

**OPTIMASI PRODUKSI N-GLUKOSAMIN DARI *ACTINOMYCETES*
18D36A2 PADA MEDIA KULIT UDANG**

(Skripsi)

Oleh

**IKROMUDIN
NPM 1717011036**



**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS LAMPUNG
BANDAR LAMPUNG
2022**

ABSTRAK

OPTIMASI PRODUKSI N-GLUKOSAMIN DARI *ACTINOMYCETES* 18D36A2 PADA MEDIA KULIT UDANG

Oleh

Ikromudin

Kitin yang terdapat di kulit udang, kepiting, serangga, dan lobster dapat dihidrolisis dengan enzim kitinase yang dihasilkan oleh mikroorganisme. *Actinomyces* merupakan salah satu mikroorganisme yang dapat menghasilkan enzim kitinase. Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan N-glukosamin dari kulit udang dengan bantuan enzim kitinase yang dihasilkan oleh *actinomyces* 18D36A2. *Actinomyces* 18D36A2 merupakan mikroorganisme koleksi UPT LTSIT Universitas Lampung yang berasal dari perairan Buleleng Bali. Berdasarkan analisis spektrofotometri UV-Vis, diperoleh aktivitas unit kitinase tertinggi di media cair serbuk kulit udang adalah pada pH 6, temperatur 29°C, dan waktu inkubasi 7 hari dengan nilai 0,00087 U/mL. Berdasarkan analisis HPLC, diperoleh waktu retensi standar D-glukosamin 0,5 mg/mL adalah 2,3 menit, sampel pada temperatur 29°C adalah 2,4 menit dan sampel pada temperatur 52°C adalah 2,4 menit. Rendemen N-glukosamin yang dihasilkan pada temperatur 29°C adalah 8,3% dan temperatur 52°C adalah 2,8%.

Kata kunci: kitinase, *actinomyces* 18D36A2, kulit udang, dan kitin.

ABSTRACT

OPTIMIZATION OF N-GLUCOSAMINE PRODUCTION FROM *ACTINOMYCETES* 18D36A2 IN SHRIMP SHELL MEDIA

By

Ikromudin

Chitin contained in the shells of shrimp, crabs, insects, and lobsters can be hydrolyzed by the chitinase enzyme produced by microorganisms. *Actinomyces* is one of the microorganisms that can produce chitinase enzymes. This research aims to obtain N-glucosamine from shrimp shells with the help of the chitinase enzyme produced by *actinomyces* 18D36A2. *Actinomyces* 18D36A2 is a collection of microorganisms from the UPT LTSIT University of Lampung originating from the waters of Buleleng Bali. Based on UV-Vis spectrophotometry analysis, the highest chitinase unit activity in liquid media of shrimp shell powder at pH 6, temperature 29°C, and incubation time of 7 days with a value of 0,00087 U/mL. Based on HPLC analysis, the retention time of standart glucosamine 0,5 mg/mL was 2,3 minutes, the sample at 29°C was 2,4 minutes and the sample at 52°C was 2,4 minutes. The yield of N-glucosamine produced at 29°C was 8,3% and 52°C was 2,8%.

Keywords: chitinase, *actinomyces* 18D36A2, shrimp shells, and chitin.

**OPTIMASI PRODUKSI N-GLUKOSAMIN DARI *ACTINOMYCETES*
18D36A2 PADA MEDIA KULIT UDANG**

Oleh

Ikromudin

Skripsi

**Sebagai Salah Satu Syarat untuk Mencapai Gelar
SARJANA SAINS**

Pada

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



**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS LAMPUNG
BANDAR LAMPUNG
2022**

Judul Skripsi : **OPTIMASI PRODUKSI N-GLUKOSAMIN
DARI *ACTINOMYCETES* 18D36A2 PADA
MEDIA KULIT UDANG**

Nama Mahasiswa : **Ikromudin**


Nomor Pokok Mahasiswa : 1717011036


Program Studi : Kimia

Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

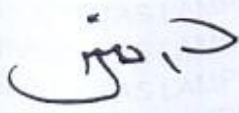
MENYETUJUI

1. Komisi Pembimbing


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


Prof. John Hendri, Ph.D.
NIP 19581021 198703 1 001

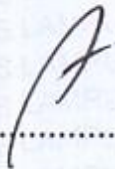
2. Ketua Jurusan Kimia


Mulyono, Ph.D.
NIP 19740611 200003 1 002

MENGESAHKAN

1. Tim Penguji

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



.....

Sekretaris : **Prof. John Hendri, Ph.D.**



.....

Anggota : **Prof. Andi Setiawan, Ph.D.**



.....

2. Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam



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

Tanggal Lulus Ujian Skripsi : **22 Desember 2022**

SURAT PERNYATAAN KEASLIAN SKRIPSI

Yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Ikromudin
NPM : 1717011036
Jurusan : Kimia
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Perguruan Tinggi : Universitas Lampung

Dengan ini menyatakan bahwa skripsi yang berjudul “Optimasi Produksi N-glukosamin Dari *Actinomyces* 18D36A2 Pada Media 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. 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, 26 Desember 2022
Yang menyatakan,



Ikromudin
NPM. 1717011036

RIWAYAT HIDUP

Ikromudin dilahirkan di Liwa pada tanggal 15 Mei 1999. Penulis merupakan Anak pertama dari dua bersaudara dari Bapak Bahrin dan Ibu Yenti Pertiwi. Penulis menyelesaikan pendidikan Sekolah Dasar di SDN Pasir Gadung 3 pada tahun 2010 dan SDN 1 Sumber Agung pada tahun 2011, kemudian melanjutkan pendidikan Sekolah Menengah Pertama di SMPN 1 Ngambur diselesaikan pada tahun 2014, dan melanjutkan pendidikan Sekolah Menengah Atas di SMAN 1 Ngambur diselesaikan pada tahun 2017. Penulis diterima sebagai mahasiswa Jurusan Kimia FMIPA Universitas Lampung pada tahun 2017 melalui jalur Seleksi Bersama Masuk Perguruan Tinggi Negeri (SBMPTN) yang diselesaikan pada tahun 2022.

Selama menjadi mahasiswa, penulis aktif mengikuti beberapa kegiatan mahasiswa di lingkungan Fakultas MIPA maupun di lingkungan Unila. Penulis memulai aktivitas organisasi sebagai kader muda Himaki FMIPA Unila pada tahun 2017. Penulis mengikuti kegiatan Karya Wisata Ilmiah yang diadakan oleh BEM FMIPA Unila tahun 2018 dan menjadi panitia kegiatan Karya Wisata Ilmiah sebagai koordinator medis pada tahun 2019. Penulis pernah menjabat sebagai anggota Biro Kesekretariatan (Kestari) Himaki FMIPA Unila pada tahun 2018, staf Departemen Ristek-PI Badan Pengurus Pusat Ikahimki pada tahun 2018-2020, ketua Biro Kesekretariatan (Kestari) Himaki FMIPA Unila pada tahun 2019, wakil ketua DPM FMIPA Unila pada tahun 2020, dan anggota Komisi Perundang-undangan DPM Universitas KBM Unila pada tahun 2021. Penulis pernah menjadi asisten matakuliah praktikum Biokimia I, Biokimia II, dan Kimia Analisis pada tahun 2021. Penulis telah menyelesaikan Praktik Kerja Lapangan (PKL) di Laboratorium Biopolimer dan UPT LTSIT Unila pada tahun 2021, dan

Kuliah Kerja Nyata (KKN) di Desa Pagar Bukit, Kecamatan Bengkuntan,
Kabupaten Pesisir Barat pada bulan Juli-Agustus 2020.

MOTTO

“Wahai orang-orang yang beriman, mohonlah pertolongan (kepada Allah) dengan sabar dan salat. Sungguh, Allah beserta orang-orang yang sabar”
(QS. Al-Baqarah : 153)

“Bersabarlah kamu dan kuatkanlah kesabaranmu dan tetaplah bersiap siaga (di perbatasan negerimu) dan bertakwalah kepada Allah agar kamu beruntung”
(QS. Ali ‘Imran : 200)

“Sesungguhnya bersama kesulitan ada kemudahan. Maka apabila engkau telah selesai (dari sesuatu urusan), tetaplah bekerja keras (untuk urusan yang lain), dan hanya kepada Tuhanmulah engkau berharap”
(QS. Al-Insyirah : 6-8)

“Sesungguhnya urusan-Nya apabila Dia mengendaki sesuatu Dia hanya berkata kepadanya, “Jadilah” Maka jadilah sesuatu itu”
(QS. Ya-Sin : 82)

“Raihlah ilmu, dan untuk meraih ilmu belajarlah tenang dan sabar ”
(Umar Bin Khattab)

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

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

Alhamdulillah, Puji syukur kepada Allah *Subhanahu Wa Ta'ala* yang senantiasa memberikan nikmat iman dan islam, serta shalawat dan salam selalu terlimpahkan kepada Nabi Muhammad *Shalallahu 'Alaihi Wassalaam*.

