

II. TINJAUAN PUSTAKA

A. Udang

Limbah udang yang berupa kulit, kepala, dan ekor dengan mudah didapatkan mengandung senyawa kimia berupa kitin dan kitosan. Senyawa ini dapat diolah dan dimanfaatkan sebagai bahan penyerap logam–logam berat yang dihasilkan oleh limbah industri. Hal ini dimungkinkan karena senyawa kitin dan kitosan mempunyai sifat sebagai bahan pengemulsi koagulasi, reaktifitas kimia yang tinggi dan menyebabkan sifat polielektrolit kation sehingga dapat berperan sebagai penukar ion (*ion exchanger*) dan dapat berfungsi sebagai absorben terhadap logam berat dalam air limbah.

Kulit udang mengandung protein (25% - 40%), kalsium karbonat (45% - 50%), dan kitin (15% - 20%), tetapi besarnya kandungan komponen tersebut tergantung pada jenis udangnya. Sedangkan kulit kepiting mengandung protein (15,60% - 23,90%), kalsium karbonat (53,70% – 78,40%), dan kitin (18,70% - 32,20%), hal ini juga tergantung pada jenis kepiting dan tempat hidupnya. Kandungan kitin dalam kulit udang lebih sedikit dari kulit kepiting (*crab*), tetapi kulit udang lebih mudah didapat dan tersedia dalam jumlah yang banyak sebagai limbah (Anonim, 2009).

B. *Actinomycetes*

Actinomycetes merupakan organisme tanah yang memiliki sifat-sifat yang umum dimiliki oleh bakteri dan jamur. Terlihat dari luar seperti jamur (eukariotik), namun organisme ini sesuai dengan semua kriteria untuk sel prokariotik, yaitu : dinding selnya mengandung asam muramat, tidak mempunyai mitokondrion, mengandung ribosom 70s, tidak mempunyai pembungkus nukleus, garis tengah selnya berkisar dari 0,5-2,0 μm , dan dapat dimatikan atau dihambat oleh banyak antibiotik bakteri (Wesley dan Wheeler, 1993 dan Rao, 1994).

Menurut Alexander, 1997, *Actinomycetes* memiliki dinding sel yang terdiri dari polimer-polimer gula, asam amino dan asam gula seperti dinding sel bakteri Gram positif. Sedangkan dinding sel fungi terdiri dari selulosa dan kitin. Hal tersebut sejalan dengan Lay dan Hastowo (1992), yang mengatakan bahwa *actinomycetes* merupakan kelompok mikroba bersifat Gram positif.

Walaupun *actinomycetes* dikatakan sebagai mikroorganisme peralihan antara bakteri dan fungi (Alexander, 1997), tetapi *actinomycetes* mempunyai ciri yang khas, yang cukup membatasinya menjadi satu kelompok yang jelas berbeda. Pada medium cair, pertumbuhan *actinomycetes* ditandai dengan keruhnya medium dan terbentuk lapisan tipis di permukaan medium.

Actinomycetes menyerupai fungi karena mempunyai hifa bercabang dengan membentuk miselium. Miselium tumbuh menjulang ke udara, dan memisah dalam fragmen-fragmen yang pendek sehingga terlihat seperti cabang pada

bakteri (Sutedjo *et al.*, 1991). *Actinomycetes* mempunyai kesamaan dengan bakteri yaitu struktur sel dan ukuran irisan melintang (Foth, 1991).

Menurut Rao (1994), pada lempeng agar, *actinomycetes* dapat dibedakan dengan mudah dari bakteri, dimana koloni bakteri tumbuh dengan cepat dan berlendir, sedangkan *actinomycetes* muncul perlahan dan berbubuk serta melekat erat pada permukaan agar. Koloni *actinomycetes* biasanya keras, kasar, dan tumbuh tinggi di atas permukaan medium. Umumnya, *actinomycetes* tidak toleran terhadap asam dan jumlahnya menurun pada pH 5,0. Rentang pH dan temperatur yang cocok untuk pertumbuhan *actinomycetes* ini sekitar 6,5–8,0 dan 25–30⁰C. Namun, ada beberapa *actinomycetes* termofilik yang dapat tumbuh pada temperatur sekitar 55–65⁰C seperti *Thermoactinomycetes* dan *Streptomyces*.

