

**OPTIMASI PRODUKSI N-GLUKOSAMIN DARI *Actinomyces* 18D36A1
PADA MEDIA KULIT UDANG**

(Skripsi)

Oleh

**RANA APRILIA RINJANI
1717011063**



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

ABSTRAK

OPTIMASI PRODUKSI N-GLUKOSAMIN DARI *Actinomycetes* 18D36A1 PADA MEDIA KULIT UDANG

Oleh

Rana Aprilia Rinjani

Glukosamin adalah monosakarida amino yang terbentuk secara alami yang terdiri dari molekul glukosa yang melekat pada gugus amino. Glukosamin banyak dimanfaatkan untuk pengobatan *osteoarthritis*, karena memiliki beragam efek biologis dan farmakologis. Penelitian ini bertujuan untuk memperoleh kondisi optimum produksi glukosamin dari *actinomycetes* 18D36A1 pada media kulit udang dan kitin. Penelitian dimulai dengan meremajakan isolat *actinomycetes* 18D36A1 pada media agar koloid kitin yang merupakan koleksi UPT LTSIT Universitas Lampung. Isolat tersebut diidentifikasi menggunakan mikroskop dan SEM kemudian dihasilkan visualisasi yang mirip dengan genus *Streptosporangium*. Selanjutnya isolat dikultivasi menggunakan metode fermentasi fase cair sistem tertutup (*batch*) dengan kulit udang dan kitin. Hasil kultivasi berupa ekstrak kasar enzim dilakukan uji kuantitatif dengan metode DNS dan HPLC untuk uji konsentrasi glukosamin dan aktivitas enzim, dan metode Bradford untuk uji kadar protein menggunakan Spektrofotometri UV-VIS. Berdasarkan hasil uji diperoleh kondisi optimum dalam produksi glukosamin pada media cair serbuk kulit udang adalah pada waktu inkubasi 7 hari, pH 6, dan suhu 29 °C dengan nilai yang diperoleh yaitu 0,213 mg/mL. Berdasarkan hasil analisis HPLC diperoleh glukosamin sebesar 0,4198 mg/mL pada temperatur 29°C dengan waktu retensi 2,436 menit dan 0,397 mg/mL pada temperatur 52°C dengan waktu retensi 2,421 menit.

Kata Kunci: *Actinomycetes* 18D36A1, glukosamin, limbah kulit udang, kitin.

ABSTRACT

OPTIMIZATION OF N-GLUCOSAMIN PRODUCTION FROM *Actinomyces* 18D36A1 IN SHRIMP SHELL MEDIA

By

Rana Aprilia Rinjani

Glucosamine is a naturally occurring amino monosaccharide consisting of a glucose molecule attached to an amino group. Glucosamine is widely used for the treatment of osteoarthritis, because it has a variety of biological and pharmacological effects. This study aims to obtain the optimum conditions for glucosamine production from *actinomyces* 18D36A1 on shrimp shell and chitin media. The study began by rejuvenating *actinomyces* isolate 18D36A1 on chitin colloidal agar which is a collection of UPT LTSIT, University of Lampung. The isolates were identified using a microscope and SEM then produced a visualization similar to the genus *Streptosporangium*. Furthermore, the isolates were cultivated using a closed system (batch) liquid phase fermentation method with shrimp shells and chitin. The results of cultivation in the form of crude extracts of enzymes were tested quantitatively using the DNS and HPLC methods to test glucosamine concentration and enzyme activity, and the Bradford method to test protein content using UV-VIS spectrophotometry. Based on the test results, the optimum conditions for glucosamine production in liquid media of shrimp shell powder were obtained at an incubation time of 7 days, pH 6, and temperature 29°C with a value obtained of 0.213 mg/mL. Based on the results of the HPLC analysis, it was obtained that glucosamine was 0.4198 mg/mL at a temperature of 29°C with a retention time of 2.436 minutes and 0.397 mg/mL at a temperature of 52°C with a retention time of 2.421 minutes.

Keywords: *Actinomyces* 18D36A1, glucosamine, shrimp shell waste, chitin.

**OPTIMASI PRODUKSI N-GLUKOSAMIN DARI *Actinomyces* 18D36A1
PADA MEDIA KULIT UDANG**

Oleh

RANA APRILIA RINJANI

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 *Actinomyces* 18D36A1 PADA
MEDIA KULIT UDANG

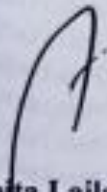
Nama Mahasiswa : Rana Aprilia Rinjani

Nomor Pokok Mahasiswa : 1717011063

Program Studi : Kimia

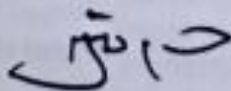
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam




Dra. Aspta Laila, M.S.
NIP. 196009091988112001


Prof. Dr. John Hendri, M.S.
NIP. 19580211987031001

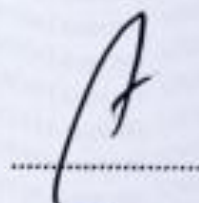
2. Ketua Jurusan Kimia FMIPA


Mulyono, Ph.D.
NIP. 197406112000031002

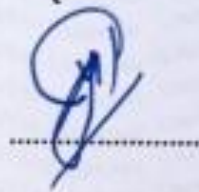
MENGESAHKAN

1. Tim Penguji

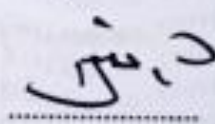
Ketua : **Dra. Aspita Laila, M.S.**



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



Anggota : **Mulyono, Ph.D.**



2. **Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam**

Dr. Edg. Satripto Dwi Yuwono, M.T.

NIP. 197407052000031001

Tanggal Lulus Ujian Skripsi: **26 Desember 2022**

SURAT PERNYATAAN KEASLIAN SKRIPSI

Yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Rana Aprilia Rinjani
NPM : 1717011063
Jurusan : Kimia
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Perguruan Tinggi : Universitas Lampung

Dengan ini menyatakan bahwa skripsi saya yang berjudul "Optimasi Produksi N-Glukosamin Dari Isolat *Actinomyces* 18D36A1 Pada Media Kulit Udang" adalah benar karya dan penelitian saya sendiri, kecuali yang secara tertulis tercantum dalam naskah ini sebagaimana disebutkan dalam daftar pustaka. Selanjutnya, saya tidak keberatan jika sebagian atau seluruh data di dalam skripsi tersebut digunakan oleh dosen atau program studi untuk kepentingan publikasi sesuai dengan kesepakatan.

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

Bandar Lampung, 27 Januari 2023
Yang Menyatakan



Rana Aprilia Rinjani
NPM. 1717011063

RIWAYAT HIDUP

Rana Aprilia Rinjani lahir di Bandar Jaya pada tanggal 21 April 2001. Penulis merupakan anak pertama dari tiga bersaudara dari pasangan Bapak Johan Santri dan Ibu Marlina. Penulis memiliki dua adik laki-laki.

Penulis menyelesaikan pendidikan Taman Kanak-Kanak di TK At-Taqwa pada tahun 2006. Penulis melanjutkan pendidikan sekolah dasar di SD N 3 Bandar Jaya dan menyelesaikannya pada tahun 2012. Kemudian, melanjutkan pendidikan sekolah menengah pertama di SMP N 3 Terbanggi Besar dari tahun 2012-2015 dan MAN 1 Lampung Tengah dari tahun 2015-2017. Pada tahun 2017, penulis diterima sebagai mahasiswa Jurusan Kimia Fakultas MIPA Universitas Lampung melalui jalur Seleksi Bersama Masuk Perguruan Tinggi Negeri (SBMPTN).