Dengan segala rasa syukur dan mengharap ridho Allah *Subhanahu Wa Ta'ala*,
saya persembahkan karya ini kepada:

Kedua orangtua saya,

Bapak dan Ibu, terima kasih atas segala doa, nasihat, perhatian, perjuangan, dan kasih sayang yang tiada hentinya.

Saudara saya,

Adik saya yang memberikan semangat dan dukungan.

Dengan rasa hormat,

Ibu Dra. Aspita Laila, M.S., Bapak Prof. John Hendri, Ph.D.,
Bapak Prof. Andi Setiawan, Ph.D., dan Bapak Mulyono, Ph.D. serta para dosen
dan guru atas bimbingan dan ilmu yang telah diberikan.

Seluruh sahabat dan teman-teman saya yang selama ini telah memberikan
semangat, bantuan, dan dukungan.

Serta

Almamater tercinta

SANWACANA

Alhamdulillah, puji syukur kepada Allah SWT atas rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan penulisan skripsi yang berjudul “**Optimasi Produksi N-glukosamin Dari *Actinomyces* 18D36A2 Pada Media Kulit Udang**”. Skripsi ini adalah salah satu syarat untuk memperoleh gelar sarjana Sains di Universitas Lampung.

Penulis menyadari bahwa skripsi ini tidak mungkin terselesaikan tanpa adanya bimbingan, dukungan, nasihat, dan bantuan dari berbagai pihak. Oleh karena itu, penulis mengucapkan terima kasih kepada:

1. Kedua orang tua yang saya cintai, Bapak Bahrin dan Ibu Yenti Pertiwi atas doa, kasih sayang, nasihat, dukungan, serta motivasi yang selalu diberikan sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini dengan baik.
2. Ibu Dra. Aspita Laila, M.S. selaku pembimbing I atas segala ilmu, motivasi, nasihat, bimbingan, serta saran terbaik sehingga penelitian dan skripsi ini dapat terselesaikan dengan baik.
3. Bapak Prof. John Hendri, Ph.D. selaku pembimbing II atas ilmu, bimbingan, nasihat, serta motivasi yang terbaik selama penelitian sehingga penulis dapat menyelesaikan penelitian dan skripsi dengan baik.
4. Bapak Prof. Andi Setiawan, Ph.D. selaku pembahas penelitian yang telah memberikan ilmu, motivasi, kritik serta saran terbaik kepada penulis sehingga skripsi ini terselesaikan dengan baik.
5. Bapak Dr.Eng. Suropto Dwi Yuwono, M.T. selaku dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lampung.

6. Bapak Mulyono, Ph.D. selaku pembimbing akademik sekaligus ketua Jurusan Kimia FMIPA Universitas Lampung.
7. Ibu Dr. Mita Rilyanti, M.Si. selaku sekretaris Jurusan Kimia FMIPA Universitas Lampung.
8. Bapak dan Ibu Dosen Jurusan Kimia FMIPA Universitas Lampung atas ilmu, nasihat, motivasi, dan pengalamannya yang telah diberikan kepada penulis selama menjalankan pendidikan di kampus.
9. Seluruh karyawan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam atas waktu serta pelayanan yang telah diberikan dalam proses perkuliahan.
10. Adik saya, Afwan Anwari yang selalu memberikan doa, dukungan dan motivasi. Semoga Allah SWT selalu melindungi, memberkahi setiap urusan dan tercapainya cita-cita.
11. Keluarga besar bapak dan ibu yang telah memberikan dukungan selama menjalankan pendidikan di kampus.
12. Teman-teman *3 Mekhanai*, Rusydi Iskandar dan Arya Sanda, serta Nurbaiti telah memberikan pengalaman dengan bisnis *Strawberry Milk*, memberikan dukungan, semangat, dan motivasi.
13. Teman-teman seperbimbingan, Rana Aprilia Rinjani, S.Si. dan Melly Yusnidar, S.Si. yang telah kebersamai penelitian.
14. Mahasiswa bimbingan Ibu Aspita dan Pak John (Angkatan 2018), Nurmay, Irma, Firda, Laras, Annisa, dan Salsabila.
15. Tim *Samsan dan Injae*, Kak Fendi, Rizky, Rana, Mba Nafila, dan Saras atas dukungan dan motivasi.
16. Teman belajar, Sandi, Andreas, Fauzan, dan Rezal yang telah memberikan kebahagiaan, pengalaman, serta selalu kebersamai dalam perkuliahan.
17. Teman-teman *Chemistry Men*, Sandi, Andreas, Rusydi, Arya, Rasyad, Rizky, Jere, Davincent, Fauzan, Kadek Suprajaya, Gray, Alfa, Pandu, Rois, Rezal, Muhlis, Sangaji, Danang, Dudung, Doni atas segala kebersamaan canda tawa dan bantuan selama penulis menyelesaikan studi di Jurusan Kimia FMIPA Universitas Lampung.
18. Teman-teman Kimia 2017 Kelas A yang telah kebersamai dalam proses perkuliahan. Terima kasih sudah menemani masa-masa perkuliahan penulis.

19. Teman-teman Kimia 2017 atas segala kebersamaan canda tawa dan bantuan selama penulis menyelesaikan studi di Jurusan Kimia FMIPA Universitas Lampung.
20. Kak Ridho, Kak Arik, dan Mba Widyastuti atas motivasi, dukungan, dan saran terbaik selama menyelesaikan penelitian dan skripsi.
21. Biopol *Squad*, Rizky, Pandu, Rusydi, Valen, Azizah, Rana, Aulia Gadis, Merriezka, Nia, Saras, dan Reika atas keceriaan dan dukungan selama penelitian.
22. Teman-teman dan kakak-kakak di Laboratorium Biokimia dan UPT LTSIT Universitas Lampung atas kerja sama, keceriaan, saling menyemangati, dan berbagi keluh kesah selama penelitian.
23. Kepengurusan Himaki FMIPA Unila periode 2018-2019, BPP Ikahimki periode 2018-2020, DPM FMIPA Unila periode 2020, dan DPM U KBM Unila periode 2021 atas pengalaman, kekeluargaan, dan motivasi.
24. Teman diskusi, Atika Putri Karina, S.T. atas dukungan, bantuan, dan motivasi kepada penulis sehingga dapat menyelesaikan skripsi ini dengan baik.
25. Semua pihak yang telah mendukung dan memotivasi penulis untuk menyelesaikan skripsi ini dan menyelesaikan studi sebagai mahasiswa S1 Kimia.

Akhir kata, penulis memohon maaf apabila masih banyak kekurangan dan kesalahan dalam penulisan skripsi ini dan penulis berharap skripsi ini dapat bermanfaat bagi kita semua.

Bandar Lampung, 26 Desember 2022

Ikromudin

DAFTAR ISI

	Halaman
DAFTAR TABEL	iii
DAFTAR GAMBAR.....	v
I. PENDAHULUAN.....	1
1.1. Latar Belakang	1
1.2. Kerangka Teoritis	2
1.3. Tujuan Penelitian.....	3
1.4. Manfaat Penelitian.....	3
II. TINJAUAN PUSTAKA	4
2.1. Kitin.....	4
2.2. Kulit Udang	4
2.3. <i>Actinomyces</i>	5
2.4. Enzim Kitinase	5
2.5. Glukosamin	6
2.6. Spektrofotometri UV-Vis	6
2.7. Fermentasi Fase Cair Sistem Tertutup (Batch)	7
2.8. <i>Scanning Electron Microscope</i> (SEM).....	8
2.9. <i>High Performance Liquid Chromatography</i> (HPLC)	9
III. METODE PENELITIAN	10
3.1. Waktu dan Tempat Penelitian	10
3.2. Alat dan Bahan	10
3.3. Prosedur Penelitian.....	11
3.3.1. Persiapan Serbuk Kulit Udang, Kitin, dan Koloid Kitin	11
3.3.2. Persiapan Media dan Larutan Standar	11
3.3.3. Peremajaan <i>Actinomyces</i> 18D36A2.....	13
3.3.4. Uji Aktivitas Kitinolitik <i>Actinomyces</i> 18D36A2.....	13
3.3.5. Identifikasi Morfologi <i>Actinomyces</i> 18D36A2.....	13
3.3.6. Laju Pertumbuhan <i>Actinomyces</i> 18D36A2.....	13
3.3.7. Persiapan Inokulum <i>Actinomyces</i> 18D36A2	14
3.3.8. Fermentasi Fase Cair Sistem Tertutup (<i>Batch</i>).....	14

