasi secara kontinyu mengacu pada pola pertumbuhan *B. licheniformis* F11.1 selama percobaan deproteinasi secara *batch*, seperti pada Gambar 2.



Gambar 1. Skematik waktu dimulainya proses demineralisasi kontinyu

Pola pertumbuhan mikroba tersebut, memasuki fase eksponensial mulai jam ke 0 sampai akhir jam ke 24, fase stasioner mulai awal jam ke 30 sampai akhir jam ke 36, dan fase kematian mulai akhir jam ke 36.

Berdasarkan analisis pola tersebut maka proses deproteinasi secara kontinyu dimulai saat memasuki jam ke 24, karena pada jam tersebut sel mulai memasuki akhir fase eksponensial.



Gambar 2. Skematik waktu dimulainya proses deproteinasi kontinyu

### Penentuan konsentrasi substrat umpan

Perubahan jumlah mikroba selama 24 jam pertama pada proses demineralisasi ( $X$ ) sebesar  $2,49 \times 10^{12}$  CFU/L, dan perubahan konsentrasi glukosa ( $S$ ) 54 g/L, maka berdasarkan persamaan 1, rendemen mikroba *L. acidophilus* FNCC 116 selama proses demineralisasi secara *batch* ( $Y_{X/S}$ ) adalah  $46,11 \times 10^6$  CFU/g glukosa.

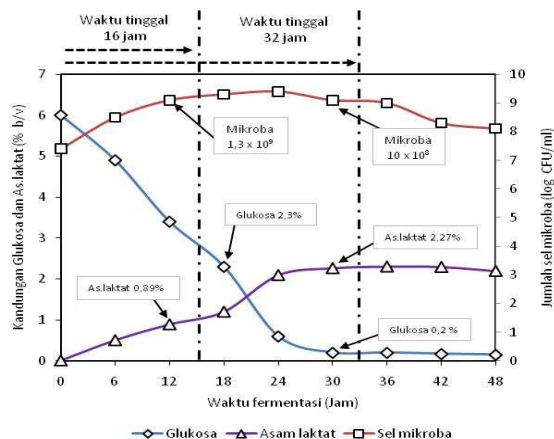
Jumlah sel yang diharapkan selama proses demineralisasi secara kontinyu ( $X_{max}$ ) sebanyak  $3 \times 10^{12}$  CFU/L, jumlah mikroba awal ( $X_0$ ) sebanyak  $25 \times 10^9$  CFU/L, maka berdasarkan persamaan 2, konsentrasi glukosa awal ( $S_0$ ) yang diperlukan sebesar 64,65 g/L atau 6,5% (b/v).

Hasil penelitian Rao dan Steven (2005), proses ekstraksi kitin dalam reaktor drum menggunakan mikroba *L. plantarum* diperlukan glukosa sebanyak 5%, kemudian Ling et al., (2006), untuk produksi

asam laktat secara kontinyu menggunakan *L. rhamnosus* digunakan glukosa 4,0%–5,0%, proses demineralisasi menggunakan *Lactobacillus acidophilus* FNCC 116 dengan *subsequent-batch* diperlukan glukosa 6,0%.

### Penentuan waktu tinggal dan laju alir

Dari gambar 3 menyatakan bahwa konsumsi glukosa meningkat sampai akhir jam ke 24 sehingga glukosa hanya tersisa sekitar 0,3%, selanjutnya konstan sampai akhir proses. Produksi asam laktat dari *L. acidophilus* FNCC 116, meningkat mulai jam ke 16 sampai jam ke 24, dan 24 jam berikutnya cenderung konstan. Berdasarkan analisa pola fase pertumbuhan mikroba, konsumsi glukosa dan produksi asam laktat tersebut, maka waktu tinggal untuk pada proses demineralisasi secara kontinyu adalah selama 16 jam dan 32 jam.

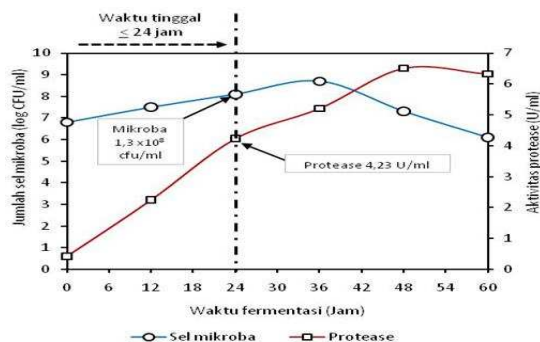


Gambar 3. Skematik penentuan waktu tinggal proses demineralisasi secara kontinyu

Sementara itu, waktu tinggal percobaan deproteinasi secara kontinyu, ditentukan berdasarkan pola pertumbuhan dan produktivitas *B. licheniformis* F11.1, dalam menghasilkan protease, seperti Gambar 4.

