

**WAKTU INKUBASI OPTIMUM *ACTINOMYCETES* ISOLAT 19B19-A1
(*Streptomyces tritolerans*) PADA MEDIA SERBUK KULIT UDANG**

(Skripsi)

Oleh

**SARAS KHAIRANI RACHMAWATI
1717011074**



**JURUSAN KIMIA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS LAMPUNG
2022**

ABSTRAK

WAKTU INKUBASI OPTIMUM *ACTINOMYCETES* ISOLAT 19B19-A1 (*Streptomyces tritolerans*) PADA MEDIA SERBUK KULIT UDANG

OLEH

SARAS KHAIRANI RACHMAWATI

Enzim kitinase merupakan suatu enzim yang dapat mendegradasi kitin dengan cara memutus ikatan β -1,4-glikosidik pada kitin untuk menghasilkan monomer dan oligomer N-Asetilglukosamin. *Actinomyces* menjadi salah satu mikroorganisme yang memiliki kemampuan kitinolitik. Penelitian ini bertujuan untuk memperoleh waktu inkubasi optimum *Actinomyces* dalam mendegradasi kulit udang menjadi glukosamin. Isolat *Actinomyces* yang digunakan diperoleh dari deposit UPT LTSIT, Universitas Lampung, yang diisolasi dari biota laut perairan Gorontalo, Indonesia. Penapisan terhadap 6 isolat *Actinomyces*, diperoleh isolat 19B19-A1 yang memiliki nilai indeks kitinolitik terbesar dengan nilai 1,328. Kemudian dilakukan identifikasi morfologi isolat secara makroskopis, mikroskopis dan analisis filogenetik. Berdasarkan hasil filogenetik dapat diindikasikan bahwa Isolat 19B19-A1 merupakan spesies *Streptomyces tritolerans* dengan kemiripan sebesar 99,41%. 16S rRNA sekuen gen isolat 19B19-A1 telah terdaftar di Genbank dengan nomor akses LC682288. Pada penelitian ini dilakukan fermentasi padat dengan menggunakan serbuk kulit udang sebagai media. Fermentasi dilakukan selama 14 hari dengan pengamatan setiap 2 hari. Aktivitas kitinase diuji menggunakan spektrofotometer UV-vis dengan metode DNS, diperoleh aktivitas kitinase terbesar pada waktu inkubasi hari ke-12 dengan nilai sebesar 0,053 U/mL. Produk degradasi kulit udang dianalisis menggunakan spektrofotometer UV-vis dan HPLC. Berdasarkan hasil analisis menggunakan spektrofotometer UV-vis diperoleh glukosamin tertinggi pada waktu inkubasi hari ke-12 dengan konsentrasi sebesar 0,619 mg/mL, sedangkan berdasarkan hasil analisis menggunakan HPLC diperoleh glukosamin tertinggi pada waktu inkubasi hari ke-14 dengan konsentrasi sebesar 1,458 mg/mL.

Kata kunci: Kulit udang, Kitinase, *Actinomyces*, Glukosamin.

ABSTRACT

OPTIMUM INCUBATION TIME OF *ACTINOMYCETES* ISOLATE 19B19-A1 (*Streptomyces tritolerans*) ON SHRIMP SHELL POWDER MEDIUM

BY

SARAS KHAIRANI RACHMAWATI

Chitinase enzyme is an enzyme that can degrade chitin by breaking β -1,4-glycosidic bonds in chitin to produce N-Acetylglucosamine monomers and oligomers. *Actinomycetes* is one of the microorganisms that have abilities of chitinolytic. This study aimed to obtain the optimum incubation time of *Actinomycetes* in degrading shrimp shells into glucosamine. The *Actinomycetes* isolate used was obtained from the UPT LTSIT deposit, University of Lampung, which was isolated from marine biota in the waters of Gorontalo, Indonesia. Screening of 6 isolates *Actinomycetes*, isolate 19B19-A1 was the isolate that had the largest chitinolytic index value with a value of 1.328. Identified the morphology of the isolates by macroscopic, microscopic and phylogenetic analysis. Based on the phylogenetic results, it can be indicated that isolate 19B19-A1 is a species of *Streptomyces tritolerans* with a similarity 99.41%. 16S rRNA gene sequence isolate 19B19-A1 was registered at Genbank with access number LC682288. In this study, solid fermentation was carried out using shrimp shell powder as a medium. Fermentation was carried out for 14 days with observations every 2 days. Chitinase activity was tested using a UV-vis spectrophotometer with the DNS method, the highest chitinase activity was obtained on the 12th day of incubation with a value of 0.053 U/mL. Shrimp shell degradation products were analyzed using spectrophotometer UV-vis and HPLC. Based on the analysis using spectrophotometer UV-vis, the highest glucosamine was obtained on the 12th day of incubation with a concentration of 0.619 mg/mL, while based on the results of the analysis using HPLC, the highest glucosamine was obtained on the 14th day of incubation with a concentration of 1.458 mg/mL.

Key words: Shrimp shell, Chitinase, *Actinomycetes*, Glucosamine.

**WAKTU INKUBASI OPTIMUM *ACTINOMYCETES* ISOLAT 19B19-A1
(*Streptomyces tritolerans*) PADA MEDIA SERBUK KULIT UDANG**

Oleh

SARAS KHAIRANI RACHMAWATI

Skripsi

**Sebagai salah satu syarat untuk mencapai gelar
SARJANA SAINS**

Pada

**Jurusan Kimia
Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam**



**JURUSAN KIMIA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS LAMPUNG
2022**

Judul Penelitian : **WAKTU INKUBASI OPTIMUM**
Actinomyces ISOLAT 19B19-A1 (*Streptomyces*
tritolerans) PADA MEDIA SERBUK KULIT
UDANG

Nama Mahasiswa : **Saras Khairani Rachmawati**


Nomor Pokok Mahasiswa : 1717011074


Program Studi : Kimia

Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

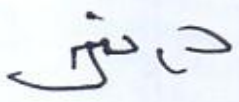
MENYETUJUI

1. Komisi Pembimbing


Prof. Joni Hendri, Ph.D.
NIP. 19581021198703001


Andi Setiawan, M.Sc., Ph.D.
NIP. 195809221988111001

2. Ketua Jurusan Kimia FMIPA


Mulyono, Ph.D.
NIP. 197406112000031002

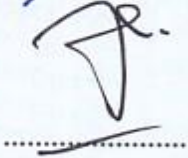
MENGESAHKAN

1. Tim Penguji

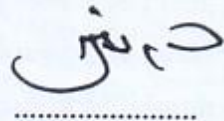
Ketua : Prof. John Hendri, Ph.D



Sekretaris : Andi Setiawan, M.Sc., Ph.D.



Penguji bukan pembimbing : Mulyono, Ph.D.



2. Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam



Dr. Eng. Suripto Dwi Yuwono, M.T.
NIP. 197407052000031001

Tanggal lulus ujian skripsi : 06 Agustus 2022

SURAT PERNYATAAN KEASLIAN SKRIPSI

Yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama : Saras Khairani Rachmawati
NPM : 1717011074
Jurusan : Kimia
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Perguruan Tinggi : Universitas Lampung

Dengan ini menyatakan bahwa skripsi yang berjudul “Waktu Inkubasi Optimum *Actinomyces* Isolat 19B19-A1 (*Streptomyces tritolerans*) Pada Media Serbuk Kulit Udang” ini tidak terdapat karya yang ditulis atau diterbitkan oleh orang lain, kecuali yang secara tertulis diacu dalam naskah ini sebagaimana disebutkan dalam daftar pustaka. Selanjutnya saya juga tidak keberatan jika sebagian atau seluruh data di dalam skripsi tersebut digunakan oleh dosen atau program studi untuk kepentingan publikasi, sepanjang nama saya disebutkan dan terdapat kesepakatan sebelum dilakukan publikasi.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sadar dan sebenar-benarnya untuk digunakan sebagai mestinya.

Bandar Lampung, 08 Agustus 2022
Yang menyatakan,



Saras Khairani R.
NPM. 17171011074

RIWAYAT HIDUP

Penulis bernama lengkap Saras Khairani Rachmawati dilahirkan di Bandar Lampung, pada tanggal 22 Februari 1999. Anak kedua dari dua bersaudara, putri dari pasangan Bapak Bagas Purwanto (Alm.) dan Ibu Binti Badriyah. Penulis mengawali jenjang pendidikan dari Taman Kanak-Kanak Satria Sukarame, Bandar Lampung yang diselesaikan pada tahun 2005. Penulis menyelesaikan pendidikan Sekolah Dasar di SD Al-Kautsar Bandar Lampung pada tahun 2011, kemudian melanjutkan pendidikan Sekolah Menengah Pertama di SMP Negeri 8 Bandar Lampung diselesaikan pada tahun 2014, dan melanjutkan pendidikan Sekolah Menengah Atas di SMA Negeri 5 Bandar Lampung diselesaikan pada tahun 2017. Pada tahun 2017, penulis diterima sebagai mahasiswa Jurusan Kimia FMIPA Universitas Lampung melalui jalur Seleksi Bersama Masuk Perguruan Tinggi Negeri (SBMPTN) yang diselesaikan pada tahun 2022.

Selama di perguruan tinggi, penulis pernah bergabung dalam bidang organisasi kemahasiswaan, sebagai Kader Muda Himpunan Mahasiswa Kimia (KAMI) periode 2017, dan kemudian menjadi anggota Bidang Sains dan Penalaran Ilmu Kimia Himpunan Mahasiswa Kimia (HIMAKI) serta anggota Bidang Kajian dan Keumatan Rois FMIPA Unila periode 2018. Pada periode 2019, penulis pernah menjabat sebagai Sekertaris Bidang Kajian dan Keumatan Rois FMIPA Unila. Pada periode 2020, penulis pernah menjabat sebagai Sekretaris Komisi II (Keuangan) DPM FMIPA Unila.

Penulis melaksanakan Kuliah Kerja Nyata (KKN) pada bulan Januari-Februari 2020 di Desa Suka Maju, Kecamatan Abung Tinggi, Kabupaten Lampung Utara. Pada tahun 2020, penulis menyelesaikan Praktik Kerja Lapangan (PKL) di Laboratorium Biopolimer, Universitas Lampung dengan judul “Isolasi dan Karakterisasi Kitin Kitosan Dari Cangkang Kepiting dengan Menggunakan *Fourier Transform Infrared* dan *Difference Scanning Calorimetry*”. Penulis

menjadi penerima Beasiswa Peningkatan Prestasi Akademik (PPA) pada tahun 2019 dan Beasiswa Adaro Foundation pada tahun 2020.

MOTTO

“Sungguh, atas kehendak Allah, semua ini terwujud, tidak ada kekuatan kecuali dengan (pertolongan) Allah.”
(Al-Kahf : 39)

“Dan mohonlah pertolongan (kepada Allah) dengan sabar dan sholat.”
(Al-Baqarah : 45)

“Sesungguhnya bersama kesulitan ada kemudahan.”
(Al-Insyirah : 6)

“Dan bahwa manusia hanya memperoleh apa yang telah diusahakannya.”
(An-Najm: 39)

“Pendidikan bukanlah sekedar meraih gelar atau mendapat ijazah, tapi mendidik karakter kita. Pembentukan mental yang jujur dan komitmen yang kuat untuk senantiasa berjalan di alur yang lurus adalah tujuan utama kita belajar”
(Ahmad Rifa'i Rif'an)

“Bahwa tak ada alasan bosan menjalankan peran, hanya karena mengulangi siklus yang sama setiap hari. Tugas kita, hanya menyibukkan diri mengabdikan dan memberi. Berusaha menjalankan peran terbaik yang Allah beri, hingga Allah sudahi masa kita di bumi”
(Farah Qoonita)

“The best way of learning about anything is by doing”
(Richard Branson)

PERSEMBAHAN

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

“Dengan menyebut nama Allah yang Maha Pengasih lagi Maha Penyayang”

Dengan segala rasa syukur, kupersembahkan karya ini kepada:

*Kedua orangtuaku tercinta,
Bapak Bagas Purwanto (Alm.) dan Ibu Binti Badriyah yang telah
menghantarkan penulis sampai tahap ini. Terima kasih banyak atas kasih
sayang, segala doa, motivasi, perhatian, serta dukungan yang tiada henti
diberikan. Sehingga karya ini dapat terselesaikan.*

*Saudaraku,
M. Rasyid Ramdhani yang telah memberikan do'a, semangat, dan bantuannya
kepada penulis.*

*Segala rasa hormat kepada,
Bapak Prof. John Hendri, Ph.D., Bapak Andi Setiawan, M.Sc., Ph.D., Bapak
Mulyono, Ph.D., Ibu Dr. Yuli Ambarwati, M.Si., serta seluruh dosen atas
segala ilmu dan bimbingan yang telah diberikan.*

*Seluruh sahabat dan temanku yang selalu memberi semangat, bantuan dan
keceriaan kepada penulis.*

Almamater yang kubanggakan Universitas Lampung.