3.3.9. Uji Aktivitas Enzim, Konsentrasi Glukosamin, dan Kadar Protein	15
3.3.10. Analisis Glukosamin dengan HPLC	16
IV. HASIL DAN PEMBAHASAN	19
4.1. Persiapan Sampel Kulit Udang, Kitin, dan Koloid Kitin	19
4.2. Peremajaan <i>Actinomyces</i> 18D36A2	21
4.3. Uji Aktivitas Kitinolitik <i>Actinomyces</i> 18D36A2.....	22
4.4. Identifikasi Morfologi <i>Actinomyces</i> 18D36A2.....	24
4.5. Laju Pertumbuhan <i>Actinomyces</i> 18D36A2	26
4.6. Fermentasi Fase Cair Sistem Tertutup (<i>Batch</i>)	27
4.6.1. Optimasi Waktu Inkubasi	31
4.6.2. Optimasi pH.....	34
4.6.3. Optimasi Temperatur	38
4.7. Analisis N-Glukosamin dengan HPLC.....	41
V. SIMPULAN DAN SARAN.....	44
5.1. Simpulan.....	44
5.2. Saran	44
DAFTAR PUSTAKA	45
LAMPIRAN.....	50

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Absorbansi BSA pada variasi konsentrasi	54
2. Absorbansi standar glukosamin pada variasi konsentrasi.....	55
3. Absorbansi pada <i>optical density</i> (OD).....	60
4. Nilai absorbansi sampel di media cair serbuk kulit udang	61
5. Aktivitas unit kitinase pada variasi waktu inkubasi di media cair serbuk kulit udang	61
6. Nilai absorbansi sampel di media cair kitin.....	61
7. Aktivitas unit kitinase pada variasi waktu inkubasi di media cair kitin	62
8. Nilai absorbansi sampel di media cair serbuk kulit udang	62
9. Aktivitas unit kitinase pada variasi pH di media cair serbuk kulit udang	62
10. Nilai absorbansi sampel di media cair kitin.....	62
11. Aktivitas unit kitinase pada variasi pH di media cair kitin.....	63
12. Nilai absorbansi sampel di media cair serbuk kulit udang	63
13. Aktivitas unit kitinase pada variasi temperatur di media cair serbuk kulit udang.....	63

14. Konsentrasi glukosamin pada variasi waktu inkubasi di media cair serbuk kulit udang	64
15. Konsentrasi glukosamin pada variasi waktu inkubasi di media cair kitin	64
16. Konsentrasi glukosamin pada variasi pH di media cair serbuk kulit udang ..	64
17. Konsentrasi glukosamin pada variasi pH di media cair kitin	64
18. Konsentrasi glukosamin pada variasi temperatur di media cair serbuk kulit udang.....	65
19. Kadar protein pada variasi waktu inkubasi di media cair serbuk kulit udang	66
20. Kadar protein pada variasi waktu inkubasi di media cair kitin.....	66
21. Kadar protein pada variasi pH di media cair serbuk kulit udang.....	66
22. Kadar protein pada variasi pH di media cair kitin	66
23. Kadar protein pada variasi temperatur di media cair serbuk kulit udang	67

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Struktur Kitin (Santos <i>et al.</i> , 2020).....	4
2. Struktur Glukosamin.....	6
3. Diagram Alir Penelitian.....	18
4. Uji filtrat dengan CuSO ₄	20
5. Uji filtrat dengan amonium oksalat.....	20
6. a) Peremajaan isolat di media agar koloid kitin, b) Peremajaan isolat di media ISP-2.....	21
7. a) Zona bening isolat 18D36A2 sebelum pewarnaan, b) Zona bening isolat 18D36A2 setelah pewarnaan dengan <i>congo red</i>	23
8. a) Isolat 18D36A2 di media agar koloid kitin pada perbesaran 400 X, b) Isolat 18D36A2 di media ISP-2 pada perbesaran 400 X, c) Isolat 18D36A2 pada perbesaran 10.00 K X, d) Ilustrasi rantai spora <i>actinomyces</i> genus <i>Actinoplanes</i> (Barka <i>et al.</i> , 2016).....	25
9. Laju pertumbuhan <i>actinomyces</i> 18D36A2.....	26
10. a) Inokulum di media cair kitin, b) Inokulum di media cair serbuk kulit udang.....	28
11. Reaksi antara CBB G-250 dan protein: a) Kondisi netral, b) Kondisi basa (anion), c) Kondisi asam (kation) (Georgiou <i>et al.</i> , 2008).....	30
12. Media fermentasi pada optimasi waktu inkubasi: a) Substrat Kitin,	31

13. Pengaruh waktu inkubasi terhadap aktivitas unit kitinase.	32
14. Pengaruh waktu inkubasi terhadap konsentrasi glukosamin.	33
15. Pengaruh waktu inkubasi terhadap kadar protein.	34
16. Media fermentasi pada optimasi pH: a) Substrat kitin, b) Substrat serbuk kulit udang.....	35
17. Pengaruh pH terhadap aktivitas unit kitinase.....	36
18. Pengaruh pH terhadap konsentrasi glukosamin.....	37
19. Pengaruh pH terhadap kadar protein.....	37
20. Media fermentasi pada optimasi temperatur: a) Temperatur 29°C,.....	38
21. Pengaruh temperatur terhadap aktivitas unit kitinase.	39
22. Pengaruh temperatur terhadap konsentrasi glukosamin.	40
23. Pengaruh temperatur terhadap kadar protein.	40
24. a) Kromatogram HPLC standar D-glukosamin 0,5 mg/mL, b) ekstrak enzim temperatur 29°C, c) ekstrak enzim temperatur 52°C.	42
25. Kurva standar BSA.	54
26. Kurva standar D-glukosamin.	55

I. PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Indonesia memiliki perairan yang luas dan biota laut yang melimpah. Udang merupakan komoditas sektor perikanan yang mempunyai nilai ekonomis tinggi dan menjadi komoditas unggulan. Udang dari industri perikanan diekspor dalam bentuk udang segar, udang beku, dan udang olahan (Mashari dkk., 2019). Udang yang diolah menghasilkan limbah, antara lain kepala, kulit, ekor, dan kaki. Limbah udang yang tidak dimanfaatkan dapat menimbulkan pencemaran lingkungan dan menimbulkan bau tidak sedap. Limbah udang yang dihasilkan perlu dimanfaatkan untuk menanggulangi pencemaran lingkungan yang ditimbulkan.

Limbah udang dapat dimanfaatkan sebagai bahan baku pembuatan kitin dan turunannya yang mempunyai daya guna dan bernilai ekonomis tinggi. Kitin diisolasi dari kulit udang melalui dua tahapan reaksi, yaitu demineralisasi dan deproteinasi. Kitin merupakan biopolimer yang melimpah di alam setelah selulosa. Kitin terdiri dari N-asetil-D-glukosamin yang terpaut melalui ikatan β -(1-4) glikosidik. Kitin tidak larut dalam air karena hidrofobitasnya yang tinggi dan menyerupai struktur kristal yang kaku dan tidak fleksibel (Arnold *et al.*, 2020). Kitin dapat digunakan di industri farmasi, tekstil, kosmetik, pertanian, dan lainnya (Yan *and* Chen, 2015). Kitin dapat dihidrolisis secara enzimatik oleh mikroorganisme yang memiliki aktivitas enzim kitinase. Glukosamin merupakan monosakarida amino dari hidrolisis kitin. Glukosamin dapat digunakan sebagai prekursor dalam biosintesis protein glikosilat dan lipid untuk memproduksi cairan

synovial (Huskisson, 2008). Selain itu, glukosamin juga dapat dimanfaatkan untuk memperbaiki tulang rawan (Mojarrad *et al.*, 2007).

Actinomycetes memiliki habitat alami, yaitu tanah dan laut. Habitat *actinomycetes* di laut, antara lain air, pasir, tumbuhan laut, dan sedimen *mangrove*. *Actinomycetes* telah dilaporkan dapat mendegradasi selulosa, kitin, dan hidrokarbon. *Actinomycetes* menghasilkan beragam enzim yang dibutuhkan di industri. Enzim yang dihasilkan oleh *actinomycetes* memiliki manfaat di berbagai industri, antara lain industri farmasi, detergen, dan fotografi (Chavan *et al.*, 2013). *Streptomyces* sp. mampu menghidrolisis limbah minyak dan jerami yang menghasilkan peningkatan produksi biogas (Priya *et al.*, 2012). *Thermobifida fusca* merupakan *actinomycetes* penghasil enzim kitinase yang berperan dalam hidrolisis kitin (Rawway *et al.*, 2018). Pemanfaatan enzim dari *actinomycetes* termasuk teknologi ramah lingkungan (Prakash *et al.*, 2013).

