

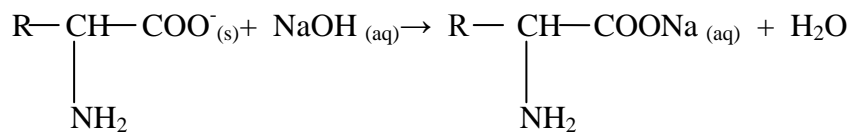
## IV. HASIL DAN PEMBAHASAN

### A. Isolasi Kitin

Isolasi kitin menggunakan bahan baku serbuk kulit udang melalui dua tahap proses yaitu deproteinasi dan demineralisasi. Deproteinasi merupakan proses pemisahan protein dari sampel, sedangkan demineralisasi merupakan proses pemisahan mineral dari sampel.

#### 1. Deproteinasi

Dalam proses ini digunakan larutan NaOH 20% untuk mengekstrak protein. Protein akan bereaksi dengan ion  $\text{Na}^+$  membentuk  $\text{Na}^+$  proteinat yang larut dalam air. Reaksi yang terjadi adalah sebagai berikut :



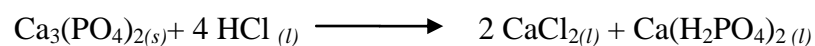
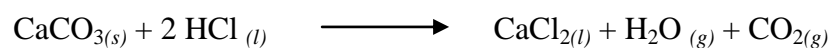
$\text{Na}^+$  proteinat sebagai filtrat dipisahkan dari residunya yang merupakan kitin kasar melalui penyaringan. Untuk membuktikan bahwa protein telah berhasil dipisahkan dari sampel maka sebanyak 4 ml filtrat ditambahkan dengan  $\text{CuSO}_4$ .

Filtrat yang awalnya berwarna kuning berubah warna menjadi ungu karena adanya reaksi antara ion  $\text{Cu}^+$  dengan protein membentuk kompleks Cu-proteinat (Lampiran 2). Residu yang diperoleh dicuci dengan air suling hingga pH 7. Pencucian ini dilakukan untuk mencegah terjadinya degradasi produk selama proses pengeringan (Sari, 2010). Residu yang telah kering merupakan kitin kasar yang akan digunakan untuk proses demineralisasi. Rendemen yang dihasilkan dari proses ini adalah 56,17 g dari 100 g sampel kulit udang kering. Hasil tersebut menunjukkan bahwa terdapat 43,83 g atau 43,83% protein yang telah berhasil didegradasi dari kulit udang.

## 2. Demineralisasi

Pada proses ini digunakan larutan HCl 1,25 N untuk melarutkan kalsium menjadi kalsium klorida. Saat larutan HCl ditambahkan dalam bejana yang berisi kitin kasar terbentuk gelembung-gelembung gas  $\text{CO}_2$ , hal ini menunjukkan proses pelepasan mineral sedang berlangsung. Kandungan mineral utama dalam kulit udang adalah  $\text{CaCO}_3$  dan  $\text{Ca}_2(\text{PO})_4$ . Garam mineral tersebut bereaksi dengan HCl membentuk gas  $\text{CO}_2$ .

Reaksi yang terjadi adalah sebagai berikut :



Untuk membuktikan bahwa proses demineralisasi berhasil dilakukan, maka filtrat yang diperoleh ditambahkan garam ammonium oksalat. Ion kalsium

dalam filtrat akan bereaksi dengan ion oksalat membentuk kalsium oksalat yang berwarna putih dan tidak larut dalam air (Lampiran 3).

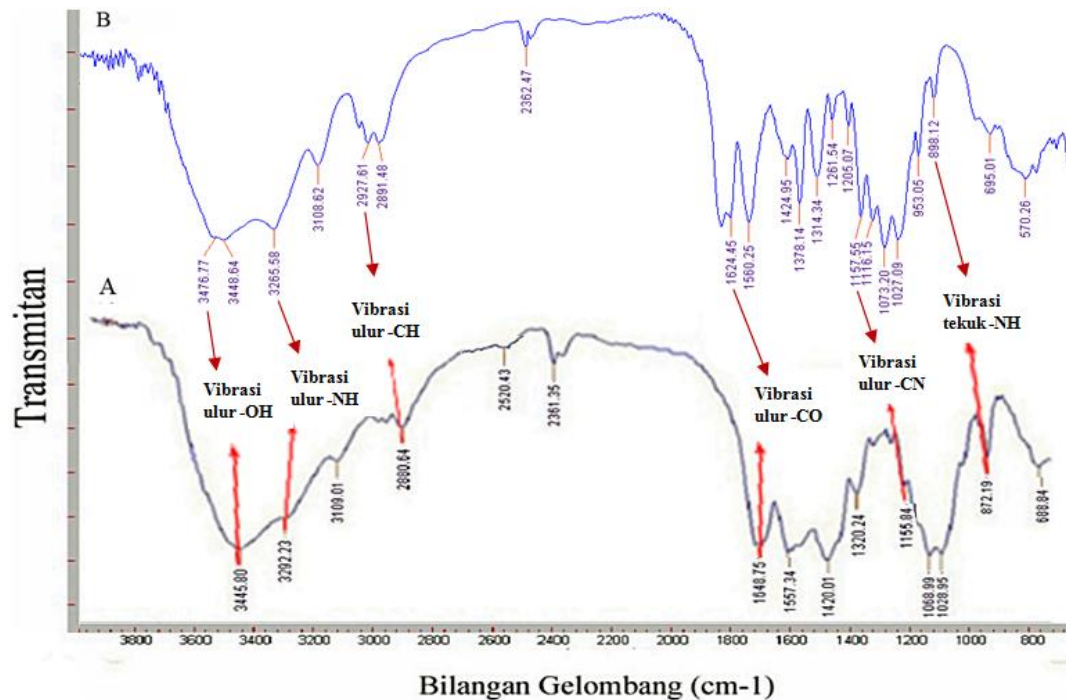
Netralisasi residu dengan akuades hingga pH 7 juga dilakukan dalam proses demineralisasi untuk mencegah terjadinya degradasi produk selama proses pengeringan. Rendemen yang dihasilkan adalah 27,14 gram dari berat kitin kasar 56,17 gram. Dengan demikian kandungan mineral dalam 100 gram sampel kulit udang adalah 29,03 g atau 29,03%.