SANWACANA

Bismillahirrahmanirrahim. Alhamdulillahirabbil'alamin. Puji syukur kehadiran Allah *subhanahu wata'ala* atas rahmat serta karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “**Waktu Inkubasi Optimum *Actinomyces* Isolat 19B19-A1 (*Streptomyces tritolerans*) Pada Media Serbuk Kulit Udang**” sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Sains di Universitas Lampung.

Dalam penulisan skripsi ini tidak terlepas dari segala dukungan dan bantuan dari berbagai pihak. Pada kesempatan ini penulis mengucapkan terima kasih yang teramat besar kepada:

1. Bapak dan Ibu dengan cinta dan kasih sayangnya yang selalu mendoakan, berkorban, memberi kekuatan, nasihat, dukungan serta mendengarkan keluh kesah, sesuatu yang sangat berharga bagi penulis. Semoga Allah *subhanahu wata'ala* membalas segala kebaikan Bapak dan Ibu, serta dilindungi baik di dunia dan akhirat.
2. Mas M. Rasyid Ramdhani dan Mba Elsa Dewi yang memberikan doa, dukungan, dan bantuan kepada penulis. Semoga Allah *subhanahu wata'ala* senantiasa melindungi kalian.
3. Keluarga besarku baik dari Ibu maupun Bapak. Terima kasih atas doa, dukungan, dan seluruh bantuannya selama ini.
4. Bapak Prof. John Hendri, Ph.D. selaku pembimbing I yang telah memberi bimbingan, ilmu, inspirasi, nasihat, motivasi, dan saran. Serta telah meluangkan waktu, pikiran, tenaga, dan kesabaran kepada penulis selama masa penelitian hingga selesainya penyusunan skripsi ini. Semoga Allah *subhanahu wata'ala* senantiasa membalas segala kebaikan Bapak.
5. Bapak Andi Setiawan, M.Sc., Ph.D. selaku pembimbing II yang telah memberikan ilmu, wawasan, saran, nasihat, arahan, serta telah meluangkan

waktu dalam membimbing dan memberi koreksi sehingga skripsi ini dapat terselesaikan. Semoga Allah *subhanahu wata'ala* senantiasa membalas segala kebaikan Bapak.

6. Bapak Mulyono, Ph.D. selaku pembahas sekaligus ketua Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Lampung yang telah meluangkan waktunya, memberikan ilmu, motivasi dan saran yang membangun kepada penulis dalam penyusunan skripsi ini. Semoga Allah *subhanahu wata'ala* senantiasa membalas segala kebaikan Bapak.
7. Ibu Dr. Yuli Ambarwati, M.Si. selaku pembimbing akademik yang telah memberikan nasihat, bimbingan, dan motivasi selama perkuliahan kepada penulis. Semoga Allah *subhanahu wata'ala* senantiasa membalas segala kebaikan Ibu.
8. Bapak Wawan A. Setiawan, M.Si. selaku kepala Laboratorium Biomolekuler UPT LTSIT yang telah memberikan bimbingan, ilmu dan bantuan kepada penulis dalam menyelesaikan skripsi ini. Semoga Allah *subhanahu wata'ala* senantiasa membalas segala kebaikan Bapak.
9. Bapak Dr. Eng. Suropto Dwi Yuwono, M.T. selaku dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Lampung.
10. Bapak dan Ibu dosen Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Lampung yang telah mendidik serta memberikan ilmu, pengalaman, saran, dan motivasi kepada penulis selama menjadi mahasiswa.
11. Seluruh karyawan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam atas waktu yang diluangkan serta pelayanan yang telah diberikan selama proses perkuliahan.
12. Pembimbing di laboratorium yaitu Mba Nafila Khansa Salsabila, S.Si. dan Kak Fendi Setiawan, M.Si. Terima kasih telah membimbing, meluangkan waktu, tenaga, pikiran, kesabaran, dan bantuan selama penulis melakukan penelitian.
13. Partner penelitianku "Anak Bapak Ibu": Mba Widyastuti, M.Si., Kak Ridho Nahrowi, M.Si., Rana Aprilia Rinjani, Mba Annisa Gabreliyan, M. Rizky Fadhilah, Ikromuddin dan Della Lestari. Terima kasih atas kerjasama,

motivasi, kekompakan, kebahagiaan, dan saling menyemangati sejak awal penulis memasuki Laboratorium Biopolimer, walaupun banyak rintangan namun tetap berjuang bersama untuk menyelesaikan amanah ini.

14. “Partner Penelitian UPT LTSIT” yaitu Kak Arik Irawan, M.Si, Mba Tya Gita Putri U., M.Si., Mba Annisa Elcentia, S.Si., Mba Rosyidatul Lutfiah, M.Si., Mba Zahra Khairani, S.Si, Mega Muryani, Reyzka Aulia W., Nia Kurniasih, Merriezka Ismaini, Anisya Reika A., Siti Aisah, Wulandari, Larasati Gadis E., Indra Prasetya, Lanang Rachmadi, dan Chasya Al Afandy. Terima kasih atas kerjasama, bantuan, keceriaan, saling menyemangati, dan berbagi keluh kesah selama penelitian berlangsung.
15. “Sobat Ambyar” yaitu Mia Triska Ambarwati, Syahdilla Anggiva Akhni R., Melisa Sari, Anindita Nur Rachmi, Putri Mawardita P., dan Melly Ratna Sari. Terima kasih telah mendoakan, memberikan dukungan, keceriaan, pengertian, dan semangat kepada penulis.
16. “Sobat Pejuang Toga” yaitu Alya Rahmatina Salsabilla, Arifa Rahmatika Salsabilla, Najma Firdausi dan Nurul Rosadinah. Terima kasih sudah menjadi pendengar segala cerita, tempat bertukar pikiran, serta memberikan doa, bantuan, kebahagiaan, semangat, pengertian, saran kepada penulis.
17. “Teman Terang” yaitu Firyal Humaira Arif, Nurbaiti, Valennisa Qunifah, Mia Saputri Krisentiana, Innama Trina, Kadek Suprajaya, dan Jeremia Christian. Terima kasih telah memberikan doa, ilmu, motivasi, dan bantuan, kepada penulis.
18. Kepengurusan HIMAKI FMIPA Unila periode 2018, Rois FMIPA Unila periode 2018 dan 2019, serta DPM FMIPA Unila periode 2020. Terimakasih atas segala kebersamaan, pengalaman, ilmu, kerjasama dan kenangan kepada penulis.
19. Teman-teman dan kakak-kakak di Laboratorium Biopolimer dan UPT LTSIT atas ilmu, kerja sama, bantuan, serta pengalaman selama penelitian berlangsung.
20. Seluruh teman-teman kimia angkatan 2017 atas bantuan, dan kebersamaannya selama masa perkuliahan.

21. Kakak tingkat dan adik tingkat yang telah menambah pertemanan dan memberikan pengalaman kepada penulis.
22. Teman KKN Desa Sukamaju : Mba Putri Dwi Septiani, Riski Wahyuni, Raisha Rahmani R., Tomi Fadlanul K., Zareva dan Pandu M. Ridho. Terimakasih atas pengalaman hidup yang kalian berikan.
23. Semua pihak yang tidak dapat penulis sebutkan satu persatu yang telah memberikan bantuan kepada penulis.

Penulis menyadari bahwa skripsi ini masih terdapat banyak kekurangan, tetapi penulis berharap skripsi ini dapat bermanfaat bagi pembacanya.

Bandar Lampung, 08 Agustus 2022

Penulis,

Saras Khairani Rachmawati

DAFTAR ISI

	Halaman
DAFTAR TABEL	iii
DAFTAR GAMBAR.....	iv
I. PENDAHULUAN	1
1.1. Latar Belakang	1
1.2. Tujuan Penelitian.....	2
1.3. Manfaat Penelitian.....	2
II. TINJAUAN PUSTAKA	3
2.1. Perairan Gorontalo	3
2.2. Biota Laut	3
2.2.1 Spons	3
2.2.2 <i>Tunicate</i>	4
2.3. <i>Actinomycetes</i>	5
2.4. Kulit Udang	6
2.5. Kitin	8
2.6. Enzim	9
2.7. Enzim Kitinase	10
2.7.1. Deskripsi Enzim Kitinase	10
2.7.2. Sumber Enzim Kitinase	11
2.8. Glukosamin	13
2.9. Fermentasi Padat	13
2.10. <i>Scanning Electron Microscopy</i> (SEM).....	14
2.11. Spektrofotometri UV-vis	14
2.12. <i>High Performance Liquid Chromathography</i> (HPLC)	15
2.13. Analisis DNA	16
III. METODE PENELITIAN	18
3.1 Waktu dan Tempat	18
3.2 Alat dan Bahan	18
3.3 Prosedur Penelitian.....	19
3.3.1 Persiapan Kulit Udang.....	19
3.3.2 Isolasi Kitin	19
3.3.3 Pembuatan Koloid Kitin	19
3.3.4 Deposit Isolat <i>Actinomycetes</i>	20
3.3.5 Penapisan dan Peremajaan Isolat <i>Actinomycetes</i>	20
3.3.6 Identifikasi Morfologi Isolat <i>Actinomycetes</i> 19B19-A1.....	21
3.3.7 Analisis DNA Isolat <i>Actinomycetes</i> 19B19-A1	21

3.3.8	Pembuatan Inokulum Isolat <i>Actinomyces</i> 19B19-A1	22
3.3.9	Fermentasi Padat Media Serbuk Kulit Udang	22
3.3.10	Uji Aktivitas Enzim dan Konsentrasi Glukosamin Menggunakan Spektrofotometer UV-vis	22
3.3.11.	Analisis Glukosamin Menggunakan <i>High Performance Liquid Chromathography</i> (HPLC).....	23
IV.	HASIL DAN PEMBAHASAN.....	24
4.1.	Persiapan Kulit Udang	24
4.2.	Isolasi Kitin	24
4.3.	Karakterisasi Kitin Menggunakan <i>Fourier Transform Infra Red</i> (FTIR).26	
4.4.	Pembuatan Koloid Kitin.....	28
4.5.	Penapisan Isolat <i>Actinomyces</i>	29
4.6.	Peremajaan Isolat <i>Actinomyces</i> 19B19-A1	31
4.7.	Identifikasi Morfologi Isolat <i>Actinomyces</i> 19B19-A1	32
4.8.	Analisis DNA Isolat <i>Actinomyces</i> 19B19-A1	34
4.9.	Pertumbuhan Inokulum Isolat 19B19-A1 (<i>S. tritolerans</i>).....	35
4.10.	Fermentasi Padat Media Serbuk Kulit Udang.....	35
4.11.	Uji Aktivitas Unit Enzim Kitinase Menggunakan Spektrofotometer UV-vis	37
4.12.	Uji Konsentrasi Glukosamin Menggunakan Spektrofotometer UV-vis ..	38
4.13.	Analisis Glukosamin Menggunakan <i>High Performance Liquid Chromathography</i> (HPLC)	40
V.	KESIMPULAN DAN SARAN	45
5.1.	Kesimpulan	45
5.2.	Saran.....	45
DAFTAR PUSTAKA.....		46
LAMPIRAN.....		58

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Indeks kitinolitik isolat <i>Actinomycetes</i> Gorontalo	31
2. Intensitas glukosamin isolat 19B19-A1 (<i>S. tolerans</i>)	43
3. Absorbansi standar glukosamin	61
4. Nilai aktivitas kitinase isolat 19B19-A1 (<i>S. tolerans</i>)	62
5. Nilai konsentrasi glukosamin isolat 19B19-A1 (<i>S. tolerans</i>)	63

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Tipe struktur rantai spora <i>Actinomycetes</i>	6
2. Struktur kitin	8
3. Struktur polimorfik kitin.	9
4. Struktur glukosamin.....	13
5. Diagram alat spektrofotometer UV-vis.....	15
6. Filtrat hasil demineralisasi	25
7. Filtrat hasil deproteinasi.....	25
8. Kitin hasil isolasi.....	26
9. Spektrum infamerah (a) Kitin standar (b) Kitin isolasi (c) Kulit udang	27
10. Koloid kitin	29
11. Zona bening isolat	30
12. Hasil peremajaan isolat 19B19-A1 pada hari ke-7	31
13. Rantai spora : (a) Rantai spora isolat 19B19-A1 (b) Perbedaan tipe rantai spora yang dihasilkan <i>Actinomycetes</i>	32
14. Hasil SEM (<i>Scanning Electron Microscope</i>) isolat 19B19-A1 pertumbuhan hari ke 21 (a) Perbesaran 3.000x (b) Perbesaran 10.000x (c) Perbedaan tipe spora <i>Streptomyces</i>	33
15. Inokulum pada media koloid kitin	35
16. Fermentasi padat media serbuk kulit udang.....	36
17. Kurva aktivitas unit kitinase isolat 19B19-A1 (<i>S. tritolerans</i>)	38
18. Reaksi DNS dengan gula pereduksi.....	39
19. Grafik konsentrasi glukosamin isolat 19B19-A1 (<i>S. tritolerans</i>)	39
20. Kromatogram HPLC (a) Standar glukosamin, (b) Inkubasi hari ke-2, (c) Inkubasi hari ke-4, (d) Inkubasi hari ke-6, (e) Inkubasi hari ke-8, (f) Inkubasi hari ke-10, (g) Inkubasi hari ke-12 dan (h) Inkubasi hari ke-14.....	41

I. PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Permintaan glukosamin dan turunannya terus meningkat setiap tahunnya. Glukosamin dan turunannya sangat diminati karena dapat digunakan dalam berbagai aplikasi seperti suplemen, obat, dan bahan kosmetik. Glukosamin dapat diproduksi melalui beberapa cara diantaranya secara kimia, fisik, fermentasi mikroba, enzimatik, metode pengolahan rekombinan, dan kombinasinya telah dilaporkan menghasilkan glukosamin dari kitin dan kitosan yang berasal dari tumbuhan, hewan serta mikroorganisme (Soni *et al.*, 2021).