Penelitian dari Widyastuti *et al.* (2022) telah menjelaskan kemampuan *Pseudonocardia antitumoralis* 18D36A1 dalam mendegradasi kulit udang menjadi glukosamin dengan metode *solid state fermentation* (SSF). Penelitian ini dilakukan produksi N-glukosamin menggunakan *actinomycetes* 18D36A2 dengan metode fermentasi fase cair sistem tertutup (*batch*). Media cair serbuk kulit udang dan media cair kitin digunakan sebagai substrat pada fermentasi *batch*. Fermentasi dilakukan pada variasi waktu inkubasi, pH, dan temperatur untuk mengetahui kondisi optimum produksi N-glukosamin.

1.2. Kerangka Teoritis

Kulit udang dilaporkan memiliki kandungan kitin, protein, dan mineral. Kitin dapat diisolasi dari kulit udang melalui tahapan demineralisasi dan deproteinasi. Demineralisasi merupakan proses pemisahan mineral dari kulit udang dengan penambahan larutan asam, sedangkan deproteinasi merupakan proses pemisahan protein dengan penambahan larutan basa. Kulit udang dan kitin dapat didegradasi menggunakan enzim kitinase dari mikroorganisme. *Actinomycetes*

merupakan mikroorganisme yang dapat menghasilkan enzim kitinase untuk menghidrolisis kitin menjadi glukosamin. Kulit udang dan kitin dapat digunakan sebagai substrat untuk produksi enzim kitinase. Produksi N-glukosamin dilakukan pada variasi waktu inkubasi, pH, dan temperatur dengan metode fermentasi fase cair sistem tertutup (*batch*).

1.3. Tujuan Penelitian

Adapun tujuan dari penelitian ini adalah :

1. Mengetahui kondisi optimum aktivitas enzim kitinase, konsentrasi glukosamin, dan kadar protein dari *actinomyces* 18D36A2 terhadap pengaruh waktu inkubasi, pH, dan temperatur.
2. Memproduksi N-glukosamin dari *actinomyces* 18D36A2 pada media kulit udang.

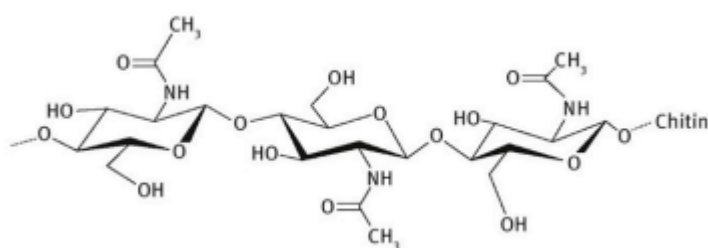
1.4. Manfaat Penelitian

Manfaat dari penelitian ini adalah untuk memberikan informasi tentang aktivitas enzim kitinase dari *actinomyces* 18D36A2 dan potensi *actinomyces* 18D36A2 yang dapat menghasilkan glukosamin dari kulit udang dan kitin.

II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Kitin

Kitin merupakan biopolimer yang paling melimpah setelah selulosa. Rumus molekul kitin adalah $C_{18}H_{26}N_2O_{10}$. Kitin terdiri dari N-asetil-D-glukosamin yang terpaut melalui ikatan β -(1-4) glikosidik. Kitin tidak larut dalam air karena hidrofobitasnya yang tinggi dan menyerupai struktur kristal yang kaku dan tidak fleksibel (Arnold *et al.*, 2020). Kitin memiliki kandungan nitrogen yang membedakan dengan biomassa lainnya. Komposit yang mengandung nitrogen banyak digunakan di industri farmasi, tekstil, kosmetik, dan pertanian (Yan *and* Chen, 2015). Kitin dapat diisolasi dari cangkang kepiting, serangga, udang, dan lobster. Manfaat kitin di bidang biomedis, antara lain digunakan untuk penyembuhan luka dan rekayasa jaringan (Duceppe and Tabrizian, 2010).



Gambar 1. Struktur Kitin (Santos *et al*, 2020).

2.2. Kulit Udang

Pengolahan udang memiliki potensi agro-industri yang besar. Produk dari pengolahan udang dalam bentuk udang yang sudah dibekukan berupa udang

mentah dan udang yang matang. Selain itu, pengolahan udang menghasilkan limbah padat berupa kulit dan kepala (Choorit *et al.*, 2008). Udang diekspor sekitar 90% dari total pengolahan udang dalam bentuk udang beku tanpa kepala dan kulit. Limbah udang yang dihasilkan secara global dapat mencapai 15 juta ton per tahun (Zargar *et al.*, 2015). Limbah udang dapat dimanfaatkan menjadi produk yang memiliki nilai tambah, yaitu dimanfaatkan untuk produksi kitin, produksi enzim, dan asam laktik (Duan *et al.*, 2012; Kandra *et al.*, 2012).

2.3. Actinomycetes

Actinomycetes berasal dari bahasa Yunani, yaitu *atkis* dan *mykes* yang memiliki arti sinar dan jamur. *Actinomycetes* memiliki ciri-ciri menyerupai bakteri dan jamur. Komposisi kimia dinding sel dan struktur sel *actinomycetes* mirip dengan bakteri gram positif, sedangkan karakteristik morfologi *actinomycetes* menyerupai cendawan yang memiliki filamen dengan bentuk spora dan miselium (Das *et al.*, 2008). *Actinomycetes* memiliki kandungan *guanine-cytocine* (GC) yang tinggi. *Actinomycetes* memiliki aktivitas biologis yang beragam dan sumber metabolit sekunder yang melimpah. *Actinomycetes* dapat menghasilkan beberapa enzim, antara lain enzim kitinase, amilase, lipase, dan gelatinase. Enzim yang dihasilkan oleh *actinomycetes* memiliki manfaat di berbagai industri, antara lain industri farmasi, deterjen, dan fotografi (Chavan *et al.*, 2013).

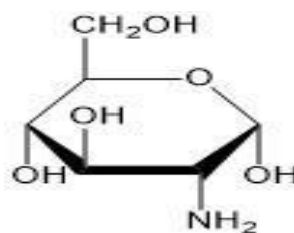
2.4. Enzim Kitinase

Enzim kitinase adalah enzim glikosil hidrolase yang memiliki fungsi sebagai biokatalisator untuk mendegradasi kitin menjadi glukosamin. Berdasarkan cara kerjanya enzim kitinase dibedakan menjadi 3 jenis, yaitu eksokitinase, endokitinase dan N-asetilglukosaminidase. Eksokitinase memotong polimer kitin hanya dari ujung non reduksi. N-asetil-glukosaminidase yang memutuskan diasetilkitobiosa dan menghasilkan N-asetil-glukosamin. Endokitinase memotong polimer kitin secara acak dan menghasilkan dimer, trimer, tetramer, dan oligomer gula. Kitinase dapat ditemukan pada bakteri dan *fungi*. Bakteri penghasil

kitinase, antara lain *Serratia marcescens*, *Enterobacter*, dan *Streptomyces*, sedangkan *fungi* yang menghasilkan enzim kitinase adalah *Penicillium*, *Aspergillus*, dan *Trichoderma* (Herdyastuti *et al.*, 2009). Perbedaan mikroorganisme dan jenis substrat yang dipilih menyebabkan perbedaan pada karakteristik enzim kitinase (Hamid *et al.*, 2014).

2.5. Glukosamin

Glukosamin merupakan monosakarida amino dari hidrolisis kitin yang terdapat di kulit golongan krustasea, *antropoda*, dan cendawan (Mojarrad *et al.*, 2007). Glukosamin dapat dimanfaatkan untuk mencegah dan menyembuhkan *osteoarthritis*. Glukosamin dalam tubuh manusia memiliki fungsi sebagai prekursor dalam biosintesis protein glikosilat dan lipid untuk memproduksi cairan *synovial*. Cairan *synovial* digunakan sebagai pelumas di tulang rawan (Huskisson, 2008). Glukosamin mempunyai berat molekul sebesar 179,17 Da. Glukosamin HCl dan glukosamin sulfat merupakan glukosamin yang telah melalui proses penggaraman dan digunakan untuk tatalaksana *osteoarthritis* (Rovati *et al.*, 2012).



Gambar 2. Struktur Glukosamin.

2.6. Spektrofotometri UV-Vis

Spektrofotometri UV-Vis adalah metode yang digunakan dalam analisis dengan melibatkan pengukuran jumlah ultraviolet atau radiasi tampak yang diserap oleh suatu zat dalam larutan. Spektrofotometer UV-Vis merupakan instrumen yang berfungsi untuk mengukur rasio intensitas dua berkas cahaya di wilayah UV-Vis.