Gambar 10. Kitin hasil isolasi

## **B. Karakterisasi Kitin dengan Spektroskopi FTIR**

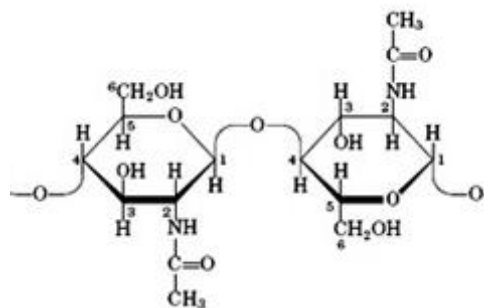
Kitin yang diperoleh dari proses deproteinasi dan demineralisasi kemudian dikarakterisasi menggunakan FTIR untuk menganalisis gugus fungsinya. Secara kualitatif data spektra IR kitin hasil isolasi dan kitin standar WAKO Jepang memiliki pita serapan yang relatif sama.



Gambar 11. Spektrum kitin standar (A) dan spektrum kitin hasil isolasi (B)

Spektrum absorbansi IR untuk kitin hasil isolasi (B) pada Gambar 11 menunjukkan pita serapan melebar dengan intensitas yang kuat pada daerah 3100-3500  $\text{cm}^{-1}$  yang merupakan karakteristik vibrasi ulur OH yang terikat pada atom C nomor 3 dan 6 (Gambar 12). Pita serapan diatas bilangan gelombang 3200  $\text{cm}^{-1}$  juga merupakan karakteristik vibrasi ulur NH dari amida yang terdapat pada atom C nomor 2. Pita serapan tunggal yang agak kasar pada daerah 3265  $\text{cm}^{-1}$  menunjukkan NH dari amina sekunder yang terdapat pada atom C nomor 2, pita serapan pada daerah 1157,55-1116,15  $\text{cm}^{-1}$  menunjukkan vibrasi ulur C-N yaitu pada atom C nomor 2 dan pita serapan pada daerah 898,12  $\text{cm}^{-1}$  menunjukkan vibrasi tekuk keluar bidang dari N-H, pita serapan dengan intensitas kuat pada daerah 2927,61-2891,48  $\text{cm}^{-1}$  merupakan karakteristik dari vibrasi ulur CH yaitu pada atom C nomor 1, 2, 3, 4, 5, dan 6.

Pita serapan lainnya adalah pita serapan pada daerah  $1424,95\text{-}1314,34\text{ cm}^{-1}$  yang menunjukkan vibrasi tekuk CH, pita serapan pada daerah  $1073,20\text{-}1027,09\text{ cm}^{-1}$  menunjukkan vibrasi tekuk C-O dan pada daerah  $1624,45\text{-}1560,25\text{ cm}^{-1}$  merupakan vibrasi ulur C-O dari amida pada atom C nomor 2 (Gambar 12). Berdasarkan data serapan yang diperoleh, dapat dibandingkan spektrum antara kitin hasil isolasi dengan kitin standar dan dapat disimpulkan jika senyawa tersebut adalah kitin.



Gambar 12. Struktur Kitin dengan Posisi Nomor Atom (Murray *et al.*, 2003)

### C. Peremajaan *Actinomyces* ANL-4

Isolat *Actinomyces* yang digunakan dalam penelitian ini merupakan isolat ANL-4 yang telah berhasil diisolasi dari sedimen mangrove pantai oleh Anggraini pada tahun 2010 dengan ciri-ciri strain yang memiliki miselium aerial berwarna putih keabuan dan miselium substratnya berwarna krem keabuan. Isolat ANL-4 ini memiliki indeks kitinolitik terbesar dibandingkan dengan isolat lainnya, hal ini ditentukan berdasarkan rasio diameter zona bening yang dihasilkan terhadap diameter koloni.

Peremajaan ANL-4 bertujuan untuk mempertahankan isolat murni dari ANL-4 dengan cara memindahkan strain ANL-4 dari medium pertumbuhan yang lama ke medium pertumbuhan baru. Strain *Actinomyces* ini ditumbuhkan pada medium ISP-2. Isolat ANL-4 yang telah diremajakan diidentifikasi secara mikroskopik. Gambar mikroskopis yang diperoleh memiliki kemiripan dengan strain ANL-4 yang pertama kali diisolasi pada tahun 2010 (Lampiran 5).

