



## DEPOLIMERISASI KITOSAN DENGAN HIDROLISA ENZIMATIK MENGUNAKAN ENZIM $\alpha$ -AMILASE

Hanik Handayani P. L., Paramarta Siwi R., Nur Rokhati \*)

Jurusan Teknik Kimia, Fakultas Teknik, Universitas Diponegoro  
Jln. Prof. Soedarto, Tembalang, Semarang, 50239, Telp/Fax: (024)7460058

### Abstrak

Kitosan merupakan polimer turunan kitin yang memiliki banyak manfaat dalam bidang pangan dan medis. Kitosan memiliki berat molekul yang cukup besar sehingga mengalami kendala dalam aplikasinya. Untuk mengatasi kekurangan tersebut, dilakukan hidrolisa kitosan untuk mendapatkan kitosan dengan berat molekul lebih rendah. Pada penelitian ini akan dilakukan hidrolisa kitosan secara enzimatik menggunakan enzim  $\alpha$ -amilase termofilik. Percobaan diawali dengan membuat larutan kitosan 1% w/v dalam larutan asam asetat 1% v/v. Larutan kitosan dihidrolisa menggunakan enzim  $\alpha$ -amilase termofilik dengan variasi variabel pH, suhu, waktu, dan perbandingan enzim:substrat untuk mendapat kondisi operasi optimum. Respon uji hasil yang dilakukan adalah uji Dextro Equivalent (DE), uji viskositas, dan berat molekul rata-rata. Hasil penelitian menunjukkan bahwa kondisi operasi optimum hidrolisa adalah pada pH 5, suhu 90 °C, waktu operasi 2 jam, dan perbandingan enzim:substrat 1:2500 (0,1 ml). Pada variasi pH, suhu, waktu, dan penambahan enzim, DE meningkat seiring variabel bertambah, namun kemudian turun secara signifikan setelah titik optimum tiap variabel. Hidrolisa ini dapat menurunkan BM dari 1680-1750 kDa menjadi 144,18 kDa sehingga termasuk dalam kategori MMWCs.

**Kata Kunci:** Kitosan; Hidrolisa; Enzim  $\alpha$ -amilase; Dextrose Equivalent; Berat molekul

### Abstract

Chitosan is a polymer derivative of chitin that has many benefits in food and medical. Since chitosan has a large molecular weight, it has constraints to its application. To overcome the disadvantage, it needs hydrolysis of chitosan in order to obtain a lower molecular weight. In this research the hydrolysis of chitosan will be operated by enzymatic process uses thermophilic enzyme  $\alpha$ -amylase. The experiment begins by making a chitosan solution 1% w/v in an acetic acid solution 1% v/v. The chitosan solution is hydrolyzed using the enzyme  $\alpha$ -amylase with varied pH, operating temperature, time, and ratio of the enzyme:substrate to obtain the optimum. The response comprehends Dextrose Equivalent (DE), viscosity, and the average of molecular weight. The results showed that the optimum operating conditions for chitosan hydrolysis using  $\alpha$ -amylase enzyme is at pH 5, temperature 90 °C, 2 hours operating time, and ratio of enzyme:substrate 1:2500 (0,1 ml). For variable pH, temperature, time, and enzyme addition, DE rises meanwhile variables are increased, then it dropped significantly after the optimum level. The hydrolysis can reduce molecular weight of chitosan from 1680-1750 kDa to 144,18 kDa thus it is included to MMWCs.

**Keyword :** Chitosan; Hydrolysis; Enzyme  $\alpha$ -amylase; Dextrose Equivalent; Molecular weight

### 1. Pendahuluan

Kitosan merupakan produk alam melimpah yang cukup berpotensi di Indonesia. Kitosan banyak dimanfaatkan dalam berbagai bidang contohnya pangan dan medis. Namun berat molekul kitosan cukup besar hingga mencapai  $4 \times 10^4$  Da (Domard A, 1987) membuat kitosan terkendala dalam pengaplikasiannya. Oleh karena itu perlu dilakukan hidrolisis untuk menurunkan berat molekul kitosan.

Hidrolisis secara enzimatik dapat dilakukan karena kondisi reaksi yang ringan (mild), spesifikasi tinggi, tidak terjadi modifikasi lingkaran glukosa, dan produksi massa dari kitooligosakarida (Akiyama, K., et al., 1995). Hal tersebut kemudian menjadi alternatif untuk melakukan hidrolisa kitosan. Enzim spesifik untuk hidrolisa kitosan adalah kitosanase. Namun saat ini enzim tersebut masih mahal dan ketersediaannya di pasaran cukup

\*) Penulis Penanggung Jawab (Email: [email\\_dosen@undip.ac.id](mailto:email_dosen@undip.ac.id))

