

## PRODUKSI KITOOLIGOSAKARIDA MENGGUNAKAN SELULASE DARI *Trichoderma reesei* DAN BIOAKTIVITASNYA SEBAGAI ANTIBAKTERI

Yusro Nuri Fawzya<sup>1)</sup>, Manuntun Yohanes Sihotang<sup>2)</sup>, Syarmalina<sup>3)</sup>, dan Asri Pratitis<sup>1)</sup>

### ABSTRAK

Penelitian ini merupakan sebagian dari rangkaian penelitian mengenai eksplorasi enzim-enzim kitinolitik mikroba dan aplikasinya untuk pembuatan oligomer kitosan (kitoooligosakarida) serta uji bioaktivitasnya. Tujuan penelitian ini adalah untuk menguji kemampuan antibakteri kitoooligosakarida yang diproduksi dari kitosan dengan menggunakan enzim selulase non spesifik komersial dari *Trichoderma reesei*. Enzim ini ditentukan terlebih dahulu suhu dan pH optimumnya sebagai kitosanase, kemudian digunakan untuk menghidrolisis kitosan dengan konsentrasi 10, 13, dan 15 U/g kitosan, masing-masing selama 1, 2, dan 3 jam. Kitoooligosakarida yang dihasilkan kemudian diidentifikasi dengan menggunakan khromatografi lapis tipis, dan diuji bioaktivitasnya sebagai antibakteri. Kitoooligosakarida terpilih berdasarkan aktivitas antibakterinya kemudian diproduksi lagi untuk penentuan viskositas dan bobot molekulnya. Hasil penelitian menunjukkan bahwa enzim selulase ini bekerja optimal sebagai enzim kitosanase pada suhu 60°C dan pH 6. Identifikasi dengan menggunakan khromatografi lapis tipis menunjukkan bahwa kitoooligosakarida yang dihasilkan dari semua perlakuan mengandung dimer, trimer, tetramer, dan pentamer. Kitoooligosakarida tersebut mampu menghambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* sampai dengan 84%, *Salmonella typhosa* sampai dengan 26%, *Bacillus subtilis* sampai dengan 15%, dan *Escherichia coli* sampai dengan 5,6%. Kitoooligosakarida yang dihasilkan dari hidrolisis menggunakan enzim ini pada 10 U/g kitosan selama 1 jam memiliki viskositas 2,15 cPs dan bobot molekul 323,76 Da.

**ABSTRACT:** *Production of chitooligosaccharides by using cellulase from Trichoderma reesei and its bioactivity as an antibacteria. By: Yusro Nuri Fawzya, Manuntun Yohanes Sihotang, Syarmalina and Asri Pratitis*

*This research was part of research on exploration of microbial chitinolytic enzymes, their application to produce chitooligosaccharides and their bioactivities. The aim of the research was to evaluate the antibacterial of chitooligosaccharides produced from chitosan by using a commercial non-specific cellulase from Trichoderma reesei. This enzyme was firstly determined its optimal temperature and pH as chitosanase, then used for hydrolyzing chitosan, with the enzyme concentration of 10, 13 dan 15 U/g chitosan for 1, 2 and 3 hours respectively. The chitooligosaccharide produced was then identified using thin layer chromatography, and tested its ability in inhibiting the microbial growth. The selected chitooligosaccharide based on its antibacterial activities was further produced in larger scale to determine its viscosity, as well as molecular weight. The result indicated that the cellulase worked optimally as chitosanase at 60°C and pH of 6. The chitooligosaccharides produced contained of dimer, trimer, tetramer dan pentamer which were able to inhibit the growth of Staphylococcus aureus up to 84%, Salmonella typhosa up to 26%, Bacillus subtilis up to 15% and Escherichia coli up to 5.6%. Hidrolysis of chitosan using 10 U/g chitosan of this enzyme for an hour incubation produced oligosaccharide with viscosity of 2.15 cPs and molecular weight of 323.76 Da.*

**KEYWORDS:** *chitooligosaccharide, cellulase, antibacterial*

### PENDAHULUAN

Kitoooligosakarida atau sering disebut dengan oligomer kitosan adalah hasil hidrolisis kitosan yang dapat dilakukan secara kimia ataupun enzimatis. Produk ini mulai banyak diminati seiring dengan banyaknya riset yang mengupas manfaat dan aplikasi produk ini dalam bidang pangan, farmasi, atau

kesehatan. Kitoooligosakarida dilaporkan memiliki bioaktivitas sebagai antitumor (Suzuki *et al.*, 1986; Dhanikula & Panchagnula, 2004; Wahyuni *et al.*, 2006). Selain itu produk ini diketahui memiliki aktivitas sebagai antibakteri (Tsai *et al.*, 2000; You-Jin & Se-Kwon, 2000<sup>a</sup>; No *et al.*, 2002; Meidina *et al.*, 2004; Kittur *et al.*, 2005; Kumar *et al.*, 2005; dan Fawzya *et al.*, 2009).