#### **D. Penetapan Waktu Inkubasi Optimum**

##### **1. Fermentasi Fase Cair Sistem Tertutup (*Batch Fermentation*)**

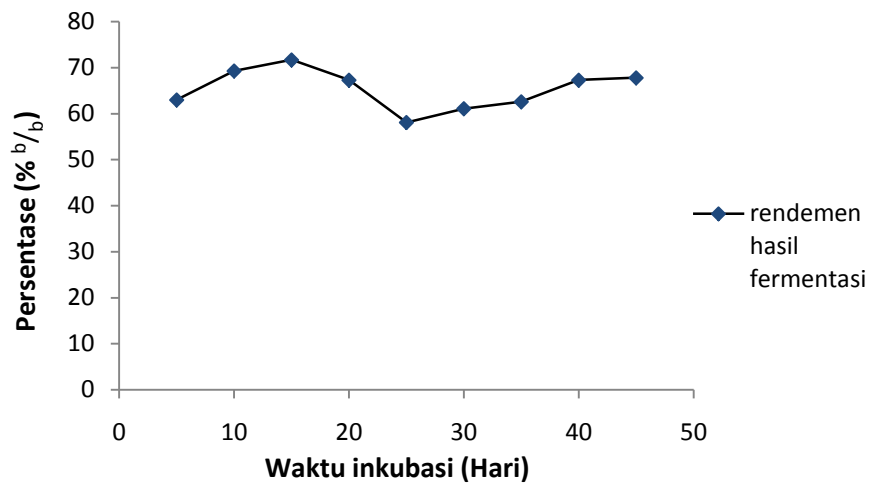
Fermentasi *batch* dipilih karena memiliki beberapa kelebihan jika dibandingkan dengan fermentasi fase padat, diantaranya adalah jenis dan konsentrasi komponen-komponen dalam media dapat diatur sesuai dengan yang diinginkan, dapat memberikan kondisi yang optimum untuk pertumbuhan, dan pemakaian medium menjadi lebih efisien.

Penggunaan labu goyang yang memiliki tonjolan-tonjolan pipih dapat memberikan aerasi yang cukup untuk proses fermentasi *batch*. Selama fermentasi berlangsung, labu goyang diletakkan diatas *shaker* yang kecepatannya dapat diatur. Gerakan berputar *shaker* ditambah dengan adanya tonjolan-tonjolan pipih di bagian dasar labu goyang menyebabkan medium bergolak sehingga terjadi aerasi. Selama fermentasi berlangsung di atas *shaker*, labu goyang dalam keadaan tertutup, dan agar supaya udara tetap dapat masuk ke dalam labu, digunakan tutup dari kapas yang tidak menghambat aliran udara

ke dalam labu tetapi sterilisasi medium tetap terjamin. Tingkat aerasi dalam labu goyang merupakan fungsi dari kecepatan *shake*, efek dari tonjolan pipih yang terdapat di dasar labu, jenis bahan penutup yang digunakan, dan volume medium dalam labu (Rahman, 1992).

Fermentasi *batch* kitin dengan *Actinomycetes* ANL-4 digunakan substrat kitin yang telah dicuci dengan NaOH (Anggraini, 2010). NaOH ini berperan untuk menghilangkan zat pengotor yang ada di dalam kitin, dan dapat memutus gugus asetamida. Fermentasi ini dilakukan dalam *shaker* inkubator dimana temperatur dan kecepatan *shaking* dapat dijaga tetap stabil. Dalam prosesnya, substrat kitin yang digunakan adalah 1 gram dengan perbandingan jumlah substrat dan volume media total adalah 1 : 20 berdasarkan perbandingan jumlah substrat dan media optimum dalam penelitian yang dilakukan oleh Yuliandari (2013).

Selama proses fermentasi, dilakukan pengecekan pH pada media tiap 5 hari. Data yang diperoleh menunjukkan pH stabil pada rentang 6-7. Hasil fermentasi (setiap 5 hari) diambil filtratnya untuk diliofilisasi menggunakan *freeze dryer* pada suhu  $-109^{\circ}\text{C}$ . Proses ini dilakukan untuk menghilangkan kandungan air dalam filtrat tanpa adanya pemanasan pada suhu yang tinggi sehingga tidak merusak struktur glukosamin. Bobot rendemen glukosamin kering yang diperoleh tiap 5 hari waktu inkubasi dapat dilihat pada Lampiran 6. Persentase bobot rendemen glukosamin dari 1 gram bobot kitin awal tiap 5 hari inkubasi dapat dilihat dalam Gambar 13.



Gambar 13. Kurva persentase rendemen hasil fermentasi terhadap lamanya waktu inkubasi kitin dengan *Actinomycetes* ANL-4

Dari Gambar 13 terlihat bahwa produksi rendemen glukosamin sudah menunjukkan persentase yang besar pada hari ke 5. Pada daerah kurva dalam rentang waktu inkubasi 5 sampai 15 hari terjadi peningkatan jumlah produksi rendemen glukosamin. Namun kenaikan produksi rendemen glukosamin ini tidak signifikan. Rata-rata kenaikan produksi glukosamin hanya sebesar 4,3 %. Setelah hari ke 15, produksi rendemen glukosamin tidak menunjukkan pertumbuhan yang konstan.