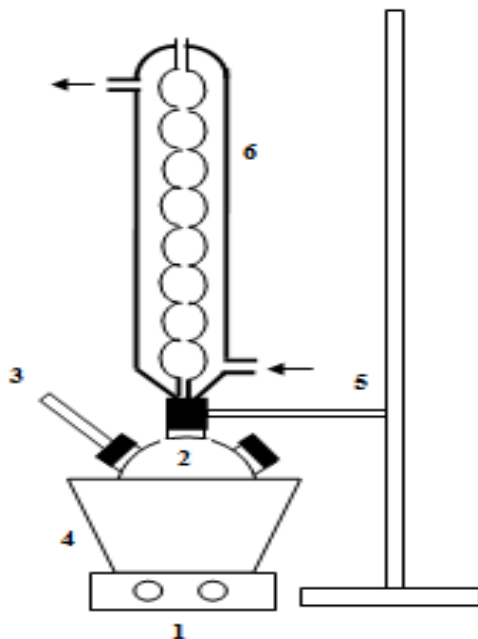
sulit ditemukan, maka kemudian muncul penelitian-penelitian dengan enzim lain, di antaranya selulase (Lin & Ma, 2003; Liu, Y. J., et al., 2005), pektinase (Kittur, F. S., et al., 2003; Sardar, M., et al., 2003), pepsin (Roncal, T., et al., 2007), papain (Huang, Y. C., et al., 2003; Lin, H., 2002), protease netral (Li, J., et al., 2005), dan lipase (Lee, D. X., et al., 2008).

Enzim yang banyak dijumpai di pasar Indonesia dan dipakai di industri adalah enzim  $\alpha$ -amilase termofilik. Sementara itu, belum ditemukan publikasi hasil penelitian mengenai hidrolisa kitosan menggunakan enzim  $\alpha$ -amilase termofilik. Dengan pertimbangan demikian maka peneliti memilih melakukan penelitian hidrolisa kitosan untuk menurunkan berat molekul dengan menggunakan enzim  $\alpha$ -amilase. Penelitian ini bertujuan menurunkan berat molekul kitosan dengan hidrolisis enzimatis menggunakan enzim  $\alpha$ -amilase termofilik dan untuk mengetahui kondisi operasi optimumnya.

## 2. Bahan dan Metode Penelitian

### Bahan dan Alat

1. Kitosan
2. Asam asetat
3. Aquadest
4. Enzim  $\alpha$ -amilase
5. NaOH
6. HCl
7. Fehling A dan Fehling B
8. Methylene Blue
9. Larutan glukosa standar
1. Rangkaian alat hidrolisa
2. *Magnetic stirrer*
3. Labu leher tiga
4. Termometer
5. *Waterbath*
6. *Beaker glass*
7. Buret, statif, dan klem
8. *Erlenmeyer*
9. Labu takar
10. Pipet tetes
11. Gelas ukur

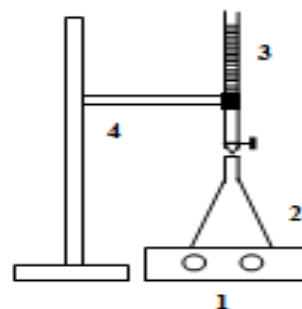


Gambar 1. Rangkaian Alat Hidrolisa

### Keterangan:

1. *Magnetic stirrer & heater*
2. *Labu leher tiga*
3. *Thermometer*
4. *Waterbath*
5. *Statif & klem*
6. *Pendingin balik*

### Arah air pendingin



### Keterangan:

1. *Heater*
2. *Erlenmeyer*
3. *Buret*
4. *Statif & klem*

Gambar 2. Rangkaian Alat Titrasi

### Langkah Percobaan

1. Pembuatan larutan asam asetat 1% v/v
2. Pembuatan larutan kitosan 1% w/v  
Kitosan 10 gr dilarutkan dalam larutan asam asetat hingga volume larutan mencapai 1000 ml.
3. Hidrolisa kitosan
  - 1.) Larutan kitosan 250 ml ditempatkan dalam labu leher tiga.
  - 2.) Rangkaian alat hidrolisa dipasang.
  - 3.) Suhu dan pH larutan diatur sesuai variabel.
  - 4.) Enzim ditambahkan ke dalam larutan.



- 5.) Hidrolisa dioperasikan selama waktu (t) tertentu sesuai dengan variabel.
  - 6.) Hidrolisa dihentikan dengan mendidihkan larutan selama 15 menit.
4. Standarisasi larutan glukosa
- 1.) Larutan fehling A 5 ml, larutan fehling B 5 ml, dan larutan glukosa anhidrit 15 ml dicampurkan dalam erlenmeyer.
  - 2.) Campuran dipanaskan selama  $\pm 1$  menit, ditambah 3 tetes MB, kemudian dititrasi sampai terdapat endapan merah bata.
  - 3.) Kebutuhan titran dicatat.
5. Uji gula pereduksi
- 1.) Lima ml dari larutan kitosan yang sudah dihidrolisa diencerkan sampai 100 ml, diambil 5 ml.
  - 2.) Fehling A 5 ml, fehling B 5 ml, dan larutan glukosa standar 15 ml ditambahkan ke larutan sampel yang sudah diencerkan.
  - 3.) Campuran dipanaskan selama  $\pm 1$  menit, ditambah 3 tetes MB, kemudian dititrasi sampai terdapat endapan merah bata.
  - 4.) Kebutuhan titran dicatat.
  - 5.) Angka DE didapat dari persamaan:

$$DE = \left[ \frac{100(F - M)N \left( \frac{100}{5} \times \frac{B}{5} \right)}{W} \right]$$