<sup>1)</sup> Peneliti pada Balai Besar Riset Pengolahan Produk dan Bioteknologi Kelautan dan Perikanan, DKP

<sup>2)</sup> Alumni Fakultas Farmasi, Universitas Pancasila, Jakarta

<sup>3)</sup> Staf Pengajar Fakultas Farmasi, Universitas Pancasila, Jakarta

Produksi kitooligosakarida secara enzimatis lebih diminati dibandingkan secara kimiawi, karena cara ini dinilai lebih ramah lingkungan dan produknya lebih seragam. Enzim yang berperan secara spesifik adalah enzim kitosanase, namun demikian beberapa enzim nonspesifik dilaporkan dapat menghidrolisis kitosan menjadi kitooligosakarida seperti campuran enzim amilase, selulase, dan proteinase (Zhang *et al.*, 1999), pektinase (Cabrera & Cutsem, 2005; Kittur *et al.*, 2005), serta papain dan pronase (Kumar *et al.*, 2005). Pada prinsipnya produksi kitooligosakarida merupakan proses hidrolisis dari kitosan dengan menggunakan enzim kitinolitik. Beberapa peneliti menggunakan enzim ini dalam bentuk enzim kasar yang telah dipekatkan (Wahyuni *et al.*, 2006; Fawzya *et al.*, 2009), enzim murni (Cheng & Yaw-Kuen, 2000; Chasanah, 2004) atau dalam bentuk enzim yang telah diimmobilisasi (Lin *et al.*, 2002). Sebagai sarana produksi dapat digunakan bioreaktor sederhana atau yang dilengkapi dengan membran ultrafiltrasi (You-Jin & Se-Kwon, 2000<sup>a</sup>; Kuo *et al.*, 2004) ataupun menggunakan bioreaktor dengan sistem ganda (You-Jin & Se-Kwon, 2000<sup>b</sup>).

Penelitian ini merupakan sebagian dari rangkaian penelitian mengenai eksplorasi enzim-enzim kitinolitik mikroba dan aplikasinya untuk pembuatan oligomer kitosan (kitooligosakarida). Beberapa isolat mikroba penghasil enzim kitinolitik koleksi Balai Besar Riset Pengolahan Produk dan Bioteknologi Kelautan dan Perikanan (BBRP2B), khususnya kitosanase, telah digunakan dalam penelitian untuk produksi kitooligosakarida dengan menggunakan bahan baku kitosan komersial (Sigma) yang memiliki derajat deasetilasi (DD) dan kelarutan relatif konstan. Adanya hasil-hasil penelitian lain yang menyatakan bahwa enzim non spesifik memiliki kemampuan menghidrolisis kitosan untuk menghasilkan kitooligosakarida, mendorong dilakukannya penelitian ini untuk mencoba produksi kitooligosakarida menggunakan enzim selulase mikroba non spesifik, mengidentifikasi dan menguji bioaktivitas produk yang dihasilkan sebagai antibakteri. Enzim selulase dipilih karena substrat yang spesifik bagi enzim ini adalah selulosa yang memiliki struktur kimia mirip dengan kitin, sehingga kemungkinan juga memiliki kemampuan untuk menghidrolisis kitin. Mengingat eksplorasi enzim selulase mikroba belum pernah dilakukan di BBRP2B maka pada penelitian ini digunakan enzim selulase mikroba komersial.

## BAHAN DAN METODE

### Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian adalah kitosan rajungan dengan derajat deasetilasi >85%

(Sigma), enzim selulase dari *T. reesei* ATCC 26921 (Sigma), asam asetat glasial, natrium asetat. Bahan lain yang digunakan meliputi bahan-bahan kimia dan atau mikrobiologi untuk uji aktivitas enzim, identifikasi kitooligosakarida dan uji antibakteri. Bakteri uji yang digunakan adalah *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhosa*, *Bacillus subtilis*, dan *Escherichia coli*.

### Metode

#### Optimasi suhu dan pH selulase sebagai kitosanase

Penentuan suhu optimal dilakukan dengan variasi suhu inkubasi 25, 30, 37, 50, 60, dan 70°C, sedangkan penentuan pH optimal dilakukan dengan mereaksikan enzim pada *buffer* dengan variasi nilai pH yang berkisar antara 3 sampai 9. *Buffer* yang digunakan dalam penentuan pH optimum adalah *buffer* sitrat (pH 3-6), *buffer* fosfat (pH 6-8), dan *buffer* borat (pH 8-9), dengan konsentrasi 0,05M. Pengukuran aktivitas enzim dilakukan berdasarkan *assay* kitosanase dengan metode Schales (Yoon *et al.*, 2000) menggunakan substrat kitosan larut air 1% yang disiapkan menurut Choi *et al.* (2004).

#### Pembuatan kitooligosakarida

Kitooligosakarida diproduksi menurut metode Chasanah (2004). Enzim selulase (sebagai kitosanase) dengan konsentrasi 10, 13, dan 15 U/g kitosan direaksikan dengan kitosan larut air pada kondisi optimal enzim (suhu 60°C, pH 6) selama 1, 2, dan 3 jam. Reaksi enzimatis dihentikan dengan pemanasan pada suhu 100°C selama 5 menit. Hasil reaksi disentrifugasi selama 15 menit pada kecepatan 9000g (Beckman Coulter Microsentrifuge 22R, rotor F241.5) sehingga diperoleh supernatan yang mengandung kitooligosakarida. Produk hasil hidrolisis ini disimpan dalam lemari es sampai dilakukan identifikasi dan pengujian lainnya.

#### Identifikasi oligomer kitosan

Kitooligosakarida diidentifikasi dengan menggunakan kromatografi lapis tipis (KLT) berdasarkan metode Choi *et al.* (2004). Larutan pengembang yang digunakan adalah campuran n-propanol dan 30% amonia dengan perbandingan 2 : 1. Plat yang digunakan adalah Silicagel 60 F254 (Merck). Spot contoh yang terbentuk dapat dibaca setelah disemprot dengan 0,1% ninhidrin dalam n-butanol, dan dikeringkan dengan menggunakan *hair dryer*. Sebagai standar digunakan kitooligosakarida yang mengandung monomer sampai heksamer (Seikagaku, Jepang).