Salah satu sumber kitin yang melimpah ialah kulit udang. Menurut Yan and Chen, (2015) kulit udang mengandung kitin sebanyak 15 - 40%. Banyak penelitian yang telah dilaporkan mengenai produksi glukosamin menggunakan limbah kulit udang, akan tetapi proses produksi tersebut menggunakan asam kuat seperti asam klorida dan asam sulfat (Mojarrad *et al.*, 2007). Hal tersebut sangat tidak ramah lingkungan dan membutuhkan biaya yang mahal. Salah satu alternatif yang dapat digunakan ialah enzim kitinase. Enzim kitinase dapat mendegradasi kitin dengan memutus ikatan 1,4 β -glikosidik dalam kitin untuk menghasilkan monomer dan oligomer N-Asetilglukosamin (Howard *et al.*, 2003). N-asetilglukosamin dapat terhidrolisis menjadi senyawa yang lebih sederhana, salah satunya ialah glukosamin. *Actinomyces* dilaporkan menjadi mikroorganisme yang dapat mendegradasi kitin dengan bantuan enzim kitinase (Brzezinska *et al.*, 2013). Beberapa jenis *Actinomyces* yang produktif dalam menghasilkan kitinase diantaranya *Microbispora*, *Saccharothrix* dan *Streptomyces* yang berasal dari genera mesofilik serta *Thermobifida* dan *Streptosporangium* yang berasal dari genera termofilik (Dhole *et al.*, 2021; Mathew *et al.*, 2021).

Aisyah (2016) telah melakukan penelitian terhadap isolat ANL-4 dan berhasil memperoleh rendemen glukosamin tertinggi yaitu sebesar 0,196 mg/mL dengan kadar 19,64% pada waktu inkubasi 24 jam. Penelitian selanjutnya, Salsabila (2020) memperoleh glukosamin pada waktu inkubasi 21 hari dari isolat 18D36A1 sebesar 0,924 mg/mL, sedangkan dari 18D36A2 diperoleh glukosamin sebesar 0,891 mg/mL pada waktu inkubasi 7 hari. Pada penelitian ini dilakukan penentuan waktu inkubasi optimum terhadap *Actinomycetes* sampel Gorontalo yang memiliki indeks kitinolitik terbesar, serta mampu mendegradasi kitin menjadi glukosamin.

1.2. Tujuan Penelitian

Adapun tujuan dilakukannya penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Untuk memperoleh isolat *Actinomycetes* yang mampu mendegradasi kitin menjadi glukosamin.
2. Untuk mengetahui aktivitas kitinase dari *Actinomycetes* dengan indeks kitinolitik terbesar.
3. Untuk mengetahui waktu inkubasi optimum *Actinomycetes* dalam mendegradasi kulit udang menjadi glukosamin.

1.3. Manfaat Penelitian

Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi mengenai potensi isolat 19B19-A1 (*S. tolerans*) dalam menghasilkan enzim kitinase serta dapat mendegradasi kulit udang menjadi glukosamin. Selain itu, hasil penelitian ini diharapkan dapat menjadi informasi awal untuk penelitian selanjutnya terkait bidang bioteknologi, pemanfaatan enzim, dan rekayasa genetik.

II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Perairan Gorontalo

Teluk Tomini merupakan teluk terbesar di wilayah khatulistiwa dengan luas sebesar ± 6 juta hektar. Sebelah timur Teluk Tomini berbatasan dengan Laut Maluku, sedangkan sebelah timur laut berbatasan dengan Laut Sulawesi. Teluk Tomini menjadi bagian dari *Coral Triangle* karena memiliki keanekaragaman terumbu karang tertinggi (Muzakir and Suparman, 2016).

Teluk Tomini memiliki potensi sumber daya perikanan, keanekaragaman hayati biota laut dan darat, yang tersebar hampir di seluruh kabupaten di Sulawesi Utara, Gorontalo, dan Sulawesi Tengah karena daerah ini dilintasi oleh garis khatulistiwa. Terdapat 1.031 hektar kawasan terumbu karang. Selain itu terdapat pula potensi lain sumber daya hayati laut yang dapat dikembangkan seperti ekstraksi senyawa bioaktif (hasil alam), biopolimer, dan lainnya yang berasal dari makroalga (rumput laut), mikroalga (fitoplankton), mikroorganisme, dan invertebrata untuk dimanfaatkan dalam obat, makanan, kosmetik, serta industri berbasis bioteknologi lainnya (Akib *et al.*, 2021).

2.2. Biota Laut

2.2.1 Spons

Spons adalah metazoa purba yang telah ada sejak 700–800 juta tahun lalu. Spons termasuk kedalam filum porifera. Wilayah hidup mereka di lautan tropis, perairan beriklim sedang dan air tawar (Hentschel *et al.*, 2002 ; Radjasa *et al.*, 2007). Spons laut tersebar luas dari zona intertidal hingga kedalaman ribuan meter dalam laut (Fusetani *et al.*, 1993). Umumnya spons terbagi menjadi tiga kelas yaitu, *Calcarea* (5 ordo dan 24 famili), *Demospongiae* (15 ordo dan 92 famili) dan

Hexactinellida (6 ordo dan 20 famili). Sejauh ini telah ditemukan 15.000 spesies sponge, tetapi sebenarnya keanekaragaman mereka sangatlah tinggi (Fieseler *et al.*, 2004)

Spons telah dipelajari lebih lanjut untuk mengeksplor keragaman mereka dan potensi dalam pengembangan obat-obatan. Setiap tahun dilaporkan bahwa lebih dari 200 metabolit baru berasal dari spons. Spons menjadi hal yang menarik karena dua faktor. Pertama, spons dapat berasosiasi dengan berbagai mikroorganisme. Kedua, spons menjadi sumber metabolit sekunder (Taylor *et al.*, 2007). Pada bagian mesohil spons banyak terdapat mikroba, termasuk jamur, bakteri, virus, dan archaea, hingga mencapai 50% dari biomassa spons (Webster *et al.*, 2001). Terdapat beberapa 14 filum bakteri yang dapat berasosiasi dengan spons, diantaranya *Acidobacteria*, *Bacteroidetes*, *Cyanobacteria*, *Firmicutes*, *Chloroflexi*, *Gemmatimonadetes*, *Deinococcus-Thermus*, *Planctomycetes*, *Nitrospira*, *Proteobacteria* (Alfa, Beta, Delta, dan *Gammaproteobacteria*), *Poribacteria*, *Spirochaetes*, *Verrucomicrobia* dan *Actinobacteria* (Taylor *et al.*, 2007).

2.2.2 Tunicate

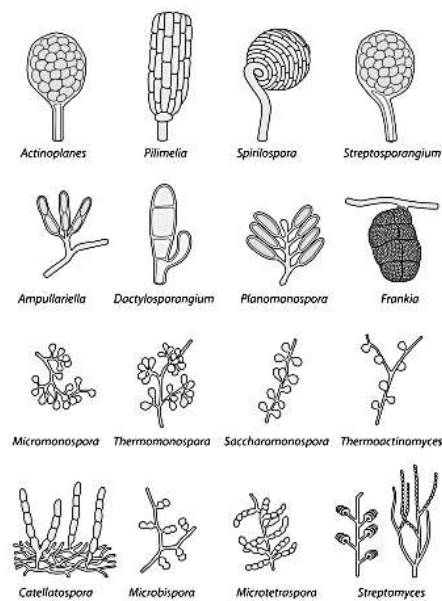
Tunicate atau yang sering dikenal *Urochordate*, adalah subfilum yang sangat beragam dari *Chordata*. Mereka disebut *Tunicate* karena adanya zooid yang terbungkus dalam selubung ekstraseluler *Tunicate* menempati habitat mulai dari perairan dangkal, hingga dekat pantai ke laut terbuka dan dalam laut. *Tunicate* dapat bereproduksi secara seksual dan aseksual. *Tunicate* dibagi menjadi tiga kelas yaitu *Ascidacea*, *Appendicularia* dan *Thaliacea*. Menurut para ahli terdapat 2000 spesies *Ascidian*, sekitar 20 spesies *Appendicularia* dan 72 spesies *Thaliacea* (Holland, 2016). Di dalam laut, *Tunicate* hidup berasosiasi dengan makhluk hidup lainnya seperti fungi dan bakteri. Terdapat beberapa jenis bakteri yang berasosiasi dengan *Tunicate* diantaranya yaitu *Bacillus*, *Pseudoalteromonas*, *Pantoea*, *Salinicola*, *Streptomyces*, *Virgibacillus* dan *Vibrio* (Ayuningrum *et al.*, 2019)

2.3. *Actinomycetes*

Actinomycetes adalah mikroorganisme berfilamen gram positif yang di dalam DNANYa terkandung guanin dan sitosin yang tinggi (Ventura *et al.*, 2007). *Actinomycetes* memiliki ciri-ciri seperti bakteri dan jamur. Namun, saat ini mereka umumnya dianggap lebih erat kaitannya dengan bakteri. Komposisi kimia dari dinding sel mereka mirip dengan bakteri gram positif, tetapi karena morfologis (hifa) dan karakteristik kultural yang terus berkembang maka *Actinomycetes* telah dianggap sebagai kelompok baru dan dipisahkan dari bakteri lainnya (Barka *et al.*, 2016).

Actinomycetes mewakili salah satu unit taksonomi terbesar di antara 18 garis keturunan utama yang saat ini diakui dalam domain bakteri, terbagi dalam 5 sub kelas, 6 ordo, dan 14 sub ordo (Ludwig *et al.*, 2012). *Actinomycetes* hidup di berbagai lingkungan, pada tanah atau akuatik (misalnya, *Streptomyces*, *Micromonospora*, *Rhodococcus*, dan *Salinispora*), simbiosis dengan tanaman (misalnya, *Frankia* spp.), patogen tumbuhan atau hewan (misalnya, *Corynebacterium*, *Mycobacterium*, atau *Nocardia*) (Barka *et al.*, 2016).

Actinomycetes dengan miselia utama yang biasanya diproduksi dengan cara membentuk spora aseksual. *Actinomycetes* memiliki berbagai macam morfologi, hal ini berdasarkan dengan ada atau tidak adanya miselium substrat atau miselium aerial, warna miselium, produksi pigmen melanoid, dan struktur rantai spora mereka. Pada **Gambar 1** menunjukkan adanya perbedaan tipe struktur rantai spora *Actinomycetes* (Barka *et al.*, 2016).



Gambar 1. Tipe struktur rantai spora *Actinomycetes*.

Actinomycetes memiliki peran penting dalam daur ulang karbon terutama dalam hal solubilisasi dinding sel tanaman dan jamur, serta kutikula serangga dan cangkang krustasea (Chater, 2016). Mereka menghasilkan berbagai macam protein ekstraseluler yang mewakili sumber enzim untuk keperluan industri (Mukhtar *et al.*, 2017).

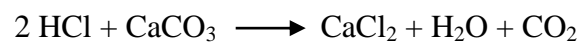
2.4. Kulit Udang

Menurut Mao *et al.* (2017), setiap tahunnya 6–8 juta ton limbah krustasea dihasilkan. Bagian kepala, cangkang, dan ekor udang dibuang sebagai produk sampingan. Kulit udang dapat dimanfaatkan menjadi produk yang memiliki nilai jual seperti kitin, kitosan, *edible coating*, produksi enzim dan diolah menjadi suatu produk mono-, di-, dan oligo-sakarida oleh mikroorganisme pendegradasi kitin (Halder *et al.*, 2013 ; Sorokulova *et al.*, 2009 ; Wang *et al.*, 2012).