Keterangan:

DE = Dekstro Equivalent

F = larutan glukosa standar yang dibutuhkan untuk menitrasi 5 ml fehling A + 5 ml fehling B + 15 ml larutan glukosa standar

M = larutan glukosa standar yang dibutuhkan untuk menitrasi 5 ml fehling A + 5 ml fehling B + 15 ml larutan glukosa standar + 5 ml sampel

N = konsentrasi glukosa standart (gr/ml)

B = volume larutan hasil hidrolisa

W = berat pati terhidrolisa

6. Uji viskositas
- 1.) Air ( $\pm 3$  ml) dimasukkan ke dalam viskosimeter ostwald.
  - 2.) Waktu laju alir air diukur.
  - 3.) Sampel larutan kitosan yang telah dihidrolisa ( $\pm 3$  ml) dimasukkan ke dalam viskosimeter ostwald.
  - 4.) Waktu laju alir sampel diukur.
  - 5.) Angka viskositas didapat dari persamaan:

$$\eta_{sp} = \frac{t - t_0}{t_0}$$

Keterangan:

$\eta_{sp}$  = viskositas spesifik (detik)

t = waktu laju alir sampel (detik)

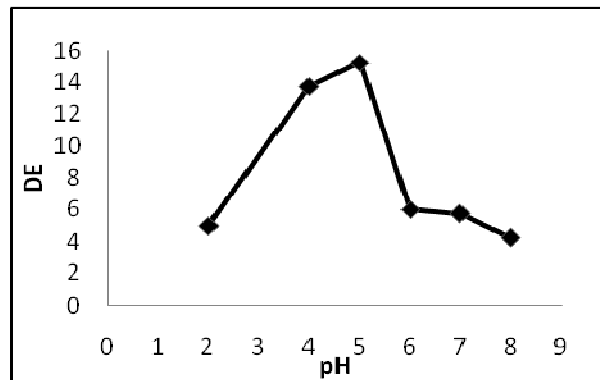
### 3. Hasil dan Pembahasan

#### 3.1. Pengaruh Kondisi Operasi terhadap DE Hasil Hidrolisis Kitosan

Dextrose Equivalent (DE) adalah besaran yang menyatakan nilai total gula pereduksi dari karbohidrat. DE berhubungan dengan Derajat Polimerisasi (DP). DP menyatakan jumlah unit monomer dalam suatu molekul (Wurzburg and Szymanski, 1970). Semakin tinggi DE larutan artinya semakin tinggi kadar gula pereduksi dalam larutan tersebut (Commerford *et al.*, 1963). Nilai DE kitosan dari Biotech Surendo adalah 0,8 sehingga setelah dihidrolisis dengan enzim  $\alpha$ -amilase diharap akan meningkatkan nilai DE. Aktivitas enzim dalam menghidrolisis kitosan dipengaruhi oleh pH, suhu reaksi, rasio penambahan enzim, dan waktu reaksi.

##### 3.1.1. Pengaruh pH

Hidrolisa kitosan dilakukan dengan penambahan enzim  $\alpha$ -amilase 0,1 ml, suhu operasi 90 °C, selama 5 jam. Analisa setelah hidrolisa kitosan adalah uji gula pereduksi (DE) dengan metode titrasi menggunakan Fehling A dan Fehling B. Pengaruh pH terhadap gula pereduksi (DE) dapat dilihat pada Gambar 3.

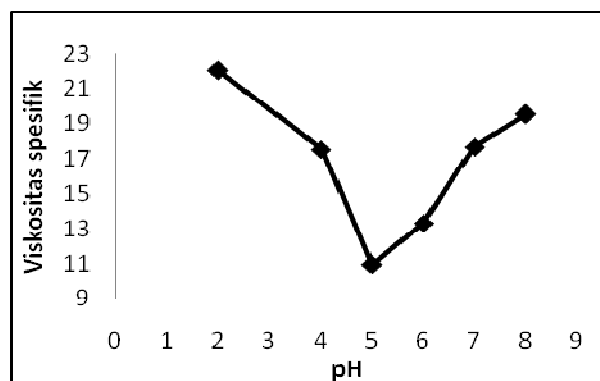


Gambar 3. Pengaruh pH terhadap DE Produk Hidrolisa Kitosan Menggunakan Enzim  $\alpha$ -amilase

Pada Gambar 3. DE cenderung meningkat pada kondisi asam. Semakin tinggi pH semakin tinggi pula DE-nya, terlihat pada pH 2, 4, dan 5. Kemudian DE turun pada saat pH mendekati netral atau semakin basa. DE menurun drastis pada pH 6. Pada variabel yang lebih basa yaitu pH 7 dan 8, DE semakin turun dibandingkan dengan pH sebelumnya.

