

REPUBLIK INDONESIA
KEMENTERIAN HUKUM DAN HAK ASASI MANUSIA

SERTIFIKAT PATEN SEDERHANA

Menteri Hukum dan Hak Asasi Manusia atas nama Negara Republik Indonesia berdasarkan Undang-Undang Nomor 13 Tahun 2016 tentang Paten, memberikan hak atas Paten Sederhana kepada:

Nama dan Alamat Pemegang Paten : UNIVERSITAS DIPONEGORO
Jl. Prof. Soedarto, SH Tembalang,
Semarang, 50275,
INDONESIA

Untuk Invensi dengan Judul : PROSES PEMBUATAN GLUKOSAMIN DARI KITOSAN
BERAT MOLEKUL RENDAH MELALUI HIDROLISIS
ENZIMATIS DAN PENAMBAHAN SURFAKTAN

Inventor : Ir. Nur Rokhati, MT
Titik Istirokhatun, ST., M.Sc
Dwi Titik Apriyanti, ST, MT
Meike Fitrianingtyas, ST, MT

Tanggal Penerimaan : 08 Januari 2019

Nomor Paten : IDS000002677

Tanggal Pemberian : 10 Desember 2019

Perlindungan Paten Sederhana untuk invensi tersebut diberikan untuk selama 10 tahun terhitung sejak Tanggal Penerimaan (Pasal 23 Undang-Undang Nomor 13 Tahun 2016 tentang Paten).

Sertifikat Paten Sederhana ini dilampiri dengan deskripsi, klaim, abstrak dan gambar (jika ada) dari invensi yang tidak terpisahkan dari sertifikat ini.



a.n. MENTERI HUKUM DAN HAK ASASI MANUSIA
DIREKTUR JENDERAL KEKAYAAN INTELEKTUAL

Dr. Freddy Harris, S.H., LL.M., ACCS.
NIP. 196611181994031001

Deskripsi**PROSES PEMBUATAN GLUKOSAMIN (*GLUCOSAMINE*) DARI KITOSAN BERAT MOLEKUL RENDAH (*LOW MOLECULAR WEIGHT CHITOSANE/LMWC*) MELALUI HIDROLISIS ENZIMATIS DAN PENAMBAHAN SURFAKTAN**

5

Bidang Teknik Invensi

Invensi ini berkenaan dengan proses pembuatan glukosamin (*glucosamine*) dari kitosan dengan berat molekul rendah (LMWC) menggunakan hidrolisis enzimatis dan penambahan surfaktan. Enzim yang digunakan dalam invensi ini merupakan perpaduan antara enzim selulase (*cellulase*) dan enzim glukosidase (β -*glucosidase*). Sedangkan surfaktan yang ditambahkan dalam pembuatan glukosamin (*glucosamine*) ini adalah tween 80.

15

Latar Belakang Invensi

Glukosamin (*glucosamine*) merupakan salah satu suplemen yang paling populer dan banyak dikonsumsi di dunia (Dalirfardouei *et al.*, 2016, *Life Sciences*, 152:21-29). Glukosamin memiliki potensi untuk mencegah atau mengobati berbagai macam penyakit. Selain itu, glukosamin bersifat sangat aman dan tidak memiliki efek mutagenik atau genotoksik. Oleh karena itu, proses yang ekonomis dan efisiensi tinggi sangat perlu dikembangkan dalam skala industri untuk menghasilkan produk glukosamin (Simon *et al.*, 2011, *Diabetes Metab. Res. Rev.*, 27:14-27).