Medium yang baik untuk menumbuhkan *actinomycetes* adalah medium yang mengandung glukosa, gliserol atau tepung sebagai sumber karbon; nitrat atau kasein sebagai sumber nitrogen dan mineral–mineral tertentu seperti NaCl, K₂HPO₄, MgSO₄.7H₂O, CaCO₃, FeSO₄.7H₂O. Inkubasi biasanya selama 2–7 hari (Jutono dalam Fithria, 2007). Populasi *actinomycetes* di alam dipengaruhi oleh beberapa faktor seperti kandungan organik, pH, kelembapan, temperatur, musim, dan lain- lain (Suwandi, 1989).

Menurut Sutedjo (1991), *actinomycetes* dapat membentuk dua tipe miselium, yaitu :

1. Miselium vegetatif

Miselium vegetatif merupakan miselium yang tumbuh di atas medium. Pada beberapa spesies miselium vegetatif berbentuk lurus dan panjang, sedang

pada spesies lain berbentuk pendek, bercabang, atau bengkok. Diameter miselium vegetatif antara 0,2-0,8 mikron. Miselium vegetatif juga dapat membentuk pigmen.

2. Miselium udara (*aerial*)

Miselium udara (*aerial*) merupakan miselium yang tumbuh pada permukaan medium dan terbentuk konidia. Banyak *actinomycetes* khususnya yang termasuk dalam *Streptomyces* dapat membentuk miselium udara. Miselium udara berbentuk pendek dan lurus, atau berulir–ulir (spiral) dan bercabang, dapat membentuk sporofora yang lurus, serta beberapa hifa udara bersifat steril. Miselium udara memiliki pigmen putih, kelabu, lembayung, merah, kuning, hijau, atau warna lainnya.

Berdasarkan morfologinya *actinomycetes* diklasifikasi sebagai berikut :

1. *Nocardioforms*, terdiri dari 11 genus dengan ciri–ciri filamen mengalami fragmentasi, diameter filamen 0,5-1,2 μm , rantai konidia terdapat pada miselium substrat dan *aerial*, dan bersifat mesofilik. Contoh: *Nocardia*.
2. *Multiloculars*, meliputi 3 genus dengan ciri–ciri diameter 0,5-2,0 μm , tidak ada miselium *aerial*, *sporangiospora* non motil, membentuk bintil akar pada tanaman yang bukan kacang-kacangan. Contoh : *Frankia*.
3. *Actinoplanes*, terdiri dari 5 genus dengan ciri-ciri diameter cabang septa miselium 0,5 μm , tanpa miselium *aerial*, spora dibentuk pada miselium substrat. Contoh : *Micromonospora*.
4. *Sterptomycetes*, terdiri dari 4 genus dengan ciri-ciri diameter filamen 0,5-2,0 μm , rantai terdiri dari tiga hingga beberapa spora, miselium *aerial*, dan dapat memproduksi antibiotik. Contoh : *Streptomycetes*.

5. *Maduromycetes*, terdiri dari 7 genus dengan ciri-ciri memiliki hifa *aerial*, bentuk *sporangiospora* pada gelendong, hifa tidak bercabang dan hifa hidrosilat berisi madurose (metal galaktosa). Contoh : *Streptosporangium*.
6. *Thermomonospora*, terdiri dari 4 genus dengan ciri-ciri bercabang tanpa fragmentasi, filamen berbentuk koloni tipis, spora dibentuk pada sekelompok cabang *sporangiospora*. Contoh : *Thermoactinomyces*.
7. *Thermoactinomycetes*, hanya 1 genus dengan ciri-ciri memiliki miselium substrat, bercabang, bersepta, diameternya 0,4–0,8 μm , dan membentuk endospora. Contoh : *Thermoactinomyces*.
8. Lainnya, terdiri dari 4 genus dengan ciri-ciri cabang hifa vegetatif berdiameter 0,4 μm , hifa aerial membentuk lingkaran yang diakhiri dengan konidia, miselium tidak berisi nitrogen, fosfolipid dan asam mycolic tetapi berisi glikolipid. Contoh : *Glycomyces*.



