PENETAPAN WAKTU INKUBASI OPTIMUM ENZIM KITINASE DAN DEASETILASE DARI ISOLAT *Actinomycetes* ANL-4 DALAM DEGRADASI KULIT UDANG TAK BERPROTEIN MENJADI GLUKOSAMIN

(Skripsi)

Oleh

ERLITA AISYAH

FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PNGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS LAMPUNG
BANDAR LAMPUNG
2016

ABSTRAK

PENETAPAN WAKTU INKUBASI OPTIMUM ENZIM KITINASE DAN DEASETILASE DARI ISOLAT *Actinomycetes* ANL-4 DALAM DEGRADASI KULIT UDANG TAK BERPROTEIN MENJADI GLUKOSAMIN

OLEH

ERLITA AISYAH

Kitinase merupakan enzim yang dapat mendegradasi kitin menjadi komponennya (oligomer, dimer, dan monomer). *Actinomycetes* ANL-4 merupakan organisme peralihan antara bakteri dan jamur. *Actinomycetes* ANL-4 adalah anggota bakteri, namun morfologinya mirip dengan fungi karena strukturnya yang berupa filamen lembut yang disebut hifa atau miselia. Salah satu bakteri kitinolitik yang dapat menghasilkan kitinase terbesar yaitu *Actinomycetes* ANL-4. Dalam penelitian ini, *Actinomycetes* ANL-4 digunakan untuk mendegradasi kulit udang tak berprotein menjadi glukosamin dengan cara fermentasi selama 2 hari, dan hasil degradasi diamati setiap 8 jam. Glukosamin yang diperoleh direaksikan dengan reagen ninhidrin, pengamatan glukosamin dilakukan dengan cara diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Dari pengukuran tersebut, diperoleh rendemen tertinggi yaitu sebesar 0,19646 g/L dengan kadar 19,64%, serta waktu inkubasi optimum pada jam 24. Hasil karakterisasi dengan *scanning* menunjukan sampel hasil fermentasi benar mengandung glukosamin.

Kata Kunci : Glukosamin, Kulit Udang Tak Berprotein, Reagen Ninhidrin, Spektrofotometer UV-Vis.

ABSTRACT

DETERMINING THE OPTIMUM TIME OF INCUBATON OF CHITINASE AND DEACETHILASE ENZYME FROM *Actinomycetes* ANL-4 ISOLATE IN DEGRADATION SHRIMP SHELL WITHOUT PROTEIN BECOME GLUCOSAMINE

BY

ERLITA AISYAH

Chitinase enzyme can be degradation chitin become a component (olygomer, dimer, and monomer). *Actinomycetes* ANL-4 is change between bacteria and fungi organism. *Actinomycetes* ANL-4 is bacteria part, however that morphology resemble with fungi because that structure is soft filament form called hifa or micellia. One of chitinolitic bacteria that can be produce greatest chitinase enzyme is *Actinomycetes* ANL-4. In this study, *Actinomycetes* ANL-4 useful for degradation shrimp shell without protein become glucosamine by fermentation during 2 day, and the yield of degradation monitored every 8 hour. Product mixed with ninhydrin reagent, glucosamine monitoring with absorbance measure use spectrophotometer UV-Vis. From measuring, the yield of fermentation 0,19646 g/L with quality 19,64% as well as the optimum time of incubation on 24 hour. The product of characterization with scanning indicates product is valid contains glucosamine.

Keywords : glucosamine, shrimp shell without protein, ninhydrin reagent, spectrophotometer UV-Vis.

PENETAPAN WAKTU INKUBASI OPTIMUM ENZIM KITINASE DAN DEASETILASE DARI ISOLAT *Actinomycetes* ANL-4 DALAM DEGRADASI KULIT UDANG TAK BERPROTEIN MENJADI GLUKOSAMIN

Oleh

Erlita Aisyah

Skripsi

Sebagai salah satu syarat untuk untuk mencapai gelar

SARJANA SAINS

Pada

Jurusan Kimia
Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS LAMPUNG
BANDAR LAMPUNG
2016

Judul Skripsi : **PENETAPAN WAKTU INKUBASI OPTIMUM ENZIM KITINASE DAN DEASETILASE DARI ISOLAT *Actinomycetes* ANL-4 DALAM DEGRADASI KULIT UDANG TAK BERPROTEIN MENJADI GLUKOSAMIN**

Nama Mahasiswa : *Erlita Aisyah*

Nomor Pokok Mahasiswa : 1217011020

Jurusan : Kimia

Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

MENYETUJUI

1. Komisi Pembimbing

Dra. Aspita Laila, M.S.
NIP 19600909 198811 2 001

Prof. Dr. John Hendri, M.S.
NIP 19581021 198703 1 001

2. Ketua Jurusan Kimia

Dr. Eng. Suripto Dwi Yuwono, M.T.
NIP 19740705 200003 1 001

MENGESAHKAN

1. Tim Penguji

Ketua : **Dra. Aspita Laila, M.S.** .....

Sekretaris : **Prof. Dr. John Hendri, M.S.** .....

Penguji
Bukan Pembimbing : **Andi Setiawan, Ph.D.** .....

2. Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

Prof. Warsito, S.Si., DEA., Ph.D.
NIP 19710212 199512 1 001

Tanggal Lulus Ujian Skripsi : **16 September 2016**

RIWAYAT HIDUP

Penulis dilahirkan di Jakarta 03 September 1993, sebagai anak ketiga dari lima bersaudara dari pasangan Bapak Erpendi dan Ibu Rismayanti. Penulis menyelesaikan Taman Kanak-Kanak di TK Eka Dharma pada tahun 1999, Sekolah Dasar di SDN 1 Sari Rejo pada tahun 2005, Sekolah Menengah Pertama di SMP Swadhipa 1 Natar pada tahun 2008, dan Sekolah Menengah Atas di SMA Negeri 1 Natar pada tahun 2011. Penulis terdaftar sebagai mahasiswa Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam (FMIPA) Universitas Lampung pada tahun 2012 melalui jalur Penerimaan Mahasiswa Perluasan Akses Pendidikan (PMPAP) di Universitas Lampung.

Selama masa perkuliahan penulis juga aktif dalam organisasi seperti Kader Muda Himaki (KAMI), sebagai pengurus di Himpunan Mahasiswa Kimia (HIMAKI) dalam Biro Kesekretariatan, sebagai Kepala Biro Kesekretariatan Himpunan Mahasiswa Kimia (HIMAKI) FMIPA Universitas Lampung periode 2014/2015. Penulis juga pernah menjadi asisten praktikum Biokimia pada tahun 2016.

Penulis melakukan Praktek Kerja Lapangan dan Penelitian di Laboratorium Biokimia Jurusan Kimia FMIPA Universitas Lampung.

Bismillahirrohmaanirrohiim

Dengan mengucap Alhamdulillahirobbil'alamin kepada Allah SWT

yang Maha Segalanya.

Kupersembahkan sebuah karya kecil ini sebagai wujud tanggung

jawabku terhadap dua insan yang luar biasa yang sangat berjasa

dalam hidupku, Bapak Erpendi dan Ibu Rismayanti yang tak pernah mengeluh dan

selalu bersabar dalam membesar dan mendidikku. Ayah, Ibu, lewat

karya kecil ini adinda ingin berterimakasih atas semua keikhlasan,

pengorbanan, kerja keras, dan kasih sayang yang sampai kapanpun takkan pernah

bisa tergantikan.

Ibu Dra. Aspita Laila, M.S., Bapak Prof. Dr. John Hendri, M.S., dan

Bapak Andi Setiawan, Ph.D. atas bimbingannya selama

saya mengerjakan penelitian dan tugas akhir, serta Bapak Ibu Dosen

Jurusan Kimia FMIPA Universitas Lampung atas semua ilmu yang

telah diberikan selama menepuh pendidikan dikampus.

Erliani Pratiwi, Erika Nur Afiah, M. Raynaldi Effendi yang selalu memeberikan

dukungan, semangatnya memberikan saran, motivasi, dan semangatnya

disaat adinda pada posisi jenuh.

Semua Bapak dan Ibu Guru yang telah memberikan ilmu, bimbingan

dan selalu mengingatkan tentang pentingnya ilmu dalam kehidupan

ini.

Semua teman-temanku yang telah mengajarkan arti kebersamaan,

kekeluargaan, cinta dan kebahagiaan.

Serta Almamaterku Tercinta…

“*You spend too much time worrying what other people think of you. A lion does not consider himself with the opinion of sheeps*”. (Tywin of House Lannister)

Yang sempurna itu Pencipta,

Yang penuh dengan cacat cela itu

Kita; manusia.

Aku dan kamu.

Namun,

Harapan itu senantiasa ada,

Selagi mana masih berpeluang, membuka mata dan melihat dunia.