Hukum dasar yang mengatur analisis spektrofotometri adalah hukum Lambert-Beer. Hukum Beer menyatakan bahwa intensitas seberkas radiasi monokromatik paralel berkurang secara eksponensial dengan jumlah molekul yang menyerap. Hukum Lambert menyatakan bahwa intensitas seberkas radiasi monokromatik paralel berkurang secara eksponensial saat melewati media dengan ketebalan homogen. Gabungan dari kedua hukum ini menghasilkan hukum Lambert-Beer. Hukum Lambert-Beer menyatakan bahwa ketika berkas cahaya dilewatkan melalui sel transparan yang berisi larutan zat penyerap, pengurangan intensitas cahaya dapat terjadi (Behera *et al.*, 2012). Secara matematis, hukum Lambert-Beer dinyatakan sebagai:

$$A = a \cdot b \cdot c$$

Keterangan:

A: Absorbansi

a: absorptivitas molar

b: tebal kuvet (cm)

c: konsentrasi larutan

Panjang gelombang biasanya dipilih adalah panjang gelombang serapan maksimum (λ_{maks}) dan konsentrasi harus disesuaikan untuk memberikan absorbansi sekitar 0,9 dengan akurasi dan presisi pengukuran optimal (Behera *et al.*, 2012).

2.7. Fermentasi Fase Cair Sistem Tertutup (Batch)

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

a. Persiapan substrat

Substrat dibuat menjadi butiran kecil. Penambahan air dan nutrisi disebut dengan pra-perawatan substrat untuk persediaan gizi yang lebih banyak.

b. Persiapan inokulum

Persiapan inokulum berdasarkan mikroorganisme yang digunakan. Persiapan inokulum bertujuan untuk mengembangkan inokulum dengan tingkat kelangsungan hidup mikroorganisme yang tinggi.

c. Persiapan wadah

Persiapan wadah dilakukan dengan pembersihan wadah setelah fermentasi sebelumnya dan wadah disterilkan sebelum ditambahkan substrat.

d. Inokulasi dan pengerjaan

Penyebaran substrat pada media yang telah dilakukan sterilisasi dan dilakukan secara aseptik.

e. Proses fermentasi *batch*

Pada proses ini diperhatikan pH, medium, temperatur, dan waktu inkubasi.

f. Kultivasi

Tahapan ini memerlukan bantuan mekanis dalam pemisahan substrat padat dari medium. Penggunaan kertas saring dan sentrifugasi dapat dipakai untuk memisahkan substrat.

2.8. Scanning Electron Microscope (SEM)

Scanning electron microscope (SEM) merupakan jenis mikroskop elektron yang digunakan untuk mengamati morfologi permukaan sampel dalam perbesaran yang tinggi dengan menggunakan berkas elektron berenergi tinggi. SEM terdiri dari elektron yang berfungsi sebagai pencitraan dan media elektromagnetik sebagai lensanya. Komponen dari SEM adalah tiga pasang lensa-lensa elektromagnetik, sumber elektron, *imaging detector*. Semakin kecil berkas

difokuskan semakin besar resolusi lateral yang dicapai. Kesalahan fisika pada lensa-lensa elektromagnetik berupa astigmatismus dikoreksi oleh perangkat stigmator. SEM tidak memiliki sistem koreksi untuk kesalahan aberasi lainnya.

Interaksi elektron dengan atom-atom di permukaan maupun di bawah permukaan sampel terjadi ketika berkas elektron *discan* pada permukaan sampel. Interaksi tersebut mengakibatkan berkas elektron keluar kembali, elektron-elektron tersebut disebut *backscattered electrons* (BSE). Proses pembentukan BSE terjadi pada atom-atom di bagian permukaan sampel yang lebih dalam yang disebabkan oleh tumbukan antara elektron dari sumber dengan inti atom. *Secondary electrons* merupakan sebagian elektron yang masuk ke dalam bahan kemudian memindahkan sebagian energi pada elektron atom sehingga terpelempar ke permukaan bahan (Sujatno dkk., 2015).

2.9. High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

High performance liquid chromatography (HPLC) atau kromatografi cair kinerja tinggi merupakan teknik kromatografi yang menggunakan fasa gerak cair. HPLC dapat digunakan dalam analisis untuk memisahkan, mengidentifikasi, dan mengukur senyawa aktif senyawa. HPLC yang menggunakan kolom dapat menampung bahan pengemas (fase diam), pompa yang menggerakkan fase gerak melalui kolom, dan detektor yang menunjukkan waktu retensi molekul. Waktu retensi bervariasi tergantung pada interaksi antara fase diam, molekul yang dianalisis, dan pelarut yang digunakan. Sampel yang akan dianalisis dimasukkan ke dalam volume kecil ke aliran fase gerak dan dihambat oleh interaksi kimia atau fisik tertentu dengan fase diam. Pelarut yang digunakan adalah campuran air atau cairan organik yang dapat bercampur, antara lain metanol dan asetonitril (Malviya *et al.*, 2010).

III. METODE PENELITIAN

3.1. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilakukan pada bulan Agustus 2021 sampai Oktober 2022 di Unit Pelaksana Teknis Laboratorium Terpadu dan Sentra Inovasi Teknologi (UPT-LTSIT) dan Laboratorium Biopolimer, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Lampung.

3.2. Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan, yaitu alat-alat gelas (pipet tetes, gelas *beaker*, erlenmeyer, tabung reaksi, gelas ukur, labu ukur), cawan petri, kapas, kasa, karet gelang, tisu, pinset, jarum ose, lampu spritus, mikropipet, neraca analitik, oven, *laminar air flow*, *incubator*, *autoclave* Tomy SX-700, sentrifius Hitachi CF 16RX II, mikroskop *Zeiss axio A1*, *scanning electron microscope* (SEM), termometer, *heating magnetic stirrer*, spektrofotometer UV-Vis, dan *high performance liquid chromatography* (HPLC).

Bahan-bahan yang digunakan, yaitu kulit udang, akuades, agar, air laut buatan, standar D-glukosamin, *bovine serum albumin*, HCl, NaOH, *yeast extract*, *malt extract*, dekstrosa, amonium oksalat, CuSO₄, air laut buatan, NaH₂PO₄·H₂O, Na₂HPO₄·7H₂O, asetonitril, etanol, dan *congo red*.

3.3. Prosedur Penelitian

3.3.1. Persiapan Serbuk Kulit Udang, Kitin, dan Koloid Kitin

Kulit udang dicuci dengan air, dikeringkan di dalam oven pada temperatur 60°C selama ± 24 jam. Kulit udang yang telah kering diubah menjadi bentuk serbuk menggunakan *blender*. Serbuk kulit udang dijadikan sebagai bahan baku pembuatan kitin. Serbuk kulit udang dimasukkan ke gelas *beaker* dan ditambahkan larutan NaOH 3,5% dengan perbandingan 1:10 (w/v), diaduk selama 2 jam pada temperatur 60°C, disaring. Residu dibilas dengan akuades sampai pH akuades (pH 6) dan dimasukkan ke dalam oven pada temperatur 60°C selama ± 24 jam. Filtrat hasil deproteinasi diuji dengan CuSO₄. Residu hasil deproteinasi ditimbang, dimasukkan ke gelas *beaker*, ditambahkan larutan HCl 1,25 N dengan perbandingan 1:10 (w/v), diaduk selama ± 2 jam pada temperatur 60°C, disaring. Residu dibilas dengan akuades sampai pH akuades (pH 6) dan dimasukkan ke dalam oven selama ± 24 jam pada temperatur 60°C. Filtrat hasil demineralisasi diuji dengan amonium oksalat (Hendri dan Laila, 2013).

Serbuk kitin dimasukkan ke gelas *beaker* dan ditambahkan larutan HCl pekat dengan perbandingan 1:10 (w/v), diaduk selama 2 jam. Selanjutnya, ditambahkan akuades dengan perbandingan 1:10 (w/v), diaduk, didiamkan hingga menjadi bentuk suspensi. Koloid kitin disentrifugasi selama 15 menit dengan kecepatan 7000 rpm, dibilas dengan akuades sampai pH 6 (Joe and Sarojini, 2017).

3.3.2. Persiapan Media dan Larutan Standar

3.3.2.1. Media *International Streptomyces Project-2 (ISP-2)*

Media ISP-2 dibuat dari 0,4 g *yeast extract*, 1 g *malt extract*, 0,4 g dekstrosa, dan 2 g agar, dilarutkan dalam 100 ml air laut buatan (Khamna *et al.*, 2010).

3.3.2.2. Media Agar Koloid Kitin

Media agar koloid kitin dibuat dari 2 g agar dan 1 g koloid kitin, dilarutkan dalam 100 ml air laut buatan (Saima *and* Roohi, 2013).

3.3.2.3. Larutan Buffer Pospat

Larutan buffer pospat 0,05 M dibuat dari $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ dan $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ yang dilarutkan dalam air laut buatan. $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ digunakan sebagai larutan stok A untuk mengurangi pH larutan, sedangkan $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ digunakan sebagai larutan stok B untuk menambah pH larutan.

a. Larutan Stok A

$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ sebanyak 3,445 gram dilarutkan dalam 500 mL air laut buatan, diperoleh larutan stok A 0,05 M, dan diukur pH larutan menggunakan pH meter.

b. Larutan Stok B

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ sebanyak 4,449 gram dilarutkan dalam 500 mL air laut buatan, diperoleh larutan stok A 0,05 M, dan diukur pH larutan menggunakan pH meter.