**Pengujian bioaktivitas kitooligosakarida sebagai antibakteri**

Pengujian aktivitas antibakteri dilakukan terhadap bakteri Gram positif (*Staphylococcus aureus* dan *Bacillus subtilis*) serta bakteri Gram negatif (*Salmonella typhosa* dan *Escherichia coli*) dengan menggunakan metode turbidimetri (You-Jin & Se-Kwon, 2000<sup>a</sup>) yang dimodifikasi. Biakan bakteri uji dengan konsentrasi 10<sup>5</sup>-10<sup>6</sup> cfu/mL diinokulasi ke dalam *nutrient broth* (NB) yang berisi sampel kitooligosakarida, lalu diinkubasi pada suhu 37°C selama 24-48 jam dan dilanjutkan dengan pengukuran *optical density* (OD) pada 640 nm. Sebagai kontrol positif, digunakan kloramfenikol 1000 ppm.

**Penentuan viskositas dan berat molekul (Hwang et al., 1997)**

Viskositas kitosan dan oligomer kitosan ditentukan dengan *Ubbelohde dilution viscometer* melalui pengukuran viskositas spesifik, kemudian dihitung dengan mempertimbangkan koefisien kinematik viskometer *Ubbelohde* yang digunakan. Untuk pengukuran terhadap kitosan digunakan viskometer tipe 1C, dengan koefisien kinematik = 0,03014 cSt per detik, sedangkan untuk oligomer kitosan digunakan tipe 1, dengan koefisien kinematik = 0,009669 cSt per detik.

Berat molekul ditentukan dengan cara dihitung dari viskositas intrinsik menggunakan persamaan Mark-Houwink sebagai berikut:

$$[\eta] = K M^a$$

Keterangan:

[ $\eta$ ] = viskositas intrinsik (dl/g)

K = konstanta pelarut (2,1 x 10<sup>-4</sup>)

a = konstanta (0,88)

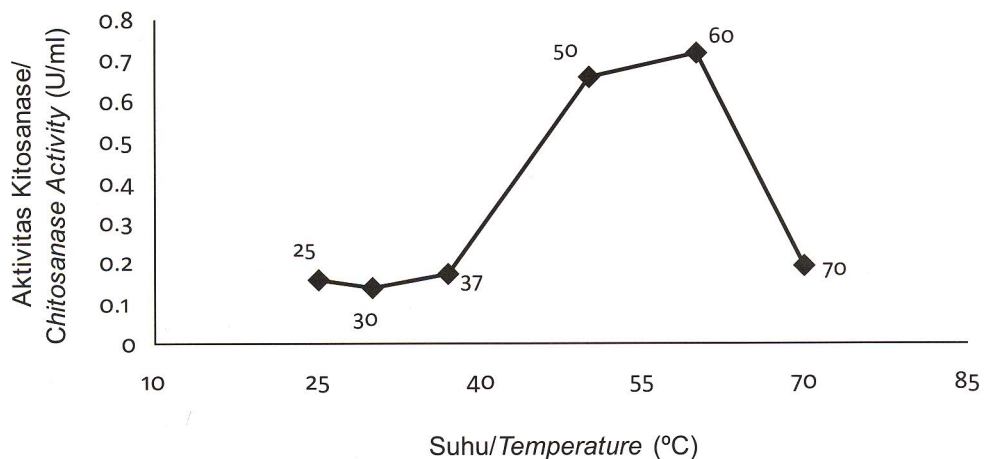
M = berat molekul (Dalton)

**HASIL DAN BAHASAN**

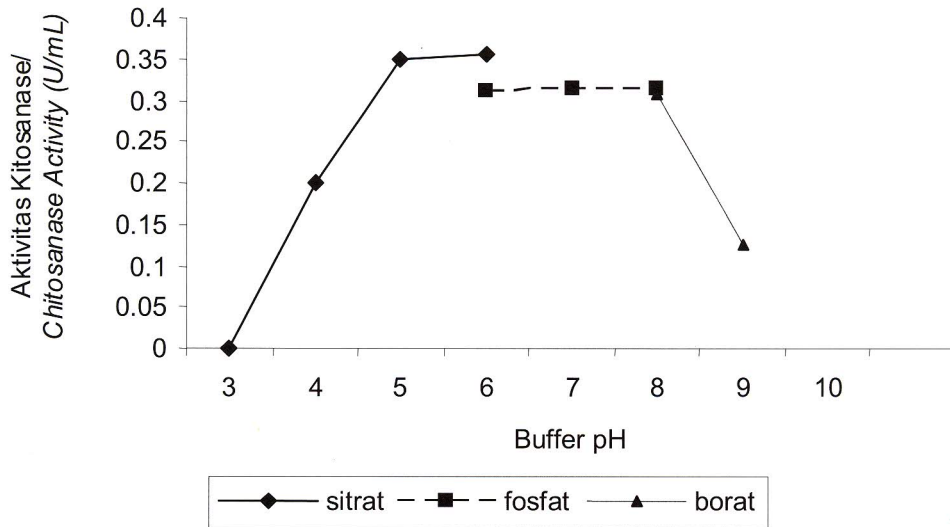
Sebelum digunakan untuk produksi kitooligosakarida, enzim selulase dari *Trichoderma reesei* dioptimasi terlebih dahulu suhu dan pH-nya sebagai kitosanase. Hasil optimasi menunjukkan bahwa kitosanase dari *Trichoderma reesei* ATCC 26921 bekerja optimal pada suhu 60°C dan pH 6 (Gambar 1 dan 2). Nogawa et al. (1998) menemukan bahwa *Trichoderma reesei* PC-3-7 merupakan kapang penghasil selulase tinggi (*hyper-cellulolytic fungus*) yang juga menghasilkan enzim eksoglukosaminidase (salah satu enzim pemecah kitosan), endoglukanase dan glukosidase. Enzim glukosaminidase yang dihasilkan oleh *Trichoderma reesei* PC-3-7 ini memiliki pH optimum 4 dan suhu optimum 50°C. Sedangkan enzim endokitinase yang dihasilkan oleh *Trichoderma viride* TNJ63 bekerja optimal pada pH 5,5 dan suhu 30°C (Nugroho et al., 2003). Dengan demikian, meskipun dari jenis mikroba yang sama karakteristik enzim yang dihasilkan kemungkinan berbeda, karena sumber mikroba tersebut berbeda dan metode maupun media yang digunakan untuk produksi enzim juga kemungkinan berbeda. Beberapa mikroba lain penghasil selulase sekaligus enzim kitinolitik adalah *Aspergillus niger*, *Acremonium cellulolyticus*, dan *Trichoderma viride*. Di antara ketiganya, *Acremonium cellulolyticus* memiliki aktivitas kitinolitik tertinggi dan bekerja optimal pada pH 3 (Sukwattanasinitt et al., 2002).