Di Indonesia, glukosamin termasuk obat yang mahal sehingga masuk ke dalam daftar obat yang dijamin dalam asuransi kesehatan (Kardiman, 2013, CDK-211/vol.40 No.12). Saat ini, kebutuhan glukosamin paling banyak digunakan untuk pengobatan *osteoarthristis* (Vangsness *et al.*, 2009, *The Journal of Arthroscopic and Related Surgery*, 25(1):86-94;

Hungerford and Jones, 2003, *Journal of Arthroplasty*, 18: 5-9). Sebagian besar kebutuhan glukosamin ini masih dipenuhi dengan impor. Glukosamin sebenarnya dapat diproduksi sendiri di Indonesia karena prosesnya sederhana dan ketersediaan bahan baku yang melimpah. Glukosamin (2-deoksi-2-aminoglukosa) merupakan monosakarida dari kitosan, yang bisa diperoleh dari proses deasetilasi dan depolimerisasi kitin yang terkandung didalam cangkang binatang invertebrata terutama *crustacea*, seperti udang, kepiting, dan rajungan. Sebagai gambaran, menurut data statistik Kementrian Kelautan dan Perikanan pada tahun 2012, jumlah ekspor daging udang (tanpa kulit dan kepala) sebanyak 162.068 ton (www.dkp.go.id). Jumlah ini menyisakan limbah udang sekitar 40-50%, dimana sekitar 20-40% dari limbah udang kering tersebut adalah kitin (Rinaudo, 2006, *Prog. Polym. Sci.*, 31; Jung et al., 2007, *Carbohydrate Polymers*, 68:746-750; Xu et al., 2008, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 79:687-697; Arbia et al., 2013, *Food Technol. Biotechnol.*, 51(1):12-25).

Depolimerisasi kitosan dapat dilakukan dengan berbagai cara antara lain hidrolisis menggunakan katalis asam (Wang et al., 2008, *Carbohydrate Polymers*, 74:127-132), kavitasi hidrodinamik (Huang et al., 2013, *Journal of South China University of Technology (Nature Science)*, 31:71-75), kavitasi swirling (Wu et al., 2014, *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 23:188-193), ultrasonik (Kasaai et al., 2008, *Ultrasonics Sonochemistry*, 15:1001-1008), radiasi gamma (Wasikiewicz et al., 2005, *Radiation Physics and Chemistry*, 73:287-295), serta hidrolisis enzimatis. Proses hidrolisis menggunakan katalis asam sebenarnya sederhana dan mudah. Akan tetapi, proses ini menggunakan asam konsentrasi tinggi dan suhu tinggi sehingga menyebabkan pencemaran lingkungan, produk menjadi *browning*, dan *yield* rendah (Wang et al., 2008, *Carbohydrate Polymers*, 74:127-132; Pan and Wu,

2011, *Eur. Food Res. Technol.*, 233:325-329; Suresh, 2012, *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 28:2945-2962). Sedangkan metode kavitasasi hidrodinamik, kavitasasi swirling, ultrasonik, dan radiasi gamma merupakan teknologi yang bersih dan produk yang dihasilkan mempunyai kemurnian tinggi. Tetapi, hasil penelitian yang dilaporkan masih menggunakan larutan kitosan dengan konsentrasi yang sangat rendah (kurang dari 1%) dan produk yang dihasilkan masih terbatas pada kitosan dengan berat molekul rendah atau *low molecular weight chitosan* (LMWC) dan oligokitosan.

Dari beberapa proses yang telah digunakan, hidrolisis enzimatis menawarkan keuntungan lebih banyak karena menggunakan kondisi pengerjaan reaksi ringan, reaksi mudah dikontrol, spesifisitas tinggi, *yield* tinggi, dan tidak terdapat modifikasi cincin glukosa, serta ramah lingkungan (Roncal *et al.*, 2007, *Carbohydrate Research*, 342: 2750-2756). Namun demikian, kelemahan proses ini adalah reaksinya berjalan lambat. Enzim spesifik yang biasanya digunakan untuk hidrolisis kitosan adalah *Chitosanase*. Harga enzim jenis ini masih mahal dan belum banyak tersedia di pasaran, sehingga menghambat penggunaannya dalam skala industri. Beberapa enzim yang tidak spesifik telah terbukti dapat menghidrolisis kitosan, diantaranya enzim *cellulase* (Xia *et al.*, 2008, *Bioresource Technology*, 99:6751-6762), *pectinase* (Sardar, *et al.*, 2003, *Biotechnol. Prog.*, 19:1654-1658; Abd-Elmohdy, *et al.*, 2010, *Carbohydrate Polymers*, 82:539-542), *pepsin* (Roncal *et al.*, 2007, *Carbohydrate Research*, 342; Li *et al.*, 2012, *Carbohydrate Polymers*, 87:2697-2705), *papain* (Lin, *et al.*, 2002, *Enzyme Microbial Technology*, 31:588-592), *protease* (Li *etal.*, 2012, *Carbohydrate Polymers*, 87:2697-2705), *lipase* (Lee *et al.*, 2008, *Food Chemistry*, 111:291-295), dan α *amylase* (Rokhati dkk., 2013, *ISRN Chemical Engineering* Volume Article ID 86159). Hasil hidrolisis yang dilaporkan masih menggunakan

