

POTENSI PERLAKUAN AWAL LIMBAH KULIT UDANG UNTUK PRODUKSI ENZIM KITINASE OLEH *Trichoderma virens* PADA FERMENTASI SUBSTRAT PADAT

Rachmawaty^{(1),(3)} & Madihah^{(1),(2)}

⁽¹⁾Departemen Industri Bioteknologi, Faculty of Bioscience and Medical Engineering, Univ. Teknologi Malaysia

⁽²⁾EnviBio Research Group, SRA, Universiti Teknologi Malaysia

⁽³⁾Jurusan Biologi, Fakultas MIPA, Universitas Negeri Makassar

Parangtambung, Jl. Dg. Tata Makassar 90222

e-mail: rachmawaty.ferry@gmail.com

Abstract: Potential Pretreatment of Shrimp Waste for Chitinase Production by *Trichoderma virens* in Solid-State Fermentation. The utilization of pretreated shrimp waste as substrate for chitinase production using *Trichoderma virens* was assessed under solid state fermentation (SSF). A crustacean biomass, shrimp which is rich in chitin was used to induce chitinase production. Five different physical (sun dried, oven, microwave and boiling) and chemical (5% (v/v) HCl and 5% (w/v) NaOH) pretreated shrimp waste were used as substrate for chitinase production. Shrimp waste pre-treated with microwave produced the highest chitinase activity (0.194 U/g IDS) as compared to control (raw shrimp), boiling, oven, sundried and chemical *pretreatment* by increment of 2.9; 1.37; 1.2; 1.2 and 41.3 fold respectively. As compared to previous studies, *Trichoderma virens* produced higher chitinase activity in SSF 4.0 fold than submerged liquid fermentation (SmF).

Abstrak: Potensi Perlakuan Awal Limbah Kulit Udang untuk Produksi Enzim Kitinase oleh *Trichoderma virens* pada Fermentasi Substrat Padat. Telah dilakukan perlakuan awal limbah kulit udang sebagai substrat untuk produksi enzim kitinase menggunakan *Trichoderma virens* pada fermentasi substrat padat. Udang sebagai kelompok Crustacea kaya akan kandungan kitin yang digunakan untuk menginduksi produksi enzim kitinase. Lima perlakuan awal kulit udang yang berbeda digunakan sebagai substrat untuk produksi enzim kitinase yaitu perlakuan fisik (pemanasan sinar matahari, oven, mikrowave dan pemasakan) dan kimiawi (5% (v/v) HCl dan 5% (w/v) NaOH). Perlakuan awal kulit udang menggunakan mikrowave menghasilkan aktivitas enzim kitinase tertinggi (0.194 U/gds) dibandingkan dengan kontrol, pemasakan, oven, pemanasan sinar matahari, dan kimiawi dengan peningkatan masing-masing 2.9; 1.37; 1.2; 1.2; dan 41.3 kali lebih tinggi. Dibandingkan dengan penelitian sebelumnya, menggunakan fermentasi substrat padat, *Trichoderma virens* menghasilkan aktivitas enzim kitinase lebih tinggi 4 kali dibandingkan dengan hasil yang menggunakan fermentasi cair terendam.

Kata kunci: *kitinase, limbah kulit udang, pretreatment, Trichoderma virens, fermentasi substrat padatan*

A. PENDAHULUAN

Produksi udang adalah agro-industri besar di negara-negara tropis dan subtropis. Produk ini berupa udang beku mentah, maupun udang beku yang sudah dimasak, yang semuanya menghasilkan sejumlah limbah padat (Choorit *et al.*, 2008). Limbah padat dari udang dikeluarkan selama pengolahan dan jumlah ini sekitar 50% dari volume bahan baku. Limbah ini dapat diatasi dengan memanfaatkan limbah kulit udang dengan menghasilkan produk bernilai tambah

seperti sumber untuk produksi enzim, asam laktik dan produksi kitin (Duan *et al.*, 2012; Kandra *et al.*, 2012).