**Produksi dan Identifikasi Kitooligosakarida**

Produksi kitooligosakarida dengan menggunakan enzim kitosanase dari *T. reesei* ATCC 26921 dengan



Gambar 1. Optimasi suhu enzim selulase *T. reesei* sebagai kitosanase.  
Figure 1. Temperature optimization of *T. reesei* cellulase as chitosanase.

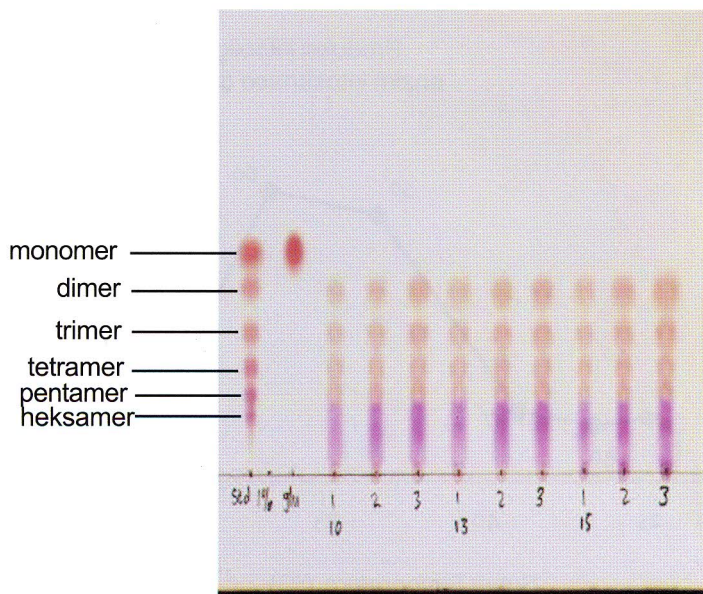


Gambar 2. Optimasi pH enzim selulase *T. reseei* sebagai kitosanase.  
 Figure 2. pH optimization of *T. reseei* cellulase as chitosanase.

bahan baku kitosan rajungan (DD 85%) menghasilkan dimer (kitobiosa) sampai pentamer (kitopentosa) (Gambar 3). Jenis kitooligosakarida yang dihasilkan dari setiap proses hidrolisis kitosan tidak selalu sama, tergantung dari beberapa hal, diantaranya jenis enzim kitinolitik, konsentrasi enzim, viskositas, dan derajat deasetilasi kitosan yang digunakan, serta lama waktu hidrolisis. Hidrolisis kitosan dengan enzim protease dilaporkan menghasilkan oligomer dengan DP 3-8 (Li *et al.*, 2005), dengan kitosanase dari *Bacillus cereus* NTU-FC-4 menghasilkan oligomer dengan DP

2-6 (Kuo *et al.*, 2004), pronase menghasilkan oligomer dengan DP 2-6 (Kumar *et al.*, 2004), kitosanase dari *Aspergillus* menghasilkan oligomer dengan DP 3-6 (Cheng & Yaw-Kuen, 2000), dan kitosanase dari *Bacillus* sp. P1-7S menghasilkan oligomer dengan DP 2-6 (Seino *et al.*, 1991). Jenis oligomer yang berbeda-beda ini memberikan pengaruh terhadap sifat bioaktivitasnya.

Pada Gambar 3 tampak bahwa spot yang terbentuk dari penggunaan enzim 15 U/g kitosan relatif lebih jelas dari konsentrasi enzim 13 U/g kitosan dan

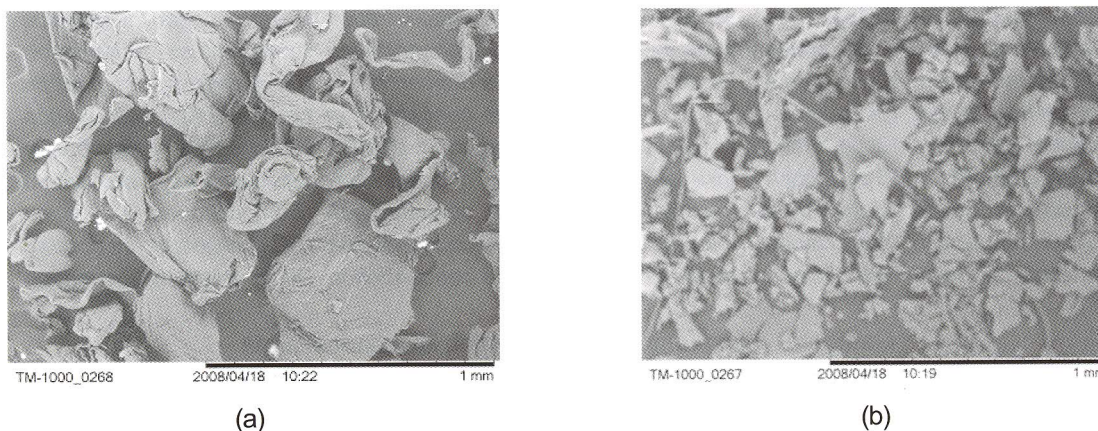


Gambar 3. Hasil khromatografi lapis tipis kitooligosakarida *T. reseei* ATCC 26921.  
 Figure 3. Chitooligosaccharides profile of *T. reseei* ATCC 26921 on thin layer chromatography.