Selama menjadi mahasiswi, penulis aktif mengikuti beberapa kegiatan mahasiswa, dimulai dengan menjadi Kader Muda Himaki pada tahun 2017 dan sebagai Anggota Muda ROIS (Amar) pada tahun 2017. Penulis juga aktif sebagai anggota Bidang Sains dan Penalaran Ilmu Kimia (SPIK) Himaki FMIPA Unila pada tahun 2018-2019. Penulis telah menyelesaikan Kuliah Kerja Nyata (KKN) di Desa Gedung Surian, Kecamatan Gedung Surian, Kabupaten Lampung Barat pada Januari-Februari 2020.

KATA INSPIRASI

“Dan Bersabarlah. Sesungguhnya Allah beserta orang-orang yang sabar.”

(Q.S. Al-Anfaal: 46)

“Allah tidak akan membebani seseorang melainkan sesuai dengan kesanggupannya...”

(Q.S. Al-Baqarah: 286)

“...Dan janganlah kamu berputus asa dari rahmat Allah. Sesungguhnya tiada berputus dari rahmat Allah melainkan orang-orang yang kafir”

(Q.S. Yusuf: 87)

“Janganlah kamu bersikap lemah dan janganlah pula kamu bersedih hati, padahal kamulah orang-orang yang paling tinggi derajatnya jika kamu beriman.”

(QS Ali Imran: 139)

“Tangga kesuksesan tak pernah penuh sesak di bagian puncak.”

(Napoleon Hill)

PERSEMBAHAN

Alhamdulillah puji syukur kepada Allah SWT atas segala limpahan rahmat dan nikmat-Nya, serta shalawat beriring salam semoga selalu tercurahkan kepada baginda Nabi Muhammad SAW. Kupersembahkan karya ini sebagai wujud bakti, cinta, dan tanggung jawabku kepada:

Orang Tua dan Saudara Tercinta

Terima kasih atas segala do'a, kasih sayang, kesabaran, semangat dan perhatian yang tidak pernah henti sampai saat ini sehingga penulis dapat menyelesaikan karya ini dengan baik.

Rasa hormatku kepada:

***Ibu Dra. Aspita Laila, M.S., Bapak Prof. Dr. John Hendri, M.S.,
dan Bapak Mulyono, Ph.D.***

Dosen pembimbing penelitian dan tugas akhirku yang telah memberikan bimbingan, saran, nasihat, dan kesabaran dalam membimbing selama ini.

Dosen Jurusan Kimia

Atas segala ilmu, bimbingan, serta pengalaman kepada penulis selama menempuh pendidikan.

Seluruh sahabat dan teman-temanku yang selalu memberikan semangat, motivasi, nasihat dan menjadi pendengar serta pengingat kepada penulis.

*Serta Almamaterku tercinta
Universitas Lampung*

SANWACANA

Puji dan syukur kepada Allah SWT. Tuhan semesta alam atas rahmat dan nikmat-Nya, sehingga Penulis dapat menyelesaikan skripsi dengan judul **“Optimasi Produksi N-Glukosamin Dari Isolat *Actinomyces* 18D36A1 Pada Media Kulit Udang”** sebagai salah satu syarat untuk mendapat gelar Sarjana Sains pada Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Lampung.

Pada kesempatan kali ini dengan teriring doa penulis mengucapkan terima kasih begitu tulus atas segala bimbingan, bantuan dan keberadaan yang diberikan kepada beberapa pihak yang turut membantu menyelesaikan skripsi ini. Penulis mengucapkan terimakasih kepada :

1. Kedua orang tua penulis, Bapak Johan Santri dan Ibu Marlina atas segala do'a, cinta dan kasih, dukungan moral dan finansial, nasihat serta motivasi yang sampai saat ini tak pernah berhenti, sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini dengan baik. Semoga Allah membalas atas segala yang telah diberikan dengan Jannah-Nya.
2. Ibu Dra. Aspita Laila, M.S., selaku pembimbing 1 atas segala kebaikan, kesabaran, motivasi, kritik dan saran serta bimbingan sehingga penulis dapat menyelesaikan penelitian dan skripsi ini dengan baik.
3. Bapak Prof Dr. John Hendri, M.S., selaku pembimbing 2 atas segala bimbingan, saran, nasehat, motivasi, kesabaran, dan ilmu yang bermanfaat kepada penulis dalam perencanaan dan penyelesaian penelitian serta skripsi ini.

4. Bapak Mulyono, Ph.D., selaku penguji atas segala bimbingan, saran dan kritik penelitian dan penulisan dalam penyusunan skripsi, dan ilmu yang bermanfaat sehingga skripsi ini dapat terselesaikan dengan baik.
5. Ibu Dr. Ni Luh Gede Ratna Juliasih, M.Si., selaku pembimbing akademik, atas bimbingan, perhatian, nasehat, dan kesabaran dalam membimbing penulis terkait permasalahan akademik selama masa perkuliahan ini.
6. Bapak Dr. Eng. Suropto Dwi Yuwono, M.T. selaku Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam (FMIPA) Universitas Lampung.
7. Bapak Mulyono, Ph.D., selaku Ketua Jurusan Kimia FMIPA Unila.
8. Ibu Dr. Mita Rilyanti, M.Si. selaku sekretaris Jurusan Kimia FMIPA Unila.
9. Bapak dan Ibu Dosen Jurusan Kimia FMIPA Unila atas seluruh ilmu, bimbingan, dan nasihat yang telah diberikan selama perkuliahan.
10. Kedua adikku tersayang, Rafi Adrilian Akram dan Refan Ali Muyassar yang selalu memberikan semangat, canda tawa, dan kebahagiaan. Semoga Allah SWT senantiasa memberkahi, melindungi, dan mempermudah disetiap urusan kalian berdua.
11. Sahabatku Retno Kurnia Saputri, S.Pd., Nia Kurniasih, S.Si., Agustina Ayu P., Ramy Zahra M, S.Si., Azizah Malik, S.Si., Merriezka Ismaini, S.Si., Rosalinda Yuliani, S.Si., Anisya Reika A, Qonitah Nurul H, S.Si., Mita Septiani, S.Si., dan teman-teman G8 atas segala do'a, kebaikan, canda tawa, nasihat, motivasi, serta bantuan yang diberikan kepada penulis
12. Teman “seperbimbingan” Ikromudin, S.Si., dan Melly Yusnidar, S.Si. atas nasihat dan bantuannya dalam menyelesaikan penelitian.
13. SAMSAN X INJAE: Mba Nafila, Kak Fendi, Saras, Ikrom dan Rizky yang telah kebersamai selama penelitian. Terimakasih atas segala bantuan, saran,

canda tawa, dan kebersaannya sehingga penulis dapat terus semangat dalam melakukan penelitian hingga akhir.

14. Teman-teman penelitian Laboratorium UPT LTSIT Mba Widya, Mba Caca, Mba Oci, Mba Gabriel, Kak Ridho, Kak Purna, Mega, Reyzka, Lanang, Indra, Kak Zahra, Wulan, Merry, Lia, Laras, Firda, Irma, Ica, atas segala bantuan, masukan, dan saran selama penelitian.
15. Teman-temanku “Anah Warey” Messy, Nike, Guna, Tegar, dan Anggi yang telah kebersamai dari MAN hingga sekarang. Terimakasih atas segala cerita, canda tawa, kebersamaan, dan semangatnya.
16. Squad Yanti Petir: Tina, Mba Nining, Endang, Mba Enok dan Kakak Revi. Terimakasih telah senantiasa menemani, memberi dukungan, dan memberikan kasih sayang yang tulus.
17. Keluarga Kimia 2017 yang telah kebersamai dari awal hingga akhir pendidikan di kampus. Terimakasih atas segala bantuan selama menjadi mahasiswa di jurusan Kimia.