Jika diamati, pada hari ke 5 inkubasi, enzim kitinase dari *Actinomycetes* ANL-4 sudah menunjukkan aktifitas pemutusan ikatan glikosidik dalam rantai panjang kitin menjadi oligomer ataupun monomer-monomernya. Hal ini ditunjukkan dari besarnya bobot rendemen glukosamin yang diperoleh. Namun glukosamin hasil fermentasi masih mungkin bercampur dengan N-asetil glukosamin atau kitooligomer lainnya. Maka penentuan waktu inkubasi

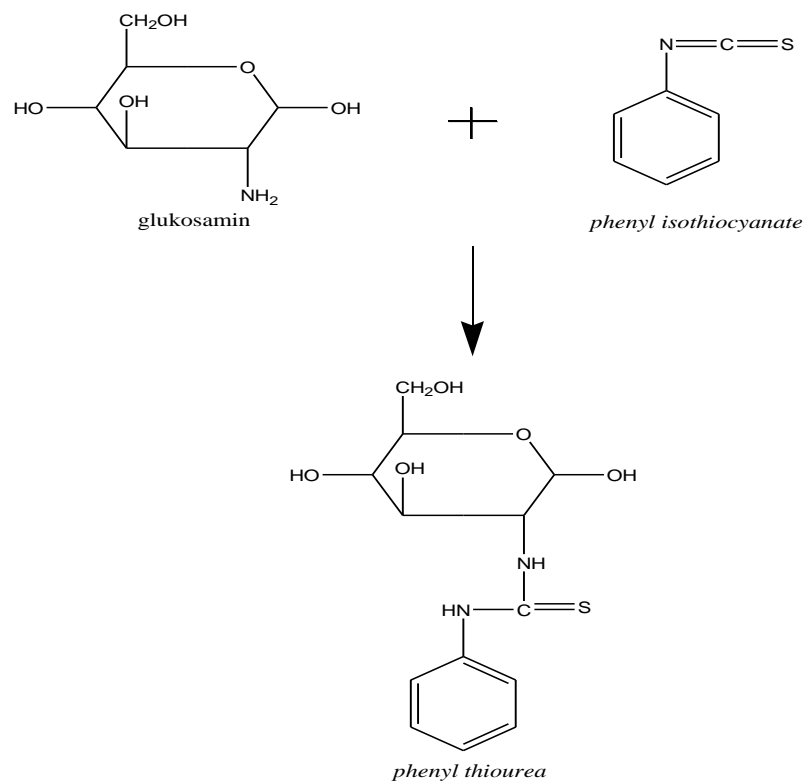


optimum hanya berdasarkan besarnya persentase rendemen glukosamin yang diperoleh belum cukup tepat. Untuk dapat menentukan konsentrasi glukosamin sebenarnya dalam sampel, maka perlu dilakukan pengujian secara spektrofotometri UV-Vis.

## **2. Penentuan Kadar Glukosamin dalam Rendemen Hasil Fermentasi Secara Spektrofotometri UV-Vis**

Glukosamin hasil degradasi kitin/kitosan tidak dapat langsung dianalisis menggunakan spektrofotometer UV-Vis karena molekulnya tidak memiliki gugus kromofor. Glukosamin menyerap sinar UV pada panjang gelombang dibawah 205 nm, yang hampir sama dengan serapan pelarut polar seperti air dan metanol. Untuk itu glukosamin direaksikan terlebih dahulu menggunakan fenil isotiosianat (PITC) menjadi senyawa derivat fenil tiourea (PTH) yang dapat menyerap sinar UV pada panjang gelombang yang lebih tinggi (Gadgoli, 2006).

Reaksi yang terjadi adalah:



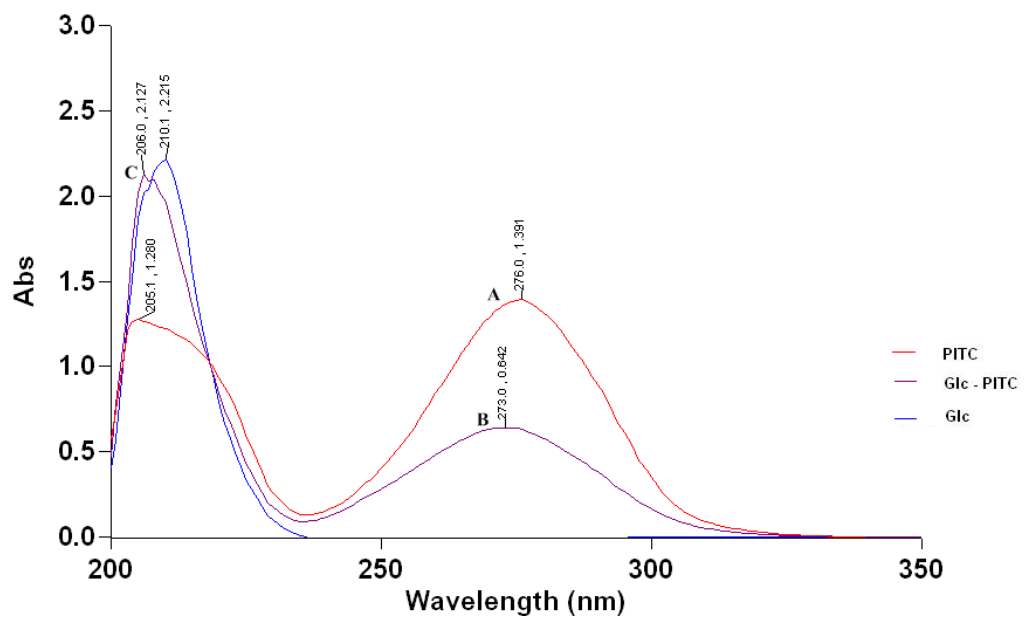
Gambar 14. Reaksi antara glukosamin dengan fenil isotiosianat menghasilkan senyawa derivat fenil tiourea (Gadgoli, 2006)