3.3.2.4. Larutan Standar Glukosamin

D-Glukosamin sebanyak 0,1 gram dilarutkan dalam 100 ml akuades, diperoleh larutan stok standar glukosamin 1 mg/mL. Larutan standar dibuat dengan konsentrasi 0,1 mg/mL; 0,2 mg/mL; 0,3 mg/mL; 0,4 mg/mL; 0,5 mg/mL; 0,6 mg/mL; dan 0,7 mg/mL.

3.3.3. Peremajaan *Actinomycetes* 18D36A2

Isolat yang digunakan pada penelitian ini merupakan deposit hasil dari penelitian sebelumnya. Jumlah isolat yang digunakan sebanyak 1 isolat dengan kode strain 18D36A2. *Actinomycetes* 18D36A2 merupakan koleksi UPT LTSIT Universitas Lampung, diperoleh dari hasil isolasi mikroorganisme perairan Buleleng, Bali. *Actinomycetes* 18D36A2 digoreskan secara aseptik di media agar koloid kitin dan media ISP-2, diinkubasi pada temperatur ruang, dan diamati pertumbuhan *actinomycetes* 18D36A2.

3.3.4. Uji Aktivitas Kitinolitik *Actinomycetes* 18D36A2

Media agar koloid kitin digunakan pada uji aktivitas kitinolitik *actinomycetes* 18D36A2. Media disterilisasi dengan *autoclave* selama 15 menit pada temperatur 121°C, tekanan 1 atm. *Actinomycetes* 18D36A2 diinokulasikan ke media agar koloid kitin, diinkubasi pada temperatur ruang dan diukur diameter zona bening dan koloni isolat pada waktu inkubasi hari ke-14.

3.3.5. Identifikasi Morfologi *Actinomycetes* 18D36A2

Identifikasi morfologi *actinomycetes* 18D36A2 dilakukan dengan metode *cover slip culture* (Gebreyohannes *et al.*, 2013). Media ISP-2 dan media agar koloid kitin ditancapkan *deck glass* dengan kemiringan 45°, digoreskan isolat di daerah *deck glass*. Setelah isolat tumbuh, morfologi isolat diidentifikasi menggunakan mikroskop *axio Zeiss A1* dan SEM.

3.3.6. Laju Pertumbuhan *Actinomycetes* 18D36A2

Actinomycetes 18D36A2 yang ditumbuhkan di media agar koloid kitin, diinokulasikan ke tabung reaksi yang berisi 9 ml air laut buatan dan 0,09 gram kitin. Pengukuran *optical density* (OD) dilakukan selama 14 hari dengan interval waktu 1 hari. OD diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang

gelombang 600 nm. Laju pertumbuhan isolat dibuat dengan memplot nilai OD_{600nm} terhadap waktu (Purkan dkk., 2014).

3.3.7. Persiapan Inokulum *Actinomyces* 18D36A2

Media inokulum yang digunakan terdiri dari 1 gram substrat dan 100 mL air laut buatan. Media inokulum disterilisasi menggunakan *autoclave* pada temperatur 121°C, tekanan 1 atm selama 15 menit. *Actinomyces* 18D36A2 sebanyak 3 ose dari media agar koloid kitin diinokulasikan ke dalam media inokulum secara aseptik, diinkubasi selama 7 hari pada temperatur ruang.

3.3.8. Fermentasi Fase Cair Sistem Tertutup (*Batch*)

Fermentasi *batch* dilakukan dengan divariasikan waktu inkubasi, pH, dan temperatur. Media fermentasi yang digunakan terdiri dari 0,36 gram substrat dan 36 mL air laut buatan. Media fermentasi disterilisasi menggunakan *autoclave* pada temperatur 121°C, tekanan 1 atm selama 15 menit. Fermentasi fase cair sistem tertutup (*batch*) dilakukan pada variasi waktu inkubasi, pH, dan temperatur.

3.3.8.1. Optimasi Waktu Inkubasi

Media fermentasi dibuat sebanyak 3 replikat menggunakan serbuk kulit udang dan kitin sebagai substrat. Media fermentasi yang telah diinokulasikan inokulum *actinomyces* 18D36A2 secara aseptik dengan perbandingan 1:10 (v/v), diinkubasi secara statis pada temperatur ruang selama 14 hari. Hasil dari fermentasi *batch* pada waktu inkubasi hari ke-2, hari ke-7, dan hari ke-14 disentrifugasi dengan kecepatan 7.000 rpm selama 15 menit pada temperatur 4°C, diperoleh ekstrak kasar enzim, dan dimasukkan ke dalam botol vial.

3.3.8.2. Optimasi pH

Optimasi pH ditentukan dengan divariasikan pH media fermentasi menggunakan buffer pospat 0,05 M dengan variasi pH 6; 7; dan 8. Masing-masing media fermentasi dibuat sebanyak 3 replikat menggunakan serbuk kulit udang dan kitin sebagai substrat. Media fermentasi yang telah diinokulasikan inokulum *actinomyces* 18D36A2 secara aseptik dengan perbandingan 1:10 (v/v), diinkubasi secara statis pada temperatur ruang selama waktu inkubasi optimum. Hasil dari fermentasi *batch* disentrifugasi dengan kecepatan 7.000 rpm selama 15 menit pada temperatur 4°C, diperoleh ekstrak kasar enzim, dan dimasukkan ke dalam botol vial.

3.3.8.3. Optimasi Temperatur

Media fermentasi yang digunakan pada optimasi temperatur adalah media cair serbuk kulit udang dengan pH optimum. Media fermentasi yang telah diinokulasikan inokulum *actinomyces* 18D36A2 secara aseptik dengan perbandingan 1:10 (v/v), diinkubasi secara statis pada temperatur 29°C dan 52°C selama waktu inkubasi optimum. Hasil dari fermentasi *batch* disentrifugasi dengan kecepatan 7.000 rpm selama 15 menit pada temperatur 4°C, diperoleh ekstrak kasar enzim, dan dimasukkan ke dalam botol vial.

3.3.9. Uji Aktivitas Enzim, Konsentrasi Glukosamin, dan Kadar Protein

3.3.9.1. Uji Aktivitas Enzim Kitinase

Uji aktivitas kitinase ditentukan dengan metode Miller (Miller, 1959). Ekstrak kasar enzim sebanyak 1 mL dimasukkan ke dalam tabung reaksi, ditambahkan 1 mL koloid kitin 1%, diinkubasi selama 30 menit pada temperatur 40°C. Selanjutnya, sampel ditambahkan 1 mL reagen DNS, dipanaskan selama 10 menit pada temperatur 100°C, dan dibaca absorbansi sampel pada panjang gelombang 540 nm menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Satu unit aktivitas

kitinase didefinisikan sebagai jumlah enzim yang diperlukan untuk melepaskan 1 μmol glukosamin dalam satu menit. Uji aktivitas enzim dilakukan sebanyak 3 kali pengulangan.

3.3.9.2. Uji Konsentrasi Glukosamin

Uji konsentrasi glukosamin ditentukan dengan metode Miller (Miller, 1959). Ekstrak kasar enzim sebanyak 1,5 mL dimasukkan ke dalam tabung reaksi, ditambahkan 1,5 mL reagen DNS. Selanjutnya, dipanaskan selama 10 menit pada temperatur 100°C. Nilai absorbansi sampel dibaca menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 540 nm. Larutan standar D-glukosamin dengan variasi konsentrasi digunakan sebagai standar. Uji konsentrasi glukosamin dilakukan sebanyak 3 kali pengulangan. Konsentrasi glukosamin ditentukan dengan persamaan kurva standar D-glukosamin.