Terima kasih atas segala bantuan dan dukungan seluruh pihak yang tidak dapat disebutkan satu persatu. Penulis menyadari bahwa skripsi ini masih jauh dari kata sempurna, tetapi semoga dapat bermanfaat bagi para pembaca.

Bandar Lampung, 27 Januari 2023

Penulis,

Rana Aprilia Rinjani

DAFTAR ISI

	Halaman
DAFTAR GAMBAR	vii
I. PENDAHULUAN	1
1.1. Latar Belakang.....	1
1.2. Kerangka Teoritis	3
1.3. Tujuan Penelitian.....	4
1.4. Manfaat Penelitian.....	4
II. TINJAUAN PUSTAKA	5
2.1. Kulit Udang	5
2.2. <i>Actinomyces</i>	6
2.2.1. Deskripsi <i>Actinomyces</i>	6
2.2.2. <i>Actinomyces</i> sebagai sumber enzim di Bidang Industri	6
2.3. Kitin.....	8
2.4. Glukosamin.....	9
2.5. Enzim.....	10
2.6. Enzim Kitinase	10
2.6.1. Pengertian Enzim Kitinase.....	10
2.6.2. Klasifikasi Enzim Kitinase.....	10
2.6.3. Sumber Enzim Kitinase.....	11
2.7. Fermentasi Fase Cair Sistem Tertutup (<i>Batch</i>).....	12
2.8. Spektrofotometri UV-Vis	13
2.9. <i>High Performance Liquid Chromatography</i> (HPLC).....	14
2.10. <i>Scanning Electron Microscopy</i> (SEM).....	15
III. METODE PENELITIAN	16
3.1. Waktu dan Tempat	16
3.2. Alat dan Bahan	16
3.3. Prosedur Penelitian.....	17

3.3.1. Persiapan Kulit Udang	17
3.3.2. Pembuatan Kitin.....	17
3.3.3. Pembuatan Media.....	17
3.3.4. Peremajaan Isolat <i>Actinomyces</i>	18
3.3.5. Pembuatan Larutan Standar	18
3.3.6. Uji Aktivitas Kitinolitik <i>Actinomyces</i> 18D36A1.....	19
3.3.7. Identifikasi Morfologi <i>Actinomyces</i> 18D36A1	19
3.3.8. Laju Pertumbuhan Isolat <i>Actinomyces</i> 18D36A1.....	19
3.3.9. Persiapan Inokulum <i>Actinomyces</i> 18D36A1	20
3.3.10. Fermentasi Fase Cair Sistem Tertutup (<i>Batch</i>)	20
3.3.11. Uji Konsentrasi Glukosamin, Aktivitas Enzim, dan Kadar Protein	21
IV. HASIL DAN PEMBAHASAN	23
4.1. Penyiapan Kulit Udang, Kitin dan Koloid Kitin.....	23
4.2. Peremajaan Isolat <i>Actinomyces</i> 18D36A1	24
4.3. Uji Aktivitas Kitinolitik <i>Actinomyces</i> 18D36A1	25
4.4. Identifikasi Morfologi <i>Actinomyces</i> 18D36A1	26
4.5. Laju Pertumbuhan Isolat <i>Actinomyces</i> 18D36A1	28
4.6. Fermentasi Fase Cair Sistem Tertutup (<i>Batch</i>).....	29
4.6.1. Fermentasi dengan Variasi Waktu Inkubasi Pada pH 6 dan Temperatur Ruang	30
4.6.2. Fermentasi Dengan Variasi pH Pada Waktu Optimum dan Temperatur Ruang	32
4.6.3. Fermentasi Dengan Variasi Temperatur Pada pH dan Waktu Optimum... 35	
4.7. Analisis Glukosamin Pada Waktu, pH dan Temperatur Optimum dengan HPLC 38	
V. KESIMPULAN	40
5.1. Simpulan	40
5.2. Saran	40
DAFTAR PUSTAKA	41
LAMPIRAN	50

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Struktur Kitin	8
2. Struktur Glukosamin	10
3. Kitin dan Koloid Kitin	24
4. Pertumbuhan Isolat 18D36A1	25
5. Zona Bening Isolat 18D36A1	26
6. Rantai Spora	27
7. Morfologi Spora Isolat 18D36A1	28
8. Grafik Laju Pertumbuhan <i>Actinomycetes</i> 18D36A1	28
9. Inokulum	29
10. Media Cair Variasi Waktu	30
11. Kadar Protein Variasi Waktu	31
12. Aktivitas Enzim Variasi Waktu	31
13. Glukosamin Variasi Waktu	32
14. Media Cair Kulit Udang Variasi pH	33
15. Kadar Protein Variasi pH	33
16. Aktivitas Enzim Variasi pH	34
17. Glukosamin Variasi pH.....	35
18. Media Cair Variasi Temperatur	36
19. Kadar Protein Variasi Temperatur	36
20. Aktivitas Enzim Variasi Temperatur	37
21. Glukosamin Variasi Temperatur	37
22. Grafik Hasil HPLC.....	39

I. PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Indonesia merupakan negara kepulauan yang terdiri dari wilayah daratan dan lautan. Jumlah pulau yang terdapat di Indonesia baik yang kecil maupun besar, mencapai 17.508 pulau. Tiga perempat dari keseluruhan wilayah Indonesia adalah berupa lautan (5,9 km²). Berdasarkan hasil “*United Nation Convention on the Law of the Sea*” (UNCLOS) atau Konvensi Hukum Laut Internasional pada tanggal 10 Desember 1982 di Montego Bay, Jamaica, luas wilayah laut di Indonesia mencapai 3.257.357 km² (Saksono, 2013). Terdapat berbagai sumber daya alam yang dimiliki perairan Indonesia, diantaranya biota-biota laut yang berguna untuk dikembangkan sebagai obat, salah satu biota yang potensial adalah udang.

Udang merupakan salah satu komoditas penting bagi hasil perikanan Indonesia. Udang di Indonesia umumnya diekspor dalam bentuk udang beku yang telah dibuang bagian kepala, kulit, dan ekornya. Bagian udang yang telah dibuang tersebut menjadi limbah yang belum banyak dimanfaatkan oleh masyarakat Indonesia. Kulit udang sendiri mengandung protein (25%-44%), kalsium karbonat (45%-50%), dan kitin (15%-20%) (Fouhcher, 2009). Oleh karena itu kulit udang merupakan salah satu sumber yang potensial untuk digunakan dalam pembuatan kitin dan kitosan, yaitu suatu biopolimer yang secara komersil berpotensi di bidang industri.

Kitin merupakan suatu polimer utama yang memiliki sifat tidak larut dalam berbagai jenis pelarut. Kitin tersusun dari residu N-asetil-D-glukosamin yang

terikat melalui ikatan β -1,4 glikosidik (Arif *et al.*, 2013). Kitin dapat dihidrolisis menghasilkan monomernya dengan reaksi enzimatis. Enzim spesifik yang digunakan untuk menghidrolisis kitin adalah enzim kitinase (Howard *et al.*, 2003).

Enzim kitinase merupakan enzim yang dapat mendegradasi senyawa menjadi monomernya yaitu N-asetilglukosamin. Enzim kitinase dihasilkan oleh bakteri, fungi, tanaman, dan hewan (Toharisman, 2007). Di alam, proses degradasi menggunakan kitinase yang berasal dari jamur, bakteri, *actinomycetes*, tumbuhan (Matsumoto, 2006), vertebrata, moluska, *arthropoda*, alga, dan beberapa jenis cendawan (Funkhouser dan Aronson, 2007).