Gugus tiosianat ( $\text{N}=\text{C}=\text{S}$ ) pada PITC dapat bereaksi dengan gugus amina bebas pada glukosamin, sedangkan pada senyawa N-asetil glukosamin, PITC tidak dapat bereaksi karena gugus amina pada N-asetil glukosamin telah mengikat gugus asetil yang mengakibatkan adanya rintangan sterik dalam reaksi tersebut. Hal ini berarti jika di dalam rendemen hasil fermentasi terdapat campuran senyawa N-asetil glukosamin, maka senyawa ini tidak akan terdeteksi dalam pengukuran spektrofotometri UV-Vis. Selain itu, PITC dapat bereaksi dengan dimer, trimer, dan tetramer glukosamin (oligomer glukosamin). Sehingga jika

dalam sampel hasil fermentasi terdapat oligomer glukosamin, maka dapat terdeteksi.

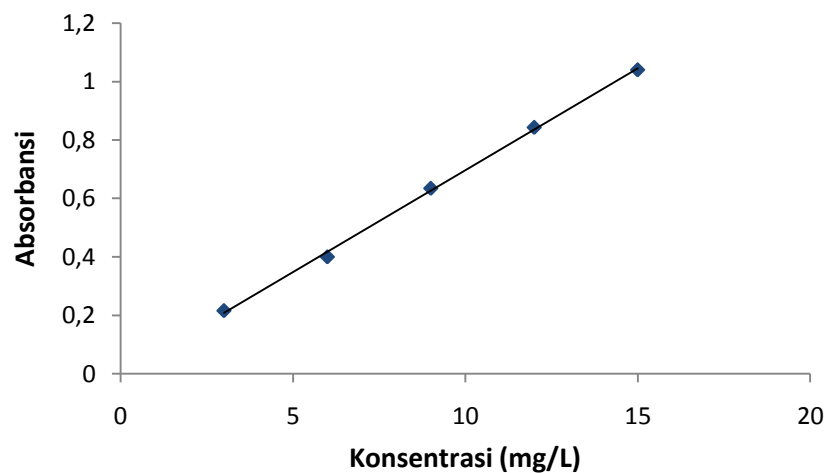
Analisis dilakukan dengan tahapan penentuan panjang gelombang maksimum, penentuan absorbansi glukosamin hasil fermentasi, dan kalibrasi glukosamin sampel dengan standar yang telah dibuat.

Pada tahap optimasi panjang gelombang, larutan PTH, larutan glukosamin standar, dan PITS murni di-*scan* dalam rentang panjang gelombang 200 sampai dengan 350 nm menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Hasil *scanning* panjang gelombang dapat dilihat pada Gambar 15.



Gambar 15. Hasil *scanning* panjang gelombang maksimum (A) fenil isotiosianat (PITS), (B) larutan glukosamin-PITS (PTH), dan (C) larutan glukosamin

Dari hasil pengukuran diperoleh panjang gelombang maksimum untuk larutan PTH adalah 273 nm, sedangkan panjang gelombang maksimum untuk larutan glukosamin dan PITC murni masing-masing adalah 210 dan 276 nm. Maka pada pengukuran larutan sampel dan standar glukosamin dilakukan pada panjang gelombang 273 nm. Hasil pengukuran absorbansi standar pada panjang gelombang 273 nm dapat dilihat pada Lampiran 8. Dari hasil tersebut, dapat digambarkan kurva kalibrasi larutan standar berupa grafik kurva konsentrasi versus absorbansi dapat ditunjukkan pada Gambar 16.



Gambar 16. Kurva kalibrasi larutan standar senyawa PTH

Berdasarkan hasil pengukuran absorbansi larutan standar pada berbagai konsentrasi, maka kurva kalibrasi larutan standar senyawa PTH diperoleh hubungan yang linear antara absorbansi dengan konsentrasi yang ditunjukkan dengan koefisien korelasi ( $R$ ) sebesar 0,9994. Besarnya nilai  $R$  ini mendekati satu, sehingga dapat dikatakan bahwa absorbansi merupakan fungsi yang besarnya berbanding lurus dengan konsentrasi.

Berdasarkan hasil perhitungan, diperoleh nilai intersep sebesar  $-0,0007$  dan slope sebesar  $0,0697$ , sehingga persamaan yang diperoleh dari kurva pada Gambar 16 adalah :

$$y = 0,0697x - 0,0007$$

Dimana x : konsentrasi (mg/L)

y : absorbansi

Persamaan tersebut, pada kurva kalibrasi larutan standar senyawa PTH, digunakan sebagai pembanding dalam analisis kuantitatif glukosamin dalam rendemen hasil fermentasi. Pengukuran absorbansi sampel dilakukan dengan 3x pengulangan, data yang diperoleh ditunjukkan pada Lampiran 9.

Absorbansi rata-rata dari masing-masing sampel rendemen glukosamin diplotkan ke persamaan regresi linear tersebut. Hasil yang diperoleh diperhitungkan dengan faktor pengenceran sehingga diperoleh konsentrasi glukosamin sebenarnya dalam sampel (Lampiran 10).