Gambar 1. Berbagai strain *actinomycetes* yang ditumbuhkan pada media agar (Caveletti, 2009)

C. Enzim

Enzim merupakan produk protein sel hidup yang berperan sebagai biokatalisator dalam proses biokimia, baik yang terjadi di dalam sel maupun di luar sel (Poedjiadi, 1994). Enzim merupakan katalisator sejati yang meningkatkan kecepatan reaksi kimia spesifik dengan nyata, tanpa enzim, suatu reaksi kimia akan berlangsung amat lambat. Enzim tidak dapat mengubah titik keseimbangan reaksi yang dikatalisisnya, enzim juga tidak akan habis dipakai atau diubah secara permanen oleh reaksi-reaksi tersebut (Lehninger, 1982).

Enzim adalah protein yang diproduksi oleh sel-sel hidup. Protein yang diproduksi ini berbeda dengan protein lain seperti albumin, gelatin dan kasein karena protein enzim yang diproduksi oleh sel hidup dapat berfungsi sebagai katalis dan digunakan oleh sel hidup untuk mengkatalisis reaksi kimia spesifik yang terjadi di dalam sel. Enzim yang diperoleh dari mikroorganisme lebih menguntungkan karena mikroorganisme dapat berkembang biak dengan cepat, tidak memerlukan lahan yang luas, biaya produksi relatif murah dan mudah dikontrol (Maggy dkk, 1989).

Fungsi terpenting dari enzim adalah kemampuannya menurunkan energi aktivasi suatu reaksi kimia. Kemampuan enzim mendegradasi substrat dipengaruhi oleh beberapa faktor, antara lain konsentrasi enzim, konsentrasi substrat, pH, serta temperatur (Lehninger, 1982).

Protein adalah bagian utama enzim yang dihasilkan sel, maka semua yang dapat mempengaruhi protein dan sel akan berpengaruh terhadap reaksi enzimatik. Beberapa faktor penting yang mempengaruhi aktivitas enzim antara lain :

a). Substrat (reaktan)

Pada konsentrasi substrat rendah, kecepatan reaksi yang terjadi rendah. Kecepatan reaksi akan meningkat dengan meningkatnya konsentrasi substrat. Akan tetapi setelah peningkatan substrat lebih lanjut akan tercapai suatu laju maksimum. Pada keadaan substrat yang berlebih akan terjadi kejenuhan pembentukan kompleks enzim substrat sehingga sebagian besar substrat tidak diubah menjadi produk. Penambahan substrat lebih lanjut tidak berakibat terhadap laju reaksi.

b). Suhu

Seperti reaksi kimia pada umumnya, maka reaksi enzimatik dipengaruhi oleh suhu. Jika suhu meningkat, maka laju reaksi juga akan meningkat. Karena enzim adalah protein, maka semakin tinggi suhu mengakibatkan proses enzim tidak aktif meningkat. Umumnya enzim mengalami kerusakan (denaturasi) pada suhu di atas 50°C.

c). Derajat keasaman (pH)

Reaksi suatu enzim dipengaruhi oleh perubahan pH karena akan berakibat langsung terhadap sifat ion dari gugus-gugus amino dan karboksilat, sehingga akan mempengaruhi bagian aktif enzim dan konformasi dari enzim. pH yang terlalu rendah atau terlalu tinggi akan mengakibatkan denaturasi dari protein enzim.