10 U/g kitosan, atau semakin tinggi konsentrasi enzim yang digunakan spot yang dihasilkan tampak semakin jelas. Hal ini kemungkinan disebabkan oleh konsentrasi masing-masing kitooligosakarida yang dihasilkan dalam campuran/*supernatant* makin tinggi dengan semakin tingginya konsentrasi enzim yang digunakan. Identifikasi dengan KLT ini hanya bersifat kualitatif, identifikasi secara kuantitatif dapat dilakukan misalnya dengan menggunakan Khromatografi Cair Kinerja Tinggi atau *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC).

Hasil pengamatan *Scanning Electron Microscope* terhadap kitosan dan kitooligosakarida hasil hidrolisis dengan enzim kitosanase dari selulase *T. reesei* ATCC 26921 memperlihatkan struktur kitosan yang lebih padat dan utuh, sedangkan hasil hidrolisisnya (kitooligosakarida) tampak lebih kecil dan kurang padat (Gambar 4).

ATCC 26921 dengan konsentrasi sebagai kitosanase sebesar 10 U/g kitosan menghasilkan kitooligosakarida yang memiliki aktivitas antibakteri relatif lebih besar dibandingkan konsentrasi yang lain; diduga bahwa konsentrasi kitooligosakarida dengan derajat polimerisasi (DP) tertentu yang aktif sebagai antibakteri dari hasil perlakuan ini lebih besar daripada hasil perlakuan konsentrasi lainnya. Pengaruh DP kitooligosakarida terhadap aktivitas antibakteri dilaporkan oleh Wang *et al.* (2007) yang meneliti aktivitas antibakteri kitooligosakarida yang dihasilkan oleh kitosanase dari *Pseudomonas* CUY 8 terhadap *E.coli*, *S. aureus*, *Streptococcus lactis*, dan *Bacillus subtilis*. Dinyatakan bahwa aktivitas penghambatan terhadap keempat jenis bakteri tersebut menurun dengan meningkatnya derajat polimerisasi (DP) kitooligosakarida. Kitooligosakarida hasil hidrolisis kitosan dengan kitosanase tersebut mampu menghambat pertumbuhan *E. coli* dengan 0,08% dan



Gambar 4. Hasil pengamatan dengan *Scanning Electron Microscope* dengan perbesaran 100x, (a) kitosan rajungan Sigma, (b) kitooligosakarida dari kitosan rajungan Sigma.

Figure 4. Observation result using *Scanning Electron Microscope* with magnification of 100x, (a) Sigma crab chitosan, (b) chitooligosaccharide produced from Sigma crab chitosan.

### Pengujian antibakteri

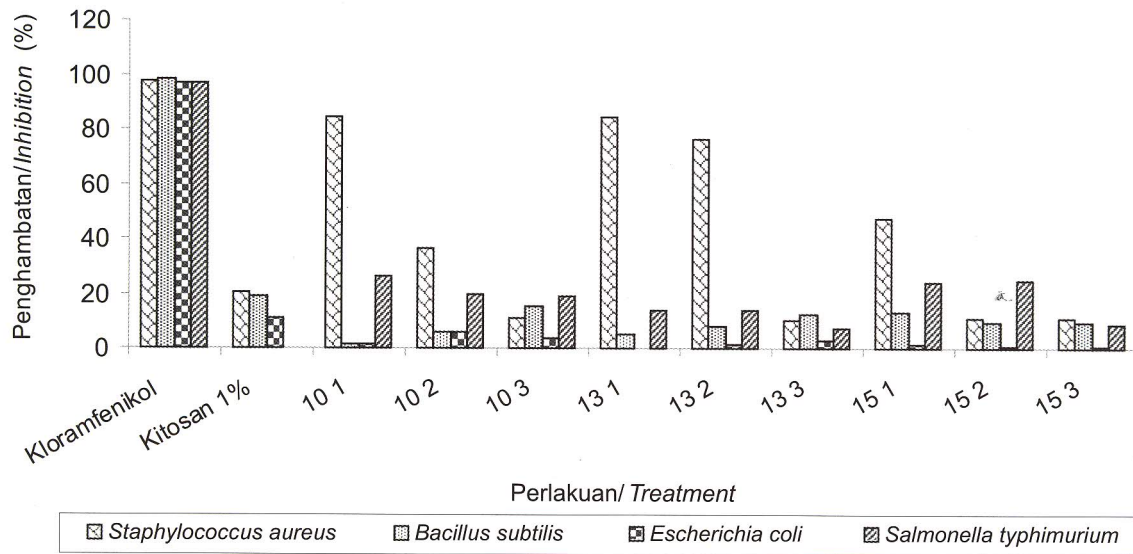
Hasil pengujian antibakteri menunjukkan bahwa kitooligosakarida yang dihasilkan dapat menghambat pertumbuhan bakteri *S. aureus*, dengan persentase penghambatan sekitar 84% yang dihasilkan dari hidrolisis dengan enzim 10 U/g kitosan selama 1 jam dan 13 U/g kitosan selama 1 dan 2 jam (Gambar 5). Kitooligosakarida yang dihasilkan oleh perlakuan hidrolisis dengan enzim 10 U/g kitosan juga mampu menghambat *Salmonella* sampai dengan 26% dan *Bacillus subtilis* sampai dengan 15%. Sedangkan penghambatan terhadap *E. coli* sangat kecil, paling tinggi sekitar 5,6% yang dihasilkan oleh perlakuan hidrolisis dengan enzim 10 U/g kitosan selama 2 jam. Hidrolisis kitosan dengan enzim selulase dari *T. reesei*

menghambat ketiga jenis bakteri lainnya dengan konsentrasi penghambatan minimum sebesar 0,12%.