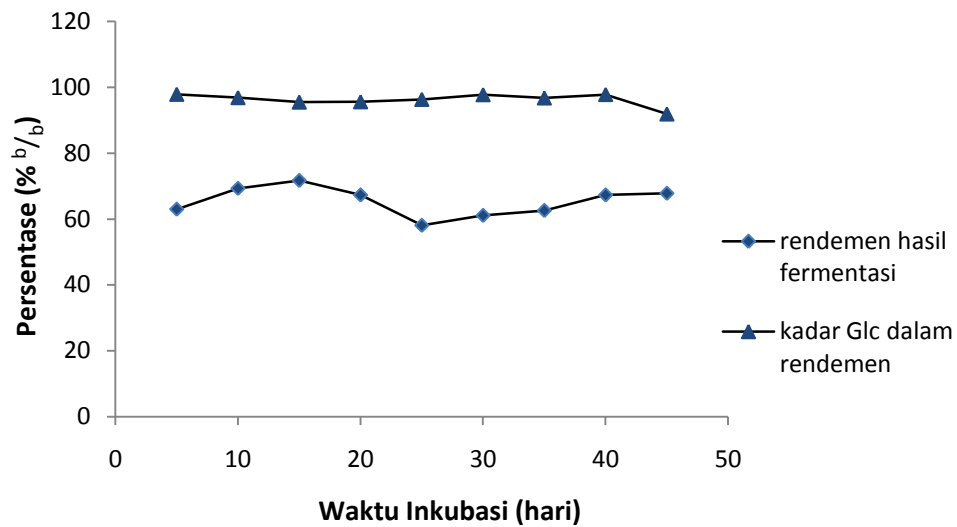
Hasil pengukuran kandungan glukosamin menggunakan spektrofotometer UV-Vis menunjukkan bahwa kandungan glukosamin rata-rata dalam rendemen hasil fermentasi adalah  $9.623,31$  mg/L atau terdapat rata-rata  $9.633,31$  mg glukosamin dalam 1 Liter larutan sampel yang digunakan. Maka dalam 10 ml larutan stok sampel glukosamin ( $10.000$  mg/L) terdapat bobot glukosamin rata-rata dalam sampel  $96,2331$  mg atau  $0,0962$  gram. Bobot glukosamin

sebenarnya dalam rendemen hasil fermentasi pada tiap selang waktu 5 hari inkubasi dapat dilihat pada Lampiran 11.

Berdasarkan perhitungan, dapat diketahui bahwa bobot glukosamin sebenarnya dalam rendemen hasil fermentasi paling tinggi diperoleh pada hari ke 15 inkubasi. Sedangkan bobot glukosamin yang paling rendah diperoleh pada hari ke 45 inkubasi.

Dari data hasil perhitungan kadar glukosamin sebenarnya dalam rendemen pada Lampiran 11, dapat diketahui bahwa kadar glukosamin pada hari ke 5 sampai hari ke 45 waktu inkubasi, mencapai lebih dari 90 % bobot rendemen hasil fermentasinya. Hal ini menunjukkan bahwa kitin hampir seluruhnya diubah menjadi glukosamin atau oligomer glukosamin oleh enzim kitinase dari *Actinomyces* ANL-4. Jika diamati, terdapat pengurangan dari bobot rendemen glukosamin awal dengan bobot glukosamin hasil analisis rata-rata sebesar 0,024 gram. Apabila diasumsikan bahwa reaksi antara glukosamin dengan PITC adalah sempurna, maka kemungkinan selisih bobot rendemen glukosamin awal dengan bobot glukosamin hasil analisis merupakan bobot dari senyawa N-asetil glukosamin atau kitoooligomer hasil degradasi kitin.

Hubungan antara waktu inkubasi dengan persentase bobot rendemen hasil fermentasi dan kadar glukosamin sebenarnya dalam rendemennya dapat dilihat pada Gambar 17.



Gambar 17. Hubungan waktu inkubasi (hari) dengan persentase bobot rendemen hasil fermentasi (% b/b) dan kadar Glc sebenarnya dalam rendemen (% b/b)

Dari Gambar 17, dapat diketahui bahwa tidak ada perbedaan kadar glukosamin yang cukup besar dalam rendemen hasil fermentasi pada hari ke 5 sampai hari ke 45. Perbedaan yang cukup jelas dapat terlihat pada bobot rendemen hasil fermentasi yang diperoleh. Meskipun hari ke 5 inkubasi menunjukkan kadar glukosamin yang paling tinggi, namun bobot rendemen yang dihasilkan masih lebih rendah dari hari ke 15. Sehingga bobot glukosamin sebenarnya dalam substrat awal kitin paling tinggi berada pada hari ke 15 inkubasi. Hal ini menunjukkan bahwa hari ke 15 merupakan waktu inkubasi optimum degradasi kitin oleh *Actinomycetes* ANL-4.

Bagaimanapun, glukosamin yang dihasilkan dalam proses fermentasi ini juga masih mungkin bercampur dengan dimer, trimer, atau tetramernya (oligomer),