3.3.9.3. Uji Kadar Protein

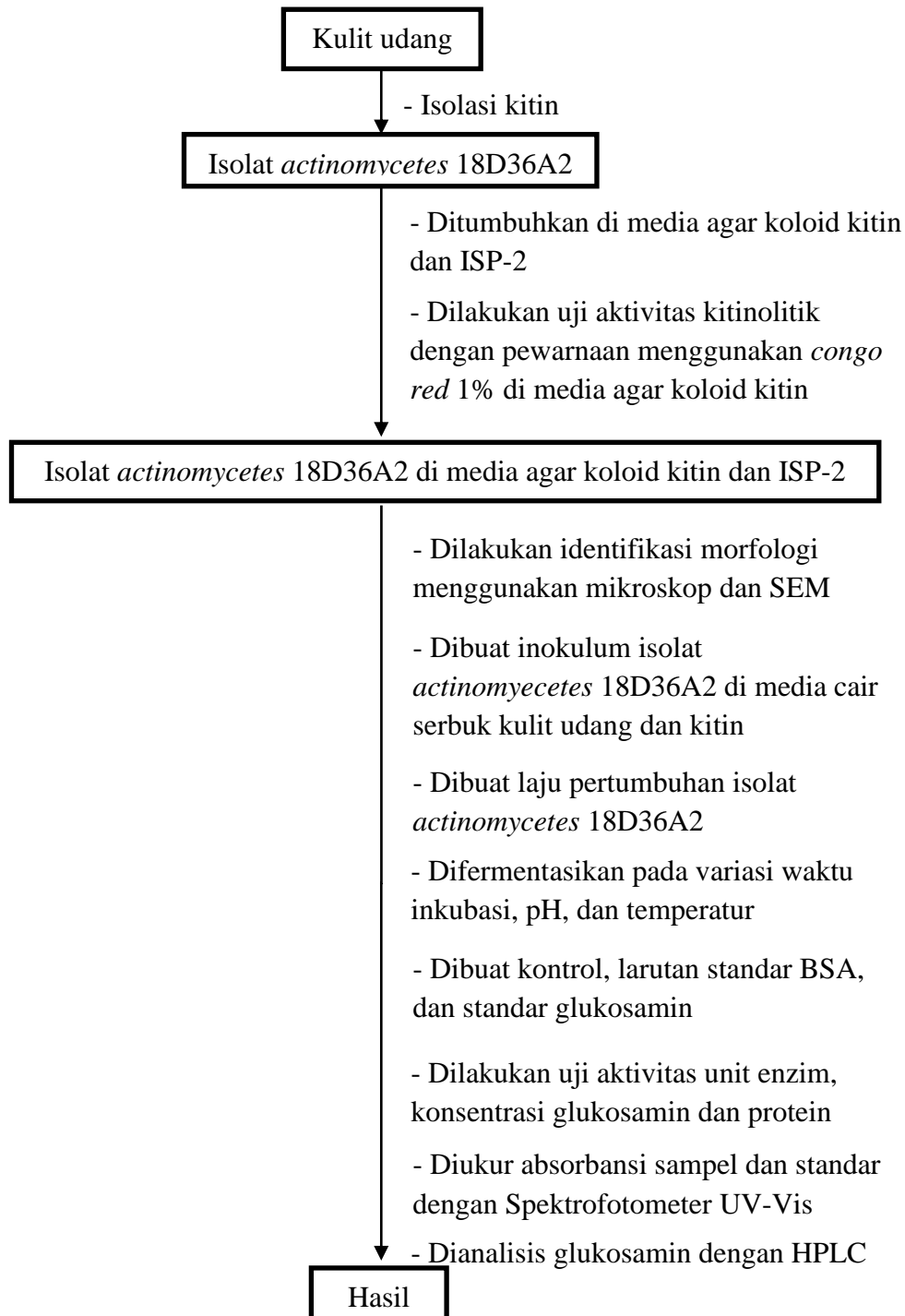
Uji kadar protein ditentukan dengan metode Bradford (Bradford, 1976). Ekstrak kasar enzim sebanyak 400 μL direaksikan dengan 2 mL reagen Bradford, diukur nilai absorbansinya menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 595 nm. Larutan BSA dengan variasi konsentrasi digunakan sebagai standar. Uji kadar protein dilakukan sebanyak 3 kali pengulangan. Kadar protein ditentukan dengan persamaan kurva standar *bovine serum albumin* (BSA).

3.3.10. Analisis Glukosamin dengan HPLC

Ekstrak kasar enzim hasil fermentasi pada waktu inkubasi, pH, dan suhu optimum diekstraksi dengan etanol absolut dan disentrifugasi selama ± 5 menit. Lapisan air dibaca dengan *high performance liquid chromatography evaporative light scattering detection* (HPLC-ELSD) menggunakan kolom C18, asetonitril/ H_2O (30%/70%, v/v) sebagai fasa gerak, laju alir 1 mL/menit,

temperatur nebulasi 40°C, temperatur evaporasi 30°C, laju gas nitrogen 1,6 L/menit, dan waktu *run* 7 menit.

Secara keseluruhan, penelitian ini terangkum dalam diagram alir penelitian yang ditunjukkan pada Gambar 3.



Gambar 3. Diagram Alir Penelitian.

V. SIMPULAN DAN SARAN

5.1. Simpulan

Berdasarkan penelitian dan pembahasan yang telah dilakukan dapat disimpulkan sebagai berikut:

1. Kondisi optimum aktivitas enzim kitinase dan konsentrasi glukosamin dari *actinomyces* 18D36A2 pada media cair serbuk kulit udang, yaitu waktu inkubasi hari ke-7, pH 6, dan temperatur 29°C dengan nilai 0,00087 U/mL dan 0,1782 mg/mL, sedangkan kondisi optimum kadar protein dari *actinomyces* 18D36A2 pada media cair serbuk kulit udang, yaitu waktu inkubasi hari ke-7, pH 6, dan temperatur 52°C dengan nilai 0,0548 mg/mL.
2. Rendemen N-glukosamin yang dihasilkan dari *actinomyces* 18D36A2 pada media cair serbuk kulit udang adalah sebesar 8,3% pada temperatur 29°C dan 2,8% pada temperatur 52°C.

5.2. Saran

Berdasarkan hasil penelitian yang telah diperoleh, maka penulis memberikan saran sebagai berikut :

1. Perlu dilakukan pemurnian pada produksi glukosamin dalam skala besar.
2. Perlu dilakukan karakterisasi ekstrak enzim menggunakan LCMS untuk memvalidasi produk glukosamin dan kitinase yang dihasilkan.

DAFTAR PUSTAKA

- Anand, A.A.P., Vennison, S.J., Sankar, S.G., Prabhu, D.I.G., Vasan, P.T., Raghuraman, T., Geoffrey, C.J. and Vendan, S.E. 2009. Isolation and Characterization of Bacteria from the Gut of *Bombyx Mori* that Degrade Cellulose, Xylan, Pectin and Starch and Their Impact on Digestion. *Journal of Insect Science*. 10(107): 1-20.
- Arnold, N.D., Bruck, W.M., Garbe, D. and Bruck, T.B. 2020. Enzymatic Modification of Native Chitin and Conversion to Specialty Chemical Products. *Marine Drugs*. 18(2): 1-27.
- Barka, E.A., Vatsa, P., Sanchez, L., Gaveau-Vaillant, N., Jacquard, C., Klenk, H-P., Clement, C., Ouhdouch, Y., and van Wezel, G. P. 2016. Taxonomy, Physiology, and Natural Products of Actinobacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 80: 1-43.
- Behera, S., Ghanty, S., Ahmad, F., Santra, S. and Banerjee, S. 2012. UV-Visible Spectrophotometric Method Development and Validation of Assay of Paracetamol Tablet Formulation. *Journal of Analytical and Bioanalytical Techniques*. 3(6): 1-6.
- Bradford, M.M. 1976. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-dye Binding. *Anal Biochem*. 72: 248-254.
- Brzezinska, M.S., Walczak, M., Lalke-Porczyk, E. and Donderski, W. 2010. Utilization of Shrimp-Shell Waste as a Substrate for the Activity of Chitinases Produced by Microorganisms. *Polish Journal Environ Studies*. 19(1): 177-182.
- Bzura, J., Korsak, D. and Koncki, R. 2022. Bioanalytical Insight Into the Life of Microbial Populations: A chemical Monitoring of Ureolytic Bacteria Growth. *Enzyme and Microbial Technology*. 153: 1-9.