Aktivitas enzim dipengaruhi beberapa hal, salah satunya adalah pH. Besarnya pH mempengaruhi aktivitas enzim karena adanya protonasi atau deprotonasi pada reaksi (Taylor, 2004). Apabila enzim  $\alpha$ -amilase digunakan pada pH yang terlalu asam (protonasi) maka aktivitas enzim akan berkurang. Begitu pula jika enzim  $\alpha$ -amilase digunakan pada pH yang lebih basa (deprotonasi) maka aktivitasnya cenderung menurun dibandingkan dengan kondisi asam, hal tersebut ditandai dengan penurunan nilai DE. Di sisi lain, kitosan dengan berat molekul yang tinggi sulit larut dalam air pada pH netral (Alla *et al.*, 1998). Kitosan larut dengan pelarut asam organik pada pH rendah (Peniston & Johnson, 1980), maka semakin asam suatu pelarut, kelarutan kitosan akan semakin baik.

Pada penelitian kami, kondisi optimum terjadi pada pH 5. Enzim amylase sendiri paling aktif bekerja pada pH 4,6-5,2 (Bennet and Friedden, 1969) kemudian mengalami penurunan setelahnya dan mengalami deaktivasi pada suasana basa (Hashemi *et al.*, 2012).



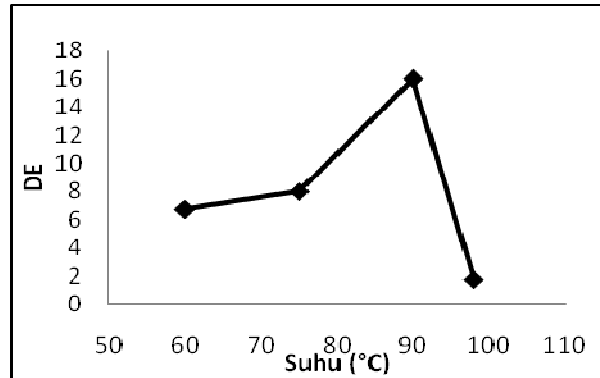
Gambar 4. Pengaruh pH terhadap Viskositas Spesifik Produk Hidrolisa Kitosan Menggunakan Enzim  $\alpha$ -amilase

Hasil uji viskositas tampak pada Gambar 4., kenaikan pH pada 1 – 5 mengakibatkan viskositas turun, dan saat pH di atas 5, semakin naik pH mendekati netral atau semakin basa, maka viskositas pun semakin meningkat.

Pada penelitian ini pH 5 merupakan titik optimum kitosan terlarut dengan baik dan enzim  $\alpha$ -amilase bekerja secara optimal, di mana semakin banyak pemutusan rantai polimer menjadi molekul yang lebih sederhana. Hal tersebut ditandai dengan meningkatnya DE larutan. Sementara itu, semakin banyak rantai yang terputus maka derajat polimerisasi (DP) akan semakin turun, dan menyebabkan turunnya viskositas larutan tersebut. Shengjun Wu (2011) pada penelitiannya menggunakan enzim  $\alpha$ -amilase jenis mesofilik dan menghasilkan titik optimum pada pH 5.

### 3.1.2. Pengaruh Suhu

Hasil penelitian sebelumnya menunjukkan kondisi pH terbaik untuk hidrolisis kitosan dengan enzim  $\alpha$ -amilase adalah pH 5, dihidrolisis menggunakan 0,1 ml enzim  $\alpha$ -amilase selama 5 jam dengan variasi suhu 40 °C hingga titik didihnya. Pengaruh suhu terhadap DE kitosan tersaji pada Gambar 5.

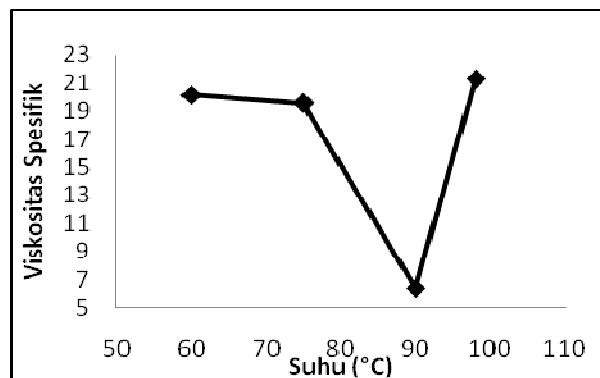


Gambar 5. Pengaruh Suhu terhadap DE Produk Hidrolisa Kitosan Menggunakan Enzim  $\alpha$ -amilase

Gambar 5. menunjukkan bahwa DE semakin tinggi seiring kenaikan suhu operasi hidrolisa. Terlihat DE meningkat dari suhu 60 °C ke 75 °C dan semakin naik pada 90 °C. Namun kemudian DE menurun drastis saat suhu operasi 98 °C.