Enzim kitinase saat ini banyak digunakan sebagai agen biokontrol karena dapat mendegradasi kitin menjadi produk yang ramah lingkungan dan dapat digunakan dalam bidang kesehatan, pangan, industri dan lain-lain. Enzim ini juga dapat digunakan dalam penanganan limbah, terutama limbah yang banyak mengandung kitin (Herdyastuti *et al.*, 2009).

Kitin yang didegradasi oleh enzim kitinase dapat menghasilkan monomer dan oligomer N-Asetilglukosamin. N-Asetilglukosamin merupakan gula amino yang sering ditemukan sebagai komponen utama pada rangka luar *Crustacea*, *Arthropoda*, dan cendawan. Glukosamin (2-amino-2-deoxyglucose, *chitosamin*) adalah gula amino yang diperoleh dari proses hidrolisis kitin. Glukosamin berperan penting di dalam tubuh seperti untuk kesehatan dan kelenturan sendi, pembentukan pelumas dan agen perlindungan (Purnomo *et al.*, 2012). Aplikasi glukosamin juga telah dikenal untuk pengobatan *osteoarthritis*, karena memiliki beragam efek biologis dan farmakologis termasuk anti-inflamasi, anti-oksidan, anti penuaan, dan pelindung hati (Jamialahmadi, 2019).

Pada penelitian sebelumnya, Asmoro (2016) melakukan penelitian tentang kemampuan *actinomycetes* dalam mendegradasi substrat berupa limbah kulit udang menggunakan *actinomycetes* ANL-4. Hasil dari penelitian tersebut didapatkan kadar glukosamin tertinggi di waktu inkubasi yaitu selama satu hari

atau 24 jam inkubasi. Terdapat pula penelitian Salsabila (2020) yang memperoleh kadar glukosamin tertinggi pada waktu inkubasi selama 14 hari menggunakan media cair koloid kitin dan media padat kulit udang berturut-turut yaitu 0,4085 mg/mL dan 0,9241 mg/mL (minggu ketiga) pada isolat 18D36A1 dan 0,1395 mg/mL dan 0,8912 mg/mL (minggu pertama) pada isolat 18D36A2.

Penelitian kali ini dilakukan berbeda dari penelitian Salsabila (2020), karena pada penelitian ini dilakukan optimasi produksi glukosamin menggunakan media cair kulit udang dan kitin oleh isolat *actinomyces* 18D36A1. Kedua jenis media tersebut memiliki kelebihan yaitu mudah didapat dan murah. Kedua media tersebut juga digunakan untuk melihat perbandingan jumlah produk glukosamin yang dihasilkan. Selain itu akan dilakukan variasi produksi pada waktu inkubasi, pH dan temperatur untuk mengetahui kondisi optimum dari glukosamin.

1.2. Kerangka Teoritis

Kulit udang merupakan salah satu sumber yang potensial untuk digunakan dalam pembuatan kitin. Pembuatan kitin dari kulit udang dilakukan dalam 2 tahapan yaitu demineralisasi yang merupakan proses untuk melepaskan mineral dari kitin dan deproteinasi yang merupakan proses untuk melepaskan protein dari kitin. Kitin dapat dihidrolisis menghasilkan monomernya dengan reaksi enzimatik menggunakan enzim kitinase. Salah satu mikroorganisme penghasil enzim kitinase yang dapat menghidrolisis kitin adalah *actinomyces*. Kulit udang dan kitin yang telah diperoleh dari hasil isolasi dapat dijadikan sebagai substrat untuk menghasilkan enzim kitinase dan glukosamin. Penentuan kondisi optimum glukosamin dan aktivitas kitinase menggunakan fermentasi fase cair sistem tertutup dilakukan pada variasi waktu inkubasi, pH dan temperatur.

1.3. Tujuan Penelitian

Tujuan dari dilakukannya penelitian ini yaitu sebagai berikut :

1. Untuk mengetahui kondisi optimum produksi glukosamin, kadar protein dan aktivitas enzim kitinase dari isolat *actinomyces* 18D36A1 terhadap pengaruh waktu inkubasi, pH dan temperatur.
2. Untuk memproduksi glukosamin dari isolat *actinomyces* 18D36A1 pada media serbuk kitin dan kulit udang.

1.4. Manfaat Penelitian

Manfaat dari penelitian ini adalah untuk mengetahui kondisi optimum glukosamin, kadar protein dan aktivitas enzim kitinase sehingga dapat dimanfaatkan dalam produksi glukosamin.

II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Kulit Udang

Udang termasuk hewan kelas *Crustacea* yang termasuk kelas *Arthropoda*, memiliki badan beruas berjumlah 13 yaitu 5 ruas kepala dan 8 ruas badan. Seluruh tubuh udang ditutupi oleh kerangka luar yang disebut eksoskeleton (Menristek, 2003). Udang di Indonesia diekspor dalam bentuk beku dan telah mengalami proses pemisahan kulit dan kepala. Pada proses pemisahan ini dapat menimbulkan masalah yang tidak diinginkan. Limbah padat lama kelamaan akan semakin besar dan menumpuk yang dapat mengakibatkan pencemaran lingkungan berupa bau yang tidak sedap dan dapat merusak estetika lingkungan. Namun karena limbah kulit udang mudah diperoleh maka limbah dimanfaatkan untuk proses kitin dan kitosan (Azhar *et al.*, 2010).

Kulit udang mengandung protein (25-40%), kalsium karbonat (45-50%), dan kitin (15-20%). Tetapi besarnya kandungan komponen tersebut tergantung pada jenis udangnya (Foucher *et al.*, 2009). Besarnya kandungan protein dan mineral pada kulit udang dapat menurunkan kualitas dari kitin, sehingga komponen tersebut perlu dihilangkan dalam pemurnian kitin untuk menghasilkan produk kitin yang bermutu tinggi sehingga molekul molekulnya menjadi lebih halus (Rohani, 2000).

2.2. Actinomycetes

2.2.1. Deskripsi Actinomycetes

Actinomycetes adalah kelompok mikroorganisme heterogen, yang memiliki filamen seperti benang di dalam tanah (Bhatti *et al.*, 2017). *Actinomycetes* didistribusikan secara luas di habitat alami dan diperlukan dalam proses metabolisme dan biologis yang berbeda, misalnya, berguna untuk menghasilkan enzim ekstraseluler (Ghorbani *et al.*, 2013).

Actinomycetes sebagian besar ditemukan di tanah, di lumpur, di udara dan di sisa-sisa tanaman. *Actinomycetes* hidup di bawah kondisi yang sangat beragam, aerobik dan anaerobik, pada temperatur 5-7°C dan 45-70°C. Banyak *actinomycetes* digunakan untuk menghasilkan antibiotik, vitamin, asam amino dan zat aktif biologis lainnya (Bhatti *et al.*, 2017).

Secara morfologis, *actinomycetes* menyerupai jamur karena terdapat sel-sel memanjang yang bercabang menjadi filamen atau hipnea. Salah satu ciri *actinomycetes* yang membedakan dari kelompok bakteri lain adalah mereka mampu memanfaatkan berbagai macam substrat yang ditemukan di tanah, terutama beberapa serangga yang kurang terdegradasi dan polimer tanaman seperti kitin, selulosa dan hemiselulosa.