(Anomin)

Barangkali sesuatu ditunda karena hendak disempurnakan;

Dibatalkan karena hendak diganti yang utama;

Ditolak karena dinanti yang lebih baik. (Salim Al Fillah)

“Rasanya dengan mengetahui bahwa Allah sangat mengetahui segala sesuatu yang terbaik itu sudah cukup membuatku tidak perlu khawatir pada banyak hal”.

(Kurniawan Gunadi)

SANWACANA

Alhamdulillahirobbil'alamin, segala puji dan syukur bagi Allah SWT tuhan semesta alam atas segala nikmat dan karunianya, serta rahmatnya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi dengan judul "**Penetapan Waktu Inkubasi Optimum Enzim Kitinase Dan Deasetilase Dari Isolat *Actinomycetes* ANL-4 Dalam Degradasi Kulit Udang Tak Berprotein Menjadi Glukosamin**" sebagai syarat untuk mencapai gelar Sarjana Sains pada Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lampung.

Penulis menyadari bahwa terselesaikannya skripsi ini tidak terlepas dari bantuan berbagai pihak. Oleh karena itu, penulis mengucapkan terimakasih kepada:

1. Bapak Erpendi dan Ibu Rismayanti, dua insan yang paling aku sayang dan cintai terima kasih atas segala cinta, kasih sayang, waktu, kesabaran, keikhlasan, dan ketulusan doa yang selalu beliau panjatkan.
2. Ibu Dra. Aspita Laila, M.S., selaku pembimbing akademik sekaligus pembimbing I atas segala bimbingan, motivasi, kesabaran, keikhlasan, dan ilmunya sehingga penelitian dan skripsi ini dapat terselesaikan dengan baik. Atas semua yang telah beliau berikan semoga Allah SWT memberikan keberkahan dan kemudahan kepada beliau.

3. Bapak Prof. Dr. John Hendri, M.S. selaku pembimbing II yang telah memberikan bimbingan, arahan, keikhlasan, kesabaran, waktu, dan ilmu. Semoga Allah SWT selalu memberikan keberkahan dan kemudahan kepada beliau.
4. Bapak Andi Setiawan, Ph.D. selaku pembahas atas segala bimbingan, motivasi, kesabaran, keikhlasan, dan ilmunya sehingga penelitian dan skripsi ini dapat terselesaikan dengan baik. Atas semua yang telah beliau berikan semoga Allah SWT memberikan keberkahan dan kemudahan kepada beliau.
5. Bapak Dr. Eng. Suripto Dwi Yuwono, M.T. selaku Ketua Jurusan Kimia FMIPA Unila atas bimbingan, arahan, dan semua ilmu yang telah diberikan. Semoga Allah SWT selalu memberikan pertolongan dan membalas semua kebaikan.
6. Bapak Prof. Dr. Warsito, DEA. selaku Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lampung.
7. Bapak dan Ibu Dosen Jurusan Kimia FMIPA Universitas Lampung atas seluruh ilmu yang telah diberikan kepada penulis selama mengikuti perkuliahan dikampus, semoga ilmu yang diberikan dapat bermanfaat.
8. Erliani Pratiwi, Erika Nur Afiah, dan M. Raynaldi Effendi atas perhatian, keikhlasan dalam mengarahkan dan menemani di saat-saat yang paling berat, segala motivasinya, semoga Allah memberikan kemudahan dan pertolongan disetiap jalan kalian semua Amiiin…
9. Seluruh staf administrasi Jurusan Kimia FMIPA Universitas Lampung.
10. Guru-guruku yang telah memberikan ilmu, semangat, dan motivasinya. Semoga Allah bisa membalas semua kebaikan kalian semua.

11. *My best partner* Maria Ulfa, S.Si., dan Ruwaidah Muliana, S.Si., atas kerjasama, bantuan, motivasi, dan kebersamaannya.
12. Keluarga Kimia 2012 : Adi Setiawan S.Si., Aditian Sulung S, Agus Ardiansyah, Ana Maria K, Apri Welda, Arif Nurhidayat, Arya Rifansyah S.Si., Atma Istanami, Ayu Imani, Deborah Jovita, Derry Vardella, Edi Suryadi S.Si., Eka Hurwaningsih, Febita Glysenda, Feby Rinaldo Pratama K, Ferdinand Haryanto S, Fifi Adriyanthi, Handri Sanjaya, Hiqi Alim, Indah Wahyu P, Indri Yani Saney, Intan Mailani S.Si., Jean Pitaloka S.Si., Jenny Jesica S, Meta Fosfi B, Muhamad Rizal R, Putri Ramadhona, Radius Uly Artha, Riandra Pratama Usman S.Si., Rizal Rio S, Rizki Putriyana, Ruliana Juni Anita, Siti Nur Halimah S.Si., Susy Isnaini Hasanah S.Si, Syathira Assegaf, Tazkiya Nurul S.Si., Tiand Reno, Tiara Dewi Astuti, Tiurma Debora S. S.Si., Wiwin Esty Sawita, Yepi Triapriani S.Si., Yunsi'U Nasy'Ah S.Si., dan Zubaidi. Atas kebersamaan pertamanan, persahabatan, dan kekeluargaannya. Semoga tali silaturahmi ini tetap ada sampai kapanpun.
13. Melli Novita Windiyani, S.Si, Rahma Nissa Aini, S.Si, dan Febriyanti, S. ST., tiga perempuan *forceful, cute, nice* haha terima kasih atas persahabatan yang sudah kita jalani dari SMA sampai sekarang, kasih sayang, semangat dan arahan yang selalu diberikan, *I Love You All*..
14. Dwi Anggraini, S.Si., Murni Fitria, S.Si., Dewi Aniatul Fatimah, S.Si., dan Ulfatun Nurun wanita-wanita yang selalu ada buat aku, makasih yaa buat semuanya.. semoga apa yang udah kita lewatin gak akan cepet berlalu dan terus terjalin sampai kapanpun… amiin..

15. Keluarga besar pimpinan Himpunan Mahasiswa Kimia (HIMAKI) periode 2014/2015 Khairul Anwar ketum yang bijaksana, Ismi Khomsiah S.Si., sekum yang sabar, Ajeng Wulandari S.Si., sekbirku yang sangat luar biasa, Elsa Zulha bendum yang baik, Rifki Husnul Khuluk S.Si., kabid yang lucu, Siti Aisah S.Si., mbak yang selalu memberikan kebahagian tersendiri, Sukamto, S.Si., dan Fenti Visiamah, S.Si., tempat aku curhat, Tri Marital yang sudah seperti kakak, Suwarda Dua Imatu Dela,S.Si., yang baik hati, Sofian Sumilat Rizki, S.Si., orang yang selalu aku repotin hehe.., Nila Amalin N tempatku untuk bergosip haha.., Diani Iska M dan Ayu Setianingrum terima kasih atas rasa kekeluargaan yang telah diberikan semoga hubungan erat yang telah dibangun akan terus awet sampai kapanpun amiin…
16. Penghuni laboratorium biokimia, mbak putri, mbak april, mbak ana, mbak uswa, mbak windi, dan koko julianser terima kasih buat semua pengalaman dan ilmu yang sudah diberikan, semoga menjadi pemberat amal kita di akhirat nanti amiin..
17. Keluarga Besar Bapak Tarmuzi dan teman-teman KKN Deka, Darma, Nila, Martha, Erika, dan Nurul atas kebersamaan dan kerjasamanya selama disana.
18. Teman-teman SMA dan SMP atas semua motivasi dan dukungannya.
19. Keluarga besar Kimia 2011, 2012, 2013, 2014, 2015, dan 2016 atas kebersamaan dan persaudaraannya selama ini.
20. Serta semua pihak yang tidak dapat penulis sebutkan satu persatu yang secara tulus dan ikhlas memberikan bantuan moril dan materil kepada penulis.