Berdasarkan kemampuan antibakterinya serta pertimbangan konsentrasi enzim dan waktu inkubasinya, maka konsentrasi enzim 10 U/g kitosan dan inkubasi 1 jam dipilih untuk penentuan viskositas dan berat molekulnya.

### Penentuan viskositas dan bobot molekul

Kitooligosakarida yang dihasilkan dari hidrolisis dengan enzim kitosanase dari *T. reesei* ATCC 26921 memiliki viskositas 2,15 cPs (Tabel 1). Dibandingkan dengan larutan kitosan 1% sebelum hidrolisis, terjadi penurunan viskositas yang tajam, mencapai 91,64%. Penurunan viskositas juga dilaporkan oleh Cheng &



Keterangan Perlakuan/Note of treatment:  
 10 1 : konsentrasi enzim 10U/g kitosan, inkubasi 1 jam/enzyme concentration 10U/g chitosan, incubation 1 hr  
 10 2 : konsentrasi enzim 10U/g kitosan, inkubasi 2 jam/enzyme concentration 10U/g chitosan, incubation 2 hrs  
 10 3 : konsentrasi enzim 10U/g kitosan, inkubasi 3 jam/enzyme concentration 10U/g chitosan, incubation 3 hrs  
 13 1 : konsentrasi enzim 13U/g kitosan, inkubasi 1 jam/enzyme concentration 13U/g chitosan, incubation 1 hr  
 13 2 : konsentrasi enzim 13U/g kitosan, inkubasi 2 jam/enzyme concentration 13U/g chitosan, incubation 2 hr  
 13 3 : konsentrasi enzim 13U/g kitosan, inkubasi 3 jam/enzyme concentration 13U/g chitosan, incubation 3 hrs  
 15 1 : konsentrasi enzim 15U/g kitosan, inkubasi 1 jam/enzyme concentration 15U/g chitosan, incubation 1 hr  
 15 2 : konsentrasi enzim 15U/g kitosan, inkubasi 2 jam/enzyme concentration 15U/g chitosan, incubation 2 hrs  
 15 3 : konsentrasi enzim 15U/g kitosan, inkubasi 3 jam/enzyme concentration 15U/g chitosan, incubation 3 hrs

Gambar 5. Penghambatan bakteri oleh kitooligosakarida.  
 Figure 5. Bacterial inhibition by chitooligosaccharides.

Tabel 1. Viskositas larutan kitosan sebelum dan setelah hidrolisis  
 Table 1. Viscosity of chitosan solution before and after hydrolysis

	Waktu Alir (detik)/ Flow Time (second)	Viskositas Spesifik/ Specific Viscosity	Viskositas Kinematik (cSt)/ Kinematic Viscosity	Viskositas (cPs)/ Viscosity
Larutan kitosan 1%/ 1% chitosan solution	247.33	0.14	24.73	25.72
Kitooligosakarida/ Chitooligosaccharide	213.00	1.10	2.06	2.15

Yaw-Kuen (2000), terjadi pada larutan kitosan yang dihidrolisis dengan enzim kitosanase dari *Aspergillus* selama 68 jam, yaitu dari 4300 cPs menjadi ± 2 cPs. Hidrolisis kitosan dengan menggunakan enzim komersial Pectinex Ultra Spl juga dilaporkan menurunkan viskositas sampai dengan 50% pada inkubasi selama 1 jam (Cabreara & Cutsem, 2005). Mirip dengan hasil tersebut, penggunaan enzim pektinase dari *Aspergillus niger* mampu menghidrolisis kitosan dan menurunkan viskositasnya sekitar 60% dalam waktu 1 jam (Kittur *et al.*, 2003).

Lin *et al.* (2002), melakukan preparasi oligomer kitosan dengan menggunakan papain terimobil, menemukan bahwa jenis pelarut kitosan, pH, dan suhu reaksi berpengaruh terhadap efektivitas hidrolisis kitosan. Pada kondisi reaksi menggunakan pelarut kitosan buffer Na-asetat—asam asetat 0,2M, pH 4, suhu 25°C, hidrolisis kitosan selama 24 jam menurunkan viskositas sekitar 47,4% dari viskositas awal. Sedangkan Choi *et al.* (2002) pada penelitiannya tentang pembuatan oligomer kitosan secara iradiasi, melaporkan bahwa penurunan viskositas larutan

kitosan yang semula 20 cPs mencapai 99,8; 99,9; dan 99,9% setelah diiradiasi pada dosis 10, 50, dan 200 kGy, sedangkan pada larutan kitosan dengan viskositas awal 100 cPs laju penurunannya sebesar 95,9; 97,3; dan 98,2%. Dengan demikian laju penurunan viskositas akan semakin meningkat dengan bertambahnya dosis iradiasi. Proses iradiasi akan menginduksi pemutusan ikatan glikosidik 1-4 pada rantai kitosan sehingga mengakibatkan penurunan berat molekul dan viskositas larutan kitosan (Choi *et al.*, 2002).