- Chavan, D.V., Mulaje, S.S. and Mohalkar, R.Y. 2013. A review on Actinomycetes and Their Biotechnological Application. *Int J Pharmaceut Sci Res.* 4(5): 1730-1742.
- Choorit, W., Patthanamane, W. and Manurakchinakom, S. 2008. Use of Response Surface Method for the Determination of Demineralization Efficiency in Fermented Shrimp Shells. *Bioresource Technology.* 99(14): 6168-6173.
- Das, S., Lyla, P.S. and Khan, S.A. 2008. Distribution and Generic Composition of Culturable Marine Actinomycetes from the Sediments of Indian Continental Slope of Bay of Bengal. *Chin J Oceanol Limnol.* 26: 166-177.
- Duan, S., Li, L., Zhuang, Z., Wu, W., Hong, S. and Zhou, J. 2012. Improved Production of Chitin from Shrimp Waste by Fermentation With Epiphytic Lactic Acid Bacteria. *Carbohydrate Polymers.* 89: 1283-1288.
- Duceppe, N. and Tabrizian, M. 2010. Advances in Using Chitosan-based Nanoparticles for in Vitro and in Vivo Drug and Gene Delivery. *Expert Opinion on Drug Delivery.* 7(10): 1191-1207.
- Fauziana, S.P., Herasari, D. dan Martasih, F. 2012. Penentuan Kondisi Optimum Actinomycetes Isolat ANL4 2b-3 untuk Produksi Enzim Protease. *Prosiding Seminar Nasional Sains, Matematika, Informatika, dan Aplikasinya.* 3(3): 509-514.
- Garriga, M., Almaraz, M., and Marchiaro, A. 2017. Determination of Reducing Sugars in Extracts of *Undaria pinnatifida* (harvey) Algae By UV-Visible Spectrophotometry (DNS Method). *Actas de Ingenieria.* 3: 173-179.
- Gebreyohannes, G., Moges, F., Sahile, S. and Raja, N. 2013. Isolation and Characterization of Potential Antibiotic Producing Actinomycetes from Water and Sediment of Lake Tana, *Ethiopia.* *Asian Pac J Trop Biomed.* 3(6): 426-435.
- Georgiou, C.D., Grintzalis, K., Zervoudakis, G. and Papapostolou, I. 2008. Mechanism of Coomassie Brilliant Blue G-250 Binding to Proteins: A Hydrophobic Assay for Nanogram Quantities of Proteins. *Analytical and Bioanalytical Chemistry.* 391: 391-403.
- Hamid, R., Khan, M.A., Ahmad, M., Ahmad, M.M., Musarrat, J. and Javed, S. 2014. Chitinases: An Update. *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences.* 5(1): 21-29.

- Hendri, J. dan Laila, A. 2013. *Kitin Kitosan*. Lembaga Penelitian Universitas Lampung. Universitas Lampung. Bandar Lampung.
- Herdyastuti, N., Raharjo, T.J., Mudasir. and Matsjeh, S. 2009. Chitinase and Chitinolytic Mikroorganism: Isolation, Characterization and Potential. *J. Chem.* 9(1): 37-47.
- Huskisson, E.C. 2008. Glucosamine and Chondroitin for Osteoarthritis. *Journal of International Medical Research.* 36(6): 1161–1179.
- Joe, S. and Sarojini, S. 2017. An Efficient Method of Production of Colloidal Chitin for Enumeration of Chitinase Producing Bacteria. *Mapana - Journal of Sciences.* 16(4): 37-45.
- Kandra, P., Challa, M.M. and Jyothi, H.K. 2012. Efficient Use of Shrimp Waste: Present and Future Trends. *Applied Microbiology and Biotechnology.* 93(1): 17-29.
- Khamna, S., Yokota, A., Peberdy, J.F. and Lumyong, S. 2010. Indole-3-acetic acid production by *Streptomyces sp.* isolat from some Thai medicinal plant rhizosphere soils. *Eur Asia J Bio Sci.* 4: 23-32.
- 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 Expression and Purification.* 143: 45-51.
- Malviya, R., Bansal, V. Pal, O.P. and Sharma, P.K. 2010. High Performance Liquid Chromatography: A Short Review. *Journal of Global Pharma Technology.* 2(5): 22-26.
- Margino, S., Nugroho, A.J. and Asmara. 2010. Purification and Characterization of *Streptomyces sp.* IK Chitinase. *Indonesian Journal of Biotechnology.* 15(1): 29-36.
- Mashari, S.R., Nurmalina, R. dan Suharno, S. 2019. Dinamika Daya Saing Ekspor Udang Beku dan Olahan Indonesia di Pasar Internasional. *Jurnal Agribisnis Indonesia.* 7(1): 37-52.
- Miller, G.C. 1959. Use of the Dinitrosalicylic Acid Reagent for the Determination of Reducing sugar. *Analitical Chemists.* 30: 420-428.

- Mitchell, D.A., Kieger, N. and Berovic, M. 2006. Solid-State Fermentation Bioreactors, Fundamentals of Design and Operation. *Springer*, Germany. 1-6.
- 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. *Pharmacognosy and Food Science, and Pharmaceutics*. 1(1): 1-5.
- Mubarik, N.R., Mahagiani, I., Anindyaputri, A., Santoso, S. and Rusmana, I. 2010. Chitinolytic Bacteria Isolated from Chili Rhizosphere: Chitinase Characterization and Its Application as Biocontrol for Whitefly (*Bemisa tabaci* Genn). *American Journal of Agricultural and Biological Sciences*. 5(4): 430-435.
- Muharni. dan Widjajanti, H. 2011. Skrining Bakteri Kitinolitik Antagonis Terhadap Pertumbuhan Jamur Akar Putih (*Rigidoporus lignosus*) dari Rizosfir Tanaman Karet. *Jurnal Penelitian Sains*. 14(1): 51-56.
- Orinda, E., Puspita, I.D., Putra, M.P., Ustadi, U. dan Lelana, I.Y.B. 2015. Aktivitas Enzim Pendegradasi Kitin dari Isolat SDI23 Asal Petis serta Karakterisasi pH dan Suhu Aktivitas Enzim Hasil Purifikasi Parsial. *Jurnal Perikanan*. 17(2): 96-102.
- Prakash, D., Nawani, N., Prakash, M., Bodas, M., Mandal, A., Khetmalas, M. and Kapadnis, B. 2013. Actinomycetes: A Repertory of Green Catalysts with a Potential Revenue Resource. *Biomed Research International*. 2013: 1-8.
- Priya, B.S., Stalin, T. and Selvam, K. 2012. Efficient Utilization of Xylanase and Lipase Producing Thermophilic Marine Actinomycetes (*Streptomyces albus* and *Streptomyces hygroscopicus*) in the Production Ecofriendly Alternative Energy from Waste. *African Journal of Biotechnology*. 11(78): 14320-14325.
- Purkan., Azizah, B., Baktir, A. dan Sumarsih, S. 2014. Eksplorasi Bakteri Kitinolitik dari Sampah Organik : Isolasi dan Karakterisasi Enzim Kitinase. *Molekul*. 9(2): 128-135.
- 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. *Journal Ecol. Health Environ*. 6: 1-8.

- Rovati, L.C., Girolami, F. and Persiani, S. 2012. Crystalline Glucosamine Sulfate in the Management of knee Osteoarthritis: Efficacy, Safety, and Pharmacokinetic Properties. *Therapeutic Advances in Musculoskeletal Disease*. 4(3): 167-180.
- Saima, M.K. and Roohi, I.Z.A. 2013. Isolation of Novel Chitinolytic Bacteria and Production Optimization of Extracellular Chitinase. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*. 11: 39–46.
- Santos, V.P., Marques, N.S.S., Maia, P.C.S.V., de Lima, M.A.B., Franco, L.de O., and de Campos-Takaki, G.M. 2020. Seafood Waste as Attractive Source of Chitin and Chitosan Production and Their Applications. *International Journal of Molecular Sciences*. 21(12): 1-17.
- Sharaf, E.F., El-Sarrany, A.E-A.Q. and El-Deeb, M. 2012. Biorecycling of Shrimp Shell by *Trichoderma viride* for Production of Antifungal Chitinase. *African Journal of Microbiology Research*. 6(21): 4538-4545.
- Soeka, Y.S. dan Triana, E. 2016. Pemanfaatan Limbah Kulit Udang Untuk Menghasilkan Enzim Kitinase dari *Streptomyces macrosporeus* InaCC A454. *Jurnal Kimia Terapan Indonesia*. 18(1): 91-101.
- Sujatno, A., Salam, R., Bandriyana. dan Dimiyati, A. 2015. Studi Scanning Electron Microscopy (SEM) Untuk Karakterisasi Proses Oksidasi Paduan Zirkonium. *Jurnal Forum Nuklir*. 9(2): 44-50.
- Suryadi, Y., Priyatno, T.P., Susilowati, D.N., Samudra, I.M., Yudhistira, N., dan Purwakusumah, E.D. 2013. Isolasi dan Karakterisasi Kitinase asal *Bacillus cereus* 11 UJ. *Jurnal Biologi Indonesia*. 9(1): 51-62.
- Widyastuti, W., Setiawan, F., Al Afandy, C., Irawan, A., Laila, A., Juliasih, N.L.G.R., Setiawan, W.A., Arai, M., Hendri, J. and Setiawan, A. 2022. Antifungal Agent Chitooligosaccharides Derived from Solid-State Fermentation of Shrimp Shell Waste by *Pseudonocardia antitumoralis* 18D36-A1. *Fermentation*. 8(353): 1-11.
- Yan, N. and Chen, X. 2015. Don't waste seafood waste: Turning cast-off shells Into Nitrogen-rich Chemicals Would Benefit Economies and the Environment. *Nature*. 524: 155-157.
- Zargar, V., Asghari, M. and Dashti, A.A. 2015. A Review on Chitin and Chitosan Polymer: Structure, Chemistry, Solubility, Derivatives, and Applications. *ChemBioEng Reviews*. 2(3): 204-226.