Peningkatan suhu dapat meningkatkan kecepatan reaksi karena molekul atom mempunyai energi yang lebih besar dan mempunyai kecenderungan untuk berpindah (Lee, 1992). Efek depolimerisasi kitosan akan meningkat seiring dengan meningkatnya suhu reaksi (Tsao *et al*, 2011). Holum (1968) menyatakan bahwa peningkatan suhu reaksi sebesar 10 °C akan meningkatkan aktivitas enzim 50 – 100%. Setelah suhu 90 °C apabila suhu reaksi ditambah maka aktivitas enzim  $\alpha$ -amilase akan menurun, karena enzim secara bertahap menjadi inaktif akibat terdenaturasi layaknya protein. Ketika reaksi dijalankan pada titik didihnya (98 °C) maka semua enzim akan rusak (Tranggono dan Setiadji, 1989). Hal ini membuktikan bahwa enzim  $\alpha$ -amilase yang digunakan dalam penelitian bersifat termofilik atau tahan terhadap suhu tinggi tetapi akan rusak jika dididihkan.

Pada penelitian kami semakin suhu operasi dinaikkan maka DE akan semakin tinggi pula, sesuai dengan peningkatan suhu akan mengakibatkan kecepatan reaksi pun meningkat. Pada suhu 90 °C terhitung DE paling tinggi dibanding suhu 60 dan 75 °C, kemudian menurun drastis pada saat mendidih yaitu 98 °C. Hal ini menunjukkan bahwa 90 °C merupakan suhu optimum untuk hidrolisa kitosan dengan enzim  $\alpha$ -amilase, sedangkan pada titik didihnya, enzim kemudian mengalami deaktivasi.



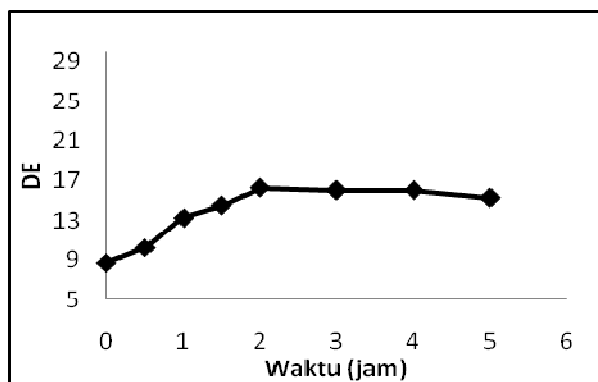
Gambar 6. Pengaruh Suhu terhadap Viskositas Spesifik Produk Hidrolisa Kitosan Menggunakan Enzim  $\alpha$ -amilase

Pada uji viskositas, tampak pada Gambar 4.4. di mana viskositas larutan kitosan hasil hidrolisa menurun seiring dengan kenaikan suhu operasi. Namun viskositas kembali tinggi ketika suhu operasi lebih besar dari 90 °C yaitu pada titik didihnya 98 °C.

Peningkatan suhu dapat meningkatkan kecepatan reaksi karena molekul atom mempunyai energi yang lebih besar dan mempunyai kecenderungan untuk berpindah (Lee, 1992). Efek depolimerisasi kitosan akan meningkat seiring dengan meningkatnya suhu reaksi (Tsao *et al*, 2011). Maka semakin suhu operasi dinaikkan, rantai yang terpotong semakin banyak dan DP larutan pun semakin menurun. Hal tersebut kemudian menurunkan berat molekul kitosan dan membuat viskositas larutan kitosan juga menurun. Pada penelitian kami suhu operasi optimum terjadi pada suhu 90 °C, kemudian enzim mengalami deaktivasi saat mencapai titik didihnya (98 °C).

### 3.1.3. Pengaruh Waktu

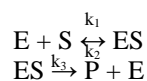
Hasil penelitian sebelumnya menjelaskan hidrolisis kitosan dengan enzim  $\alpha$ -amilase paling baik dilakukan pada pH 5 dan suhu 90 °C. Larutan kitosan-asam asetat kemudian dihidrolisis pada suhu 90 °C, pH 5 dengan 0,1 ml enzim  $\alpha$ -amilase selama 1 jam hingga 5 jam. Pengaruh waktu terhadap DE tersebut tersaji pada Gambar 7.



Gambar 7. Pengaruh Waktu terhadap DE Produk Hidrolisa Kitosan Menggunakan Enzim  $\alpha$ -amilase

Gambar 7., menunjukkan bahwa nilai DE hasil hidrolisis dengan enzim  $\alpha$ -amilase meningkat ketika operasi dilakukan pada waktu 1 – 2 jam. Setelah 2 jam maka hidrolisis berlangsung konstan meskipun waktu reaksi ditambah. Ketika waktu ditingkatkan sampai 3 jam maka produksi gula pereduksi mengalami penurunan dan cenderung konstan hingga jam ke 4 kemudian mengalami penurunan kembali pada jam ke-5.