Cangkang krustasea merupakan sumber alami kitin karena terdiri dari: (30–50%) kalsium karbonat, (30–40%) protein, (20–30%) kitin, dan pigmen lainnya seperti

astaxanthin, b-karoten, canthaxanthin, lutein (Aranaz *et al.*, 2009). Pada jaringan rangka, kitin bergabung dengan protein membentuk protein kitin matriks dikalsifikasi untuk menghasilkan cangkang keras (Younes and Rinaudo, 2015). Pada cangkang krustasea terdapat juga karotenoid dari astaxanthin dan lipid dari sisa daging (Ambati *et al.*, 2014). Untuk memperoleh biopolimer dengan kemurnian yang tinggi maka berbagai molekul perlu ini dihilangkan. Terdapat dua cara, yaitu secara biologi dan kimia. Ekstraksi secara biologi menggunakan enzim proteolitik atau dapat juga menggunakan mikroba (Arbia *et al.*, 2016). Sedangkan secara kimia, dapat menggunakan asam dan basa untuk menghilangkan mineral dan protein yang ada (Al-Sagheer *et al.*, 2009).

Tahap demineralisasi merupakan tahap penghilangan mineral terutama kalsium karbonat. Umumnya tahap demineralisasi menggunakan larutan asam, seperti HCl, H₂SO₄, HNO₃, HCOOH dan CH₃COOH, di antara berbagai macam asam ini, asam klorida encer menjadi larutan yang sering dipakai dalam tahap demineralisasi. Demineralisasi mudah dicapai karena terjadi dekomposisi kalsium karbonat menjadi garam kalsium yang larut dalam air dengan pelepasan karbon dioksida. Persamaan reaksi antara asam klorida dengan kalsium karbonat:

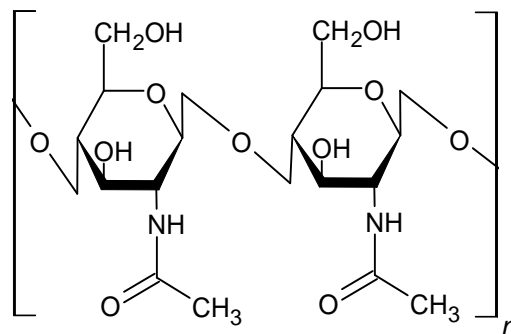


Mineral yang terdapat dalam kutikula udang bereaksi dengan asam menghasilkan garam. Kemudian, garam dapat dengan mudah dipisahkan dengan cara penyaringan padatan kitin dan diikuti dengan pencucian menggunakan air deionisasi. Proses demineralisasi sangat bergantung pada waktu ekstraksi, suhu, jumlah mineral pada udang, ukuran partikel, konsentrasi asam dan rasio zat terlarut/pelarut. Konsentrasi asam sangat berpengaruh, karena untuk mengubah satu molekul kalsium karbonat menjadi kalsium klorida dibutuhkan dua molekul HCl. Agar reaksi sempurna, maka jumlah asam harus sama dengan jumlah stoikiometri mineral, atau bahkan lebih besar (Johnson and Peniston, 1982; Shahidi and Synowiecki, 1991).

Deproteinasi merupakan tahap pemutusan ikatan kimia antara protein dengan kitin. Bahan yang dapat digunakan dalam proses deproteinasi diantaranya ialah NaOH, Na₂CO₃, Na₂SO₃, NaHCO₃, NaHSO₃, Na₃PO₄, Na₂S, KOH, K₂CO₃, Ca(OH)₂, dan CaHSO₃. NaOH menjadi larutan yang sering digunakan dalam proses deproteinasi dengan konsentrasi antara 0,125 hingga 5,0 M pada temperatur yang bervariasi, suhu tertinggi pada 160°C. Penggunaan NaOH menghasilkan deasetilasi parsial pada kitin dan hidrolisis biopolimer yang dapat menurunkan berat molekulnya.

2.5. Kitin

Kitin merupakan polimer linier dari β-1, 4-N-Asetilglukosamin (GlcNAc). Kitin menjadi biopolimer kedua yang paling melimpah di bumi (Shahidi and Abozaytoun, 2005). Kitin banyak ditemukan di skeleton serangga, jamur, ragi, ganggang, kepiting, udang, dan lobster, dan di struktur internal invertebrata lainnya (Bhattachrya *et al.*, 2007).

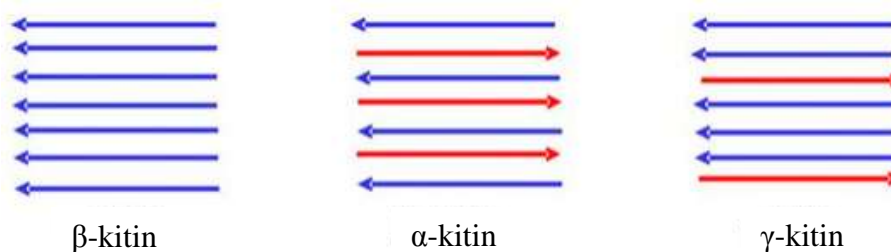


Gambar 2. Struktur kitin (Abidin *et al.*, 2020).

Kitin memiliki kegunaan di berbagai aplikasi diantaranya untuk meningkatkan pembentukan kitinase ekstraseluler, proses penyembuhan luka, serat makanan, dan pengolahan air limbah (Muzzarelli, 1999). Kitin berwarna putih, keras, tidak larut dalam air, dan inelastik (Mutreja *et al.*, 2020). Kitin memiliki persentase

nitrogen yang tinggi (6,89%), yang dapat berguna menjadi agen pengkhelet (Muzzarelli, 1997).

Terdapat 3 struktur kristal kitin diantaranya, α , β , dan γ , kitin yang berbeda pada jumlah rantai per sel, ukuran unit dan tingkat hidrasi. Perbedaan struktur kitin dapat dilihat pada **Gambar 3**. α -chitin adalah bentuk yang paling berlimpah, ditemukan dalam eksoskeleton arthropoda, terdapat pada posisi rantai polimer adalah anti-paralel. Pada β -chitin, disposisinya paralel dan mereka ditemukan pada hewan yang fleksibel, seperti cumi-cumi. γ -chitin menunjukkan adanya campuran kedua posisi (Mehrabani *et al.*, 2018 ; Ru *et al.*, 2019).



Gambar 3. Struktur polimorfik kitin (Santos *et al.*, 2020).

Kitin dapat didegradasi oleh kitinase. Katabolisme kitin terjadi dalam 2 langkah, yang melibatkan pemotongan awal polimer kitin oleh kitinase menjadi oligosakarida kitin dan pemotongan lebih lanjut menjadi N-asetilglukosamin, dan monosakarida oleh kitobiase (Suginta *et al.*, 2000).

Sifat kitin yang tidak larut serta sulit dipisahkan dari bahan yang telah terikat membuat pemanfaatan kitin menjadi terbatas. Sehingga kitin perlu diubah terlebih dahulu menjadi produk turunannya (Hendri dan Laila, 2013).

2.6. Enzim

Enzim merupakan biokatalis yang dapat mempercepat suatu reaksi biokimia yang terjadi dalam makhluk hidup. Enzim dapat diperoleh dari sel, yang kemudian

dapat digunakan untuk mengkatalisis berbagai proses penting. Sebagai katalis, enzim hanya dibutuhkan dalam konsentrasi yang rendah dan mampu mengonversi molekul substrat menjadi produk (Robinson, 2015). Aktivitas enzim bergantung pada pelipatan protein, enzim biasanya sensitif terhadap suhu, pH, dan konsentrasi garam lingkungan (Moran, 2018).

2.7. Enzim Kitinase

2.7.1. Deskripsi Enzim Kitinase

Kitinase termasuk dalam keluarga glikosil hidrolase yang mengkatalisis hidrolisis ikatan glikosidik dalam kitin. Ukuran molekul kitinase bervariasi dari 20 hingga 90 kDa (Hamid *et al.*, 2013). Kitinase masuk ke dalam keluarga 18 dan 19 dari hidrolase glikosil (Bhattacharya *et al.*, 2007). Karakteristik ini berdasarkan urutan N-terminal, lokalisasi enzim, pH isoelektrik, peptida sinyal, dan induser. Keluarga 18 berisi kitinase kelas III dan V, sedangkan keluarga 19 termasuk kitinase kelas I, II, dan IV. Kitinase diproduksi secara alami oleh berbagai organisme yaitu, jamur, bakteri, ragi, tanaman, *actinomycetes*, *arthropoda*, dan manusia (Henrissat *et al.*, 1997).

Menurut Sahai and Monacha (1993) enzim kitinase dibagi menjadi 2 kelompok utama yaitu:

Endokitinase

Endokitinase dapat membentuk multimer N-Asetilglukosamin dan dimer diasetilkitobiose dengan cara memecah kitin secara acak di bagian dalam mikrofibril kitin.

Eksokitinase

Eksokitinase dibagi menjadi 2 kategori: 1-4- β -glukosa aminidase dan kitobiosidase. 1-4- β -glukosa aminidase dapat menghasilkan monomer N-asetilglukosamin, hasil dari pembelahan produk oligomerik kitobiosidase dan

endokitinase. Kitobiosidase terlibat dalam katalisis pelepasan di-asetilkitobiose secara progresif dimulai dari ujung mikrofibril kitin non-reduksi.

2.7.2. Sumber Enzim Kitinase

Kitinase Pada Mamalia

Kitinase pada mamalia dikelompokkan ke dalam keluarga 18 dari glikosil hidrolase. Kitinase mamalia dikenal sebagai kitotriosidase. Struktur molekul kitinase mamalia menunjukkan adanya domain katalitik N-terminal yang terdiri dari lipatan isomerase triose-fosfat. Dalam kitinase mamalia, untuk menghidrolisis ikatan glikosidik β (1-4) pada kitin maka asam glutamat perlu menyumbangkan proton, sedangkan dalam kitinase yang menyerupai protein, asam glutamat bertukar dengan leusin, glutamin dan isoleusin sebagai donor proton (Bussink *et al.*, 2006). Kitinase mamalia sebagian besar telah ditelusuri lebih jauh untuk tujuan pengobatan luka, mengubah bentuk jaringan, dan pengobatan peradangan (Kzhyshkowska *et al.*, 2007).

Kitinase Pada Serangga

Kitinase serangga merupakan protein beta/alfa-barel, lembaran beta sebagian besar disusun dalam bentuk paralel (Kramer *et al.*, 2009). Jaringan epitel ektodermal seperti trakea, foregut, hindgut, dan kutikula menjadi tempat ditemukannya kitinase pada serangga (Lee *et al.*, 2011). Kitinase yang berasal dari *Manduca sexta* dan *Bombyx mori* menjadi jenis yang paling banyak dipelajari (Dean *et al.*, 2012). Karena memiliki sifat nematosida, fungisida, dan insektisida, sehingga enzim ini berpotensi digunakan dalam bidang pertanian.

Kitinase Pada Tanaman

Tanaman memiliki endokitinase pada bagian biji, bunga, batang, dan umbi yang secara acak dapat menghidrolisis internal kitin pada ikatan β -1,4, menghasilkan produksi N-Asetil glukosamin dan *Chitooligosakarida*. Kitinase dari tumbuhan

dikelompokkan ke dalam keluarga glikosil hidrolase 19 yang berperan penting dalam sintesis etilen, embriogenesis, dan melawan tekanan konsentrasi garam tinggi (Smith *et al.*, 2016). Selain itu, tanaman menghasilkan kitinase sebagai respons terhadap serangan fitopatogen. Kitinase tanaman banyak ditemukan pada tanaman monokotil dan dikotil seperti kacang, gandum, kubis, wortel, jagung, mentimun, bawang putih, gandum, bawang, kacang, kacang, kentang, beras, tomat (Collinge *et al.*, 1993). Kitinase rekombinan yang dihasilkan mampu menghambat pertumbuhan *Alternaria solani*, *Rhizoctonia solani*, *Verticillium dahlia* dan *Fusarium* sp. (Toufiq *et al.*, 2017). Kitinase tanaman juga menunjukkan potensi luar biasa untuk mentolerir stres abiotik yaitu, kitinase dari *Rhamnoides Hippophae* untuk mengurangi kondisi dingin (Kashyap *et al.*, 2017) dan kitinase dari kedelai untuk mengurangi arsenik dan kadmium (Galusová *et al.*, 2015).