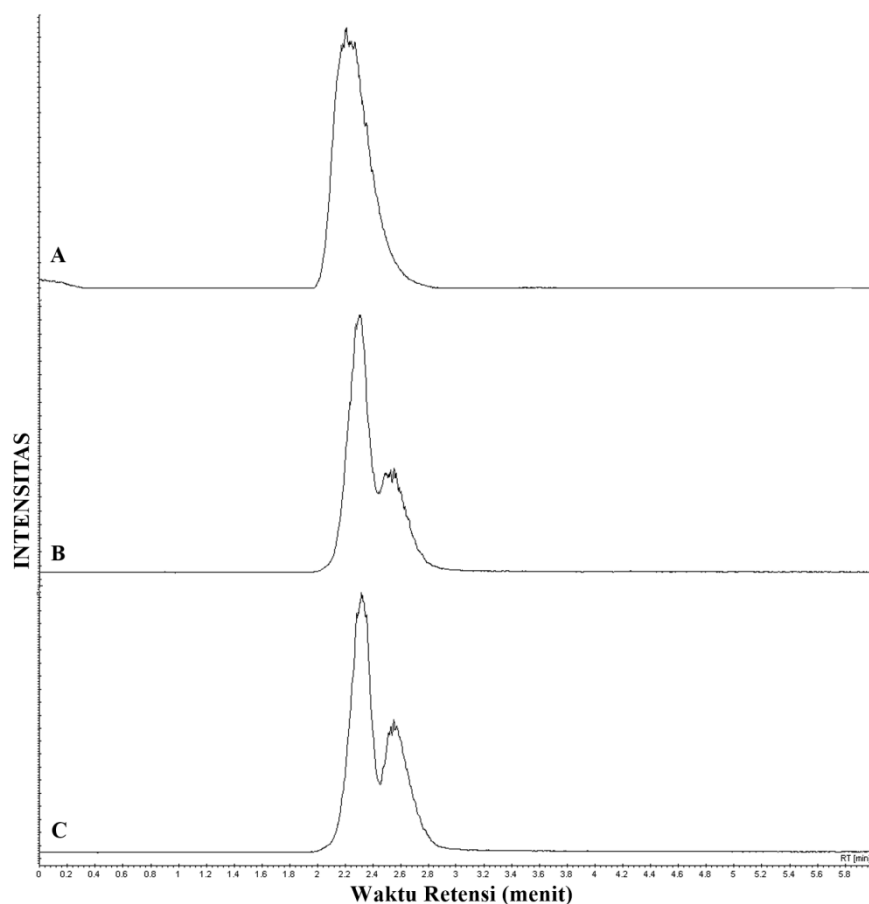
sehingga analisis dengan menggunakan HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) diperlukan untuk mengetahui kemurnian glukosamin.

### **3. Analisis Kemurnian Glukosamin dengan HPLC-ELSD**

Sampel glukosamin hari ke 5 dan 15, dan standar glukosamin dianalisis menggunakan HPLC detektor ELSD dengan konsentrasi 2000 mg/L, menggunakan kolom C18, fasa gerak asetonitril/H<sub>2</sub>O (65/35) yang merupakan campuran pelarut polar, laju alir 0,8 mL/menit laju gas N<sub>2</sub> 1,6 L/menit, suhu nebulisasi 40°C, suhu evaporasi 30°C, dan lama proses 6 menit memberikan satu puncak yang dominan.

Sampel yang diperoleh merupakan campuran dari glukosamin, oligomer glukosamin, N-asetil glukosamin dan oligomernya. Analisis kemurnian dengan HPLC-ELSD hanya diamati pada waktu retensi glukosamin (2-3 menit) (Jacyno *and* Dean, 2004).





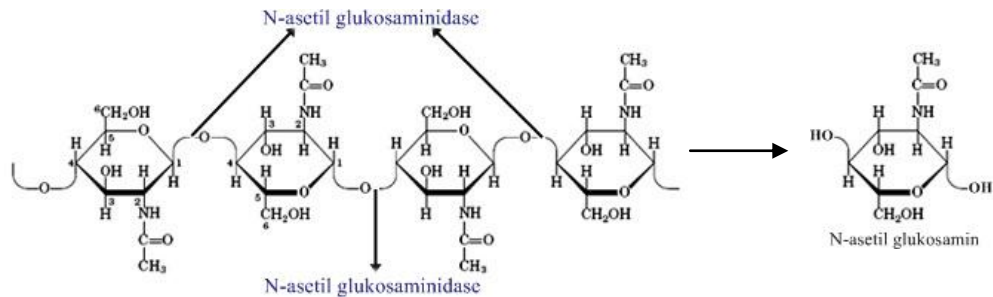
Gambar 18. Kromatogram HPLC-ELSD glukosamin standar (A), glukosamin hasil fermentasi kitin dengan *Actinomyces* ANL-4 hari ke 5 (2000 mg/L) (B) dan hari ke 15 (1000 mg/L) (C)

Dari kromatogram yang ditunjukkan pada Gambar 18, terlihat bahwa adanya satu puncak dari glukosamin standar dengan rentang waktu retensi 2-3 menit. Sampel rendemen hasil fermentasi hari ke 5 dan 15 menunjukkan adanya dua puncak pada waktu retensi 2-3 menit, dimana terdapat satu puncak yang dominan dari masing-masing sampel. Adanya dua puncak ini menunjukkan bahwa glukosamin yang dihasilkan belum murni, kemungkinan masih ada campuran oligomer glukosamin dalam sampel rendemen tersebut. Hal ini mengindikasikan bahwa hasil pengukuran dengan spektrofotometer UV-Vis

yang menunjukkan adanya absorbansi glukosamin ternyata masih merupakan campuran dengan oligomer glukosamin, artinya PITC juga bereaksi dengan oligomer glukosamin. N-asetil glukosamin juga mungkin terdapat dalam sampel rendemen hasil fermentasi namun tidak diamati pada rentang waktu retensi lebih dari 6. N-asetil glukosamin memiliki rentang waktu retensi 7-9 menit (Sari, 2011), sehingga N-asetil glukosamin tidak terdeteksi pada kromatogram yang dihasilkan.