larutan kitosan konsentrasi rendah ($\pm 1\%$) dan produk yang dihasilkan masih berupa LMWC dan oligokitosan. Dengan demikian, enzim yang tidak spesifik khususnya enzim selulase (*celullase*) dapat digunakan untuk menghidrolisis kitosan karena enzim ini banyak dijumpai di Indonesia. Serta untuk mengantisipasi reaksi yang berjalan lambat dapat menggunakan surfaktan.

Penelitian sebelumnya (Rokhati dkk., Reaktor, Vol. 15 No. 4, Oktober 2015, Hal. 261-267) menunjukkan bahwa hidrolisis kitosan secara enzimatis menggunakan kombinasi enzim endo-glukanase dan *cellobiohydrolase* dapat menyebabkan terjadinya penurunan berat molekul yang ditandai dengan adanya penurunan viscositas larutan kitosan. Hidrolisis kitosan tersebut dapat menurunkan berat molekul kitosan dari 1280 kDa menjadi 435 kDa.

Invensi sebelumnya yang berkaitan dengan proses pembuatan glukosamin dari kitosan berat molekul rendah diungkapkan dalam Publikasi Paten Amerika Nomor 8034925 B2 menjelaskan pembuatan glukosamin dibuat dari biomas mikroba serta Paten Amerika Nomor Aplikasi US2011/0114472A1 bahwa proses pembuatan glukosamin dengan menggunakan teknik microwave.

Invensi sebelumnya yang telah dilakukan belum memperlihatkan adanya upaya optimal untuk membuat glukosamin. Proses pembuatannya masih membutuhkan biaya tinggi dan suhu tinggi dalam prosesnya.

Invensi yang diajukan ini adalah proses pembuatan glukosamin dari kitosan dengan berat molekul rendah (LMWC) menggunakan hidrolisis enzimatis dan penambahan surfaktan. Enzim yang digunakan dalam invensi ini merupakan perpaduan antara enzim selulase (*cellulase*) dan enzim glukosidase (β -*glucosidase*) yang banyak dijumpai di Indonesia. Sedangkan

surfaktan tween 80 yang digunakan telah terbukti dapat mempercepat reaksi hidrolisis.

Uraian Singkat Invensi

5

Tujuan dari invensi ini adalah untuk membuat glukosamin dari kitosan dengan berat molekul rendah (LMWC). Proses untuk membuat glukosamin dari kitosan dengan berat molekul rendah (LMWC) dilakukan dengan hidrolisis enzimatis dan penambahan surfaktan. Enzim selulase (*cellulase*), enzim glukosidase (β -*glucosidase*), dan surfaktan tween 80 digunakan dalam hidrolisis enzimatis ini. Hasil invensi menunjukkan bahwa penambahan surfaktan non-ionik tween 80 dapat secara efektif meningkatkan hidrolisis enzimatis. Dalam rentang yang dipelajari, glukosamin dapat dibuat dengan menggunakan jenis enzim kombinasi selulase (*cellulose*) dan glukosidase (β -*glucosidase*) dengan perbandingan enzim:kitosan adalah 1:100 (berat/berat) dan penambahan surfaktan tween 80 sebanyak 1% (berat/berat). Proses hidrolisis ini dilakukan pada suhu 55°C selama 24 jam dan kecepatan pengadukan 250 rpm.

Uraian Singkat Gambar

Gambar 1, adalah grafik pengaruh waktu reaksi dan penambahan surfaktan terhadap pembentukan gula reduksi.