Mekanisme reaksi enzimatik adalah sebagai berikut:

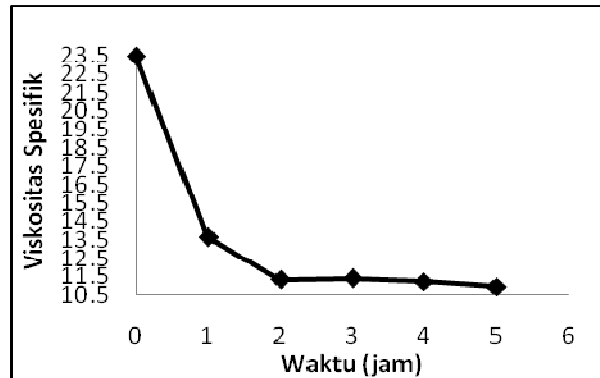


Enzim dan Substrat akan membentuk kompleks Enzim Substrat sebelum akhirnya membentuk produk (Michaelis and Menten, 1913). Reaksi dalam penelitian ini adalah reaksi depolimerisasi dimana produk yang dihasilkan tetap berupa kitosan tetapi berat molekulnya lebih rendah. Enzim  $\alpha$ -amilase harus membentuk kompleks dengan substrat kitosan sebelum memotong ikatan glikosidik kitosan. Pembentukan kompleks enzim substrat ini membutuhkan waktu tertentu.

Apabila waktu reaksi bertambah maka artinya waktu pembentukan kompleks enzim substrat juga bertambah. Hal ini menyebabkan kompleks yang terbentuk semakin banyak tetapi jika semua substrat telah membentuk kompleks dengan enzim maka penambahan waktu reaksi setelahnya tidak akan berpengaruh lagi. Laura Ramirez (2005) dalam penelitiannya mengatakan bahwa larutan kitosan bisa saja turun kelarutannya karena konsekuensi sisa gugus asetamidanya yang terdapat dalam kitin. Sementara kelarutan berhubungan erat dengan DE, maka bisa saja terjadi fenomena penurunan DE ketika waktu reaksi ditambah disebabkan oleh gugus asetamida tersebut.

Dapat disimpulkan bahwa aktivitas enzim akan meningkat dengan bertambahnya waktu reaksi hingga mencapai waktu optimum. Apabila waktu optimum telah dicapai maka penambahan waktu reaksi tidak akan mempengaruhi reaksi hidrolisis. Waktu reaksi akan sangat berpengaruh terhadap hidrolisis

kitosan, waktu yang lama menyebabkan banyak rantai kitosan yang terdegradasi dan menghasilkan kitosan dengan berat molekul yang rendah (Nystrom *et al.*, 1999).

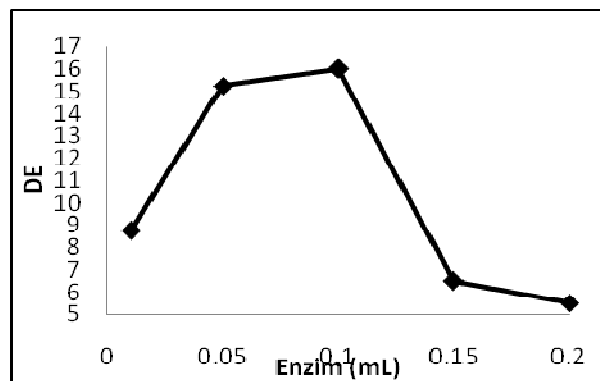


Gambar 8. Pengaruh Waktu terhadap Viskositas Spesifik Produk Hidrolisa Kitosan Menggunakan Enzim  $\alpha$ -amilase

Hal ini juga dibuktikan dengan uji viskositas larutan kitosan hasil hidrolisa yang ditunjukkan pada Gambar 8. Viskositas yang menurun pada rentang waktu 1 – 2 jam menunjukkan larutan terhidrolisa dengan baik sehingga memotong ikatan glikosidik dan menghasilkan larutan kitosan dengan viskositas lebih rendah. Semakin banyak ikatan yang terpotong maka semakin turun DP larutan kemudian berpengaruh pada viskositas larutan yang juga semakin turun. Dalam penelitian kami waktu operasi optimum terjadi pada 2 jam, kemudian viskositas akan cenderung konstan.

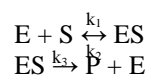
### 3.1.4. Pengaruh Perbandingan Enzim:Substrat

Hasil penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa hidrolisa kitosan optimum pada pH 5, suhu operasi 90 °C, dan waktu 2 jam. Larutan kitosan 1% w/v yang dilarutkan dalam asam asetat 1% v/v diatur pH-nya menjadi 5 dengan menambahkan HCl. Ketika hidrolisa kitosan mencapai suhu operasi 90 °C, penambahan enzim  $\alpha$ -amilase dilakukan sesuai variabel yaitu rasio enzim:substrat = 1:5000; 1:2500; 1:1666; dan 1:1250. Hidrolisa kitosan dilakukan selama 2 jam operasi. Hasil dari uji gula pereduksi (DE) dapat dilihat pada Gambar 9.