Kitinase Pada Mikroorganisme

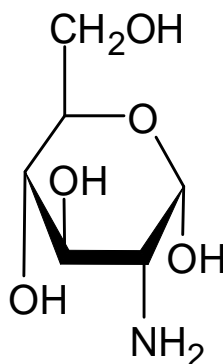
Mikroorganisme menjadi sumber kitinase yang disukai karena kelimpahannya yang luas di alam dan ketersediaan bahan baku yang mudah untuk budidaya yang mengakibatkan biaya produksi kitinase yang lebih rendah (Kuranda *et al.*, 1991). Sebagian besar kitinase dari sumber mikroba telah dikelompokkan ke dalam keluarga glikosil hidrolase 18 (Bhattacharya *et al.*, 2007), tetapi terdapat pengecualian pada beberapa bakteri gram positif yang termasuk dalam keluarga 19 Bakteri seperti *Aeromonas punctata*, *A. Hydrophila*, *Bacillus pumilus*, *B. thuringiensis*, *B. licheniformis* telah menunjukkan potensi untuk menghasilkan kitinase (Agrawal *et al.*, 2015 ; Synstad *et al.*, 2008 ; Kuddus and Ahmad, 2013 ; Rishad *et al.*, 2016). *Actinomycetes* seperti *Saccharothrix yanglingensis* (Shivalee *et al.*, 2018), *Streptomyces pratensis* (Gaber *et al.*, 2016), dan *Thermobifida fusca* (Rawway *et al.*, 2018) dapat menghasilkan kitinase dengan kadar tinggi.

Bakteri utama yang menghasilkan kitinase dapat mendegradasi kitin dan dimanfaatkan sebagai sumber energi, serta beberapa kitinase bakteri telah menunjukkan potensi sebagai agen kontrol biologis terhadap berbagai penyakit tanaman yang disebabkan oleh jamur fitopatogenik (Lu *et al.*, 2018 ; Kavroulakis *et al.*, 2010 ; Babashpour *et al.*, 2012).

2.8. Glukosamin

Glukosamin (2-amino-2-deoksi-D-glukosa) adalah amino monosakarida yang berasal dari kitin, senyawa ini dapat ditemukan dalam eksoskeleton invertebrata laut tertentu (Heath-Heckman and McFall-Ngai, 2011). Senyawa yang mengandung glukosamin adalah glukosamin hidroklorida, glukosamin sulfat, dan N-asetilglukosamin (Anderson *et al.*, 2005). Glukosamin menjadi bahan utama dalam biosintesis berbagai makromolekul seperti asam hialuronat, glikosaminoglikan, proteoglikan, glikoprotein, dan glikolipid.

Glukosamin terdapat hampir di semua jaringan lunak pada tubuh manusia, tetapi konsentrasi tertinggi terdapat dalam tulang rawan (Miller and Clegg, 2011). Glukosamin merupakan suplemen multifungsional terutama untuk penyakit arthritis dan osteoarthritis. Selain itu juga glukosamin memiliki efek pada berbagai penyakit lainnya seperti infeksi bakteri, kanker, kardiovaskuler, penyakit kulit serta neurodegeneratif (Jamialahmadi, 2019).



Gambar 4. Struktur glukosamin.

2.9. Fermentasi Padat

Fermentasi padat menjadi habitat asli dari kebanyakan mikroorganisme terutama mold dan fungi. Fermentasi padat memiliki keunggulan di antaranya yaitu sedikit energi dalam sterilisasi karena sedikitnya aktivitas air, lebih tahan dengan kontaminasi, menghasilkan produk dengan konsentrasi tinggi, menggunakan

limbah industri sebagai bahan utama substrat dan sumber energi. Keunggulan lainnya dari fermentasi padat ini memiliki kualitas yang tinggi dan aktivitas ekstrak yang tinggi pula, tidak membutuhkan pelarut organik, serta rendah biaya produksi (Martins *et al.*, 2011 ; Singhanian *et al.*, 2009).

Limbah industri yang dapat digunakan sebagai substrat dalam fermentasi padat di antaranya yaitu bagas singkong, beras, pulp kopi, kulit buah, kulit jagung (Farinas, 2015 ; Singhanian *et al.*, 2009 ; Soccol and Vandenberghe, 2003). Selain itu dapat pula menggunakan limbah kulit udang, dan cangkang kepiting (Suresh, 2012).

2.10. Scanning Electron Microscopy (SEM)

Scanning electron microscope (SEM) merupakan salah satu instrumen yang sering digunakan dalam menganalisis morfologi objek padat pada ukuran mikro maupun nano partikel. *Scanning electron microscope* (SEM) memiliki kemampuan untuk menganalisis partikel hingga ukuran 10 nm (Goldstein, 2012).

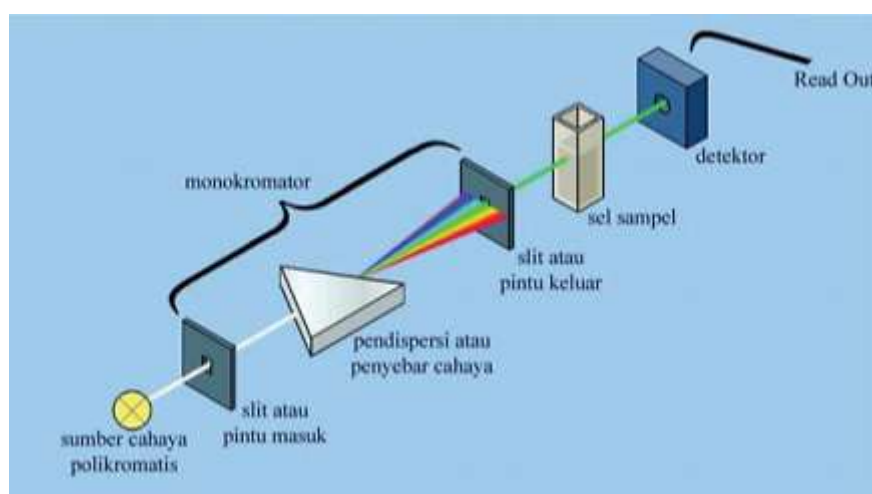
Prinsip kerja dari SEM yaitu adanya berkas elektron yang melalui sistem bertegangan tinggi (20 kV), lalu berkas elektron ini melewati sebuah lubang dan lensa elektromagnetik. Setelah itu, *beam* memindai seluruh permukaan spesimen dengan bantuan *scan coil*. Selanjutnya, gambar dihasilkan setelah adanya sinyal SEM dari area interaksi *beam* dan spesimen (Hafner, 2007). Metal stub digunakan untuk *mounting* sampel yang dilapisi dengan lapisan karbon atau logam seperti emas dan paladium, lalu sampel dapat diamati di bawah mikroskop (Mukhopadhyay, 2003).

2.11. Spektrofotometri UV-vis

Spektrofotometri UV-vis adalah metode instrumen yang paling sering digunakan dalam analisis untuk mendeteksi suatu senyawa berdasarkan absorbansi foton. Sampel harus diberi penambahan reagen dalam pembentukan garam kompleks

atau lain sebagainya, supaya sampel dapat menyerap foton pada daerah UV-vis. Melalui senyawa kompleks yang terbentuk maka unsur dapat diidentifikasi. (Irawan, 2019).

Prinsip dasar Spektrofotometri UV-vis berdasarkan cahaya putih yang dipecah menjadi komponennya (spektra) menggunakan kisi difraksi. Intensitas panjang gelombang tertentu dari spektra kemudian diubah ke nilai yang berbanding lurus dengan intensitas cahaya yang mencapai sensor (Solvason and Foley, 2015). Diagram alat spektrofotometer UV-vis dapat dilihat pada **Gambar 5**.



Gambar 5. Diagram alat spektrofotometer UV-vis (Suhartati, 2017).

2.12. *High Performance Liquid Chromathography (HPLC)*

High performance liquid chromathoghaphy (HPLC) merupakan teknik modern dari kromatografi cair. HPLC memiliki sensitivitas yang tinggi dan pada waktu yang bersamaan teknik ini memiliki gas analog (Aniszewski, 2007). HPLC merupakan teknik yang digunakan untuk memisahkan, mengidentifikasi, dan quantifikasi dari campuran seperti ionik, biologikal, organik, anorganik dan material polimer. HPLC merupakan kolom kromatografi dengan aliran pelarut bertekanan tinggi, sehingga sampel dapat dipisahkan menjadi konstituen yang

berbeda. Hal ini sangat bergantung pada model pemisahan, teknik elusi, skala pemisahan dalam analisis (Olander, 1984).

2.13. Analisis DNA

Reaksi Polimerase Berantai atau *Polymerase Chain Reaction* (PCR) adalah komponen integral dari banyak protokol dan merupakan teknik penting dari biologi molekuler. PCR mengubah jumlah DNA yang sangat sedikit menjadi sangat banyak. Publikasi metode PCR pertama ada pada tahun 1985 (Saiki *et al.*, 1985).

Menurut Waters and Shapter (2013), komponen utama PCR adalah (1) DNA templat, DNA yang disalin; (2) *deoxynucleotide triphosphates* (dNTPs), bahan penyusun DNA yang terdiri dari adenin trifosfat (ATP), timin trifosfat (TTP), guanin trifosfat (GTP), dan sitosin trifosfat (CTP); (3) Taq DNA polimerase, enzim yang menggabungkan nukleotida dan bersama-sama membentuk cerminan dari templat; (4) primer oligonukleotida, urutan DNA yang akan melengkapi DNA target dan mengikat DNA polimerase serta memulai sintesis DNA; (5) larutan penyangga dengan kekuatan ion dan pH yang sesuai.

Menurut Green and Sambrook (2019), PCR menggunakan siklus pemanasan untuk memulai dan mengakhiri sintesis enzim-katalis DNA. Setiap siklus terdiri dari tiga tahap:

1. Denaturasi DNA templat oleh panas, biasanya suhu yang digunakan $>90^{\circ}\text{C}$. Proses ini dapat memisahkan untai ganda pada DNA.
2. *Annealing* dari dua primer oligonukleotida sintetik ke DNA templat yang telah didenaturasi. Primer ini biasanya terdiri dari 20–25 nukleotida, kemudian dirancang menggunakan urutan DNA templat. Kedua primer melengkapi urutan pada untai yang berlawanan dari DNA target. Tempat pengikatan untuk primer dapat dipisahkan hanya dengan beberapa nukleotida atau sesuai keinginan peneliti.

3. Ekstensi, proses dimana sintesis DNA dimulai pada ujung 3' dari primer yang terikat. Ekstensi terjadi pada suhu antara 55°C dan 70°C dalam reaksi enzimatik yang dikatalisis oleh termostabil DNA polimerase. Proses ini diulang sekitar 25–35 kali, berlangsung dalam siklus termal, perangkat yang telah terprogram dapat mengontrol waktu dan suhu setiap langkah dalam siklus.

Elektroforesis telah banyak diterapkan dalam bidang sekuensing DNA. Elektroforesis merupakan suatu teknologi yang dapat memisahkan molekul seperti asam amino dari DNA. Pada proses tersebut, molekul akan dipisahkan berdasarkan ukuran, massa dan muatannya. Partikel akan bergerak secara teratur, partikel yang memiliki ukuran dan massa yang lebih kecil akan terlebih dahulu melewati gel. Sedangkan partikel yang besar akan bergerak relatif lambat (Cai, 2020).

III. METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat

Penelitian dilakukan pada bulan Maret 2021 sampai Maret 2022 di Unit Pelaksana Teknis Laboratorium Terpadu dan Sentra Inovasi Teknologi (UPT LTSIT) dan Laboratorium Biopolimer, Fakultas MIPA, Universitas Lampung.

3.2 Alat dan Bahan

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi alat-alat gelas (Iwaki), batang pengaduk, termometer, neraca analitik (Wiggen Hauser), *blender*, cawan petri (Anumbra), oven (Jisico), *magnetic stirrer*, *hot plate* (Wiggen Hauser HPS 630), ose, pinset, mikropipet (Dragon Lab), *microtube* (Onemed), mikrotip (Onemed), tabung sentrifus (Onemed), jangka sorong (Tricle), incubator (Memmert), *shaker* (Julabo SW 22), *laminar air flow* (Esco), autoklaf (Tomy SX-700), sentrifus (Hitachi CF 16RX II), mikroskop (Zeiss Axio A1), *Scanning Electron Microscopy* (EVO), *Fourier Transform Infra Red* (Agilent Cary 630), spektrofotometer UV-vis (Cary 600), dan *High Performance Liquid Chromatography* (Shimadzu).

Bahan-bahan yang digunakan yaitu kulit udang, aquades, NaOH (Merck), HCl (Merck), CuSO₄ (Merck), amonium oksalat (Merck), indikator universal (Merck), kapas, kassa, alkohol 70% (Onemed), bubuk agar, air laut buatan, H₂SO₄(Merck), NaK tartrat (Merck), *3,5-dinitrosalicilic acid* (Sigma Aldrich), glukosamin HCl (WAKO), dan etanol PA (Merck).

3.3 Prosedur Penelitian

3.3.1 Persiapan Kulit Udang

Kulit dan kepala udang diperoleh dari Pasir Sakti, Lampung Timur. Kulit udang dicuci dengan air mengalir untuk menghilangkan kotoran serta daging yang masih tersisa, lalu dikeringkan dan dihaluskan menggunakan blender kemudian diayak. Hasilnya berupa serbuk kulit udang yang disebut bahan baku.