Pertumbuhan *B. licheniformis* F11.1 memasuki akhir fase eksponensial pada jam ke 24, dan memasuki fase stasioner awal jam ke 30. Produksi protease meningkat sampai akhir jam ke 36. Peningkatan protease setelah jam ke 36, kemungkinan akibat tambahan enzim dari lisis masa sel yang mati.

Pertumbuhan *B. licheniformis* F11.1 selama 60 jam proses deproteinasi, fase akhir eksponensial terjadi di akhir jam ke 12, dan fase stasioner terjadi pada awal jam ke 18 sampai akhir jam ke 24. Sedangkan produksi protease mengalami kenaikan sampai jam ke 30.



Gambar 4. Skematik penentuan waktu tinggal proses deproteinasi secara kontinyu

Seperti telah diuraikan sebelumnya bahwa, laju alir ditentukan berdasarkan waktu tinggal (Rt) pada setiap proses kontinyu. Pada proses demineralisasi kontinyu, waktu tinggalnya adalah 16 jam dan 32 jam, sedangkan volume kerja demineralisasi (V) adalah 5000 ml, maka berdasarkan persamaan 3, laju alir nutrisi glukosa (F) sekitar 5,21 ml/menit dan 2,6 ml/menit.

Sedangkan laju alir nutrisi *yeast extract* pada proses deproteinasi kontinyu, dengan waktu tinggal (Rt) 6 jam, 12 jam dan 24 jam, dan volume kerja deproteinasi (V) adalah 5000 ml, maka berdasarkan persamaan 3, laju alir nutrisi (F) yang diperlukan sekitar 13,89 ml/menit, 6,94 ml/menit, dan 3,47 ml/menit.

### Ekstraksi Kitin dari Kulit Udang Secara Kontinyu

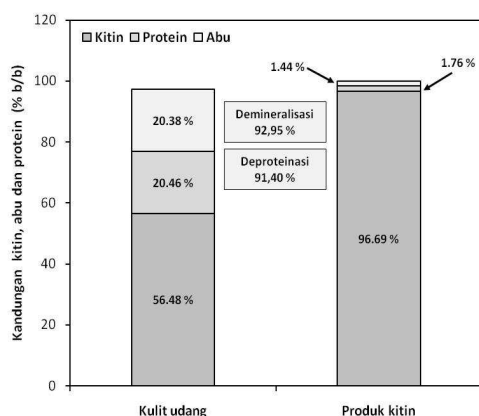
Berdasarkan hasil proses demineralisasi kontinyu selama 36 jam dengan konsentrasi glukosa umpan 6,5% dan waktu tinggal 16 jam, dapat menurunkan kandungan abu sebesar 97,94%, pada awal proses kandungan abu kulit udang sebesar 20,38%, di akhir proses turun menjadi 0,42%.

Kandungan protein kulit udang mengalami kenaikan 50,59%, pada awal proses sebesar 20,46% di akhir proses naik menjadi 30,81%, hal ini akibat berubahnya proporsi antara mineral dan protein dalam kulit udang hasil demineralisasi secara kontinyu.

Setelah dilakukan deproteinasi secara kontinyu terhadap produk hasil demineralisasi tersebut, maka kandungan protein mengalami penurunan sebesar 94,29%, di awal proses kandungan protein sebesar 30,81% dan di akhir proses turun menjadi 1,76%. Kandungan abu mengalami kenaikan, di awal proses kandungan abu sebesar 0,42% dan diakhir proses naik menjadi 1,44%.

Berdasarkan analisa terhadap produk kitin hasil ekstraksi demineralisasi dan deproteinasi kontinyu seperti pada Gambar 5, tingkat penurunan kandungan abu (demineralisasi) sebesar 92,95%, dan tingkat penurunan kandungan protein (deproteinasi) sebesar 91,40%, dengan kandungan abu dan protein adalah 1,44 % (b/b) dan 1,76 %

(b/b), dengan kandungan kitin sebesar 96,69 % (b/b).