Bandar Lampung, 16 September 2016

Penulis

Erlita Aisyah

DAFTAR ISI

DAFTAR ISI ..... **iv**

DAFTAR TABEL ..... **vi**

DAFTAR GAMBAR ..... **vii**

I. PENDAHULUAN **1**

A. Latar Belakang 1
B. Tujuan 4
C. Manfaat Penelitian 4

II. TINJAUAN PUSTAKA **5**

A. Udang 5
B. Ekstraksi Kulit Udang 6
1. Deproteinasi 6
2. Demineralisasi 7
C. *Actinomycetes* 8
D. Glukosamin 11
E. Kitinase 13
F. Kitindeasetilase 16
G. Reagen Ninhidrin 17
I. Spektrofotometri UV-Vis 18

III. METODOLOGI PENELITIAN **21**

A. Waktu Dan Tempat 21
B. Alat Dan Bahan 21
C. Prosedur Penelitian 22
1. Persiapan Sampel 22
2. Deproteinasi 22
3. Pembuatan Media ISP-2 22
4. Pertumbuhan Actinomycetes ANL-4 23
5. Pembuatan Larutan Mineral Garam Actinomycetes ANL-4 23

6. Persiapan Inokulum Actinomycetes ANL-4 23
7. Fermentasi Fase Cair Sistem Tertututp (Batch) 23
D. Karakterisasi Glukosamin 24
1. Analisis Glukosamin hasil fermentasi dengan Spektofotometri UV-Vis 24

IV. HASIL DAN PEMBAHASAN 25

A. Persiapan Sampel 25
B. Deproteinasi 25
C. Prosedur Penelitian 26
1. Pembuatan Media ISP-2 26
2. Pertumbuhan Actinomycetes ANL-4 27
3. Pembuatan Larutan Mineral Garam Actinomycetes ANL-4 28
4. Persiapan Inokulum Actinomycetes ANL-4 28
5. Fermentasi Fase Cair Sistem Tertututp (Batch) 29
D. Karakterisasi Glukosamin 34
1. Analisis Glukosamin hasil fermentasi dengan Spektofotometri UV-Vis 34

V. KESIMPULAN DAN SARAN 40
A. Kesimpulan 40
B. Saran 40

DAFTAR PUSTAKA 41

LAMPIRAN

DAFTAR TABEL

Tabel **Halaman**

1. Indeks kitinolitik *Actinomycetes* yang diisolasi dari Lumpur Hutan Bakau asal Pantai Ringgung Perairan Teluk Lampung 11

DAFTAR GAMBAR

Gambar **Halaman**

1. Struktur Glukosamin 12

2. Reaksi Pemutusan Ikatan β-1,4 Pada Bagian Internal Mikrofibril 14

3. ReaksiPembebasan Unit-Unit Diasetilkitobiose Oleh Enzim Eksokitinase 14

4. Reaksi Pemutusan Diasetilkitobiose, Kitotriose, dan Kitotetraose Dan Menghasilkan Monomer-monomer Glukosamin 15

5. Reaksi antara ninhidrin dengan glukosamin 18

6. Cangkang kulit hasil dari penggilingan..... 25

7. Reaksi antara protein dengan NaOH 26

8. Larutan media ISP-2 27

9. Hasil peremajaan setelah lebih dari 7 hari..... 28

10. Diagram batang rendemen hasil fermentasi…….. 30

11. Reaksi pemutusan ikatan glikosidik secara *single-displacement inverting* 32

12. Kurva persentase hasil fermentasi terhadap lamanya waktu inkubasi substrat dengan *Actinomycetes ANL-4* 33

13. Hasil positif yang ditunjukkan pada glukosamin hasil fermentasi setelah ditambahkan reagen ninhidrin dan dipanaskan..... 35

14. Grafik hasil *scanning* sampel hasil fermentasi 36

15. Grafik hasil *scanning* glukosamin standar 36

16. Kurva kalibrasi larutan glukosamin standar..... 37

DAFTAR TABEL

Tabel **Halaman**

1. Indeks kitinolitik *Actinomycetes* yang diisolasi dari Lumpur Hutan Bakau asal Pantai Ringgung Perairan Teluk Lampung 11

I. PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

Kitinase merupakan enzim yang dapat mendegradasi kitin menjadi komponennya (oligomer, dimer, dan monomer). Salah satu bakteri kitinolitik yang dapat menghasilkan kitinase terbesar yaitu *Actinomycetes* ANL-4. Hal ini dibuktikan dengan penelitian yang dilakukan oleh Anggraini (2010) yaitu menguji isolat *Actinomycetes* ANL-4 yang memiliki indeks kitinolitik terbesar dari beberapa isolat *Actinomycetes* yang lain dan hasilnya ialah *Actinomycetes* ANL-4 yang memiliki indeks kitinolitik terbesar yaitu 5,0 yang ditentukan berdasarkan rasio diameter zona bening yang dihasilkan terhadap diameter koloni. *Actinomycetes* sendiri merupakan organisme bersel satu yang termasuk dalam peralihan antara bakteri dan jamur. Karena tumbuh secara perlahan membentuk cabang-cabang seperti benang sehingga dianggap sebagai jamur dan memiliki sifat gram positif yang mengelompokkannya sebagai bakteri.

Saat ini banyak penelitian yang menggunakan bakteri kitinolitik (*Actinomycetes*) untuk mendegradasi kitin/kitosan menjadi glukosamin.

Glukosamin secara luas telah diaplikasikan dalam berbagai bidang diantaranya industri, kesehatan, pertanian, dan farmasi. Salah satunya yaitu dibidang farmasi, dimana glukosamin digunakan untuk mencegah radang sendi pada manula. Hal ini dikarenakan kemampuan sintesis glukosamin dalam tubuh akan menurun dengan bertambahnya usia.

Glukosamin (*2-amino-2-deoxyglucose, Chitosamine*) adalah gula amino yang diperoleh dari proses hidrolisis kitin (Shanthos *et al.*,2007). Glukosamin dapat diperoleh dengan bantuan enzim melalui dua jalur hidrolisis. Jalur degradasi pertama, yaitu kitin dihidrolisis oleh enzim endokinase menghasilkan oligomer kitin. Kemudian oligomer kitin dipecah oleh enzim kitobiosidase menghasilkan dimer N-asetilglukosamin. Selanjutnya dimer ini akan dipecah menjadi monomer N-asetilglukosamin oleh enzim N-asetilglukosaminidase (kitobiase). Selanjutnya monomer ini akan mengalami deasetilasi menjadi glukosamin dengan bantuan enzim N-asetilglukosamin-deasetilase. Jalur degradasi kedua, yaitu deasetilasi kitin menjadi kitosan oleh enzim kitin-deasetilasi dan kitosan terdegradasi menjadi oligomer kitosan oleh enzim kitosanase. Kemudian oligomer kitosan akan terdegradasi oleh enzim glukosaminidase menghasilkan glukosamin (Dinter *et al*., 2000).

Metode untuk mengidentifikasi glukosamin secara kuantitatif telah banyak mengalami perkembangan. Saat ini penggunaan reagen ninhidrin merupakan metode baru yang dapat mengidentifikasi glukosamin secara kuntitatif. Prinsip dari metode ini adalah reaksi *Ruhemann* antara glukosamin dengan ninhidrin

yang diukur secara kolorimetri dan spektroskopi, dimana akan terjadi perubahan warna ketika glukosamin dicampur dengan glukosamin dan ditambah dengan buffer posfat pH 6 kemudian dipanaskan maka akan menghasilkan warna ungu, yang selanjutnya akan di ukur spektrofotometer UV-Vis.

Utami Heriyani (2014) berhasil memperoleh glukosamin dari kitosan menggunakan *Actinomycetes* ANL-4 dengan hasil persentase rendemen sebesar 71,7% pada waktu inkubasi 15 hari. Kemudian Robiah (2015) dari kitosan, mendapatkan glukosamin dengan persentase rendemen sebesar 69 % dan kemurnian sebesar 99,7% pada waktu inkubasi 4 jam dengan *sampling* setiap 1 jam. Pada tahun 2015 penelitian ini dikembangkan kembali, dengan menggantikan bahan dasarnya menjadi kulit udang terdeproteinasi dan diperoleh glukosamin dengan persentase rendemen sebesar 60%. Hal tersebut menandakan bahwa glukosamin juga dapat diperoleh dari kulit udang terdeproteinasi. Untuk itu penelitian ini bertujuan untuk melihat berapa lama waktu yang dibutuhkan enzim kitinase dan deasetilase tersebut mulai bekerja mendegradasi ekstrak kasar kulit udang menjadi glukosamin serta lama waktu yang dibutuhkan untuk menghasilkan jumlah optimum glukosamin.

Dalam pelaksanaan penelitian ini dilakukan dengan cara fermentasi dengan bantuan bakteri *Actinomycetes* ANL-4 yang dilakukan selama 2 hari dengan *sampling* setiap 8 jam perharinya. Glukosamin yang diperoleh akan dikarakterisasi dengan bantuan alat spektofotometer UV-Vis.

B. Tujuan

Adapun tujuan dilakukannya penelitian ini adalah:

1. Menentukan waktu optimum yang dibutuhkan enzim kitinase dalam bekerja mendegradasi ekstrak kasar kulit udang menjadi glukosamin
2. Mengkarakterisasi glukosamin yang diperoleh dengan Spektrofotometer UV-Vis.

C. Manfaat Penelitian

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi tentang:

1. Potensi *Actinomycetes* ANL-4 dalam menghasilkan enzim kitinase
2. Mengetahui potensi glukosamin hasil degradasi khususnya, dalam bidang farmasi
3. Memberikan informasi mengenai pemanfaatan limbah kulit udang dalam pembuatan glukosamin sehingga meningkatkan nilai tambah.