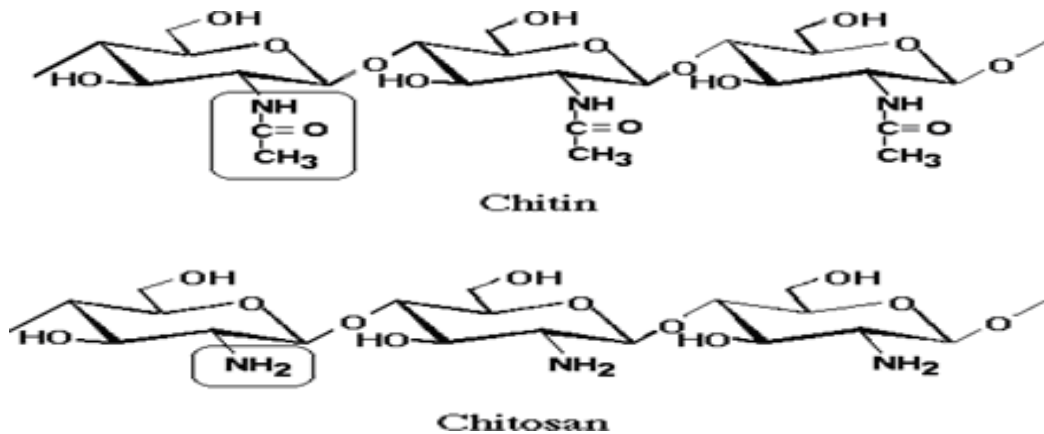
d). Penghambat enzim (inhibitor)

Inhibitor dapat meminimalkan kerja enzim karena akan membentuk ikatan dengan sisi aktif enzim sehingga mengganggu proses pembentukan dan kestabilan ikatan kompleks enzim substrat. Ada beberapa cara penghambatan enzim, seperti penghambat secara bersaing (kompetitif), penghambat tidak bersaing (non-kompetitif), penghambat umpan balik (feed back inhibitor), dan penghambat alosterik.

D. Kitin

Kitin adalah polimer kedua terbanyak di alam setelah selulosa. Kitin merupakan komponen penyusun tubuh serangga, udang, kepiting, cumi-cumi, dan *artropoda* lainnya, serta bagian dari dinding sel kebanyakan fungi dan alga. Setiap tahun dari perairan (laut) dihasilkan sekitar 10–11 ton kitin, namun kurang dari 0,1% yang dimanfaatkan kembali.

Kitin memiliki struktur yang mirip selulosa. Bila selulosa tersusun atas monomer glukosa, maka kitin tersusun dari monomer N-asetilglukosamin (Gambar 2). Keduanya memiliki kelarutan sangat rendah dalam air serta mengalami biodegradasi melalui mekanisme yang hampir serupa dengan melibatkan kompleks enzim.



Gambar 2. Struktur Kitin, dan Kitosan (Skjak-Braek and Sanford, 1989)

E. Kitinase

Kitinase merupakan enzim yang mampu menghidrolisa polimer kitin menjadi kitin oligosakarida atau monomer N-asetilglukosamin. Enzim ini dihasilkan oleh bakteri, fungi, tanaman, dan hewan. Atas dasar cara kerjanya dalam mendegradasi substrat, kitinase dibedakan kedalam 2 kelompok utama: endokitinase dan eksokitinase. Endokitinase memotong polimer kitin secara acak menghasilkan dimer, trimer, tetramer dan atau oligomer gula. Eksokitinase memotong kitin hanya dari ujung non reduksi. Bila hasil potongan berupa monomer maka enzim tersebut dinamakan N-asetilheksosaminidase, namun bila potongan yang dihasilkan berupa dimer maka enzim tersebut disebut sitobiosidase (Cohen-Kupiec dan Chet, 1998).