3.3.2 Isolasi Kitin

Tahap isolasi kitin merujuk pada metode Hendri dan Laila (2013) dengan beberapa modifikasi. 100 gram serbuk kulit udang ditempatkan dalam gelas beaker yang dilengkapi dengan pengaduk, lalu diletakkan pada *hot plate*. Selanjutnya, sampel ditambahkan HCl 1,25 N dengan perbandingan 1:10 (w/v) dan distirer selama 2 jam pada suhu 90°C. Kemudian dilakukan penyaringan untuk memisahkan antara residu dan filtrat. Filtrat diuji dengan ammonium oksalat. Residu dicuci dengan aquades hingga pH= 6, dikeringkan dalam oven dengan suhu 60°C selama 24 jam. Kemudian sampel hasil demineralisasi, ditambahkan NaOH 3,5% dengan perbandingan 1:10 (w/v) dan distirer selama 2 jam pada suhu 60°C. Setelah itu, dilakukan penyaringan. Filtrat diuji dengan CuSO₄. Residu dibilas dengan aquades sampai pH= 7 dan dikeringkan dalam oven pada suhu 60°C selama 24 jam. Selanjutnya dilakukan karakterisasi kitin menggunakan *Fourier Transform Infra Red* (FTIR).

3.3.3 Pembuatan Koloid Kitin

Pembuatan koloid kitin dilakukan berdasarkan metode Murthy and Bleakey (2012) yang dimodifikasi. Sebanyak 10 gram kitin ditambahkan 100 mL HCl pekat, distirer selama 2 jam, ditambahkan 2 L aquades, diaduk, dan didiamkan dalam lemari es hingga terbentuk suspensi. Selanjutnya, suspensi dibilas dengan

aquades hingga pH= 6 dan disentrifius selama 10 menit dengan kecepatan 6000 rpm dan diperoleh koloid kitin.

3.3.4 Deposit Isolat *Actinomyces*

Sebanyak 6 isolat yang digunakan pada penelitian ini merupakan hasil deposit dari kegiatan penelitian sebelumnya. Isolat ini diperoleh dari biota laut yang diambil secara acak pada perairan Gorontalo dengan koordinat 0°26'43.2"N 123°07'16.1"E

3.3.5 Penapisan dan Peremajaan Isolat *Actinomyces*

Proses penapisan dilakukan pada 6 isolat *Actinomyces* menggunakan media agar koloid kitin. Pembuatan media agar koloid kitin ini merujuk pada Murthy and Bleakley (2012). Media agar koloid kitin terdiri dari 2% koloid kitin, 2% agar dan dilarutkan dalam air laut buatan. Lalu, campuran disterilisasi pada suhu 121°C selama 15 menit, tekanan 1 atm. Media agar koloid kitin dituangkan ke cawan petri 6 isolat *Actinomyces* digores di atas media agar koloid kitin.

Diamati pertumbuhan zona hidrolisis dari isolat selama 21 hari. Dipilih isolat yang menghasilkan indeks kitinolitik terbesar. Indeks kitinolitik ditentukan dengan menggunakan persamaan berikut:

$$\text{Indeks kitinolitik} = \frac{\text{diameter zona bening}}{\text{diameter koloni}}$$

Selanjutnya dilakukan peremajaan isolat pada media agar, komposisi yang digunakan sama dengan pada proses penapisan. Peremajaan ini bertujuan untuk memelihara isolat agar tumbuh dan tidak terkontaminasi oleh bakteri atau jamur lainnya, sehingga dapat digunakan untuk percobaan berikutnya.

3.3.6 Identifikasi Morfologi Isolat *Actinomyces* 19B19-A1

Metode cover slip culture merujuk pada Diba *et al.* (2007) dengan beberapa modifikasi. Cover slip ukuran 20 x 20 mm ditancapkan pada sudut 45° ke dalam media, lalu strain digoreskan di atas media agar. Setelah isolat telah tumbuh, selanjutnya dilakukan identifikasi morfologi *Actinomyces* merujuk ada Li *et al.* (2016). Secara mikroskopi morfologi ditentukan menggunakan mikroskop Zeiss Axioo A1 dan *Scanning Electron Microscopy* berdasarkan struktur spora yang terbentuk. Persiapan sampel *Actinomyces* dilakukan dengan menggunakan coating Gold.ob88. Sebelum pengamatan, cover slip diletakkan pada stub yang telah direkatkan dengan karbon tip, lalu dilakukan *coating* dengan *gold*. Pengamatan morfologi *Actinomyces* dilakukan pada energi 20 kV.

3.3.7 Analisis DNA Isolat *Actinomyces* 19B19-A1

Tahapan ini diawali dengan meremajakan isolat pada media koloid kitin agar dan diinkubasi selama 4 hari. Tahap selanjutnya, DNA genom dilakukan ekstraksi berdasarkan protokol genomik Wizard Genomic DNA KIT (cat. No.A1120, Promega, Madison, WI,USA). PCR urutan rDNA 16s dilengkapi dengan *Thermocycler Sensoquest Sensodirect* yang berasal dari Jerman. PCR dilakukan dengan menggunakan forward primer: 5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3' (Heuer *et al.*, 1997) dan reverse primer: 5'-CCG TAC TCC CCA GGC GGG G-3' (Baskaran *et al.*, 2016) yang diamplifikasi pada 810 bp. Reaksi PCR dilakukan dengan menggunakan 2G *Fast Ready Mix Kit* (cat. no. KK5102, Merck, Taufkirchen, Germany). Reaksi PCR dilakukan pada volume total 25 µL yang berisi 5 template DNA µL(50 ng / L) yang mengandung 12,5 µL 2G *Fast ReadyMix*, 6,5 µL RNase-free water, 0,5 µL *forward primer*, dan 0,5 µL *reverse primer*. Amplifikasi dilakukan dengan 35 siklus berikut ini, denaturasi selama 60 detik pada suhu 92°C, primer anil selama 60 detik pada suhu 54 °C, dan polimerisasi selama 90 detik pada suhu 72°C. Protokol peralatan QIAXCEL ADVANCED, Qiagen digunakan dalam proses elektroforesis. Selanjutnya metode Sanger digunakan dalam pengurutan sekuen dari 10 hasil PCR yang akan

menghasilkan amplikon. Hasil sekuensing dianalisis menggunakan *software* Mega versi X.

3.3.8 Pembuatan Inokulum Isolat *Actinomyces* 19B19-A1

Pembuatan inokulum *Actinomyces* dilakukan dengan cara 3 ose isolat *Actinomyces* diinokulasi ke dalam labu Erlenmeyer 250 mL yang berisi 1% koloid kitin dalam 100 mL air laut buatan yang telah disterilisasi. Selanjutnya labu Erlenmeyer diletakkan pada *shaker* dengan kecepatan 100 rpm pada suhu 25°C selama 7 hari.

3.3.9 Fermentasi Padat Media Serbuk Kulit Udang

Metode fermentasi padat media serbuk kulit udang merujuk pada Suresh (2012). Pembuatan substrat fermentasi kulit udang dilakukan dengan cara menghaluskan kulit udang yang sudah kering dengan alat *blender*. Sebanyak 5 g serbuk kulit udang halus dimasukkan ke dalam Erlenmeyer 100 mL. Selanjutnya, substrat ditambahkan air laut buatan sebanyak 2,5 mL. Media disterilisasi dengan autoklaf pada tekanan 1 atm, suhu 121°C selama 15 menit. 5 mL inokulum diinokulasi ke dalam media lalu diinkubasi pada suhu ruang selama 14 hari. Pada interval 2 hari dilakukan panen. 20 mL aquades dimasukkan ke dalam Erlenmeyer, lalu di-*shaker* dengan kecepatan 100 rpm selama 30 menit. Lalu, hasil fermentasi disentrifus pada kecepatan 6000 rpm selama 15 menit.

3.3.10 Uji Aktivitas Enzim dan Konsentrasi Glukosamin Menggunakan Spektrofotometer UV-vis

Uji aktivitas enzim merujuk ada metode Zhu *et al.* (2007) dengan beberapa modifikasi. 1 mL ekstrak kasar sampel ditambahkan 1 mL substrat koloid kitin 1% . Kemudian diinkubasi pada suhu 40°C selama 30 menit, lalu ditambahkan

1 mL reagen *3,5-dinitrosalicylic acid* (DNS). Selanjutnya dipanaskan pada suhu 100°C selama 10 menit dan didinginkan. Larutan standar glukosamin dan blanko dengan variasi konsentrasi digunakan sebagai standar. Nilai absorbansi dibaca menggunakan spektrofotometer UV-vis pada panjang gelombang 540 nm. Satu unit (1 U) dari aktivitas kitinase menunjukkan jumlah enzim yang diperlukan untuk memproduksi 1 μ mol glukosamin selama 1 menit.

Penentuan konsentrasi glukosamin merujuk pada menggunakan metode Zbircea *et al.* (2016) dengan beberapa modifikasi. 1,5 mL ekstrak kasar ditambahkan 1,5 mL reagen *3,5-dinitrosalicylic acid* (DNS), lalu dipanaskan pada suhu 100°C selama 10 menit dan didinginkan. Larutan standar glukosamin dan blanko dengan variasi konsentrasi digunakan sebagai standar. Nilai absorbansi dibaca menggunakan spektrofotometer UV-vis pada panjang gelombang 540 nm.

3.3.11. Analisis Glukosamin Menggunakan *High Performance Liquid Chromathography* (HPLC)

Preparasi sampel, 1 mL ekstrak kasar hasil fermentasi dimasukkan ke dalam *microtube*, lalu disentrifus. Kemudian dibagi ke dalam 4 *microtube*, lalu ditambahkan etanol PA hingga volume 1 mL dan disentrifus. Supernatan dibuang dan endapan dimasukkan ke dalam satu wadah *microtube*, lalu ditambahkan etanol PA hingga volume 1 mL dan disentrifus. Endapan yang diperoleh ditambahkan aquades hingga volume 1 mL. Selanjutnya, 12 μ L sampel diinjeksikan ke instrumen HPLC dengan kolom Agilent HC-C18, fasa gerak asetonitril:air (70:30), laju alir 1 mL/menit, panjang gelombang 210 nm dengan menggunakan detektor *diode array* (Halder *et al.*, 2013).

V. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1. Kesimpulan

Kesimpulan dari penelitian ini adalah isolat 19B19-A1 mampu mendegradasi kulit udang menjadi glukosamin. Isolat 19B19-A1 merupakan spesies *Streptomyces tritolerans* yang memiliki aktivitas kitinase dan konsentrasi glukosamin tertinggi pada waktu inkubasi hari ke-12 berdasarkan analisis menggunakan spektrofotometer UV-vis. Sedangkan, berdasarkan analisis menggunakan HPLC konsentrasi glukosamin tertinggi pada waktu inkubasi hari ke-14.

5.2. Saran

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan, disarankan penelitian lebih lanjut mengenai fermentasi padat kulit udang dengan adanya variasi kimia dan fisika.

DAFTAR PUSTAKA

- Abidin, N.A. Z., Kormin, F., Abidin, N. A. Z., Anuar, N. A. F. M., dan Bakar, M. F. A. 2020. The Potential of Insects as Alternative Sources of Chitin: An Overview on the Chemical Method of Extraction from Various Sources. *International Journal of Molecular Sciences*. **21**(14): 4978.
- Agrawal, A., Rajamani, V., Reddy, V. S., Mukherjee, S.K., and Bhatnagar, R.K. 2015. Transgenic plants over-expressing insect-specific microrna acquire insecticidal activity against *Helicoverpa armigera*: An alternative to Bt-toxin technology. *Transgen. Res*. **24**: 791-801.
- Aisyah, E. 2016. Penetapan Waktu Inkubasi Optimum Enzim Kitinase dan Deasetilase dari Isolat *Actinomyces* ANL-4 dalam Degradasi Kulit Udang Tak Berprotein Menjadi Glukosamin. *Skripsi*. Universitas Lampung.
- Akib, F. H. Y., Arham, M. A., and Suratinoyo, S. 2021. Analysis of Economic Potentials and Contributing Factors of Rural Poverty In The Area Of Tomini Bay, Sulawesi, Indonesia. *International Journal of Economics, Business and Management Research* . **5**(9):117.
- Al-Sagheer, F. A., Al-Sughayer, M. A., Muslim, S., Elsabee, M. Z. Extraction and characterization of chitin and chitosan from marine sources in Arabian Gulf. 2009. *Carbohydr. Polym*. **77**: 410-419.
- Ambati, R. R., Phang, S. M., Ravi, S., Aswathanarayana, R. G. 2014. Astaxanthin: sources, extraction, stability, biological activities and its commercial applications a review. *Marine Drugs*. **12**: 128-152.
- Anderson J. W., Nicolosi R. J., and Borzelleca, J. F. 2005. Glucosamine effects in humans: a review of effects on glucose metabolism, side effects, safety considerations and efficacy. *Food and Chemical Toxicology*. **43**(2): 187-201.
- Andronopoulou, E., and Vorgias, C. E. 2004. Multiple components and induction mechanism of the chitinolytic system of the hyperthermophilic archaeon

Thermococcus chitonophagus. *Applied Microbiology and Biotechnology*. **65**(6): 694–702.