Kitin merupakan salah satu biopolimer terbarukan yang paling berlimpah di bumi setelah selulosa. Kitin memiliki banyak manfaat seperti hemostatin dan penyembuhan luka (Khouasab dan Yamabhai, 2010), imunologi (Muzarelli, 2010), carrier obat (Ishihara *et al.*,

2006), penghilang logam berat dan polutan lainnya (Franco *et al.*, 2004; Hakim *et al.*, 2008).

Spesies dari *Trichoderma* telah diketahui sebagai agen pengendali hayati terhadap jamur fitopatogenik (Howel, 2003). *Trichoderma sp.* memiliki kemampuan mengeluarkan enzim hidrolitik seperti kitinase, protease dan β -glukanase jika dalam medium tumbuh diberikan kitin, glukukan atau laminarin (Vinale *et al.*, 2008). Kitinase adalah enzim hidrolitik yang bertanggung jawab dalam degradasi kitin. Kitinase mempunyai peranan penting dalam pengendalian hama secara biologi, dalam industri makanan, untuk produksi faktor pertumbuhan, sel protein tunggal dan terpenting dapat mendegradasi bahan limbah yang kaya kandungan kitin (Maadhavan *et al.*, 2004).

Kulit udang tidak dapat larut merupakan salah satu keterbatasan dalam fermentasi terendam (SmF). Penerapan fermentasi solid substrat (SSF) untuk produksi enzim dan metabolit lainnya yang dapat memberikan hasil yang lebih tinggi daripada fermentasi terendam (Pandey, 2003). Selain itu, biaya yang digunakan jauh lebih rendah pada SSF karena pemanfaatan limbah yang dapat memberikan nilai tambah dan lebih efisien (Robinson dan Nigam, 2003). Sejumlah mikroorganisme memiliki kemampuan untuk tumbuh pada media padat SSF yaitu bakteri, yeast dan jamur, tetapi jamur memiliki kemampuan beradaptasi lebih bagus pada media SSF (Khrisna, 2005). Jamur memiliki kemampuan menembus ke substrat padat yang kompleks dan menghasilkan berbagai enzim ekstraseluler (Dahiya *et al.*, 2005).

Kulit udang adalah substrat yang tidak dapat larut, metode perlakuan awal fisikal dan kimia adalah strategi yang baik untuk meningkatkan aksesibilitas mikroorganisme dalam merusak ikatan pada kulit udang dengan cara hidrolisis (Roy *et al.*, 2003). Berdasarkan beberapa hasil penelitian, perlakuan awal pada kulit udang dapat meningkatkan produksi kitinase seperti menggunakan mikrowave (Roy *et al.*, 2003), pemasakan dan penghancuran (Jesus *et al.*, 2006), pemanasan pengeringan (Aye dan Stevens, 2004), pemanasan sinar matahari (Suresh dan Chandrasekaran, 1998; Suraini *et al.*, 2008).

Sangat kurangnya laporan hasil penelitian yang tersedia pada produksi kitinase oleh *Trichoderma virens* menggunakan *pretreatment* kulit udang. Azaliza *et al.* (2009) melaporkan rendahnya aktivitas *T. virens* UKM-

1 menggunakan perlakuan awal limbah kulit udang pada fermentasi terendam yaitu 0.028 U/ml. Tujuan dari penelitian ini untuk mengevaluasi potensi *Trichoderma virens* untuk menghasilkan kitinase pada fermentasi substrat padat dengan skrining pengaruh perlakuan awal limbah kulit udang yang berbeda dalam produksi kitinase.

B. METODE

1. Mikroorganisme

T. virens adalah jamur yang didapatkan dari laboratorium Bioresearch, Fakultas Bioscience dan Kejuruteraan Medikal, Universiti Teknologi Malaysia. Jamur ditumbuhkan pada media Potato dextrose agar (PDA) selama 7 hari pada suhu 28°C.

2. Substrat

Limbah kulit udang yang digunakan pada penelitian ini didapatkan dari pasar lokal di Johor Bahru, Malaysia. Limbah kulit udang dicuci untuk membersihkan dari bahan-bahan lain dan disimpan pada suhu -20°C.