2.2.2. Actinomycetes Sebagai Sumber Enzim di Bidang Industri

Selulase

Selulase dari galur *Streptomyces sp.* digunakan dalam pemrosesan kertas, tekstil, detergen, dan pakan hewan. Selain *Streptomyces*, terdapat beberapa genus seperti *Micromonospora* dan *Thermobifida* dapat dimanfaatkan secara komersial karena dapat menghasilkan selulase rekombinan (Zhang *et al.*, 2011).

Amilase

Amilase dianggap sebagai kelompok enzim penting yang menghidrolisis pati menjadi fruktosa, glukosa dan maltosa tinggi dan dapat dikategorikan menjadi endoamilase dan eksoamilase. Strain *actinomyces* misalnya *Streptomyceserumpens* dan *Thermobifidafusca* memiliki kemampuan mensekresi amilase ke luar sel untuk melakukan pencernaan ekstraseluler (El-Sersy *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2011). Terdapat pula enzim α -amilase yang digunakan dalam hidrolisis pati dan dimanfaatkan secara luas dalam dunia industri seperti fermentasi, tekstil, kertas, obat-obatan, dan gula (Gupta *et al.*, 2003).

Keratinase

Keratinase adalah enzim industri penting yang diproduksi oleh sejumlah strain *actinomyces* seperti *Streptomyces* spp. dan *Actinomadura*. Enzim ini banyak digunakan untuk hidrolisis keratin (Habbeche *et al.*, 2003).

Protease

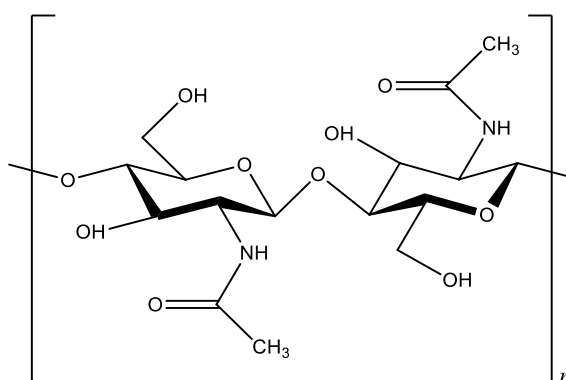
Protease yang dihasilkan oleh *Nocardiopsis* spp. dikenal sebagai enzim industri yang penting dan memiliki potensi untuk digunakan secara luas dalam industri kulit, pembuatan tekstil, deterjen, kue, pembuatan bir, dan keju (Gohel dan Singh, 2012). Protease dari *Streptomyces* spp. dapat digunakan dalam pengolahan limbah agroindustri yang berbeda seperti kuku, bulu, rambut dan limbah tanaman (Bentley *et al.*, 2002). Lebih dari 48 strain *actinomyces* tanah telah dilaporkan untuk produksi protease bersama dengan efek sitotoksiknya pada sel kanker (Mitra dan Chakrabarty, 2005).

Lipase

Lipase memiliki potensi untuk digunakan dalam pengolahan minyak dan lemak, kosmetik, diagnosis dan deterjen (Ninawe *et al.*, 2006). Anggota *actinomyces* seperti *Streptomyces exfoliates* dan *Nocardiopsis alba* menghasilkan lipase yang menghidrolisis ikatan ester dalam trigliserida menjadi gliserol dan asam lemak (Gandhimathi *et al.*, 2009).

2.3. Kitin

Kitin merupakan polimer alam yang tersusun atas unit-unit molekul β -D-glukosamin dan gugus N-asetil, membentuk monomer yang akan diikat oleh ikatan beta (1 \rightarrow 4) (Ameh *et al.*, 2014). Kitin mempunyai rumus empiris $(C_6H_9O_4.NHCOCH_3)_n$ dan merupakan zat padat yang tidak larut dalam air, pelarut organik, alkali pekat, asam mineral lemah tetapi larut dalam asam-asam mineral yang pekat (Suryanto *et al.*, 2005). Untuk dapat dicirikan sebagai kitin derajat asetilasinya harus berada di atas 50 % (Anitha *et al.*, 2014).



Gambar 1. Struktur Kitin (Nguyen dan Kobayasi, 2020)

Kitin terdistribusi luas di lingkungan biosfer seperti pada kulit *Crustacea* (udang, kepiting, dan lobster), ubur-ubur, komponen struktur eksternal insekta, dinding sel fungi (22-40%), alga, nematoda ataupun tumbuhan (Gohel *et al.*, 2006). Isolasi kitin dapat diperoleh dari limbah kulit udang karena mudah diperoleh dan memiliki kandungan kitin yang cukup banyak. Selain itu, kulit udang juga mengandung protein (25%-40%), dan kalsium karbonat (45%-50%) (Natsir, 2002).

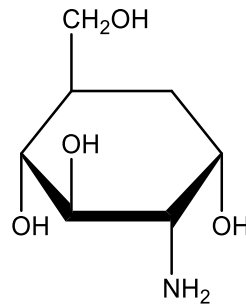
Kitin merupakan polimer alami sehingga memiliki karakteristik yang bersifat polisakarida, seperti: *biocompatibility*, *biodegradability*, *non-toxicity*, dan mempunyai bioaktivitas yaitu aktivitas antibakteri (Ongkiko *et al.*, 2016), anti mikroba (Kim *et al.*, 2016), anti kanker, anti koagulan (Ifuku *et al.*, 2015), dan sifat adsorpsi molekular (Younes *et al.*, 2012).

Kitin banyak diaplikasikan sebagai adsorben ion logam dalam pengolahan air, pewarna, aditif makanan, pengawet, pigmen dalam rekayasa limbah, anti kolesterol, dan imobilisasi enzim. Pada bidang biomedis kitin dan turunannya dapat digunakan sebagai pembalut luka, *drug delivery*, dan pendiagnosis kanker. Kitin juga mudah diolah sebagai gel, film, membran, dan fiber. Kitin juga sering dimanfaatkan sebagai bahan baku utama pembuatan kitosan yang memiliki nilai jual yang tinggi dan memiliki banyak manfaat di berbagai bidang (Afriani *et al.*, 2016).

2.4. Glukosamin

Glukosamin (2-amino-2 *deoxyalpha-D-glucose*) merupakan monosakarida amino yang terbentuk secara alami yang terdiri dari molekul glukosa yang melekat pada gugus amino dan terdapat dalam matriks semua jaringan ikat (Chan *et al.*, 2011). Glukosamin dapat ditemukan di matriks tulang rawan sendi dan cairan sendi manusia, bahkan hampir di semua jaringan lunak dalam tubuh manusia. Selain itu, glukosamin sebagai komponen utama dari rangka luar *Crustaceae*, *Artropoda*, dan cendawan yang tersebar di alam (Miller and Clegg, 2011).

Glukosamin sebagai makromolekul berperan penting di dalam tubuh untuk kesehatan dan kelenturan sendi, lapisan membran sel, kolagen, osteroid, tulang rusuk, pembentukan pelumas dan agen perlindungan (Purnomo *et al.*, 2012). Aplikasi glukosamin juga telah dikenal untuk pengobatan *osteoarthritis*, karena memiliki beragam efek biologis dan farmakologis termasuk antiinflamasi, antioksidan, antipenuaan, kardioprotektif, kondroprotektor, pelindung hati, dan sifat sitoprotektif (Jamialahmadi, 2019).



Gambar 2. Struktur Glukosamin

2.5. Enzim

Enzim adalah katalis biologis (juga dikenal sebagai biokatalis) yang mempercepat reaksi biokimia dalam organisme hidup. Mereka juga dapat diekstraksi dari sel dan kemudian digunakan untuk mengkatalisis berbagai proses penting secara komersial (Robinson, 2015). Pada tingkat molekuler, enzim mengkatalisis reaksi biokimia dengan mempercepat konversi substrat menjadi produk dalam situs aktif enzim. Tanpa katalisis enzim, sebagian besar reaksi akan terlalu lambat untuk berguna bagi kehidupan, meskipun tidak semua reaksi di alam memerlukan katalisis (Keller *et al.*, 2015).