- Aniszewski, T. 2007. Alkaloids - Secrets of Life: Alkaloid Chemistry. *Biological Significance*. Applications and Ecological Role 1st Edition. Elsevier.
- Aranaz, I., Mengibar M., Harris, R., Paños, I., Miralles, B., Acosta, N., Galed, G., and Heras A. 2009. Functional characterization of chitin and chitosan. *Curr. Chem. Biol.* **3**: 203-230.
- Arbia, W., Arbia, L., Adour, L., and Amrane, A. 2013. Chitin extraction from crustacean shells using biological methods a review. *Food Technol. Biotechnol.* **51**: 12-25.
- Aruna, S., Vijayalakshmi, K., Shashikanth, M., Rani, M. S. and Jyothi K. First report of antimicrobial spectrum of novel strain of *Streptomyces tritolerans* (Strain AS1) Isolated from Earthworm Gut (*Eisenia foetida*) Against Plant Pathogenic Bacteria and Fungi. *Curr. Res. Bacteriol.* **1**(2): 46-55.
- Ayuningrum, D., Liu, Y., Riyanti, Sibero, M. T., Kristiana, R., Asagabaldan, M. A., and Schäberle, T. F. 2019. Tunicate-associated bacteria show a great potential for the discovery of antimicrobial compounds. *PLOS ONE*. **14**(3).
- Babashpour, S., Aminzadeh, S., Farrokhi, N., Karkhane, A., and Haghbeen, K. 2012. Characterization of a chitinase (chit62) from *Serratia marcescens* b4a and its efficacy as a bioshield against plant fungal pathogens. *Biochem. Genet.* **50**: 722-735.
- Barka, E. A., Vatsa, P., Sanchez, L., Gaveau-Vaillant, N., Jacquard, C., Klenk, H-P., Clément, C., Ouhdouch, Y., and Van Wezel, G. P. 2016. Taxonomy, Physiology, and Natural Products of Actinobacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. **80**: 1-43.
- Baskaran, R., Mohan, P. M., Sivakumar, K., Kumar, A. 2016. Antimicrobial Activity and Phylogenetic Analysis of *Streptomyces Parvulus* Dosmb-D105 Isolated from the Mangrove Sediments of Andaman Islands. *Acta Microbiol. Immunol. Hung.* **63**. 27-46.
- Bhattacharya, D.; Nagpure, A.; Gupta, R. K. 2007. Bacterial chitinases: Properties and potential. *Rev. Biotechnol.* **27**: 21-28.

- Brzezinska, M. S., Jankiewicz, U., and Walczak, M. 2013. Biodegradation of chitinous substances and chitinase production by the soil actinomycete *Streptomyces rimosus*. *International Biodeterioration & Biodegradation*. **84**: 104-110.
- Bussink, A. P., Eijk Van M., Renkema, G. H., Aerts, J. M., and Boot, R. G. 2006. The Biology of the Gaucher Cell: The Cradle of Human Chitinases. *International Review of Cytolog*. **252**: 71-128.
- Cai, Y. 2020. Analysis on Gel Electrophoresis in Biology. *E3S Web of Conferences*. **145**: 1-4.
- Chater, K. F. 2016. Recent advances in understanding *Streptomyces*. *F1000 Research*. **5**: 2795.
- Collinge, D. B., Kragh, K. M., Mikkelsen, J. D., Nielsen, K. K., and Rasmussen, U. 1993. Plant chitinases. *Plant J*. **3**: 31-40.
- Cross, T. 1970. The diversity of bacterial spores. *J Appl Bacteriol*. **33**: 95-102.
- Cross, T. 1982. Actinomycetes: a continuing source of new metabolites. *Develop. Indust. Microbiol*. **23**: 1-8.
- Dean, R., Van Kan, J. A., Pretorius, Z. A., Hammond-Kosack, K. E., Di Pietro, A., Spanu, P. D., Rudd, J. J., Dickman, M., Kahmann, R., and Ellis, J. 2012. The top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Mol. Plant Pathol*. **13**: 414-430.
- Deshavath, N. N., Mukherjee, G., Goud, V. V., Dasu, V. V., and Sastri, C. V. 2020. Pitfalls in the 3, 5-dinitrosalicylic acid DNS assay for the reducing sugars: Interference of furfural and 5-hydroxymethylfurfural. *International Journal of Biological Macromolecules*. **156**: 180-185.
- Dhole, N. P., Dar, M. A., and Pandit, R. S. 2021. Recent advances in the bioprospection and applications of chitinolytic bacteria for valorization of waste chitin. *Arch. Microbiol*. **203**: 1953-1969.
- Diba K., Kordbacheh P., Mirhendi S. H., Rezaie S., and Mahmoudi M. 2007. Identification of *Aspergillus* species using morphological characteristics. *Pak J Med Sci*. **23**(6): 867-872.

- Dukariya G., and Kumar A. 2020. Distribution and Biotechnological Applications of Chitinase: A Review. *International Journal of Biochemistry and Biophysics*. **8**(2): 17-29.
- Farinas, C. S. 2015. Developments in solid-state fermentation for the production of biomass degrading enzymes for the bioenergy sector. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. **52**: 179-188.
- Gaber, Y., Mekasha, S., Vaaje-Kolstad, G., Eijsink, V. G., and Fraaije, M.W. 2016. Characterization of a chitinase from the cellulolytic actinomycete *Thermobifida fusca*. *Biochim Biophys Acta (BBA) Proteins Proteom*. **1864**: 1253-1259.
- Galusová, T., Rybanský, L., Mészáros, P., Spieß, N., Piršelová, B., Kuna, R., Libantová, J., Moravčíková, J., Hauptvogel, P., and Matušíková, I. 2015. Variable responses of soybean chitinases to arsenic and cadmium stress at the whole plant level. *Plant Growth Regul*. **76**: 147-155.
- Gbenebor, O. P., Adeosun, S. O., Lawal, G. I., Jun, S., and Olaleye, S. A. 2017. Acetylation, crystalline and morphological properties of structural polysaccharide from shrimp exoskeleton. *Engineering Science and Technology, an International Journal*. **20**(3): 1155-1165.
- Goldstein, J. I., 2012. Practical Scanning Electron Microscopy: Electron and Ion Microprobe Analysis. *Springer Science & Business Media*.
- Green, M. R., and Sambrook, J. 2019. Polymerase Chain Reaction. *Cold Spring Harbor Protocols*. **6**: 436-456.
- Hafner, B. 2007. Scanning Electron Microscopy Primer. *Characterization Facility*. University of Minnesota-Twin Cities. 1-29.
- Halder, S., K, Maity, C., Jana, A., Das A., Paul, T., Mohapatra, P. K. D., Pati, B. R., and Mondal, K. C. 2013. Proficient biodegradation of shrimp shell waste by *Aeromonas hydrophila* SBK1 for the concomitant production of antifungal chitinase and antioxidant. *Int Biodeterior Biodegrad*. **79**: 88-97.
- Hamid, R., Khan, M. A., Ahmad, M., Ahmad, M. M., Abdin, M. Z., Musarrat, J., and Javed, S. 2013. Chitinases: An update. *J. Pharm. Bioallied Sci*. **5**: 21-29.

- Heath-Heckman E. A. and McFall-Ngai M. J. 2011. The occurrence of chitin in the hemocytes of invertebrates. *Zoology*. **114**(4): 191-198.
- Hendri, J., dan Laila, A. 2013. *Kitin Kitosan*. Lembaga Penelitian Universitas Lampung. Universitas Lampung.
- Hendri J., Wardana, Laila, A., dan Ginting, I. 2007. Penentuan Kadar Ca dan Mg Pada Hasil Demineralisasi Optimum Kulit Udang Windu Gravimetri dan Spektroskopi Serapan Atom Dimuat. *Jurnal Sains MIPA*. **13**(2).
- Henrissat, B., and Davies, G. Structural and sequence-based classification of glycoside hydrolases. 1997. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **7**: 637-644.
- Heuer, H., Krsek, M., Baker, P., Smalla, K., Wellington E. M. H. 1997. Analysis of actinomycete communities by specific amplification of genes encoding 16S rRNA and gel-electrophoretic separation in denaturing gradients. *Appl Environ Microb.* **63**: 3233-3241.
- Holland, L. Z. 2016. Tunicates. *Current Biology*. **26**(4).
- Howard, R. L., Abotsi E., Van Rensburg, J.E.L., and Howard S. 2003. Lignocellulose biotechnology: Issues of bioconversion and enzyme production. *Afr. J. Biotechnol.* **2**(12): 602-619.
- Irawan A. 2019. Kalibrasi spektrofotometer sebagai penjaminan mutu hasil pengukuran dalam kegiatan penelitian dan pengujian. *Indonesian Journal Of Laboratory*. **1**(2): 1-9.
- Jamialahmadi, K. 2019. Beneficial applications of glucosamine. *Molecular Nutrition: Carbohydrates*. 319-336.
- Johnson, E. L., and Peniston, Q. P. 1982. *Utilization of shellfish waste for chitin and chitosan production*. In *Chemistry & Biochemistry of Marine Food Products Chapter 19*. AVI Publishing Co. USA.
- Karthik, N., Binod, P., and Pandey, A. 2015. Purification and characterisation of an acidic and antifungal chitinase produced by a *Streptomyces sp.* *Bioresource Technology*. **188**. 195-201.

- Kashyap, P. and Deswal, R. 2017. A novel class I chitinase from *Hippophae rhamnoides*: Indications for participating in ice-cbf cold stress signaling pathway. *Plant Sci.* **259**: 62-70.
- Kavroulakis, N., Ntougias, S., Besi, M.I., Katsou, P., Damaskinou, A., Ehaliotis, C., Zervakis, G.I., and Papadopoulou, K.K. 2010. Antagonistic bacteria of composted agro-industrial residues exhibit antibiosis against soil-borne fungal plant pathogens and protection of tomato plants from *Fusarium oxysporum f. sp. radicis-lycopersici*. *Plant Soil.* **333**: 233-247.
- Kramer, K. and Muthukrishnan, S. 2009. *Chitin metabolism in insects. In Insect Development: Morphogenesis, Molting and Metamorphosis.* Gilbert, L.I., Ed. Italy.
- Kuddus, M., and Ahmad, I. 2013. Isolation of novel chitinolytic bacteria and production optimization of extracellular chitinase. *J. Genet. Eng. Biotechnol.* **1**: 39-46.
- Kuranda, M. J. and Robbins, P.W. 1991. Chitinase is required for cell separation during growth of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **266**: 19758-19767.
- Kzhyshkowska, J., Gratchev, A., and Goerdt, S. 2007. Human chitinases and chitinase-like proteins as indicators for inflammation and cancer. *Biomarker Insights.* **2**: 128-146.
- Lee, C. G., Da Silva, C.A., Dela Cruz, C.S., Ahangari, F., Ma, B., Kang, M.-J., He, C.-H., Takyar, S., and Elias, J.A. 2011. Role of chitin and chitinase/chitinase-like proteins in inflammation, tissue remodeling, and injury. *Annu. Rev. Physiol.* **73**: 479-501.
- Li, Q., Chen, X., Jiang, Y., and Jiang, C. 2016. Morphological Identification of Actinobacteria. *Review.* Chapter 3.
- Lu, Y., Wang, N., He, J., Li, Y., Gao, X., Huang, L., and Yan, X. 2018. Expression and characterization of a novel chitinase with antifungal activity from a rare actinomycete *Saccharothrix yanglingensis* Hhs 015. *Protein Expr. Purif.* **143**: 45-51.
- Ludwig, W., Euzeby, J., Schumann, P., Buss, HJ., Trujillo, ME., Kämpfer, P., and Whiteman, WB. 2012. *Bergey's Manual Of Systematic Bacteriology Volume 5.* Springer-Verlag. New York.