II. TINJAUAN PUSTAKA

A. Udang

Udang merupakan jenis ikan konsumsi air payau, memiliki ruas 13 (5 ruas kepala dan 8 ruas dada) dan seluruh tubuhnya ditutupi oleh kerangka luar yang disebut eksosketelon. Udang yang terdapat di pasaran umumnya terdiri dari udang laut. Hanya sebagian kecil saja yang terdiri dari udang air tawar, terutama di daerah sekitar sungai besar dan rawa dekat pantai. Udang air tawar umumnya termasuk dalam keluarga Palaemonidae, sehingga sering disebut sebagai kelompok udang palaemonid. Udang laut, terutama dari keluarga Penaeidae, oleh para ahli biasa disebut udang penaeid.

Berikut klasifikasi udang (Murray *et al*., 2003):

Phylum	: *Arthropoda*
Classis	: *Crustacea*
Sub Classis	: *Malacrostaca*
Ordo	: *Decapoda*
Sub Ordo	: *Natantia*
Famili	: *Palaemonidae, Penaeidae*
Super-Famili	: *Penaeididae*
Genus	: *Penaeus*

Kulit udang mengandung senyawa seperti protein (25-40 %), kalsium karbonat (45-50%), dan kitin (15-20%). Namun besarnya kandungan senyawa ini bergantung pada jenis udangnya (Foucher *et al*., 2009). Ekstraksi kitin dari kulit udang dapat dilakukan melalui dua tahap yaitu penyisihan protein (deproteinasi) dan penyisihan kalsium karbonat (demineralisasi) (Mahmoud *et al*., 2007). Ekstraksi kitin tersebut dapat dilakukan secara kimia maupun biologi (Beaney *et al*., 2005).

B. Ekstraksi kulit udang

1. Deproteinasi

Penghilangan kadar protein dalam kulit udang dapat dilakukan dengan cara fisik dan kimia. Penghilangan protein secara fisik dapat dilakukan seperti pengecilan ukuran dan pencucian dengan air. Penghilangan protein secara kimia yaitu dengan pelarutan dalam larutan basa kuat atau dengan perlakuan biologis (Synowiecki *and* Al-Khateeb, 2003). Namun, deproteinasi biasanya menggunakan basa kuat seperti NaOH. Hal ini dikarenakan lebih mudah dan efektif. NaOH mampu memperbesar volume partikel bahan (substrat), sehingga ikatan antarkomponen menjadi renggang dan juga mampu menghidrolisis gugus asetil pada kitin sehingga kitin akan mengalami deasetilasi dan berubah menjadi kitosan yang menyebabkan kadar kitin berkurang. NaOH memutus ikatan antara karbon pada gugus asetil dengan nitrogen pada kitin menjadi kitosan yang mengandung gugus amina.

Dengan menggunakan basa konsentrasi tinggi maka pemutusan gugus asetil dengan gugus nitrogen akan terjadi karena gugus-gugus ini berada dalam unit sel dengan struktur kristalin. Sehingga semakin tinggi konsentrasi NaOH maka gugus asetil akan yang terlepas semakin banyak dengan demikian derajat deasetilasi kitosan semakin tinggi (Endang M., 2005). Namun, lebih dianjurkan untuk menggunakan basa dengan konsentrasi di bawah 40% karena jika menggunakan basa dengan konsentrasi di atas 40% kulit udang akan mengalami deasetilasi sebagian (Hendri dkk, 2007).

2. Demineralisasi

Dalam kulit udang mengandung mineral 30-35% (berat kering), dimana komposisi utamanya adalah kalsium karbonat. Komponen mineral ini dapat dihilangkan dengan penambahan asam seperti asam klorida, asam sulfat, atau asam laktat (Synowiecki *and* Al-Khateeb, 2003). Optimumnya demineralisasi dapat diperoleh dengan ekstraksi menggunakan HCl 1,0 M yang diinkubasi pada suhu 75°C selama 1 jam (Bahariah, 2005). Demineralisasi sebaiknya dilakukan setelah proses ekstraksi protein. Hal ini karena penambahan larutan alkali pada proses sebelumnya akan memberikan efek penstabil pada kulit udang dan memaksimalkan produk serta kualitas protein yang dihasilkan. Jika proses demineralisasi dilakukan sebelum proses deproteinasi maka akan mudah terkontaminasi protein pada cairan ekstrak mineral.

C. *Actinomycetes*

Klasifikasi *Actinomycetes* sp. menurut Rao (1994):

Kelas : *Schizomycetes*

Ordo : *Actinomycetales*

Famili : *Actinomycetaceae*

Genus : *Actinomycetes*

Berdasarkan morfologinya *Actinomycetes* diklasifikasikan sebagai berikut:

1. *Nocardioforms*, terdiri dari 11 genus dengan ciri-ciri filament 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 di bentuk 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, mielium *aerial*, dan dapat memproduksi antibiotik. Contoh: *Strepomyces*.
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 endospore. Contoh: *Themoactinomyces*.

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*.

Sifat-sifat umum yang dimiliki *Actinomycetes* terlihat seperti perpaduan antara jamur dan bakteri. Dari luar terlihat seperti jamur (eukariotik), tetapi organisme ini juga memiliki semua kriteria untuk sel prokariotik, yaitu dinding selnya mengandung asam muramat, tidak mempunyai mitokondrion, mengandung riboson 70s, tidak mempunyai pembungkus nukleus, garis tengah selnya berkisar dari 0,5-2,0 µm, dan dapat dimatikan atau dihambat oleh banyak antibiotik bakteri (Abbas I.H., 2006 ; Mugianto Puji, 2012).

Dinding sel *Actinomycetes* terdiri dari polimer gula, asam amino, dan asam gula seperti dinding sel bakteri gram positif sedangkan dinding sel fungsi terdiri dari selulosa dan kitin. Seperti yang dikatakan *Actinomycetes* merupakan mikroorganisme peralihan antara jamur dan bakteri. Namun tetap saja ada ciri khas yang cukup membatasinya menjadi satu kelompok yang

jelas berbeda. Pada medium cair, pertumbuhan *Actinomycetes* ditandai dengan keruhnya medium dan terbentuk lapisan tipis dipermukaan medium.

Menurut Rao (1994), pada media 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 diatas permukaan medium. Umumnya, *Actinomycetes* tidak toleransi 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 25-30 ^{o}C. Namun, ada beberapa *Actinomycetes* termofilik yang dapat tumbuh pada temperatur sekitar 55-65 ^{o}C seperti *ThermoActinomycetes* dan *Streptomyces*.

Salah satu mikroorganisme kitinolitik yang dapat menghasilkan enzim kitinase adalah *Actinomycetes*. *Actinomycetes* dapat menghidrolisis kitin dan menghasilkan monomernya melalui reaksi enzimatis. Anggraini (2010) menguji isolat *Actinomycetes* yang memiliki indeks kitinolitik terbesar dari beberapa isolat *Actinomycetes* yang lain (Tabel 1) ialah *Actinomycetes* ANL-4, ini ditentukan berdasarkan rasio diameter zona bening yang dihasilkan terhadap diameter koloni. Berikut ini indeks kitinolitik isolat *Actinomycetes* yang memiliki aktivitas kitinolitik:

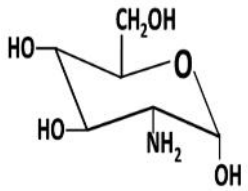
Tabel 1. Indeks kitinolitik *Actinomycetes* yang diisolasi dari Lumpur Hutan Bakau asal Pantai Ringgung Perairan Teluk Lampung.