Penentuan berat molekul secara viskometri dilakukan melalui pendekatan viskositas intrinsik. Viskositas intrinsik diperoleh dari kurva hubungan antara viskositas spesifik dibagi dengan konsentrasi ( $\eta_{sp}/C$ ) vs konsentrasi yang diekstrapolasi hingga C mendekati 0 sehingga meniadakan pengaruh konsentrasi. Nilai viskositas intrinsik yang diperoleh selanjutnya digunakan pada persamaan Mark Houwink guna mendapatkan berat molekul (Hwang *et al.*, 1997). Nilai viskositas intrinsik dipengaruhi oleh derajat deasetilasi, konsentrasi, berat molekul, kekuatan ion, pH dan suhu saat pengukuran (Dunn *et al.*, 1997). Tabel 2 menyajikan data viskositas spesifik kitooligosakarida pada berbagai konsentrasi.

dan proteinase) untuk depolimerisasi kitosan dilaporkan menurunkan berat molekul kitosan dari  $1,5 \times 10^6$  Dalton menjadi 10000 Dalton (Zhang *et al.*, 1999).

**KESIMPULAN**

- Enzim *sellulase* dari *Trichoderma reseei* ATCC 26921 memiliki kemampuan sebagai kitosanase yang bekerja optimal pada pH 6 dan suhu 60°C.
- Hidrolisis kitosan dengan DD 85% menggunakan enzim ini menghasilkan produk yang mengandung kitooligosakarida dimer (kitobiosa) sampai pentamer (kitopentosa).
- Kitooligosakarida yang dihasilkan mampu menghambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* sampai dengan 84%, *Salmonella typhosa* sampai dengan 26%, *Bacillus subtilis* sampai dengan 15% dan *Escherichia coli* sampai dengan 5,6%.
- Kitooligosakarida hasil hidrolisis menggunakan kitosanase dari selulase *T. reseei* ATCC 26921 dengan konsentrasi 10U/g kitosan selama inkubasi 1 jam memiliki viskositas 2,15 cPs dan berat molekul sekitar 323,76 Da.

Tabel 2. Viskositas spesifik kitooligosakarida pada berbagai konsentrasi  
 Table 2. Specific viscosity of chitooligosaccharide at various concentrations

Konsentrasi (%)/ Concentration (%)	Viskositas Spesifik/ Specific Viscosity
1.00	1.10
0.80	0.99
0.60	0.66
0.40	0.45
0.20	0.27

Berdasarkan data di atas, dapat ditentukan viskositas intrinsik kitooligosakarida, yaitu diperoleh Viskositas Intrinsik  $[\eta]$  kitooligosakarida sebesar 0,034. Dengan menggunakan persamaan Mark Houwink, diperoleh bahwa berat molekul kitooligosakarida 323,76 Da.

Berat molekul kitooligosakarida yang dihasilkan dari hidrolisis kitosan menggunakan papain terimobil adalah 1.000, 6.000, 2.000, dan 600 Dalton tergantung dari jenis oligomer yang didapatkan (Lin *et al.*, 2002). Berat molekul kitosan ini ditentukan dengan menggunakan *Gel Permeation Chromatography* (GPC). Sedangkan penggunaan enzim kompleks (campuran enzim meliputi *sellulase*, *alpha amylase*,

**DAFTAR PUSTAKA**

Cabrera, J.C. and Cutsem, P.V. 2005. Preparation of chitooligosaccharides with degree of polymerization higher than 6 by acid or enzymatic degradation of chitosan. *Biochem. Engin. J.* 25: 165-172.

Chasanah, E. 2004. *Characterization of Thermophylic Bacillus licheniformis MB2 Chitosanase Isolated from Manado Hot Spring Water*. Disertasi. Sekolah Pascasarjana, Institut Pertanian Bogor, Bogor.

Cheng, C.Y. and Yaw-Kuen, L. 2000. An *Aspergillus* chitosanase with potential for large-scale preparation of chitosan oligosaccharides. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 32: 197-203.

Choi, Y. J., Kim, E. J., Piao, Z., Yun, Y. C., and Shin, Y. C. 2004. Purification and characterization of chitosanase