- Maier, R. M., Pepper, I. L., and Gerba, C. P. 2009. *Environmental Microbiology*. Academic Press. Arizona.
- Mangamuri, U. K., Muvva, V., Poda, S., and Agasar, D. 2014. Optimization of Process Parameters for Improved Production of Bioactive Metabolites by *Streptomyces tritolerans* DAS 165T. *Microbiology Research Journal International*. 428-442.
- Mao, X., Guo, N., Sun J., and Xue, C. 2017. Comprehensive utilization of shrimp waste based on biotechnological methods: a review. *J Clean Prod.* **143**: 814-823.
- Meriem, G., and Mahmoud, K. 2016. Optimization of chitinase production by a new *Streptomyces griseorubens* C9 isolate using response surface methodology. *Annals of Microbiology.* **67**(2): 175-183.
- Martins, S., Mussatto, S. I., Martínez-Avila, G., Montanez-Saenz, J., Aguilar, C. N., and Teixeira, J. A. 2011. Bioactive phenolic compounds: Production and extraction by solid-state fermentation. A review. *Biotechnology Advances.* **29**: 365-373.
- Masri, M., Sukmawaty, E., and Aditia, L. 2021. Novel chitinolytic bacteria from the shrimp shell processing waste. *Biodiversitas.* **22**(5): 2672-2681.
- Mathew, G. M., Madhavan, A., Arun, K. B., Sindhu, R., Binod, P., Singhanian, R. R., Sukumaran, R. K., and Pandey, A. 2021. Thermophilic Chitinases: Structural, Functional and Engineering Attributes for Industrial Applications. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **193**: 142-164.
- Mehrabani, M.G., Karimian, R., Rakhshaei, R., Pakdel, F., Eslami, H., Fakhrzadeh, V., Rahimi, M., Salehi, R., and Kafil, H.S. 2018. Chitin/silk fibroin/TiO₂ bio-nanocomposite as a biocompatible wound dressing bandage with strong antimicrobial activity. *Int. J. Biol. Macromol.* **116**: 966-976.
- Miller, G. 1959. *Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar*. *Analytical Chemistry.* **31**: 426-428.
- Miller, K. L., and Clegg, D. O. 2011. Glucosamine and Chondroitin Sulfate. *Rheumatic Disease Clinics of North America.* **37**(1): 103-118.

- Mojarrad, J. S., Nemati, M., Valizadeh, H., Ansarin, M., and Bourbour, S. 2007. Preparation of Glucosamine from Exoskeleton of Shrimp and Predicting Production Yield by Response Surface Methodology. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **55**(6): 2246-2250.
- Moran, S. 2018. *Biology. An Applied Guide to Water and Effluent Treatment Plant Design*. 25-37.
- Mukhopadhyay, S.M. 2003. Sample preparation for microscopic and spectroscopic characterization of solid surfaces and films. *Sample Prep. Tech. Anal. Chem.* **162**(9): 377-411.
- Mukhtar, S., Zaheer, A., Aiysha, D., Abdulla Malik, K., and Mehnaz, S. 2017. Actinomycetes: a source of industrially important enzymes. *J Proteomics Bioinform.* **10**: 316-319.
- Murthy, N. and Bleakley, B. 2012. Simplified Method of Preparing Colloidal Chitin Used For Screening of Chitinase- Producing Microorganisms. *The Internet Journal of Microbiology.* **10**(2).
- Mutreja, R., Thakur, A., and Goyal, A. 2020. *Chitin and chitosan: current status and future opportunities*. Handbook of Chitin and Chitosan. 401-417.
- Muzakir and Suparman. 2016. Strategy of Developing Tomini Bay for Economic Growth of Coastal Community in Central Sulawesi. *Journal of Economics and Policy.* **9**(1): 96-110.
- Muzzarelli, R. A. 1997. *Natural Chelating Polymers, per gives it the ability to bond chemically with negatively charged lipids, fats and bile acids*. The gamon press. New York.
- Muzzarelli, R. A. 1999. *Clinical and biochemical evaluation of chitosan for hypercholesterolemia and overweight control.* **87**: 293-304.
- Olander, D. P. 1984. Instrumental Methods of Analysis Sixth Edition. *Journal of Chemical Education.* **61**(8).
- Rawway, M., Beltagy, E.A., Abdul-Raouf, U.M., Elshenawy, M.A., and Kelany, M.S. 2018. Optimization of process parameters for chitinase production by a marine *Aspergillus flavus* MK20. *J. Ecol. Health Environ.* **6**: 1-8.

- Rishad, K., Rebello, S., Nathan, V.K., Shabanamol, S., and Jisha, M. 2016. Optimised production of chitinase from a novel mangrove isolate, *Bacillus pumilus* MCB-7 using response surface methodology. *Biocatal Agric. Biotechnol.* **5**: 143-149.
- Robinson, P. K. 2015. *Enzymes: principles and biotechnological applications*. Essays Biochem. **59**: 1-41.
- Robinson, R. K. 2000. *Encyclopedia Of Food Microbiology*. Academic Press
- Ru, G., Wu, S., Yan, X., Liu, B., Gong, P., Wang, L., and Feng, J. 2019. Inverse solubility of chitin/chitosan in aqueous alkali solvents at low temperature. *Carbohydrate Polym.* **206**: 487-492.
- Sahai A. S., and Manocha M. S. 1993. Chitinases of fungi and plants: Their involvement in morphogenesis and host-parasite interaction. *FEMS Microbiol Rev.* **11**: 317-38.
- Saiki R., Scharf S., and Faloona F. 1985. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anaemia. *Science.* **230**: 1350-1354.
- Salsabila, N. K. 2020. Penapisan *Actinomycetes* yang Berasosiasi dengan Spons Sebagai Sumber Enzim Kitinase Menggunakan Media Limbah Kulit Udang. *Skripsi*. Universitas Lampung.
- Santos, V. P., Marques, N. S. S., Maia, P. C. S. V., Lima, M. A. B., Franco, L. O., and Takaki, G. M. 2020. Seafood Waste as Attractive Source of Chitin and Chitosan Production and Their Applications. *International Journal of Molecular Sciences.* **2**: 4290.
- Sari, M., Nawangsih, A. A., and Wahyudi, A. T. 2021. Rhizosphere *Streptomyces* formulas as the biological control agent of phytopathogenic fungi *Fusarium oxysporum* and plant growth promoter of soybean. *Biodiversitas.* **22**(6): 3013-3023.
- Setiawan, A., Widyastuti, W., Irawan, A., Wijaya, O. S., Laila, A., Setiawan, W. A., Juliasih, N. L. G. R., Nonaka, K., Arai, M., and Hendri, J. 2021. Solid State Fermentation of Shrimp Shell Waste Using *Pseudonocardia carboxydvorans* 18A13O1 to Produce Bioactive Metabolites. *Fermentation.* **7**(4): 247.

- Shahidi, F., and Abozaytoun, R. 2005. Chitin, chitosan., and co-products.. Chemistry, production, applications and health effects. *Adv Food Nutr Res.* **49**: 93-135.
- Shahidi, F., and Synowiecki, J. 1991. Isolation and characterization of nutrients and value-added products from snow crab (*Chionoecetes opilio*) and shrimp (*Pandalus borealis*) processing discards. *J. Agric. Food Chem.* **39**: 1527-1532.
- Shanmugavel, M., Vasantharaj S., Saathiyavimal S., and Gnanama A. 2016. Application of an alkaline protease in biological waste processing: an eco-friendly approach. *International Journal of Biosciences and Nanosciences.* **3**(2): 19-24.
- Shivalee, A., Lingappa, K., and Mahesh, D. 2018. Influence of bioprocess variables on the production of extracellular chitinase under submerged fermentation by *Streptomyces pratensis* strain KLSL55. *J. Genet. Eng. Biotechnol.*
- Singhania, R. R., Patel, A. K., Soccol, C. R., and Pandey, A. 2009. Recent advances in solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal.* **44**: 13-18.
- Smith, R. S. and Osburn, R. M. 2016. *Combined Used of Lipo-Chitooligosaccharides and Chitinous Compounds for Enhanced Plant Growth and Yield.* U.S. Patent.
- Soccol, C. R. and Vandenberghe, L. P. S. 2003. Overview of solidstate fermentation in Brazil. *Biochemical Engineering Journal.* **13**: 205-218.
- Solvason, G. O., and Foley, J. T. 2015. Low-cost spectrometer for icelandic chemistry education. *Procedia CIRP.* **34**: 156-161.
- Soni, T., Zhuang, M., Kumar, M., Balan, V., Ubanwa, B., Vivekanand, V., and Pareek, N. 2021. Multifaceted production strategies and applications of glucosamine: a comprehensive review. *Crit Rev Biotechnol.* **19**: 1-21.
- Sorokin, D. Y., Gumerov, V. M., Rakitin, A. L., Beletsky, A. V., Damsté, J. S. S., Muyzer, G., and Ravin, N. V. 2013. Genome analysis of *Chitinivibrio alkaliphilus* gen. nov., sp. nov., a novel extremely haloalkaliphilic anaerobic chitinolytic bacterium from the candidate phylum Termite Group 3. *Environmental Microbiology.* **16**(6): 1549-1565.

- Sorokulova, I., Krumnow, A., Globa, L., and Vodyanoy, V. 2009. Efficient decomposition of shrimp shell waste using *Bacillus cereus* and *Exiguobacterium acetylicum*. *J Ind. Microbiol Biotechnol.* **36**: 1123-1126.
- Suginta, W., Robertson, PA., Austin, B., Fry, SC., and Fothergill-Gillmore, LA. 2000. Chitinases from vibrio: Activity screening and purification of chiA from *V. carchariae*. *J Appl Microbiol.* **89**: 76-84.
- Suhartati, T. 2017. *Dasar-Dasar Spektrofotometri UV-vis dan Spektrometri Massa Untuk Penentuan Struktur Senyawa Organik*. Aura. Bandar Lampung.
- Suresh, P. V. 2012. Biodegradation of shrimp processing bio-waste and concomitant production of chitinase enzyme and N-acetyl-D-glucosamine by marine bacteria : production and process optimization. *World Journal Microbiol Biotechnol.* **28**: 2945-2962.
- Swiatek, M. A., Tenconi, E., Rigali, S., and Van Wezel, G. P. 2011. Functional Analysis of the N-Acetylglucosamine Metabolic Genes of *Streptomyces coelicolor* and Role in Control of Development and Antibiotic Production. *Journal of Bacteriology.* **194**(5): 1136-1144.
- Synstad, B., Vaaje-Kolstad, G., Cederkvist, F.H., Saua, S.F., Horn, S.J., Eijsink, V.G., and Sørli, M. 2008. Expression and characterization of endochitinase C from *Serratia marcescens* B JL200 and its purification by a one-step general chitinase purification method. *Biosci Biotechnol Biochem.* **72**(3): 715-723.
- Taylor, M., Rada, R., Steger, D., and Wagner, M. 2007. Sponge-associated microorganisms: evolution, ecology, and biotechnological potential. *Microbiology and Molecular Biology Reviews.* **71**(2): 295-347.
- Thongprajukaew, K., Choodum, A., Sa-E, B., and Hayee, U. 2014. Smart phone: A popular device supports amylase activity assay in fisheries research. *Food Chemistry.* **163**: 87-91.
- Toufiq, N., Tabassum, B., Bhatti, M. U., Khan, A., Tariq, M., Shahid, N., Nasir, I. A., and Husnain, T. 2017. Improved antifungal activity of barley derived chitinase gene that overexpress a 32 kDa recombinant chitinase in *Escherichia coli* host. *Braz. J. Microbiol.* **42**: 414-421.

- Ventura, M., Canchaya, C., Tauch, A., Chandra, G., Fitzgerald, G. F., Chater, K. F., and Van Sinderen, D. 2007. Genomics of Actinobacteria: Tracing the Evolutionary History of an Ancient Phylum. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. **71**(3): 495-548.
- Wang, S. L., Liu, C. P., and Liang, T., W. 2012. Fermented and enzymatic production of chitin/chitosan oligosaccharides by extracellular chitinases from *Bacillus cereus*. TKU027. *Carbohydr Polym*. **90**: 1305-1313.
- Waters, D. L. E. and Shapter, F. M. 2013. The Polymerase Chain Reaction (PCR): General Methods. *Cereal Genomic*. 65-75.
- Xu, T., Qi, M., Liu, H., Cao, D., Xu, C., Wang, L., and Qi, B. 2020. Chitin degradation potential and whole-genome sequence of *Streptomyces diastaticus* strain CS1801. *AMB Express*. **10**(1).
- Yan, N., and Chen, X. 2015. Sustainability: Don't waste seafood waste. *Nature*. **524**(7564): 155-157.
- Younes, I., and Rinaudo, M. 2015. Chitin and chitosan preparation from marine sources, structure, properties and applications. *Marine Drugs*. **13**: 1133-1174.
- Zbircea, R. I., Menghiu, G., Matica A., and Ostaf V. 2016. Use of 3,5-dinitrosalicylic acid reaction to study the chitosan hydrolysis. *New Frontiers in Chemistry*. **25**(2): 145-153.
- Zhu, X., Zhou, Y., and Feng, J. 2007. Analysis of both chitinase and chitosanase produced by *Sphingomonas* sp. CJ-5. *Journal of Zhejiang University Science B*. **8**(11): 831-838.