Kode Isolat	Diameter Zona Bening (cm)	Diameter Koloni (cm)	Indeks Kinolitik
ANL-12	2.3	1.2	1.9
ANL-9	1.0	0.5	2.0
ANLd-2b-3	0.7	0.3	2.3
ANL-4	0.5	0.1	5.0

D. Glukosamin

Glukosamin (Gambar 1) atau (*2-Amino-2-Deoxyglucose, Chitosamin*) merupakan gula amino yang diperoleh dari proses hidrolisis kitin (Shantosh *et al.*, 2007). Salah satu senyawa gula amino yang banyak ditemukan pada tulang rawan dan memiliki peranan yang sangat penting untuk kesehatan dan kelenturan sendi adalah glukosamin (EFSA 2009). Glukosamin merupakan senyawa alami yang terdiri dari glukosa dan asam amino glutamin. Selain itu, glukosamin juga merupakan unsur pokok dari GAG pada tulang rawan kartilago dan cairan sinovial. Dalam tubuh glukosamin berfungsi untuk memproduksi cairan sinovial yang berperan sebagai pelumas pada tulang rawan, sehingga pergerakkan tulang menjadi lebih baik. Glukosamin dapat diperoleh dengan bantuan enzim melalui dua jalur hidrolisis. Jalur degradasi pertama, yaitu kitin dihidrolisis oleh enzim endokinase menghasilkan oligomer kitin. Kemudian oligomer kitin dipecah oleh enzim kitobiosidase menghasilkan dimer N-asetilglukosamin. Selanjutnya, dimer ini akan dipecah menjadi monomer N-asetilglukosamin oleh enzim N-

asetilglukosaminidase (kitobiase). Kemudian monomer ini akan mengalami deasetilasi menjadi glukosamin dengan bantuan enzim N-asetilglukosamin-deasetilase. Jalur degradasi kedua, yaitu deasetilasi kitin menjadi kitosan oleh enzim kitin-deasetilasi dan kitosan terdegradasi menjadi oligomer kitosan oleh enzim kitosanase. Kemudian oligomer kitosan akan terdegradasi oleh enzim glukosaminidase menghasilkan glukosamin (Dinter *et al*., 2000). Dalam sintesis biokimia glukosamin merupakan gula amino dan *precursor* penting dari proses glikosilasi protein dan lipid. Glukosamin merupakan monosakarida yang banyak ditemukan dalam rangka luar *Crustacea* (seperti rajungan, kepiting, udang, dan cumi-cumi), *Arthropoda*, dan cendawan sebagai komponen utama. Selain itu, juga terdapat pada invertebrata seperti *Molusca*, *Coelenterata*, dan *Nematoda* serta beberapa kelas serangga dan jamur. Golongan hewan dan jamur tersebut tersusun atas kitin, dimana kitin merupakan prekusor kitosan yang merupakan polimer dari glukosamin (D-glukosamin). Glukosamin dapat berfungsi sebagai pengemulsi, koagulasi, pengkhelat, dan penebal emulsi (Anonim, 2007).

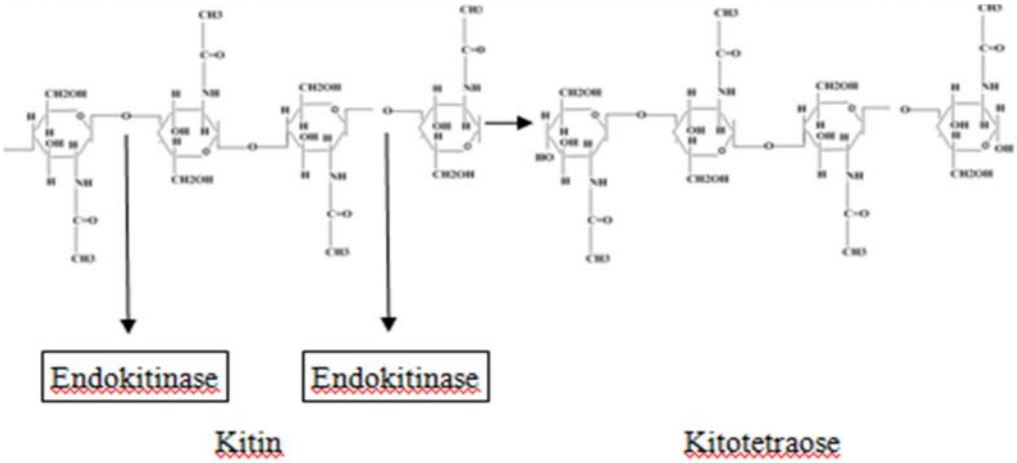


Gambar 1. Struktur D-glukosamin.

E. Kitinase

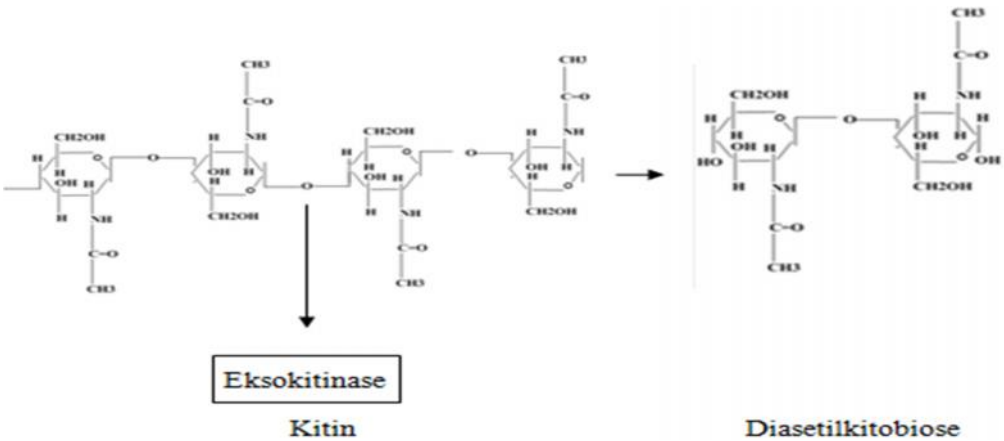
Kitinase merupakan enzim kompleks terdiri dari beberapa enzim yang dibedakan berdasarkan kerjanya yaitu endokitinase dan eksokitinase. Kitinase merupakan enzim yang mampu menghidrolisa polimer kitin menjadi kitin oligosakarida atau monomer N-asetilglukosamin. Enzim ini dihasilkan oleh bakteri, fungi, tanaman, dan hewan. Di alam, proses degradasi menggunakan kitinase yang berasal dari jamur, bakteri, *Actinomycetes*, tumbuhan (Matsumoto, 2006), vertebrata, moluska, *arthropoda*, alga, dan beberapa jenis cendawan (Funkhouser dan Aronson, 2007). Pada jamur, kitinase berperan dalam pengaturan fisiologis saat pembelahan sel, diferensiasi, dan aktivitas mikoparasit (Gohel *et al*., 2006). Bakteri memanfaatkan kitinase untuk asimilasi kitin sebagai sumber karbon dan nitrogen (Wu *et al*., 2001). Selain itu, kitinase juga digunakan hewan untuk mengkonversikan kitin menjadi monomer dan oligomernya, serta tumbuhan menggunakan kitinase untuk mendegradasi dinding sel fungi patogen (Gohel *et al*., 2006).

1. Endokitinase (E.C 3.2.1.14) yang merupakan enzim kitinase yang memotong secara acak ikatan β-1,4 bagian internal mikrofibril kitin. Produk akhir yang terbentuk bersifat mudah larut berupa oligomer pendek N-asetil- glukosamin (GIcNAc) yang mempunyai berat molekul rendah seperti kitotetraose. Produk yang akan dihasilkan oleh endokitinase bersifat mudah larut. Reaksi pemutusan ikatan β-1,4 pada bagian internal mikrofibril kitin dapat dilihat pada Gambar 2.



Gambar 2. Reaksi pemutusan ikatan β-1,4 pada bagian internal mikrofibril kitin (Suryanto *et al.*, 2005).

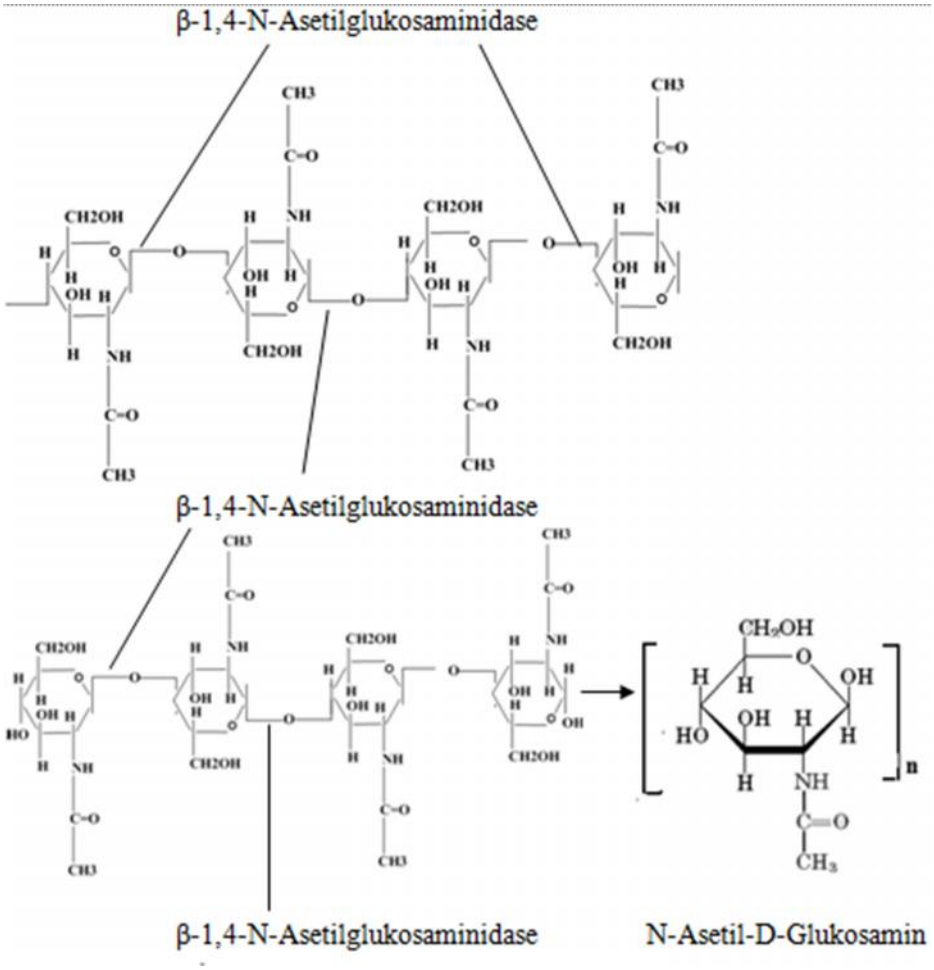
2. Eksokitinase (E.C 3.2.1.14) dinamakan juga kitobiodase atau kitin 1,4-β-kitobiodase, yaitu enzim yang mengatalisis secara aktif pembebasan unit-unit diasetilkitobiose tanpa ada unit-unit monosakarida atau polisakarida yang dibentuk. Pemotongan hanya terjadi pada ujung non reduksi mikrofibril kitin dan tidak secara acak. Reaksi pemutusan ikatan oleh Eksokitinase ditunjukkan pada Gambar 3.