Gambar 2, adalah pola hasil analisis HPLC: (A) glukosamin hidroklorida hasil hidrolisis kitosan dan (B) glukosamin hidroklorida standar (Merc).

30

Uraian Lengkap Invensi

Proses pembuatan glukosamin dari kitosan berat molekul rendah dilakukan dengan komposisi (berat/berat) sesuai tabel berikut:

No	Material	Komposisi
1	Kitosan	100% (b/b)
2	Enzim selulase (<i>cellulase</i>)	0,5% (b/b)
3	Enzim glukosidase (β - <i>glucosidase</i>)	0,5% (b/b)
4	Surfaktan tween 80	1% (b/b)

5

Proses pembuatan glukosamin dimulai dengan proses hidrolisis kitosan berat molekul rendah (LMWC) menjadi glukosamin. Proses ini dimulai dengan membuat larutan kitosan (LMWC) 1% dengan cara melarutkan 10 gram kitosan dalam larutan penyangga 0,1 M, kemudian ditambahkan lagi larutan penyangga 0,1 M hingga volume menjadi 1 liter. Sedangkan larutan penyangga 0,1 M ini dibuat dengan melarutkan CH₃COONa sebanyak 8,2 gram ke dalam aquades, kemudian ditambah larutan CH₃COOH sebanyak 5,714 ml dan ditambah aquadest sehingga volume menjadi 1 liter. Setelah larutan kitosan (LMWC) 1% dibuat, pencampuran antara 50 mL larutan kitosan (LMWC) 1%, 0,005 mL surfaktan tween 80, enzim selulase 2% sebanyak 0,125 mL, dan enzim glukosidase 2% sebanyak 0,125 mL dilakukan. Pembuatan larutan enzim selulase 2% dan glukosidase 2% ini dilakukan dengan melarutkan 2 gram enzim selulase atau glukosidase ke dalam aquades sehingga volumenya menjadi 100 mL. Campuran reaksi antara larutan kitosan, surfaktan, dan enzim selulase-glukosidase ini selanjutnya diinkubasi dengan menggunakan shaker inkubator pada suhu 55°C dengan kecepatan pengadukan pada 250 rpm. Setelah reaksi hidrolisis selesai, enzim dideaktifasi dengan cara dipanaskan di atas air mendidih selama 10 menit, kemudian didinginkan hingga suhu

10

15

20

25

lingkungan. Proses berikutnya, analisis hasil hidrolisis (gula reduksi) berdasarkan metode *Schaless* modifikasi (Imoto and Yagashita, 1971). Aktivitas enzim dihentikan dengan cara mendidihkan larutan sampel selama 10 menit. Sampel sebanyak 2 mL diencerkan menjadi 25 mL, kemudian 1,5 ml sampel yang telah diencerkan ditambahkan dengan 2 ml reagen Imoto atau pereaksi *Schaless*. Sampel ditutup dengan alumunium foil, kemudian dipanaskan dalam air bersuhu 100°C selama 15 menit. Setelah itu, sampel didinginkan sampai suhu ruangan, kemudian disaring untuk menghilangkan endapan kitosan. Pembuatan larutan *Schaless* ini dilakukan dengan melarutkan 1,325 gram Na₂CO₃ kedalam aquadest sehingga volumenya 25 mL. Selanjutnya, larutan dituang ke beker glass yang ditutup alumunium foil dan ditambah K Fe sianida sebanyak 0,0125 gr, kemudian diaduk hingga larut. Absorbansi sampel diukur pada panjang gelombang 420 nm (Roncal et al., 2007, *Carbohydrate Research*, 342:2750-2756). Konsentrasi total gula reduksi dihitung berdasarkan kurva standar, dengan glukosamin hidroklorida sebagai larutan standar. Proses terakhir, pemurnian (kristalisasi) produk glukosamin dengan penyaringan menggunakan membran ultrafiltrasi (50 kDa) untuk memisahkan produk glukosamin. Larutan glukosamin yang diperoleh ditambahkan dengan HCl sebesar 10% dengan konsentrasi larutan 0,1 N dan dipekatkan dengan menggunakan rotavapor hingga konsentrasi 20%. Larutan konsentrat ditambahkan etanol sebanyak 50% volume untuk mengendapkan glukosamin menjadi glukosamin hidroklorida. Kristal glukosamin hidroklorida dipisahkan dari filtratnya dengan menggunakan sentrifuge dan dikeringkan dengan oven vakum pada suhu 30 °C.