- from *Bacillus sp.* Strain KCTC 0377BP and its application for the production of chitosan oligosaccharides. *Appl. Environ. Microbiol.* 70(8): 4522–4531.
- Dhanikula, A.B. and Panchagnula, R. 2004. Development and characterization of biodegradable chitosan films for local delivery of paclitaxel. *AAPS J.* 6(3): 1–12.
- Dunn, E.T., Grandmaison, E.W. and Goosen, M.F.A. 1997. Applications and properties of chitosan. In Goosen, M.F.A. (ed). *Applications of Chitin and Chitosan*. Technomic Pub, Basel. p 3-30.
- Fawzya, Y.N., Setyani, H.E., dan Wijaya, A. 2009. Produksi dan aplikasi enzim kitosanase dari bakteri asal terasi untuk pembuatan oligomer kitosan. *Makalah disampaikan pada Seminar Nasional Kelautan V Universitas Hang Tuah*, Surabaya tanggal 23 April 2009.
- Hwang, J.S., Hong, and Kim, C. 1997. Effect molecular weight and NaCl concentration on dilute solution properties of chitosan. *J. Food Sci. Nutr.* 2: 1–5.
- Kittur, F.S., Kumar, A.B.V., and Tharanathan, R.N. 2003. Low molecular weight chitosans – preparation by depolymerization with *Aspergillus niger* pectinase, and characterization. *Carbohydrate Research.* 338: 1283–1290.
- Kittur, F.S., Kumar, A.B.V., Varadaraj, M.C., and Tharanathan, R.N. 2005. Chitooligosaccharides-preparation with the aid of pectinase isozyme from *Aspergillus niger* and their antibacterial activity. *Carbohydrate Research.* 340: 1239–1245.
- Kumar, A.B.V., Varadaraj, M.C, Gowda, L.R., and Tharanathan, R.N. 2005. Characterization of chito-oligosaccharides prepared by chitosanlysis with the aid of papain and pronase, and their bactericidal action against *Bacillus cereus* and *Escherichia coli*. *Biochem. J.* 391: 167–175.
- Kuo, C.H., Chen, C.C., and Chiang, B.H. 2004. Process characteristics of hydrolysis of chitosan in a continuous enzymatic membrane reactor. *J. of Food Sci.* 69(7): 332–337.
- Li, J., Du, Y., Yang, T.J., Feng, T., Li, A. and Cheng, P. 2005. Preparation characterization of low molecular weight chitosan and chito-oligomers by a commercial enzyme. *Polymer Degradation and Stability.* 87(3): 441-448.
- Lin, H., Wang, H., Xue, C., and Ye, M. 2002. Preparation of chitosan oligomers by immobilized papain. *Enzyme and Microbial Technol.* 31: 588–592.
- Meidina, Sugiyono, Jenie, B.S.J., dan Suhartono, M.T. 2004. Aktivitas antibakteri oligomer kitosan yang diproduksi menggunakan kitosanase dari isolat *B. licheniformis* MB-2. *Prosiding Seminar Nasional dan Kongres Perhimpunan Ahli Teknologi Pangan Indonesia (PATPI)*. 17-18 Desember 2004, Jakarta p. 288–293.
- No, H.K., Park, N.Y., Lee, S.H., Hwang, H.J., and Meyers, S.P. 2002. Antimicrobial activities of chitosans and chitosan oligomers with different molecular mass on spoilage bacteria isolated from tofu. *J. Food Sci.* 67: 1511–1514.
- Nogawa, M., Hiroya, T., Aya, K., Kenji, O., Hirofumi, O., and Yasushi, M. 1998. Purification and characterization of exo- $\alpha$ -D-glucosaminidase from a cellulytic fungus, *Trichoderma reesei* PC-3-7. *Appl. and Env. Microbiol.* 64(3): 890–895.
- Nugroho, T.T., Ali, M., Ginting, C., Wahyuningsih, Dahliaty, Devi, S., dan Sukmarisa, Y. 2003. Isolasi dan karakterisasi sebagian Kitinase *Trichoderma viride* TNJ63. *Jurnal Natur Indonesia.* 5(2): 101–106
- Sukwattanasinitt, M., Zhu, H., Sashiwa, H., and Sei-ichi, A. 2002. Utilization of commercial non-chitinase enzymes from fungi for preparation of 2-acetamido-2-deoxy-D-glucose from chitin. <http://lanna-net.info/Biotechnology/Abstract/23004930.pdf>. Diakses pada tanggal 23 Juni 2009.
- Seino, H., Tsukada, K., and Shimasue, Y. 1991. Properties and action pattern of chitosanase from *Bacillus sp* P1-7S. *Agric. Biol. Chem.* 55(9): 2421–2423
- Suzuki, K., Mikami, T., Okawa, Y., Tokoro, A., Suzuki, S., and Suzuki, M. 1986. Antitumor effect of Hexa-N-acetylchitohexose and chitohexose against Meth-A solid tumor. *Carbohydr. Res.* 151: 403–408
- Tsai, G.J., Wu, Z.Y., and Su, W.H. 2000. Antibacterial activity of a chitooligosaccharides mixture prepared by cellulase digestion of shrimp chitosan and its application to milk preparation. *J. Food Prot.* 63(6): 747–752.
- Wahyuni, S., Witarto, A.B., Syah, D., Zakaria, F.R., and Suhartono, M.T. 2006. *Proceeding International Seminar and Workshop Marine Biodiversity and Their Potential for Developing Bio-Pharmaceutical Industry in Indonesia. Jakarta, May 17-1th 2006*. Research Centre for Marine and Fisheries Product Processing and Biotechnology. Agency for Marine and Fisheries Research. Ministry of Marine Affairs and Fisheries.
- Wang, Y., Zhou, P., Yu, J., Pan, X., Wang, P., Lan, W., and Thao, S. 2007. Antimicrobial effect of chitooligosaccharides produced by chitosanase from *Pseudomonas* CUY 8. *Asia Pac. J. Clin. Nutr.* 16(1): 174–177.
- Yoon, H.G., Kim, H.Y., Lim, Y.H., Kim, H.K., Shin, D.H., Hong, B.S., and Cho, H.Y. 2000. Thermostable chitosanase from *Bacillus sp.* strain CK4: Cloning and expression of the gene and characterization of the enzyme. *Applied and Environmental Microbiology.* 66(9): 3727–3734.
- You-Jin, J. and Se-Kwon, K. 2000<sup>a</sup>. Production of chitooligosaccharides using an ultrafiltration membrane reactor and their antibacterial activity. *Carbohydr. Polymers.* 41: 133–141.
- You-Jin, J. and Se-Kwon, K. 2000<sup>b</sup>. Continuous production of chitooligosaccharides using dual reaction system process. *J. Biochem.* 35: 623–632.
- Zhang, H., Du, Y., Yu, X., Mitsutomi, M., dan Aiba, S-I. 1999. Preparation of chitooligosaccharides from chitosan by a complex enzyme. *Carbohydrate Research.* 320: 257–260.