Gambar 3. Reaksi pembebasan unit-unit diasetilkitobiose oleh enzim eksokitinase (Suryanto *et al.*, 2005).

3. β-1,4-N-asetilglukosaminidase (E.C 3.2.1.30) merupakan suatu kitinase yang bekerja pada pemutusan diasetilkitobiose, kitotriose, dan

kitotetraose dengan menghasilkan monomer-monomer GIcNAc. Reaksi yang terjadi dapat dilihat pada Gambar 4.



Gambar 4. Reaksi pemutusan diasetilkitobiose, kitotriose dan kitotetraose dan menghasilkan monomer-monomer GIcNAc (Suryanto *et al.*, 2005).

Mikroorganisme yang dapat menghasilkan kitinase adalah mikroorganisme dengan berat molekul berkisar 20.000-120.000 kDA. Pada bakteri *Actinomycetes* menghasilkan kitinase paling rendah yaitu 30.000 kDA. Bakteri yang paling banyak dilaporkan menghasilkan kitinase adalah genus *Clostridium* sp, *Enterobacter liquefaciens*, *Flavobacterium indolthecium*, *Klebsiella* sp, *Micrococcus colpogenes*, *Psedomonas* sp, *Serratia*

marcencens, Vibrio parahaemaluticus, V.alginoliticus, Bacillus, dan *pyrococus* (Gao *et al.,* 2003). Kitinase yang dihasilkan dari mikroorganisme ini berperan penting dalam *control fungi pathogen* tamanan secara mikroparasitisme (Priyatno *et al.,* 2000).

F. Kitindeasetilase

Perbedaan antara kitinase dan kitindeasetilase adalah kitinase mendegradasi kitin secara acak pada ikatan glikosidiknya, sedangkan kitindeasetilase mengkonversi kitin menjadi kitosan, dimana degradasi kitin ini dapat dilakukan secara termokimia dengan menggunakan alkali kuat pada suhu tinggi. Selain itu, proses ini juga menghasilkan limbah dan produk samping yang berpotensi sebagai toksik bagi lingkungan sehingga dianjurkan untuk menggunakan enzim kitindeasetilasi untuk degradasi kitin menjadi kitosan secara enzimatis. Hal ini karena relatif lebih baik dan mudah dikendalikan, terurai biologis (*biodegradable*), dan sesuai lingkungan (*biocompatible*), serta dapat membentuk oligomer atau poligomer (Tsigos *et al.,* 2000).

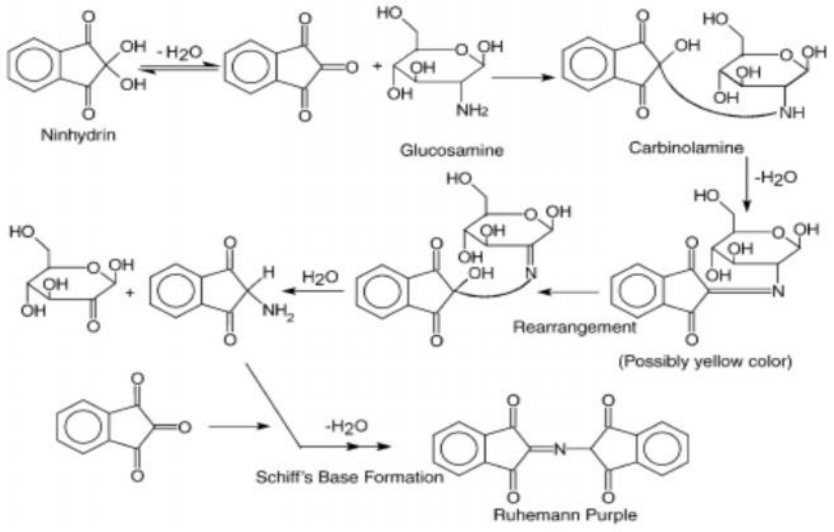
Menurut Copeland (2000), kultur di fermentasi dalam media selama 2 hari pada 55 ^{o}C. enzim di panen dengan cara di sentrifugasi pada 8000 rpm selama 15 menit pada 4 ^{o}C, guna memisahkan sel bakteri dan sisa media. Dalam keadaan diaduk bagian supernatan difraksinasikan hingga kejenuhan 80%. Kemudian campuran diendapkan selama 24 jam dengan suhu 4 ^{o}C, lalu di sentrifius dengan kecepatan 8000 rpm selama 15 menit. Selanjutnya, filtrat dilarutkan dengan 0.02 M *buffer* borat pH 8 dan disimpan pada suhu 4 ^{o}C.

untuk pengujian kadar protein enzim di uji dengan metode Lowry (Copeland, 2000), menggunakan standar BSA dan ditentukan aktivitas enzim.

G. Reagen Ninhidrin

Telah ditemukan metode terbaru untuk mengidentifikasi glukosamin. Dimana larutan standar ninhidrin ditambahkan ke dalam larutan sampel yang mengandung glukosamin, yang telah dihilangkan dari segala pengotornya, dan diamati perubahan warna yang terjadi kemudian di ukur secara spektrofotometri. Ninhidrin dapat di serap oleh UV pada panjang gelombang maksimum 260 nm, dalam keadaan kondisi optimum, dengan konsentrasi hasil reaksi ninhidrin-glukosamin yang korelatif.

Ninhidrin (*triketohydrindene hydrate*) merupakan bubuk kristal berwarna coklat yang larut dalam air dan alkohol. Ninhidrin akan kembali berwarna merah ketika dipanaskan pada suhu 100 ^{o}C dan dapat meleleh pada suhu 240-245 ^{o}C dan terdekomposisi. Ninhidrin berpotensi dapat beraksi dengan amina primer dan skunder, yang dihasilkan dari reaksi *Ruhemann* menghasilkan warna ungu pada sampel. Reaksi antara ninhidrin dan glukosamin dapat di lihat pada Gambar 5.



Gambar 5. Reaksi antara ninhidrin dengan glukosamin.

Ketika ninhidrin beraksi dengan α-asam amino yang telah ditunjukkan pada Gambar 5. Karbon dioksida (CO_2) dan aldehida yang berikatan dengan satu karbon pada asam amino akan mengalami dekarboksilasi, dan ketika larutan dipanaskan maka gugus amina akan beraksi dengan molekul ninhidrin lainnya, menghasilkan perubahan warna dari biru ke ungu, dengan panjang gelombang maksimum absorbansi pada 570 nm karena diukur berdasarkan reaksi kolorimeter maka menjadikan ninhidrin sebagai reagen penting untuk analisis kunatitatif asam amino. Faktor yang paling penting dalam analisis kuntitatif *Ruhemann purple* meliputi konsentrasi ninhidrin, waktu reaksi, pH, temperatur reaksi, lamanya kestabilan warna ungu, dan perbandingan glukosamin/ninhidrin (Yunqi Wu et al., 2005).

H. Spektrofotometri UV-Vis

Spektrofotometri merupakan pengukuran absorbansi energi cahaya suatu atom atau molekul pada panjang gelombang tertentu (Day *and* Underwood,

2002). Daerah serapan pada spektrofotometri dibedakan menjadi dua yaitu spektrofotometri UV-Vis dan spektrofotometri sinar tampak, dimana masing-masing rentang spektrum yaitu pada *range* 200-400 nm dan 400-750 nm (Rohman, 2007).