Gambar 9. Pengaruh Jumlah Penambahan Enzim terhadap DE Produk Hidrolisa Kitosan Menggunakan Enzim  $\alpha$ -amilase

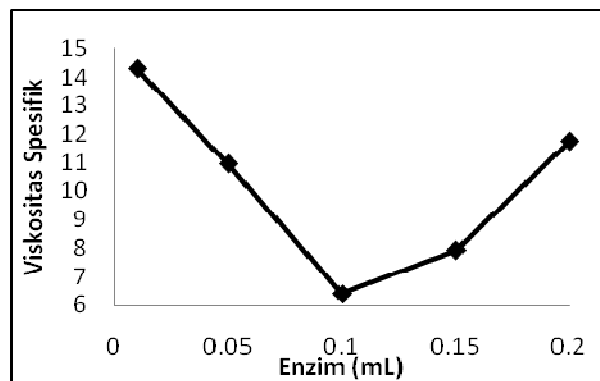
Mekanisme reaksi enzimatis:



Dari mekanisme tersebut dapat dilihat bahwa enzim akan bereaksi dengan substratnya membentuk kompleks enzim-substrat [ES]. Kemudian kompleks [ES] tersebut membentuk produk dan terbentuk enzim seperti pada awalnya (Michaelis and Menten, 1913). Dalam halnya penelitian kami, substrat berupa kitosan dan enzim  $\alpha$ -amilase kemudian menjadi produk kitosan bermolekul lebih rendah.

Dengan demikian enzim  $\alpha$ -amilase akan bereaksi dengan substrat membentuk kompleks sehingga bisa memotong rantai polimer kitosan.

Dengan penambahan enzim sesuai variabel rasio dapat dilihat pada Gambar 4.7., nilai DE yang cenderung menurun ketika penambahan lebih dari rasio 1:2500 (0,1 ml). Menurut mekanisme reaksi enzimatik di atas, jika penambahan enzim semakin banyak, maka kompleks [ES] pun akan lebih banyak terbentuk. pada proses hidrolisa, keberadaan produk dalam kondisi tertentu justru akan menjadi inhibitor yang akan menghambat kinerja enzim karena bersifat kompetitif. Keberadaan inhibitor kompetitif dalam proses hidrolisa mempunyai struktur yang sama dengan substrat sehingga akan berkompetisi untuk berikatan dengan tempat aktif enzim. Pada penelitian kami, rasio optimum adalah 1:2500 (0,1 ml), dan seiring penambahan enzim dengan rasio yang lebih besar, aktivitas enzim menurun dengan ditandai dengan kecilnya nilai DE.



Gambar 10. Pengaruh Jumlah Penambahan Enzim terhadap Viskositas Spesifik Produk Hidrolisa Kitosan Menggunakan Enzim  $\alpha$ -amilase

Pada Gambar 4.8. terjadi penurunan viskositas ketika rasio enzim:substrat ditambah. Dengan bertambahnya enzim maka semakin banyak terbentuk kompleks dan semakin banyak memotong rantai polimer, sehingga kekuatan tarik-menarik antar ikatan menurun dan ditandai dengan menurunnya viskositas senyawa tersebut. Namun penambahan enzim ini optimum di 0,1 ml (rasio 1:2500), karena ketika ditambahkan enzim melebihi rasio tersebut maka enzim akan berebut substrat untuk membentuk kompleks dan justru menaikkan kembali viskositas larutan kitosan.

### 3.2. Perbandingan Karakteristik Sebelum dan Sesudah Hidrolisa

Kitosan dari Biotech Surendo memiliki Berat Molekul (BM) 1680-1750 kDa. Kitosan dengan BM tinggi ini sulit untuk diaplikasikan dalam bidang pangan maupun farmasi karena tidak dapat larut dalam air sehingga perlu dilakukan *treatment* khusus untuk menurunkan BM. Penelitian ini membandingkan kondisi kitosan sebelum dan setelah dihidrolisa pada kondisi operasi optimum suhu 90 °C pH 5 selama 2 jam menggunakan 0.1 ml enzim  $\alpha$ -amylase. Hasilnya seperti tersaji pada disajikan dalam Tabel 4.1. dibawah ini.

Tabel 1. Perbandingan Kondisi Kitosan Sebelum dan Setelah Hidrolisa

| Karakteristik | Sebelum Hidrolisa | Setelah Hidrolisa |
|---------------|-------------------|-------------------|
| DE            | 8,75              | 16                |
| Kelarutan     | 13%               | 45%               |
| Viskositas    | 38,4              | 6,4               |
| BM            | 1680-1750 kDa     | 144,18 kDa        |

Dari Tabel 1. terlihat bahwa perbedaan karakteristik sebelum dan setelah hidrolisa enzimatik menggunakan enzim  $\alpha$ -amilase termofilik. Kelarutan kitosan meningkat dari 13% menjadi 45%. Viskositas awal larutan 38,4 turun sekitar 80% menjadi 6,4. BM kitosan awal sebesar 1680-1750 kDa menjadi 144,18 kDa, sehingga kitosan hasil hidrolisis ini termasuk dalam MMWCs (*Medium Molecular Weight Chitosan*).





#### 4. Kesimpulan

Kondisi operasi optimum untuk hidrolisa kitosan secara enzimatik menggunakan enzim  $\alpha$ -amilase adalah pada pH 5, suhu 90 °C, waktu 2 jam, dan perbandingan enzim:substrat 1:2500 (0,1 ml). Hidrolisa kitosan tersebut dapat menurunkan berat molekul kitosan 1680-1750 kDa menjadi 144,18 kDa, yang termasuk *Medium Molecular Weight of Chitosan (MMWCs)*

#### Ucapan Terima Kasih

Penelitian ini terselenggara atas biaya DIPA Fakultas Teknik Universitas Diponegoro tahun 2012.