Gambar 5. Perubahan kandungan abu selama proses deproteinasi kontinyu

#### 4. KESIMPULAN

Produk akhir yang diperoleh dari proses demineralisasi dan deproteinasi sistem fermentasi kontinyu memiliki kandungan kitin 96,69% (b/b), abu 1,44% (b/b), protein 1,76% (b/b). Secara umum proses demineralisasi dan deproteinasi kontinyu pada tahap ekstraksi kitin secara biologis hasilnya cukup baik, walaupun belum mencapai target yang diharapkan yaitu demineralisasi dan deproteinasi minimal 97%, dengan kandungan abu dan protein maksimal 1,5%.

#### DAFTAR PUSTAKA

AOAC. 1984. Official Methods of Analysis. 15th Ed. Association of Official Analytical Chemistry, Inc. Arlington. Virginia.

Aye, K.N., and W.F Stevens. 2004. Improved Chitin Production by Pretreatment of Shrimp Shells. *J. Chem., Technol., and Biotechnol.* (79): 421 – 425.

Jung, W.J., Kuk, J.H., Kim, K.Y., and Park, R.D., 2005, Demineralization of red crab shell waste by lactic acid fermentation. *Appl. Microbiol. Biotechnol. (Environmental Biotechnology)*, (67): 851-654.

Jung, W.J., G.H. Jo, J.H. Kuk, Y.J. Kim, K.T. Oh and R.D. Park. 2007. Production of chitin from red crab shell waste by successive fermentation with *Lactobacillus paracasei* KCTC-3074 and *Serratia marcescens* FS-3. *Journal of Carbohydrate Polymers*.68(4): 746-750.

Ling, L.S., Mohamad, R., Rahim, R.A., Wan, H.Y., and Arif, A.B. 2006. Improved Production of Live Cells of *Lactobacillus rhamnosus* by Continuous Cultivation using Glucose-yeast Extract Medium. *The Journal of Microbiology*. 44(4): 439-446.

Lowry. O.H, N.J. Rosebrough, A.L. Farr, and R.J. Rundall. 1954. Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. *J. Bio.Chem.* (193): 265 – 275.

Rao, M.S., and W.F. Stevens. 2005. Chitin Production by *Lactobacillus* Fermentation of Shrimp Biowaste in a Drum Reactor and Its Chemical Conversion to Chitosan. *J. Chemical Technology and Biotechnology.* (80): 1080 – 1087.

Rao, M.S., and W.F. Stevens. 2006. Fermentation of Shrimp Biowaste under Different Salt Concentration with Amylolytic and Non-Amylolytic *Lactobacillus* Strains for Chitin Production. *J. of Food Technol., and Biotechnol.* (44): 83 – 87.

Sini, Theruvathil K., Sethumadhavan Santhosh, and Paruthapara T. Mathew. 2007. Study on the production of chitin and chitosan from shrimp shell by using *Bacillus subtilis* fermentation. *J. of Carbohydrate Research*. 342(16): 2423-2429

Stevens, W.F., Cheypratub, P., Haiqing, S., Lertsutthiwong, P., How, N.C., and Chandkrachang, S. 1998. Alternatives in Shrimp Biowaste Processing, In Flegel, T.W. (ed) *Advance in Shrimp Biotechnology, Proceeding Shrimp Biotechnology 5th Asian Fisheries Forum*, Thailand.

Teknologi-dkp.go.id, 2006, Industri Kitin: Dari Limbah Menjadi Bernilai Tambah, <http://ikanmania.wordpress.com/2007/12/30/industri-kitin-dari-limbah-menjadi-bernilai-tambah/>. Diakses: September 2008.

Toan, NV., Ng-How, C., Aye KY., and Trang TS. 2006. Production of High-Quality Chitin and Chitosan from Preconditioned Shrimp Shells. *J. Chemical Technology and Biotechnology.* (81): 1113 – 1118

Waldeck. J, G. Daun, B. Bisping, and F. Meihardt. 2006. Isolation and Molecular Characterization of Chitinase-Deficient *Bacillus licheniformis* Strains Capable of Deproteinization of Shrimp Shell Waste to Obtain Highly Viscous Chitin. *J. Appl. Environ. Microbiol.* (72): 7879 – 7885.