3. Perlakuan awal secara fisik

Perlakuan secara fisikal meliputi pemasakan, pengeringan sinar matahari, mikrowave dan pemanasan dengan oven. Kulit udang mentah digunakan sebagai kontrol. Pada *pretreatment* oven, kulit udang dikeringkan dalam oven dengan menggunakan suhu 70°C selama tiga hari dan dihaluskan dengan blender untuk mendapatkan bentuk yang halus. *Pretreatment* pemanasan sinar matahari, limbah kulit udang dipanaskan di bawah sinar matahari untuk beberapa hari sampai mencapai berat konstan. *Pretreatment* pemasakan dilakukan dengan memasak kulit udang selama satu jam diikuti dengan penghancuran struktur. *Pretreatment* mikrowave dilakukan dengan memanaskan kulit udang selama 10 menit sampai mencapai berat konstan. Sebagai bahan perbandingan digunakan kulit udang mentah sebagai kontrol. Semua *pretreatment* kulit udang dihancurkan dengan blender dan disterilisasi dengan autoclave.

4. Perlakuan kimiawi

Perlakuan kimiawi dari limbah kulit udang dilakukan dengan dengan merendam dalam 5.0% (v/v) HCl 37% selama 1 jam. Setelah itu, limbah udang dicuci dengan air dan

direndam dalam larutan 5.0% (w/v) NaOH selama 65 jam pada suhu 25°C. Cuci sampai semua alkali yang digunakan hilang (pH 7). Limbah udang dikeringkan dalam oven selama 30 jam pada suhu 60°C.

5. Fermentasi substrat padat limbah udang

Lima gram (5 g) limbah udang ditempatkan dalam 250 mL erlenmeyer. Medium basal ditambahkan sebagai nutrisi dengan kelembaban awal substrat sebesar 70%. (Rattanakit *et al.*, 2003), kemudian diautoklaf pada 121°C selama 15 menit. Komposisi medium basal adalah sebagai berikut: 0.2% (w/v) (NH₄)₂SO₄; 0.1% (w/v) yeast extract; 0.028% (w/v) KH₂PO₄; 0.025% (w/v) MgSO₄·7H₂O; 0.007% (w/v) CaCl₂·2H₂O. Setiap erlenmeyer diinokulasi dengan 1 x 10⁷ spore *T. virens*. Erlenmeyer diinkubasi pada suhu 28°C selama 10 hari. Pengambilan sampel dilakukan setiap hari untuk mengukur aktivitas kitinase.

6. Ekstraksi enzim

Substrat fermentasi (5 g) ditambahkan dengan buffer bertujuan untuk mendapatkan volume ekstraksi total 100 mL. Substrat dan buffer dicampur menggunakan *rotary shaker* pada 150 putaran per menit (rpm) selama 30 menit. Campuran disentrifugasi pada 4.000 rpm selama 30 menit pada 4°C. Supernatan dikumpulkan dan digunakan untuk pengujian kitinase.

7. Assay kitinase

Kitinase ditentukan oleh asam dinitrosalisilat (DNS) metode Miller (1955). Metode ini bekerja pada konsentrasi N-asetil glukosamin (NAG), yang dilepaskan sebagai akibat dari reaksi enzim. Campuran reaksi, 2 ml mengandung 1 mL dari 1,0% koloidal kitin dalam buffer sitrat fosfat (pH 4,0) dan 1 mL ekstrak kasar enzim. Larutan tersebut divortex agar homogen, diinkubasi pada suhu 50°C pada waterbath selama 1 jam dan disentrifugasi pada 4.000 rpm selama 5 menit. Reaksi ditangkap dengan penambahan 1 mL reagen DNS diikuti dengan pemanasan pada 100°C selama 5 menit.

Absorbansi sampel diukur pada 540 nm menggunakan spektrofotometer UV (UV-160A, Shimadzu, Jepang) bersama dengan substrat dan enzim kosong sebagai blanko. Koloidal kitin dibuat dengan metode Azaliza *et al.* (2009). Satu unit (U) aktivitas kitinase didefinisikan sebagai

jumlah enzim yang diperlukan untuk melepaskan 1 umol dari N-asetil-β-D-glukosamin per menit dalam kondisi assay.