Berdasarkan homologi sekuen asam aminonya, kitinase dibedakan atas famili 18 dan 19. Famili 18 meliputi kitinase dari bakteri, fungi, serangga, tanaman (kelas III dan V), hewan (Gijzen *et al*, 2001) dan satu kitinase dari *Streptomyces griseus* (Ohno *et al*, 1996). Kitinase tanaman kelas I tersusun atas sekuen yang *conserved* pada struktur utamanya, serta domain kaya sistein pada ujung N. Kitinase kelas II

secara struktural homolog dengan kelas I, tetapi tidak memiliki domain kaya sistein. Sementara, kitinase kelas III dan V tidak memiliki homologi dengan kitinase kelas I, II dan IV (Fukamizo, 2000).

Selain oleh kitinase, polimer kitin juga bisa didegradasi oleh enzim kitin deasetilase dan kitosanase (Gambar 2). Kitin deasetilase menghilangkan gugus asetil dari kitin menghasilkan kitosan. Kitosan akan dipotong-potong oleh kitosanase menghasilkan kitosan oligomer kitosan. Oligomer kitosan kemudian dipotong-potong lagi oleh β -D-glukosaminidase menghasilkan monomer glukosamin, kitin dan kitosan memiliki struktur yang serupa tetapi disusun oleh monomer gula yang berlainan. Kitin tersusun atas monomer N-asetilglukosamin, sementara kitosan disusun oleh monomer glukosamin.

Pengukuran aktivitas kitinase dalam memecah kitin dapat dilakukan dengan beberapa cara seperti yang disebutkan dalam Jeaniaux (1966) dan Cabib (1987) yaitu :

a) Berdasarkan pengurangan substrat

1. Metode viskosimetri yaitu aktivitas kitinase terhadap kitosan, glikol kitin atau karboksimetil kitin yang ditunjukkan oleh terjadinya pengurangan viskositas substrat.
2. Metode turbidimetri (nephelometri) yaitu pengukuran variasi kekeruhan suspensi koloidal kitin selama kitinolisis. Pengukuran ini bersifat cepat dan akurat tapi tidak cocok untuk enzim dengan aktivitas rendah. Contoh pada pengukuran aktivitas enzim endokitinase. Unit aktivitas enzim endokitinase diukur sebagai persen

pengurangan kerapatan atau turbiditas relatif dari suspensi yang sama antara yang berisi enzim dengan akuades. Satu unit endokitinase didefinisikan sebagai jumlah enzim yang dibutuhkan untuk mereduksi turbiditas suspensi kitin 5 %.

- b) Berdasarkan pembentukan produk akhir yaitu GlcNAc (metode Reissig, 1955). GlcNAc yang dibebaskan dari kitin ditentukan secara kolometrik dengan penambahan p-dimetilaminobenzaldehida. Satu unit aktivitas kitinase dinyatakan sebagai μmol GlcNAc yang dibebaskan selama 1 jam dalam kondisi yang ditetapkan.
- c) Pengujian spektrofotometri yaitu menggunakan kromogen 3,4-dinitrophenil-tetra- N-asetilkitotetraose sebagai substrat.
- d) Pengujian sensitifitas kitinase menggunakan radiometri yaitu substrat diberi label ^{14}C atau ^3H . Kadar produk diuji dengan radioaktifitasnya setelah penghilangan kitin yang belum dipecah dengan penyaringan atau dengan cara disentrifugasi.

F. Fermentasi

Fermentasi merupakan reaksi oksidasi reduksi yang menggunakan sumber energi dan sumber karbon, nitrogen dan pospor untuk membentuk senyawa yang mempunyai nilai ekonomi lebih tinggi serta terakumulasi dalam medium. Proses fermentasi disebabkan oleh organisme atau hasil metabolisme (Rao, 2009). Medium yang digunakan dalam suatu fermentasi harus mengandung substrat kaya akan nutrisi. Substrat atau nutrisi adalah senyawa yang terdapat di lingkungan pertumbuhan dan digunakan untuk proses katabolisme dan anabolisme. Nutrien

utama yang digunakan untuk pertumbuhan mikroba adalah karbon, nitrogen, hidrogen, oksigen dan pospor.