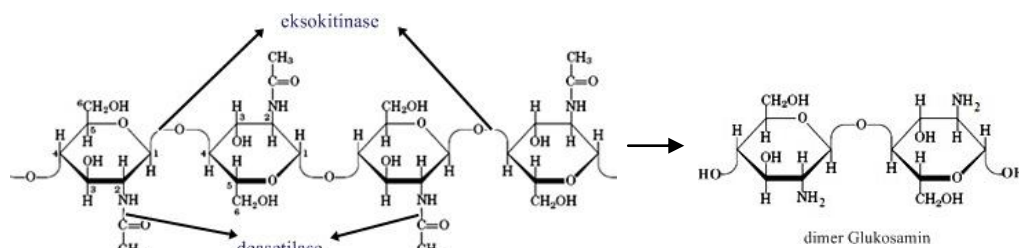
Jika diamati pada Gambar 18, dapat diketahui bahwa intensitas glukosamin hasil fermentasi hari ke 15 lebih besar dua kali lipat dibandingkan dengan intensitas glukosamin hari ke 5. Hal ini dikarenakan glukosamin hari ke 15 dengan konsentrasi 1000 mg/L menunjukkan intensitas yang sama besar dengan glukosamin hari ke 5 pada konsentrasi 2000 mg/L. Hasil tersebut menunjukkan bahwa glukosamin yang dihasilkan pada hari ke 15 inkubasi lebih banyak dari hari ke 5 inkubasi.

Kromatogram hasil analisis HPLC-ELSD juga menunjukkan bahwa enzim kitinase yang dihasilkan oleh *Actinomyces* ANL-4 yang berperan memutus ikatan glikosidik pada rantai panjang kitin menjadi monomer-monomernya yaitu N-asetil glukosaminidase (Shakhbazau and Kartel, 2008) telah menunjukkan aktifitas yang cukup tinggi pada hari ke 5 inkubasi. Reaksi pemutusan ikatan glikosidik pada rantai kitin oleh enzim N-asetil glukosaminidase menjadi monomer-monomer kitin dapat dilihat pada Gambar 19.



Gambar 19. Reaksi pemutusan ikatan glikosidik rantai kitin oleh enzim N-Asetil Glukosaminidase dari *Actinomyces* ANL-4 menjadi monomer-monomernya

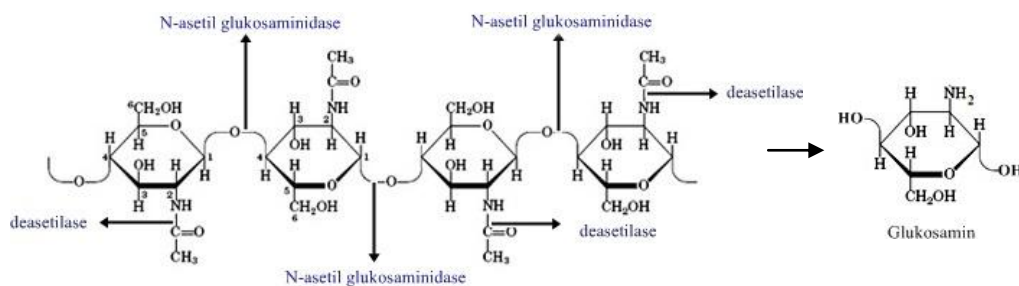
Sedangkan enzim yang memutus ikatan glikosidik pada kitin menjadi dimer-dimer dan oligomer kitin (eksokitinase) juga telah menunjukkan aktifitasnya pada hari ke 5 inkubasi. Hal ini ditandai dari adanya puncak kedua dari glukosamin sampel dengan intensitas yang lebih kecil dalam rentang waktu retensi 2-3 menit yang ditunjukkan pada kromatogram hasil analisis HPLC-ELSD.



Gambar 20. Reaksi pemutusan ikatan glikosidik pada rantai kitin oleh enzim eksokitinase dan pemutusan gugus asetamida oleh enzim deasetilase dari *Actinomyces* ANL-4 secara serempak menghasilkan dimer glukosamin

Glukosamin sendiri dapat diproduksi dari reaksi pemutusan ikatan glikosidik pada rantai kitin oleh enzim N-asetil glukosamidase dan adanya pemutusan

gugus asetamida oleh enzim deasetilase yang keduanya bekerja secara serempak. Reaksi pemutusan rantai kitin oleh enzim N-asetil glukosamidase dan deasetilase dapat dilihat pada Gambar 21. Aktivitas dari kedua enzim ini telah nampak pada hari ke 5 inkubasi yang ditunjukkan oleh adanya puncak tunggal glukosamin pada rentang waktu retensi 2-3 menit dengan intensitas cukup tinggi. Adanya kenaikan intensitas glukosamin pada hari ke 15 inkubasi menunjukkan aktifitas enzim N-asetil glukosaminidase dan deasetilase yang terus meningkat. Kenaikan intensitas glukosamin dalam rendemen hasil fermentasi kemungkinan akan terus bertambah selama proses fermentasi berlangsung, namun diperlukan penyelidikan lebih lanjut mengenai hal tersebut.



Gambar 21. Reaksi pemutusan ikatan glikosidik pada rantai kitin oleh enzim endokitinase dan pemutusan gugus asetamida oleh enzim deasetilase dari *Actinomyces* ANL-4 menjadi monomer-monomer glukosamin