C. HASIL DAN PEMBAHASAN

1. Hasil Penelitian

Mekanisme proses hidrolisis kitin merupakan aksi sinergis dari tiga enzim yaitu endochitinase (EC 3.2.1.14), exochitinase (EC 3.2.1.29) dan N-asetil hexosaminidase (EC 3.2.1.52) (Seidl, 2008). Limbah krustasea seperti limbah udang ini sebagian besar terdiri dari kitin dan protein. Limbah udang memiliki sebagian besar serat kristalin yang tertanam dalam matriks selain komponen lain seperti glukon, mannan, protein dan mineral (Crespo *et al.*, 2006). Struktur kompleks yang kompak ini membuatnya kurang dapat diakses oleh enzim kitinolitik.

Pengaruh perlakuan awal terhadap degradasi dapat meningkatkan kemampuan hidrolisis seperti dalam penelitian Rosgaard (2006). Perlakuan awal sebelum degradasi adalah salah satu strategi untuk meningkatkan aksesibilitas enzim dan dapat mengubah konfigurasi kristal kitin agar memungkinkan peningkatan degradasi. Kitin adalah acetil polisakarida yang kompleks yang menyebabkan kitin sangat kaku. Kitin tidak dapat larut dan hanya dapat dilarutkan oleh deasetilasi atau perusakan kristalin kitin (Vincent, 2002).

Dalam penelitian ini, ada lima perlakuan awal yang berbeda termasuk kontrol yang diselidiki. Setiap *pretreatment* dipelajari secara ekstensif untuk memahami kemampuan setiap *pretreatment* dalam produksi kitinase pada fermentasi substrat padat.

Produksi kitinase lebih tinggi diperoleh pada perlakuan microwave (Tabel 1) dibandingkan dengan perlakuan limbah udang yang lainnya. Limbah udang dengan perlakuan microwave menghasilkan aktivitas kitinase tertinggi 0.194 U / g substrat setelah 3 hari fermentasi. Goncalves dan Schuchardt (2002) menemukan bahwa microwave meningkatkan hasil konversi hidrogenolisis dari lignin. Microwave juga telah ditemukan bermanfaat untuk ekstraksi kitin dari kepiting merah, dan tidak mengubah kerentanan kitin untuk deasetilasi (Pajak *et al.*, 1998), proses perlakuan dengan microwave pada kitin menghasilkan peningkatan hidrolisis enzimatis oleh kitinase dari kubis (Roy *et al.*, 2003). Aktivitas kitinase diukur secara kuantitatif

Tabel 1. Pengaruh Perlakuan Awal yang Berbeda dari Limbah Udang untuk Produksi Kitinase

Pre-treatment	Maximum Kitinase aktiviti (U/g)	Hari	Maximum Spesifik aktiviti (U/mg)	Hari	Produktiviti (U/mg/day)
Pemasakan	0.141	5	0.012	5	0.0023
Mikrowave	0.194	3	0.0161	3	0.0058
Oven	0.158	3	0.0113	3	0.00405
Pemanasan sinar matahari	0.151	9	0.0121	2	0.0065
Chemical	0.0047	1	0.0005	1	0.0005
Kontrol	0.0665	6	0.0066	8	0.00085

berdasarkan pada produksi kitinase. Di antara semua perlakuan limbah udang yang diteliti, perlakuan microwave menghasilkan aktivitas kitinase lebih tinggi dibandingkan dengan metode perlakuan lain dari pemanasan oven, pemasakan, pemanasan sinar matahari, kontrol dan perlakuan kimiawi dengan kenaikan masing-masing 1,28 kali lipat, 1,2 kali lipat, 1,37 kali lipat, 2,92 kali lipat dan 41,3 kali lipat.

Umumnya, *pretreatment* fisik memberikan pengaruh yang lebih baik untuk produksi enzim dibandingkan dengan *pretreatment* kimia dan tanpa *pretreatment*. Hal ini disebabkan *pretreatment* fisik menyebabkan kehancuran konfigurasi kristal kitin pada kulit udang sehingga memudahkan mikroorganisme untuk menghidrolisis kitin.