#### Daftar Pustaka

- Akiyama, K., Kawazu, K., & Kobayashi, A. 1995. A novel method for chemoenzymatic synthesis of elicitor-active chitosan oligomers and partially N-deacetylated chitin oligomers using N-acylated chitotrioses as substrates in a lysozyme-catalyzed transglycosylation reaction system. *Carbohydrate Research*, 279, 151–160.
- Alla. 1998. The Preparation of Low- Molecular Weight Chitosan using chitinolytic Complex from *Streptomyces kurssanovii*. *Process Biochemistry* 34 (1999) 875-878
- Bennet and Friedden. 1969. Cytochemical aspect of the effect of chitosan on decay of bell. *Biochemistry and Behavior* 53 2 1996 0091-3057 (441-448)
- Domard, A. Rinadudo M. 1983. Preparation and Characterization of Fully Deacetylated Chitosan. *I.J. Biol Macromol* 1983; 5:49-52.
- Hashemi. 2012. Chitosan/Polyethylene Glycol Fumarate Blend Film: Physical and Anti Bacterial Properties. *Carbohydr Polym.* 2013 Jan 30;92(1):48-56
- Holum, J. R. & Bredy, J.E., 1968. *Chemistry*. John Wiley & Son: New York pp.681-702
- Huang, Y. C., Li, L., Guo, S. Y., & Cai, M. Y. (2003). Characteristics of chitosan degradation by papain. *Journal of South China University of Technology (Nature Science)*, 31, 71–75 (in Chinese).
- Kittur, F.S., Vishu Kumar, A.B., and Taranathan, R.N. 2003. *Low Molecular Weight Chitosan – Preparation by Depolymerization with Aspergillus niger Pectinase, and Characterization*. *Carbohydrate Research*, 2003, Volume 338 (12), PP. 1283-1290.
- Lee, M. Nah, Kwon Y, Koh JJ, Ko KS, Kim SW. 1992. Purification and Characteristic of chiosanase from *Bacillus* sp. HW-002. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 6, 19-25.
- Lee, D. X., Xia, W. S., & Zhang, J. L. (2008). Enzymatic preparation of chitooligosaccharides by commercial lipase. *Food Chemistry*, 111, 291–295.
- Li, J., Du, Y., Yang, J., Feng, P., Li, A., and Cheng, P. 2005. Preparation and Characterization of Low Molecular Weight Chitosan and Chito – Olygomers by A Commercial Enzym. *Polymer Degradation and Stability*, 2005, Volume 87, PP. 441-448.
- Lin, H., Wang, H. Y., Xue, C. H., & Ye, M. (2002). Preparation of chitosan oligomers by immobilized papain. *Enzyme Microbial Technology*, 31, 588–592.
- Lin, Q., & Ma, K. L. 2003. Study of catalytic hydrolysis of chitosan by cellulase. *China Surfactant Detergent and Cosmetics*, 33, 22–25 (in Chinese).
- Liu, Y. J., Jiang, Y., Feng, Y. F., & Han, D. (2005). Study on the chitosan hydrolysis catalyzed by special cellulase and preparation of chitooligosaccharide. *Journal of Functional Polymers*, 18, 325–329 (in Chinese).
- Peniston, Q. P., & Johnson, E. 1980. Process of the manufacture of chitosan. *US Patent No/ 4,195,175 (pp.5-15)*
- Roncal, Tomas., Oviedo, A., Armentia, I.L.D., Fernandez, L., & Villarian, M. 2007. *High yield production of monomer-free chitosan oligosaccharides by pepsin catalyzed hydrolysis of a high deacetylation degree chitosan*. Spain.



- Sardar, M., Roy, I., & Gupta, M. N. (2003). A smart bioconjugate of alginate and pectinase with unusual biological activity toward chitosan. *Biotechnology Progress*, 19, 1654–1658.
- Taylor. 2004. Electrospinning of Chitosan Solution in Acetic Acid with poly(ethylene oxide). *Journal of Biomaterials Science, Polymer edition*. Vol.15 Issue 6
- Tsao, CT, Chang, CH, Lin, YY, Wu, MF, Han, JL, Hsieh, KH. 2011. Kinetic Study of Acid Depolymerization of Chitosan and Effects of Low Molecular Weight Chitosan on Erythrocyte Rouleaux Formation. *Carbohydrate Research* 346 (2011) 94–102
- Wu, Shengjun. 2011. Preparation of water soluble chitosan by hydrolysis with commercial  $\alpha$ -amylase containing chitosanase activity. *School of Marine Science and Technology*, Huaihai Institute of Technology, 59 Cangwu Road, Lianyungang 222005, China.
- Wurzburg, O.B. & Szymanski, C.D. 1970. Modified Starches for The Food Industry. *Journal Agriculture. Food Chemistry*. 18 : 997-1001