Tabel 1. Sumber nutrisi utama yang digunakan dalam pertumbuhan mikroba (Rao, 2009)

Nutrien	Sumber
Karbon Glukosa Laktosa Lemak Hidrokarbon	gula jagung, pati, selulosa tebu, <i>molasse</i> <i>milkwhey</i> Fraksi minyak
Nitrogen Protein Ammonia Nitrat Nitrogen	kedelai amoniak atau garam amonium garam nitrat Udara
Pospor	garam pospat

Menurut Pujaningsih (2005) faktor-faktor yang mempengaruhi pemilihan substrat fermentasi, adalah :

- a) Kontinuitas ketersediaan, yaitu tersedia substrat sepanjang tahun sehingga dapat disimpan dalam beberapa bulan, mutu dan komposisi relatif tetap.
- b) Sifat fermentasi substrat harus dapat difermentasikan, contoh pada *Tichoderma viridae* yang hanya tumbuh baik pada substrat selulosa (jerami padi), tetapi tidak dapat tumbuh pada bungkil kelapa.
- c) Harga substrat ekonomis dan dapat digunakan sesuai kebutuhan.

G. Fermentasi Keadaan Padat (*Solid State Fermentation*)

Untuk fermentasi pertumbuhan mikroba dan pembentukan produk bergantung dari permukaan pada substrat padat. Substrat tradisional yang digunakan berupa hasil produk agrikultur seperti beras, tepung, maisena, tebu, dan lain-lain. Substrat

tersebut dapat bermanfaat bagi organisme miselium untuk tumbuh pada konsentrasi nutrisi yang tinggi, dan menghasilkan berbagai macam enzim ekstraseluler seperti sejumlah filamen jamur dan beberapa bakteri, *actinomyces* dan satu strain dari *Bacillus* (Pandey, 2008).

Fermentasi keadaan padat atau *Solid State Fermentation* (SSF) pertama kali dikenalkan oleh Takagi *et al.* (1977), yang telah berhasil mengkombinasikan enzim kitinase dan *yeast S. Cerevisiae* untuk fermentasi gula menjadi etanol. Fermentasi keadaan padat (SSF) sebagai proses fermentasi yang melibatkan zat padat dalam suatu fasa cair (Moo-Young *et al.*, 1983). Untuk proses SSF ini dapat dilakukan dalam satu tempat, proses ini hampir sama dengan proses hidrolisis dengan enzim dan proses fermentasi. Proses SSF ini membutuhkan bahan mentah alami sebagai sumber karbon dan bahan iner sebagai matrik padatan. Substrat padat (matrik) harus cukup akan kelembapan dan memiliki area permukaan substrat yang lebar.

Pembagian SSF berdasarkan dari sifat fisik dibagi menjadi dua kelompok, antara lain :

1. Fermentasi keadaan padat dengan kelembapan rendah atau dengan agitasi berkala.
2. Fermentasi keadaan padat tersuspensi dalam kolom dengan sirkulasi larutan.
Jamur yang digunakan biasanya aerob obligat.

1. Proses Fermentasi Keadaan Padat (*Solid State Fermentation*)

Menurut Mitchel *et al.* (2006) tahapan-tahapan proses SSF secara umum, antara lain :