Penyerapan sinar tampak atau ultraviolet ini menghasilkan energi. Energi tersebut digunakan untuk eksitasi elektron dari tingkat energi dasar ke tingkat energi yang lebih tinggi. Ada beberapa hal yang harus diperhatikan dalam analisis menggunakan spektrofotometri ultraviolet dan cahaya tampak terutama untuk senyawa yang tidak berwarna, yaitu:

1. Pembentukan molekul yang dapat menyerap sinar UV-Vis

   Sampel diubah menjadi senyawa lain atau direakasikan dengan pereaksi tertentu sehingga dapat menyerap sinar UV-Vis.
2. Waktu kerja (*operating time*)

   Waktu kerja ditentukan dengan mengukur hubungan antara waktu pengukuran dengan absorbansi larutan.
3. Pemilihan panjang gelombang

   Panjang gelombang yang digunakan untuk analisis kuntitatif adalah panjang gelombang yang mempunyai absorbansi maksimal.
4. Pembuatan kurva baku

   Dilakukan dengan membuat seri larutan baku dalam berbagai konsentrasi kemudian kemudian absorbansi tiap konsentrasi diukur lalu dibuat kurva yang merupakan hubungan antara absorbansi dengan konsentrasi.
5. Pembacaan absorbansi sampel

Absorbansi yang terbaca pada spektrofotometer hendaknya antara 0,2 sampai 0,6 karena hal ini disebabkan pada kisaran nilai absorbansi tersebut kesalahan fotometrik yang terjadi adalah paling minimal.

III. METODOLOGI PERCOBAAN

A. Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Maret 2016 sampai Juni 2016 di Laboratorium Biokimia Jurusan Kimia, Universitas Lampung.

B. Alat dan Bahan

Peralatan yang digunakan dalam kerja praktik ini adalah peralatan gelas, bejana tahan asam dan basa, spatula, batang pengaduk, *heating magnetic strire*r, pH universal, kertas saring, mikropipet, *laminar air flow*, *incubator*, *centrifuge*, digital *waterbath*, *autoclave*, *frezeer*, neraca digital, *thermometer*, *mortar*, oven, *shaker incubator*, penangas air, dan spektrofotormeter UV-Vis.

Adapun bahan-bahan yang digunakan adalah glukosamin standar produk WAKO Jepang, ninhidrin, y*east extrac*, *malt exstrac*, dekstrosa, *agar for microbiology*, *cycloheximide*, *nalidixic acid*, air laut, $(NH_4)_2SO_4$, NaCI, K_2HPO_4, KH_2PO_4, $CaCI_2$, NaOH, $MgSO_4$, $NaH_2PO4.H_2O$, $Na_2HPO4.7H_2O$, , isolat *Actinomycetes* ANL-4, akuades, dan serbuk cangkang kulit udang.

C. Prosedur Penelitian

1. Persiapan Sampel

Cangkang kulit udang dibersihkan, dan dikeringkan, kemudian dihaluskan menggunakan blender kering hingga ukuran 80 *mesh*.

2. Deproteinasi

Sebanyak 100 gram sampel ditempatkan dalam bejana tahan asam dan basa yang dilengkapi pengaduk dan termometer, kemudian ditambahkan 1000 ml NaOH 20%. Setelah itu sampel diletakkan dalam penangas air dan didiamkan selama 1 jam pada suhu 90 ^{o}C (Pareira, 2004). Setelah itu dilakukan penyaringan sehingga diperoleh residu dan filtrat. Residu yang diperoleh dicuci dengan aquades hingga pH netral yang diukur dengan indikator universal. Kemudian residu dikeringkan dalam oven dengan suhu 60 ^{o}C selama 6 jam. Kemudian untuk filtrat di uji dengan $CuSO_4$ sehingga protein yang telah terpisah berikatan dengan Cu membentuk kompleks ungu.

3. Pembuatan Media ISP-2

Media ISP-2 terdiri dari 0,4 g *yeast exstract*,1g *malt exstract*, 0,4g dektrosa, dan 2 g agar dilarutkan dalam 100 mL air laut steril kemudian disterilkan dengan *autoclave* pada suhu 121 ^{o}C dan tekanan 2 atm (Khamna *et al*., 2010). Setelah media sedikit dingin, ditambahkan *cycloheximide* (25 µg/mL) dan *nalidixix acid (*25 µg/mL). C*ycloheximide* dan *nalidixic acid* ditambahkan untuk menghindari kontaminasi jamur dan bakteri (Margavey *et al*., 2004).

4. Pertumbuhan *Actinomycetes* ANL-4

Media ISP-2 di tuang ke dalam cawan petri yang telah disterilisasi sebelumnya dan dibiarkan menjadi padat. Setelah media padat, ditumbuhkan strain *Actinomycetes* ANL-4 di dalam media ISP-2 dan di inkubasi dalam inkubator pada suhu 30°C. Pertumbuhan *Actinomycetes* diamati setelah ± 7 hari waktu inkubasi.

5. Pembuatan Larutan Mineral Garam *Actinomycetes* ANL-4

Larutan ini terdiri atas 0,4% $(NH_4)_2SO_4$, 0,6% NaCl, 0,1% K_2HPO_4, 0,01% CaCI, 0,01% $MgSO_4$, dan 1% cangkang kulit udang yang tak berprotein. Larutan disterilkan dengan *autoclave* selama 15 menit pada suhu 121 ^{o}C dan tekanan 2 atm.

6. Persiapan Inokulum *Actinomycetes* ANL-4

Actinomycetes ANL-4 yang telah ditumbuhakan selama 7-9 hari, diambil dan dipisahkan spora kulturnya. Kemudian spora kultur dimasukkan ke dalam labu erlenmeyer 500 mL yang berisi 200 mL larutan mineral garam yang telah disterilisasi. Selanjutnya labu erlenmeyer diletakkan pada *shaker incubator* dengan kecepatan 175 rpm pada suhu 30 ^{o}C selama 5 hari.

7. Fermentasi Fase Cair Sistem Tertututp (Batch)

Sebanyak 1g substrat cangkang kulit udang tak berprotein dimasukkan dalam labu Erlenmeyer 100 mL. Substrat kemudian direndam dengan larutan mineral garam sebagai media cangkang kulit udang tak berprotein dan pH

larutan dikondisikan pada 7,0 dengan menggunakan *buffer* pospat pH 7 kemudian media disterilisasi dengan *autoclave* pada 2 atm temperatur 121 ^{o}C selama 20 menit. Kultur awal diinokulasikan dalam media cangkang kulit udang tak berprotein dengan perbandingan $^{b}/_{v}$ 50%, lalu difermentasikan pada 30 ^{o}C dengan *shaking* 250 rpm selama 1 hari.

Hasil dari fermentasi *batch* dipanaskan dengan *waterbatch* pada suhu 70°C selama 45 menit. Kemudian dicampur dengan 5 mL air destilasi dengan membiarkan tabung pada *rotary shaker* selama 1 jam pada 200 rpm. Campuran disaring menggunakan kain katun dan filtrat disentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm selama 20 menit pada suhu 4°C. Semua filtrat yang diperoleh dibekukan di dalam *frizeer* selama 24 jam.

D. Karakterisasi Glukosamin

1. Analisis Glukosamin dengan Spektrofotometri UV-Vis

3 mL larutan hasil fermentasi ditambahkan 0,375 mL *buffer* fosfat pH 6 yang telah dicampurkan dengan 0,375 mL larutan ninhidrin 0,8%, kemudian dipanaskan selama 60 menit. Setelah , diukur absorbansinya menggunakan UV-Vis dengan panjang gelombang 570 nm.

V. KESIMPULAN DAN SARAN

A. KESIMPULAN

Dari pembahasan yang telah dipaparkan, maka dapat disimpulkan :

1. Waktu optimum enzim kitinase yang diperlukan untuk mendegradasi kulit udang tak berprotein menjadi glukosamin yaitu pada waktu fermentasi 24 jam. Dengan perolehan konsentrasi sebesar 196,46 ppm.

2. Hasil yang diperoleh terbukti adalah glukosamin, hal ini dibuktikan dengan hasil *scanning* antara hasil fermentasi dan glukosamin standar berada pada daerah yang sama.

3. Kadar (%) glukosamin terbesar yaitu 19,64 % yang diperoleh dari fermentasi dengan waktu inkubasi 24 jam dengan rendemen sebesar 0,19646 g/L.

B. SARAN

Disarankan penelitian selanjutnya untuk mengganti deproteinasi menjadi demineralisasi, karena masih terdapatnya kandungan mineral dalam produk menyebabkan kualitas menjadi kurang baik.