Limbah udang mentah (tanpa *pretreatment*) digunakan sebagai kontrol dalam eksperimen ini. Aktivitas kitinase tertinggi yang diamati yaitu pada hari keenam, 0,066 U/g dan konstan sampai hari kesepuluh. Aktivitas kitinase rendah dalam udang tanpa perlakuan (kontrol) disebabkan karena kitin merupakan asetil polisakarida sepenuhnya yang sangat kaku. Kitin tidak larut dan hanya dapat dilarutkan oleh deasetilasi atau perusakan tatanan dari kristalin kitin (Vincent, 2002). Degradasi enzimatik yang terendah dalam limbah udang dengan perlakuan kimiawi dibandingkan dengan *pretreatment* lainnya, yaitu 0,0047 U / g substrat untuk hari pertama. Setelah hari pertama sampai hari kesepuluh inkubasi, aktivitas kitinase tidak

terlihat, yang berarti bahwa jamur tidak tumbuh pada *pretreatment* kimiawi. Hal ini menunjukkan bahwa *pretreatment* ini tidak sesuai terhadap degradasi dari *Trichoderma virens*. Win dan Stevens (2001) melaporkan bahwa perlakuan bahan kimia limbah udang menunjukkan aktivitas kitinase terendah dibandingkan dengan limbah udang mentah. *Pretreatment* kimia dapat menghilangkan 60-80% dari gugus asetil pada kitin (Khoushab dan Yamabhai, 2010). Gugus asetil yang terdapat dalam sebuah molekul disebut asetilasi. Dalam organisme biologis, kelompok asetil biasanya ditransfer dari asetil-CoA menjadi koenzim A (CoA). Asetil-CoA adalah perantara baik dalam sintesis biologis dan dalam pemecahan banyak molekul organik. Asetil-CoA juga dibuat selama tahap kedua respirasi selular.

D. KESIMPULAN

Perlakuan fisik limbah udang meningkatkan efisiensi untuk produksi kitinase terhadap *Trichoderma virens*. Perlakuan kimiawi tidak sesuai untuk pertumbuhan dan produksi enzim kitinase *Trichoderma virens* seperti diperlihatkan pada hasil penelitian dengan menghasilkan produksi yang sangat rendah. Perlakuan awal limbah udang itu penting untuk meningkatkan dan mempercepat reaksi enzim substrat untuk menghasilkan produk yang memberikan kontribusi terhadap nilai tambah industri.

E. DAFTAR PUSTAKA

- W. Choorit, W. Patthanamane, S. Manurakchinakom (2008). Use of response surface method for the determination of demineralization efficiency in fermented shrimp shells. *Bioresource Technology*. 99 (14) : 6168-6173.
- Duan, S., Lei, L., Zejnani, Z., Wenya, W., Shuying, H., Jienhua, Z (2012) Improved production of chitin from shrimp waste by fermentation with epiphytic lactic acid bacteria. *Carbohydr. Polym.* 89 : 1283-1288.
- Kandra, P., M.M. Challa and H.K. Jyothi (2012). Efficient use of shrimp waste ; present and future trends.