Adapun hasil optimal yang diperoleh untuk proses pembuatan glukosamin yaitu menggunakan perpaduan enzim selulase dan glukosidase dengan perbandingan enzim:kitosan 1:100 (berat/berat) dan penambahan surfaktan tween 80

sebanyak 1% (berat/berat). Proses hidrolisis ini dilakukan pada pada suhu 55 °C selama 24 jam dan kecepatan pengadukan 250 rpm. Rendemen kristal *glucosamine* yang diperoleh sebesar 36,7% (b/b kitosan). Enzim selulase (*cellulose*) akan
5 menghidrolisis kitosan menjadi rantai oligosakarida, sedangkan enzim glukosidase (β -*glukosidase*) akan menghidrolisis oligomer menjadi monomer glukosamin. Surfaktan tween 80 terbukti dapat meningkatkan pembentukan gula reduksi menjadi dua kali lebih tinggi daripada tanpa surfaktan tween
10 80. Surfaktan dapat meningkatkan desorpsi enzim dari gugus fungsional substrat dan kemudian mengabsorpsi gugus fungsional substrat lainnya.

15

20

25

30

Klaim

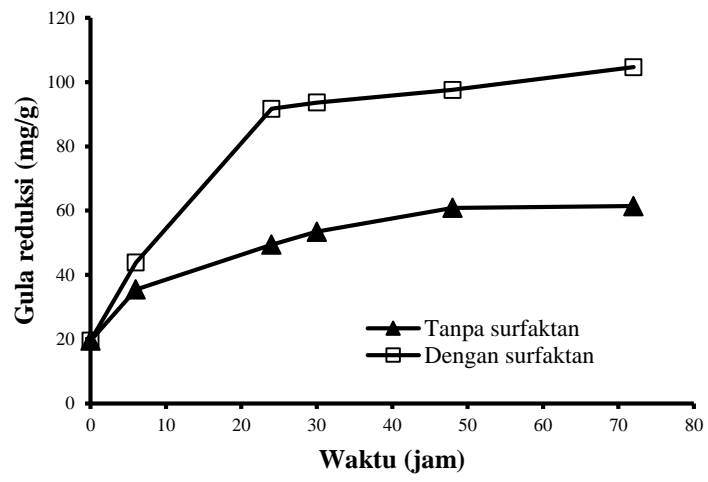
1. Proses pembuatan glukosamin dari kitosan dengan berat molekul rendah (LMWC) dilakukan dengan hidrolisis enzimatis menggunakan kombinasi enzim selulase (*cellulase*) dan enzim glukosidase (β -*glucosidase*) serta penambahan surfaktan tween 80 dengan langkah-langkah sebagai berikut:
- Pembuatan larutan kitosan konsentrasi 1% dengan melarutkan kitosan berat molekul rendah (\pm 150 kDa) dalam larutan pendapar asam/natrium asetat 0,1 M (pH larutan 4,7). Larutan kitosan ditambahkan dengan surfaktan Tween 80 sebanyak 1% (b/b) dan enzim (kombinasi *cellulase* dan β -*glucosidase*) dengan rasio 1:100 (b/b kitosan). Campuran larutan tersebut diinkubasi dengan menggunakan *shaker incubator* pada suhu 55 °C dengan kecepatan pengadukan pada 250 rpm selama 24 jam. Setelah reaksi hidrolisis selesai, enzim dideaktifasi dengan cara dipanaskan diatas air mendidih selama 10 menit;
 - Larutan hasil hidrolisis kitosan berat molekul rendah disaring dengan menggunakan membran ultrafiltrasi untuk memisahkan kotoran dan kitosan rantai panjang, Bagian permeal yang diperoleh ditambahkan dengan larutan HCl 1N sebesar 10% dan dipekatkan dengan menggunakan rotavap hingga konsentrasi larutan 20%. Larutan konsentrat ditambahkan etanol untuk mengendapkan *glucosamine* menjadi *glucosamine-HCl*. Kristal *glucosamine-HCl* dipisahkan dari filtratnya dengan menggunakan sentrifuge dan dikeringkan dengan oven vakum pada suhu 30° C kemudian menghasilkan kristal *glucosamine-HCl* sebesar 36,7 % (gr *glucosamine*/gr kitosan berat molekul rendah).