2.6. Enzim Kitinase

2.6.1. Pengertian Enzim Kitinase

Kitinase merupakan enzim yang dapat menghidrolisis kitin menjadi komponen oligomer, dimer, dan monomeriknya (Patil *et al.*, 2000). Enzim kitinase banyak dihasilkan oleh organisme seperti bakteri, fungi, khamir, tumbuhan, insekta, protozoa, manusia, dan hewan (Gohel *et al.*, 2006). Kitinase memiliki banyak aplikasi industri dan pertanian seperti biokontrol jamur patogen tanaman, dan produksi protein sel tunggal (Itoi *et al.*, 2007).

2.6.2. Klasifikasi Enzim Kitinase

Sahai and Monacha (1993) membagi kitinase ke dalam 2 kelompok yaitu:

1. Endokitinase

Endokitinase memotong secara acak ikatan β -1,4 bagian internal mikrofibril kitin. Produk akhir yang terbentuk bersifat mudah larut berupa oligomer pendek N-asetilglukosamin (GlcNAc) yang mempunyai berat molekul rendah seperti kitotriose dan kitotetraose.

2. Eksokitinase

Eksokitinase terbagi kategori yaitu :

- a. 1-4- β -glukosaminidase menghasilkan monomer N-asetilglukosamin yang merupakan hasil pembelahan produk oligomer endokitinase dan kitobiosidases.
- b. Kitobiosidase, terlibat dalam katalisis pelepasan di-asetilkitobiose dimana pemotongan terjadi pada ujung mikrofibril kitin yang tidak tereduksi dan tidak secara acak.

2.6.3. Sumber Enzim Kitinase

Kitinase dari Serangga

Kitinase serangga termasuk dalam famili 18 glikosilhidrolase yang menghidrolisis kitin dengan pembelahan tipe-endokitinase sambil mempertahankan konfigurasi produk anomerik β -(1-4) (Arakane dan Muthukrishnan 2009). Kitinase pada serangga biasanya ditemukan di jaringan epitel ektodermal seperti foregut, kutikula, trakea, dan hindgut pada serangga (Lee *et al.*, 2011).

Kitinase dari Tanaman

Tanaman tidak menghasilkan kitinase setiap waktu, namun terdapat rangsangan tertentu (fitopatogenik serangan) yang mengaktifkan produksi kitinase pada tanaman (Van *et al.*, 2006). Peran kitinase pada tanaman terlihat dalam bentuk mekanisme pertahanan. Serangan fitopatogen bertindak sebagai sinyal induksi kitinase dan memfasilitasi tanaman dalam pertahanan diri terhadap patogen. Pada beberapa tanaman produksi kitinase juga ditemukan selama pertumbuhan bibit,

embriogenesis, dan perkecambahan biji (Kirubakaran and Sakthivel, 2007). Tempat untuk produksi kitinase pada tumbuhan berada pada jaringan spesifik seperti pada bunga, biji, batang dan umbi (Van *et al.*, 2006).

Kitinase dari Mikroorganisme

Mikroba penghasil kitinase sebagian besar telah dikelompokkan ke dalam keluarga 18 glikosil hidrolase (Bhattacharya *et al.*, 2007). Kelompok bakteri dan kelompok jamur merupakan jenis mikroba yang telah ditemukan oleh peneliti. Kitinase bakteri memiliki peran penting dalam proses degradasi kitin, yaitu untuk memenuhi kebutuhan energinya (Patil *et al.*, 2000; Huang *et al.*, 2005; Bhattacharya *et al.*, 2007). Aktivitas kitinase telah banyak ditemukan terutama pada spesies *Streptomyces*, *Serratia*, *Clostridium*, *Aeromonas*, *Arthrobacter*, *Vibrio*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Chromobacterium* dan *Bacillus* (Wang *et al.*, 2008; Han *et al.*, 2009; Narayana dan Vijayalakshmi, 2009; Liu *et al.*, 2010; Kuddus dan Ahmad, 2013; Islam dan Datta, 2015).

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

Fermentasi merupakan proses dimana komponen-komponen kimiawi dihasilkan sebagai akibat adanya pertumbuhan maupun metabolisme mikroba yang mencakup proses aerob dan anaerob. Medium kultur permukaan dapat berupa medium padat maupun medium cair. Kondisi yang optimum untuk fermentasi tergantung pada jenis mikroorganisme yang digunakan. Fermentasi medium cair lebih memungkinkan adanya pengendalian faktor-faktor fisik dan kimia yang mempengaruhi proses fermentasi seperti temperatur, pH, dan kebutuhan oksigen (Ton *et al.*, 2010). Adapun kelebihan dari fermentasi medium cair yaitu pemakaian medium yang lebih efisien, jenis dan konsentrasi komponen-komponen dapat diatur sesuai dengan yang diinginkan, dan dapat memberikan kondisi yang optimum untuk pertumbuhan (Waites *et al.*, 2001).

Aplikasi dari penggunaan fermentasi *batch* secara tradisional menurut Hölker dan Lenz (2005) dan Pandey (2000) antara lain :

- a. Bir, minuman beralkohol. Sari buah yang diberi *Saccaromyces cereviciae* kemudian diinkubasikan didapatkan minuman beralkohol.
- b. Yoghurt, diproduksi dengan cara memfermentasikan air susu dengan bakteri bukan khamir. Biasanya menggunakan campuran *Lactobacillus bulgaricus* dan *Streptococcus thermophilus*. Bakteri mengubah laktosa gula susu pada kondisi anaerobik. Laktosa diubah menjadi asam laktat yang bersifat menggumpalkan kasein protein susu.

Selain aplikasi di atas, kebanyakan dari aplikasi tersebut menghasilkan produk-produk seperti enzim, pigmen, senyawa aromatik, senyawa kimia, antibiotik, dan agen pengontrol biologis.

2.8. Spektrofotometri UV-Vis

Spektrofotometer merupakan alat yang digunakan untuk mengukur nilai absorbansi dengan cara melewatkan cahaya dengan panjang gelombang tertentu pada suatu objek kaca atau kuarsa yang disebut kuvet. Sebagian dari cahaya tersebut akan diserap dan sisanya akan dilewatkan. Nilai absorbansi dari cahaya yang diserap sebanding dengan konsentrasi larutan di dalam kuvet (Sastrohamidjojo, 2007).

Berdasarkan daerah serapannya, spektrofotometer dibagi menjadi dua, yaitu spektrofotometer UV-Vis dan spektrofotometer sinar tampak. Rentang spektrum untuk spektrofotometer UV-Vis atau ultraviolet yaitu pada panjang gelombang 200-400 nm, sedangkan untuk rentang spektrofotometer sinar tampak yaitu pada rentang panjang gelombang 400-750 nm (Rohman, 2007).

Menurut Yanlinastuti *et al.* (2011) prinsip kerja spektrofotometer UV-Vis yaitu apabila cahaya monokromatik melalui suatu media (larutan), maka sebagian cahaya tersebut diserap, sebagian dipantulkan, dan sebagian lagi dipancarkan. Adapun yang melandasi pengukuran spektrofotometer ini dalam penggunaannya adalah hukum Lambert-Beer yaitu bila suatu cahaya monokromatis dilewatkan

melalui suatu media yang transparan, maka intensitas cahaya yang ditransmisikan sebanding dengan tebal dan kepekaan media larutan yang digunakan berdasarkan persamaan berikut:

$$A = \log I/I_0 \text{ atau } A = a.b.c (l)$$

A = absorbansi

a = koefisien serapan molar

b = tebal media cuplikan yang dilewati sinar

c = konsentrasi unsur dalam larutan cuplikan

I_0 = intensitas sinar mula-mula

I = intensitas sinar yang diteruskan.