- Applied Microbiology and Biotechnology. 93 (1) : 17-29
- Khoushab and Yamabhai (2010). Chitin research revisited. *Marine Drugs*
- Muzzarelli (2010). Chitin and chitosans as immunoadjuvants and non-allergenic drug carriers. *Marine Drugs*.
- Ishihara (2006). Chitosan hydrogel as a drug delivery carrier to control angiogenesis. *Journal Artif. Organs*. 9 : 8 – 16.
- L.O. Franco, R.C.C. Maia, A.L.F. Porto (2004). Heavy metal biosorption by chitin and chitosan isolated from *Cunninghamella elegans* (IFM 46109). *Braz. J. of Microbiol.* 35 : 243-247.
- R.S. Hakim, S. Caccio, Marcia, L., and G. Smaggha (2008). Primary culture of insect midgut cells. *In vitro cell Dev. Biol. Animal.* 45 : 106 – 110.
- C.R. Howel (2003). Mechanisms employed *Trichoderma* species in the biological control of plant disease : the history and evolution of current concepts. *Phytopath Society*. 87 : 4 – 10.
- F. Vinale, K. Sivasithampanan, E.L. Gisalberti, R. Marra, S.L. Wao and M. Lorito (2008). *Trichoderma* – plant – pathogen interactions. *Soil Biology and Biochemistry*. 40 : 1 – 10.
- Nampoothiri, M., Baiju, T.V., Sandhya, C., Sabu, A., Szakacs, G., Pandey, A., (2004) Process optimization for antifungal chitinase production by *Trichoderma harzianum*. *Proc. Biochem.* 39 : 1583-1590.
- Pandey (2003). Solid state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*. 13 : 81-84
- T. Robinson and P. Nigam (2003). Bioreactor design for protein enrichment of agricultural residues by solid state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*. 13 : 197 – 203.
- C. Khrisna (2005). Solid State Fermentation System – an Overview. *Critical Reviews in Biotechnology*. 25 : 1 – 30.
- Dahiya, N., Tewari, R., Tiwari, R.M., Hondal, G.S (2005) Chitinase Production in Solid-State Fermentation by *Enterobacter* sp. NRG4 Using Statistical Experimental Design. *Curr. Microbiol.* 51 : 222-228.
- Roy, K. Mondal and M.N. Gupta (2003) Accelerating enzymatic hydrolysis of chitin by microwave *pretreatment*. *Biotechnol. Prog.* 19 : 1648-1653.
- Jesus, E.M., K.N. Waliszewski, M.A. Garcia and R.C. Camarillo (2006). The use of crude shrimp shell powder for chitinase production by *Seeratia marcescens* WF. *Food. Technol. Biotechnol.* 44 : 95 – 100.
- K.N. Aye and W.F. Stevens (2004). Improved chitin production by *pretreatment* of shrimp shell. *Chemical Technology and Biotechnology*. 79 : 421 – 425.
- P.V. Suresh and M. Chandrasekaran (1998). Utilization of prawn waste for chitinase production by the marine fungus *Beauveria bassiana* by solid state fermentation, *World Journal Microbiology and Biotechnology*. 14 : 655-660.
- Suraini A.A., Teoh L.S., Noorjahan A., Shahab N. And Kamarulzaman K. (2008). Microbial degradation of chitin materials by *Trichoderma virens* UKM1. *Journal of Biological Science*. 8 : 52-59
- A.S. Wasli, Madihah, M.S., Suraini, A.Z., O. Hassan (2009). Medium optimization for chitinase production from *Trichoderma virens* using Central Composite design. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*. 14 : 781-787.
- Rattanakit, N., A. Plikomol, S., Yano, M. Wakayama, and T. Tachiki (2002). Utilization of shrimp shellfish waste as a substrate for solid state cultivation of *Aspergillus* sp. S1-13: evaluation of a culture based on chitinase formation which is necessary for chitin assimilation. *Biosci. Bioeng.* 93: 550-556.
- Miller GL (1959) Modified DNS method for testing reducing sugar. *Anal Chem.* 31:426–431.
- V. Seidl (2008). Chitinase of filamentous fungi : a large group of diverse protein with multiple a physiological function. *Fungal Biology Reviews*. 22 : 36 – 42.
- Crespo, M.O.P., M.V. Martinez, J.L. Hernandez and M.A.L. Yusty (2006). High-Performance liquid chromatographic determination of chitin in the snow crab, *Chionoecetes opilio*. *Journal of Chromatography A*. 116 : 189-192.
- Rosgaard, S. Pedersen, J.R. Cherry, P. Harris, A.S. Meyer (2006). Efficiency of new fungal cellulase systems in boosting enzymatic degradation of barley straw lignocellulase. *Biotechnol. Prog.* 22 : 493 – 498.
- Vincent (2002). Arthropod cuticle : a natural composite shell system. *Composite Part A*. 33 : 1311-1315
- Goncalves, A.R. and Schuchardt, U. (2002). Hydrogenolysis of lignins influence of the *pretreatment* using microwave and ultrasound irradiations. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 98-100 : 815-832.
- N. Win and F. Stevens (2001). Shrimp chitin as substrate for fungal chitin deacetylase. *Applied Biotechnology and Microbiology*. 57 : 334-341.