Abstrak

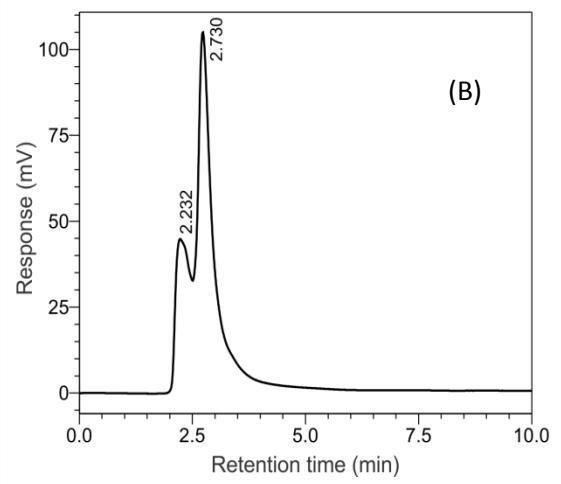
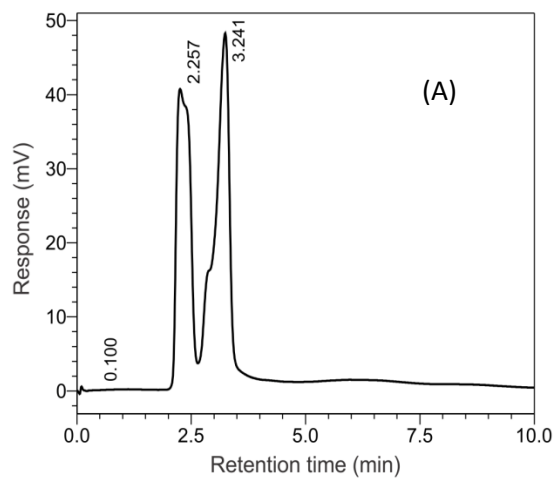
PROSES PEMBUATAN GLUKOSAMIN (*GLUCOSAMINE*) DARI KITOSAN BERAT MOLEKUL RENDAH (*LOW MOLECULAR WEIGHT CHITOSANE/LMWC*) MELALUI
5 **HIDROLISIS ENZIMATIS DAN PENAMBAHAN SURFAKTAN**

Telah dihasilkan invensi berupa proses pembuatan glukosamin dari kitosan berat molekul rendah (LMWC) dengan hidrolisis enzimatis menggunakan enzim selulase (*cellulase*)
10 dan enzim glukosidase (β -*glucosidase*) serta penambahan surfaktan tween 80. Hasil optimal diperoleh dengan menggunakan komposisi enzim kombinasi selulase (*cellulase*) dan enzim glukosidase (β -*glucosidase*) dengan perbandingan enzim:kitosan adalah 1:100 (berat/berat) dan penambahan
15 surfaktan tween 80 sebanyak 1% (berat/berat). Proses hidrolisis ini dilakukan pada suhu 55 °C selama 24 jam dan kecepatan pengadukan 250 rpm. Invensi menunjukkan bahwa surfaktan tween 80 dapat meningkatkan pembentukan gula reduksi dua kali lebih tinggi daripada tanpa menggunakan
20 surfaktan tween 80. Selain itu, hasil uji karakterisasi menggunakan HPLC menunjukkan bahwa waktu retensi produk kristal glukosamin-HCl hasil hidrolisis kitosan mirip dengan glukosamin-HCl yang ada di pasaran (produk Aldrich).

25



Gambar 1



Gambar 2