2.9. High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

Kromatografi merupakan teknik analisis dengan solut atau zat-zat terlarut terpisah oleh perbedaan kecepatan elusi, karena zat-zat ini melewati kolom kromatografi. Kromatografi dibedakan menjadi dua golongan besar berdasarkan fase gerak yang digunakan yaitu kromatografi cair (*liquid chromatography*) dan kromatografi gas (*gas chromatography*). HPLC merupakan teknik pemisahan yang diterima secara luas untuk analisis dan pemurnian senyawa tertentu dalam suatu sampel pada sejumlah bidang. HPLC merupakan metode yang tidak destruktif dan dapat digunakan baik untuk analisis kualitatif maupun kuantitatif serta memiliki kecepatan analisis dan kepekaan yang tinggi (Gandjar dan Rohman, 2007).

Menurut Effendy (2004) HPLC memiliki banyak kelebihan dibandingkan dengan metode yang lain. Kelebihan tersebut antara lain:

1. Mampu memisahkan molekul-molekul dari suatu campuran
2. Kecepatan analisis dan kepekaan yang tinggi
3. Mudah melaksanakannya
4. Kolom dapat digunakan kembali
5. Dapat digunakan bermacam-macam *detector*
6. Resolusi yang baik
7. Mudah melakukan *sample recovery*.

2.10. Scanning Electron Microscopy (SEM)

Scanning Electron Microscope (SEM) merupakan salah satu jenis mikroskop elektron yang menggunakan berkas elektron untuk menggambarkan bentuk permukaan dari material yang dianalisis. Prinsip kerja dari SEM ini adalah dengan menggambarkan permukaan benda atau material dengan berkas elektron yang dipantulkan dengan energi tinggi. Permukaan material yang disinari atau terkena berkas elektron akan memantulkan kembali berkas elektron atau dinamakan berkas elektron sekunder ke segala arah. Tetapi dari semua berkas elektron yang dipantulkan terdapat satu berkas elektron yang dipantulkan dengan intensitas tertinggi. Detektor yang terdapat di dalam SEM akan mendeteksi berkas elektron berintensitas tertinggi yang dipantulkan oleh benda atau material yang dianalisis. Elektron memiliki resolusi yang lebih tinggi daripada cahaya. Cahaya hanya mampu mencapai 200 nm sedangkan elektron bisa mencapai resolusi sampai 0,1-0,2 nm (Ayu, 2013).

III. METODE PENELITIAN

3.1. Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilakukan pada bulan Agustus 2021 sampai September 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

Alat-alat yang digunakan yaitu alat-alat gelas (pipet tetes, gelas beaker, erlenmeyer, tabung reaksi, gelas ukur), kasa, kapas, karet gelang, tisu, jarum ose, pinset, lampu spirtus, cawan petri, mikropipet, neraca analitik, *hot plate*, oven, *laminar air flow*, inkubator, *shaker incubator*, *autoclave* Tomy SX-700, pH meter, sentrifus Hitachi CF 16RX II, mikroskop Zeiss axio A1, spektrofotometer UV-Vis, dan HPLC.

Bahan-bahan yang digunakan yaitu limbah kulit udang, aquades, bubuk agar, HCl, NaOH, standar glukosamin WAKO Jepang, *yeast extract*, *malt extract*, dekstrosa, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, air laut buatan, *Coomassie Brilliant Blue* (CBB), *Bovine Serum Albumin* (BSA), dan *Dinitrosalicylic Acid* (DNS).

3.3. Prosedur Penelitian

3.3.1. Persiapan Kulit Udang

Limbah kulit udang berasal dari Gudang Lelang, Teluk Betung Selatan. Limbah kulit dan kepala udang yang telah dikumpulkan untuk bahan baku, selanjutnya dibersihkan, dicuci dengan air mengalir dan dikeringkan. Kemudian udang yang telah dikeringkan dihaluskan sehingga diperoleh serbuk kulit udang yang akan digunakan sebagai bahan baku substrat.

3.3.2. Pembuatan Kitin

Pembuatan kitin dilakukan dengan merujuk pada Hendri dan Laila (2013) dengan beberapa modifikasi. Sebanyak 100 gram serbuk kulit udang kering ditambahkan NaOH 3,5% dengan perbandingan 1:10 (w/v) dan distiter selama 2 jam pada temperatur 60°C. Kemudian dilakukan penyaringan, dinetralkan menggunakan aquades hingga pH netral dan dikeringkan dalam oven pada temperatur 60°C selama 24 jam. Selanjutnya, hasil residu ditambahkan HCl 1,25 N dengan perbandingan yang sama yaitu 1:10 (w/v), distirer selama 2 jam pada temperatur 60°C. Kemudian disaring, dinetralkan, dan dikeringkan dalam oven pada temperatur 60°C selama 24 jam. Hasil serbuk tersebut merupakan kitin (kulit udang yang telah demineralisasi dan dideproteinasi).

3.3.3. Pembuatan Media

3.3.3.1. Media ISP-2

Pembuatan media ISP-2 dilakukan dengan cara mencampurkan 4 gram *yeast extract*, 10 gram *malt extract*, 4 gram dekstrosa, dan 20 gram agar yang dilarutkan dalam 1 liter air laut steril kemudian disterilkan dengan *autoclave* (Margavey *et al.*, 2004).

3.3.3.2. Koloid Kitin

Pembuatan koloid kitin merujuk pada Saima and Roohi (2013) dengan beberapa modifikasi. Sebanyak 20 gram kitin ditambahkan perlahan 200 mL HCl pekat (1:10), distirer selama 2 jam, ditambahkan aquades 2 liter, diaduk, dan didiamkan hingga terbentuk suspensi. Selanjutnya, suspensi dibilas menggunakan aquades hingga pH netral dan disentrifus selama 10 menit dengan kecepatan 7000 rpm. Lalu, suspensi diautoklaf pada 121°C selama 15 menit, dan diperoleh koloid kitin.

3.3.3.3. Larutan Buffer Fosfat pH 6, 7, dan 8

Pembuatan larutan ini dilakukan dengan cara mencampurkan 0,964 gram $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ dan 0.8078 gram $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ yang dilarutkan dalam 100 mL aquades dan dicek pH-nya. Kemudian ditambahkan NaOH atau H_3PO_4 bila dibutuhkan.

3.3.4. Peremajaan Isolat *Actinomyces*

Isolat yang digunakan adalah *actinomyces* 18D36A1 yang diperoleh dari perairan Buleleng, Bali koleksi laboratorium UPT LTSIT Unila. Peremajaan isolat dilakukan pada media agar koloid kitin dan ISP-2. Media agar koloid kitin terbuat dari 1% koloid kitin (b/v), dan 2% agar yang dilarutkan dalam air laut buatan. Setelah itu, campuran disterilisasi dengan autoklaf selama 15 menit pada 1 atm, 121°C. Kemudian, masing-masing media dituangkan ke dalam tabung reaksi. Isolat *actinomyces* 18D36A1 digoreskan pada kedua media agar tersebut.

3.3.5. Pembuatan Larutan Standar

3.3.5.1. Pembuatan Standar Glukosamin

0,1 gram standar glukosamin dilarutkan dalam 100 mL aquades, dihomogenkan dan diperoleh konsentrasi akhir 1000 ppm. Kemudian, dibuat ke dalam konsentrasi 10 ppm hingga 70 ppm.