- a) Persiapan substrat, dimana substrat harus dipotong, digiling, dipecahkan, atau dibuat menjadi butiran kecil. Dengan penambahan air dan nutrisi disebut dengan pra-perawatan substrat untuk menambah ketersediaan gizi.
- b) Persiapan inokulum, tipe dan persiapan inokulum tergantung pada mikroorganisme yang digunakan. Banyak proses SSF melibatkan hifa khamir, maka digunakan spora hasil inokulasi. Tujuan dari langkah ini untuk mengembangkan sebuah inokulum dengan tingkat kelangsungan hidup mikroorganisme yang tinggi.
- c) Persiapan wadah, dimana wadah harus dibersihkan setelah fermentasi sebelumnya dan perlu disterilkan sebelum penambahan substrat.
- d) Inokulasi dan pengerjaan, pengerjaan tahapan ini dengan menyebarkan substrat pada media yang telah disterilkan secara hati-hati untuk menghindari kontaminasi dari mikroorganisme yang tidak diinginkan.
- e) Proses SSF, pada proses ini banyak hal yang harus diperhatikan antara lain pH medium, suhu, dan waktu inkubasi, kelembapan.
- f) Kultivasi, pada tahapan ini memerlukan bantuan mekanis untuk memisahkan substrat padat dari medium. Penggunaan kertas saring dan sentrifugasi dapat dipakai untuk memisahkan substrat.

2. Keuntungan Fermentasi Keadaan Padat (*Solid State Fermentation*)

Keuntungan dari SSF, antara lain biaya lebih murah, media produksi dapat menggunakan residu agroindustri, menggunakan sedikit air, limbah yang dihasilkan sedikit, proses sederhana, menggunakan wadah dalam jumlah kecil tetapi menghasilkan konsentrasi produk tinggi, dan proses aerasi lebih mudah.

3. Aplikasi Fermentasi Keadaan Padat (*Solid State Fermentation*)

Menurut Holker *et al.* (2004) dan Pandey (2000) dapat menguraikan aplikasi dari SSF secara tradisional, antara lain :

- a) Tempe, dimana tempe melibatkan kultivasi dari khamir *Rhizopus oligosporus* pada kedelai yang direbus, kemudian digoreng dan dimakan sebagai pengganti daging. Makanan fermentasi ini sangat terkenal di Indonesia.
- b) Tahapan *koji* dalam pembuatan kecap yang melibatkan kultivasi dari khamir *Aspergillus oryzae* dalam kedelai rebus. Proses SSF miselium khamir menutupi kedelai dan menginjeksikan ke dalam campuran enzim. Kedelai hasil fermentasi kemudian dipindahkan ke dalam air asin selama beberapa bulan sehingga akan menghasilkan saus yang berwarna coklat tua.
- c) “*ang-kak*” atau anggur merah melibatkan kultivasi dari khamir *Monascus purpureus* pada beras yang direbus. Produksi khamir menghasilkan pigmen berwarna merah gelap, pada tahap akhir fermentasi beras hasil fermentasi dikeringkan dan dihaluskan menjadi bubuk yang akan digunakan sebagai pewarna saat memasak.

Selain aplikasi di atas, kebanyakan dari aplikasi tersebut menghasilkan produk-produk seperti enzim, pigmen, senyawa aromatik, senyawa kimia, antibiotik, dan agen pengontrol biologis serta banyak aplikasi penggunaan mikroorganisme dalam SSF sebagai bagian dari proses perantara, yaitu pewarnaan zat warna, *biobleaching*, *biopulping*, dan *bioremediation*.

H. Metode Somogyi - Nelson

Metode Somogyi-Nelson adalah metode fotometri yang dapat mereduksi gula dengan reagen tembaga dan reagen arsenomolibdat. *Assay* reduksi gula bergantung pada reduksi oksidan anorganik seperti ion tembaga (Cu^{2+}) dengan penerima elektron yang berasal gugus aldehyd ujung rantai kitosan. Kisaran deteksi berkisar kurang dari 1 μg per sampel hingga 2500 μg per sampel. DNS dan metode Nelson-Somogyi adalah dua *assay* yang umum digunakan untuk mengukur reduksi gula aktivitas kitinase. Kedua metode ini digunakan karena tinggi kisaran deteksi dan sedikit gangguan dari kitinase (Ghose, 1987; Zhang *et al.*, 2006).

Dalam penelitian ini akan digunakan metode Somogyi–Nelson dengan modifikasi menggunakan *microplate reader*. Keuntungan utama modifikasi *assay* ini adalah sampel dan reagen yang lebih sedikit dan menghilangkan proses pemanasan.