DAFTAR PUSTAKA

Abbas I.H. 2006. Biological and Biochemical Studies of Actinomycetes Isolated from Kuwait Saline Soil-Kuwait, Journal of Applied Science Research, 2 (10) : 809-815 INISInet Publiation.

Anggraini, W. 2010. Uji Aktivitas Enzim Kitinase dari Isolat *Actinomycetes* Selama Proses *Solid State Fermentation* Kitin dengan Metode Somogyl-Nelson. (Skripsi). Universitas Lampung. Bandar Lampung.

Anonim. 2007. *Glukosamin Untuk Osteoartitis*. *http://www.halalguide.info*. Diakses pada 10 Januari 2016

Bahariah. 2005. Pengaruh Konsentrasi NaOH dan Suhu Pada Proses Deproteinasi Untuk Produksi Kitin dari Limbah Udang Putih (Penaeus merguensis). *Skripsi*. Jurusan Kimia FMIPA Universitas Hasanuddin

Beaney P, J Lizardi-Mendoza, M Healy. 2005. Comparison of chitin produced by chemical and bioprocessing methods. *J Chem Technol Biotechnol*. 80: 145-150.

Copeland RA. 2000. Methods for Protein Analysis : A Practical Guide to Laboratory Protocols. Champman and Hall. New York.

Dinter, S., U. Bunger, and E. Siefert. 2000. Enzymatic Degradation of Chitin by Microorganisms. In: *Advances in Chitin Science*. Universitas Potsdam Druckhaus Schmergow. Germany.

EFSA [*European Food Safety Authority*]. 2009. Scientific Opinion on the substantiation of a health claim related to glucosamine hydrochloride and reduced rate of cartilage degeneration and reduced risk of development of osteoarthritis pursuant. Parma, Italy. *European Food Safety Authority*, 7(10): 1358.

Endang Mastuti W. 2005. Pengaruh Konsentrasi NaOH dan Suhu Pada Proses Deasetilasi Khitin dari Kulit Udang (Skripsi) Ekuilibrium, Vol.4, No.1 : 21-25.

Foucher, J.P., G.K. Westbrook, A. Boetius, S. Ceramicola, S. Dupre, J. Mascle, J. Mienert, O. Pfannkuche, C. Pierre, and D. Praeg. 2009. Structure and Drivers of Cold Seep Ecosystems. *Oceanography*, 22: 92-109.

Funkhouser, J., D. & Aronson, N., N. 2007. Chitinase family GH18: Evolutionary Insights From The Genomic History Of A Diverse Protein Family. *BMC Evol Biol* 7: 96-111.

Fukamizo T. 2000. Chitinolityc enzymes: *Catalysis, Substrate Binding, And Their Application*. Curr Prot Peptide Sci 1: 105-124.

Gao, J.M.W. Baver, K.R. Shockley, M.A. Pysz and R.M. Kelly. 2003. Growth of Hipertemophilic Archaeon *Pyroccocus furiosus* On Chitin Involves Two Family 18 Chitinases. Apl. Environ. Microbiol. 69 : 319-3128.

Gijzen M, Kuflu K, Qutob D, Chernys JT. 2001. *A Class I Chitinase From Soybean Seed Coat*. J Exp Bot 52: 2283-2289.

Gohel, V., A. Singh, M. Vimal, P. Ashwini, and H.S. Chatpar. 2006. Bioprospecting and Antifungal Potential of Chitinolytic Microorganisms. *African Journal of Biotechnology*. 5(2):54-72.

Hendri J., Desi Indriani, Aspita Laila, Irwan Ginting Suka., 2007. Pembutaan Asetilglukosamin Secara Enzimatik Dari Kulit Udang dan Kepiting. Jurnal Ilmiah MIPA (JIM) Vol. 10, No. 2.

Khamna S, Yokota A, Peberdy J.F., and Lumyong S. 2010. Indole 3-acetic-acid Production by Streptomyces sp. Isolated from Some Thai Medicinal Plant Rhizosphere Soils. *Eur Asia J. Bio Sci* 4:23-32.

Koga D, Isogai A, Sakuda S, Matsumoto S, Suzuki A, Kimura S, Ide A. 1987. Specific inhibition of Bombyx mori chitinase by allosamidin. Agric Bio Chem 51:471–476

Mahmoud, N.S., Ghaly, A.E., and Arab, F., 2007. Unconventional Approach For Demineralization Of Deproteinized Crustacean Shells For Chitin Production. American Journal of Biochemistry and Biotechnology. 3(1): 1-9.

Margavey, N.A., J.M. Keller, V. Bernan, M. Dworkin, and D.H. Sherman. 2004. Isolation and Characterization of Novel Marine-Derived Actinomycetes Texa Rich in Bioactive Metabolites. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol.12. Hlm. 7520-7529.

Matsumoto, K.S. 2006. Fungal Chitinases, In: Guevara-Gonzales R.G and Torres-Pacheco I (Eds). Advences in Agricultural and Food Biotechnology. Research Signpost, India. 289-304.

Mugianto Puji. 2012. Uji Efektivitas Fermentasi Kitin Secara Bertahap Dengan Isolat *Actinomycetes* ANL-4 dan *Mucor Miehei* Untuk pembuatan Glukosamin (Skripsi). Universitas Lampung. Bandar Lampung.

Murray, R. K., Granner, D. K., Mayes, P. A., dan Rodwell, V. W. 2003. Biokimia *Harper*. Edisi 25. Buku Kedokteran EGC. Jakarta.

Noviendri, Dedi, Fawzya, Yusro Nuri, dan Chasanah Ekowati. 2008. Karakteristik dan Sifat Kinetika Enzim Kitinase dari Isolat Bakteri T5a1 Asal Terasi. *Jurnal Pascapanen dan Bioteknologi Kelautan dan Perikanan Vol. 3 No. 2: 123-129*

Pareira, B.M. 2004. *Limbah Cangkang Udang Menjadi Kitosan*. *http://www.chem-is-try.org*. Diakses pada 26 Januari 2013.

Priyatno, T. P. Sudjono, M. S. Y. Chaerani, Suryadi dan Sudjadi, M. 2000. Teknik Produksi dan Formulasi Bakteri Kitinolitik untuk Pengendalian Penyakit Karat Kedelai.J. Natur. Indonesia. 5 : 299-335.

Rao, N. 1994. *Mikrooganisme Tanah dan Pertumbuhan Tanaman*. UI press. Jakarta.

Robiah, Nur. 2015. Mapping Aktivitas Enzim Kitinase Dan Deasetilase Dari Isolate Actinomycetes ANL-4 Dalam 24 Jam Waktu Inkubasi. (Skripsi). Universitas Lampung. Bandar Lampung.

Shantosh, S., and P.T. Mathew. 2007. Preparation of glucosamine and carboxymethylchitin from shrimp shell. *Journal of Applied Polymer Science*, 107: 280-285.

Suhardi. 1993. Khitin dan Khitosan. Pusat antar Universitas Pangan dan Gizi UGM. Yogyakarta.

Suryanto, D., E.M. dan Yurnaliza. 2005. Eksplorasi Bakteria Kitinolitik : Keragaman Genetik Gen Penyandi Kitinase Pada Berbagai Jenis Bakteri dan Pemanfaatannya (Tesis). USU.

Synowiecki, J and Al-Khateeb N. 2003. Production, Properties, and Some New Application of Chitin and Its Derivatives. Critical Review in Food Science and Nutrition. ProQuest Medical Library. 43(2): 145-171.

Tsigos, I., A. Martinou, D. Kafetzopoulos dan V. Bouriotis. 2000. Chitin Deasetylase : New, Versatile Tools in Biotechnology. TIBTECH, 18 : 305-312.

Tews I, Scheltinga AC, Terwisscha V, Perrakis A, Wilson KS, Dijkstra BW. 1997. Substrate assisted catalysis unifies two families of chitinolytic enzymes. J Am Chem Soc 119: 7954–7959

Utami, Putri Heriyani. 2014. Penetapan Waktu Inkubasi Optimum Degradasi Kitin Oleh Kitinase Dari *Actinomycetes* ANL-4 Secara Spektrofotometri Uv-Vis. (Skripsi). Universitas Lampung. Bandar Lampung.

Winarno, F. 1995. *Enzim Pangan*. Gramedia Pustaka Utama. Jakarta.

Y.Wu., Munir Hussain and Reza Fassihi. 2005. Development Of A Simple Analytical Methodology For Determination Of Glukosamin Release From Modified Release Matrix Tablets. Article in Journal Of Pharmaceutical And Biomedical Analysis. https://www.researchgate.net/publication/7817205. Diakses pada 10 Februari 2016.