3.3.5.2. Pembuatan Standar *Bovine Serum Albumin* (BSA)

0,1 gram standar BSA dilarutkan dalam 100 mL aquades, dihomogenkan dan diperoleh konsentrasi akhir 1000 ppm. Kemudian, dibuat ke dalam konsentrasi 5 ppm, 10 ppm, 15 ppm, dan 20 ppm.

3.3.6. Uji Aktivitas Kitinolitik *Actinomycetes* 18D36A1

Uji aktivitas kitinolitik *actinomycetes* dilakukan dengan penampakan zona bening pada media agar koloid kitin. Strain *actinomycetes* 18D36A1 yang telah ditumbuhkan sebelumnya pada media agar kolod kitin 1% diinokulasikan pada media agar koloid kitin baru dan diinkubasi selama 14 hari dalam inkubator hingga terlihat zona bening.

3.3.7. Identifikasi Morfologi *Actinomycetes* 18D36A1

Identifikasi morfologi dilakukan menggunakan metode *cover slip culture* merujuk pada Singh *et al.* (2014) dengan beberapa modifikasi. Metode tersebut dilakukan dengan cara menancapkan *cover slip* dengan kemiringan 45° ke dalam media agar dan digoreskan strain di atas media tersebut. Setelah isolat tumbuh, diidentifikasi morfologinya dengan menggunakan mikroskop Zeiss Axioo A1 dan *Scanning Electron Microscopy* (SEM) yang merujuk pada Li *et al.* (2016).

3.3.8. Laju Pertumbuhan Isolat *Actinomycetes* 18D36A1

Suspensi *actinomycetes* dibuat dengan cara isolat *actinomycetes* 18D36A1 yang telah ditumbuhkan koloid kitin selama 14 hari, diinokulasikan ke dalam tabung reaksi yang berisi 9 mL media cair kitin 1%, dihomogenkan, dan dibuat sebanyak 42 replikat. Sebanyak 4 mL suspensi kemudian dimasukkan ke dalam kuvet dan diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 600 nm.

3.3.9. Persiapan Inokulum *Actinomyces* 18D36A1

Persiapan inokulum *actinomyces* dilakukan dengan mengambil dan memisahkan spora kultur *actinomyces* 18D36A1 yang telah ditumbuhkan pada media agar koloid kitin berdasarkan hasil waktu optimum pertumbuhan. Kemudian, spora kultur diinokulasikan ke dalam masing-masing labu erlenmeyer 100 mL yang berisi larutan air laut buatan dengan substrat kitin dan serbuk kulit udang yang telah disterilisasi sebelumnya.

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

3.3.10.1. Variasi Waktu

Substrat kitin dan kulit udang sebanyak 0,36 gram dimasukkan dalam masing-masing labu erlenmeyer 100 mL dan ditambahkan dengan 36 mL larutan air laut buatan. pH larutan dicek menggunakan kertas pH. Masing-masing media fermentasi dibuat sebanyak 3 replikat. Media disterilisasi selama 15 menit pada 1 atm dan temperatur 121°C. Kultur awal sebanyak 4 mL diinokulasikan dalam masing-masing media kitin dan kulit udang dan difermentasi pada temperatur ruang selama 2, 7, dan 14 hari. Kemudian, kultur disentrifus selama 15 menit pada kecepatan 700 rpm dan diperoleh filtrat hasil fermentasi. Setelah itu, pada filtrat yang diperoleh dilakukan uji glukosamin, protein dan aktivitas enzim pada hari ke-2, hari ke-7, dan hari ke-14.

3.3.10.2. Variasi pH

Pada penentuan pH optimum dilakukan dengan cara memvariasikan pH media fermentasi menggunakan buffer fosfat. Media disterilisasi dengan autoklaf pada temperatur 121°C, selama 15 menit pada tekanan 1 atm. Sebelumnya, dilakukan pembuatan inokulum seperti pada variasi waktu. Lalu, sebanyak 4 mL inokulum diinokulasikan ke dalam masing-masing media dengan pH 5, 6, dan 7 dan diinkubasi selama waktu optimum inkubasi pada temperatur ruang. Masing-

masing media fermentasi dibuat sebanyak 3 replikat. Kemudian, kultur disentrifus selama 15 menit pada kecepatan 700 rpm dan filtrat yang diperoleh diuji glukosamin, kadar protein dan aktivitas enzimnya.

3.3.10.3. Variasi Temperatur

Pada penentuan temperatur optimum dilakukan dengan cara memvariasikan temperatur menggunakan inkubator. Media disterilisasi dengan autoklaf pada temperatur 121°C, selama 15 menit pada tekanan 1 atm. Sebelumnya, telah dilakukan pembuatan inokulum seperti pada variasi waktu. Sebanyak 4 mL inokulum diinokulasikan ke dalam media dengan waktu dan pH optimum dan diinkubasi menggunakan inkubator pada temperatur 52°C dan pada temperatur ruang. Masing-masing media fermentasi dibuat sebanyak 3 replikat. Kemudian, kultur disentrifus selama 15 menit pada kecepatan 700 rpm dan filtrat yang diperoleh diuji glukosamin, kadar protein dan aktivitas enzimnya.

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

Uji konsentrasi glukosamin dilakukan dengan merujuk pada Zbircea *et al.* (2016). Sebanyak 2 mL filtrat ditambahkan 2 mL reagen DNS (3,5-dinitrosalicylic acid), dipanaskan selama 10 menit pada temperatur 100°C dan didinginkan. Blanko dan larutan standar glukosamin dengan variasi konsentrasi digunakan sebagai standar. Lalu dibaca absorbansinya menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 540 nm.

Uji glukosamin juga dilakukan menggunakan HPLC. Hasil fermentasi diambil sedikit dan dievaporasi menggunakan kolom C18. Fase gerak yang digunakan adalah asetonitril:air (30:70, v/v) yang merupakan campuran pelarut polar. Lalu, sampel diidentifikasi pada panjang gelombang 250 nm menggunakan detektor UV dengan waktu *run* 7 menit (Jacyno, 2004).

Penentuan aktivitas enzim dilakukan dengan merujuk pada Vahed *et al.* (2013). Sebanyak 1 mL filtrat ditambahkan 1 mL substrat koloid kitin 1% yang dibuat dengan cara menambahkan 1 gram koloid kitin ke dalam 100 mL air. Kemudian diinkubasi terlebih dahulu pada temperatur 40°C selama 30 menit, dan ditambahkan 2 mL reagen DNS. Blanko dan larutan standar glukosamin dengan variasi konsentrasi digunakan sebagai standar. Nilai absorbansi dibaca menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 540 nm.

Kadar protein dilakukan menggunakan metode Bradford. Sebanyak 400 µl filtrat direaksikan dengan 2 mL reagen bradford, lalu diukur absorbansi pada panjang gelombang 595 nm. Larutan BSA dan blanko dengan variasi konsentrasi digunakan sebagai standar.

V. SIMPULAN DAN SARAN

5.1. Simpulan

Berdasarkan penelitian ini dapat disimpulkan sebagai berikut:

1. Kondisi optimum produksi glukosamin, aktivitas enzim dan kadar protein yang dihasilkan dari *actinomyces* 18D36A1 pada media cair serbuk kulit udang yaitu pada waktu inkubasi 7 hari, pH 6 dan temperatur 29°C dengan nilai berturut-turut yaitu 0,213 mg/mL, 0,0008 U/mL dan 0,0326 mg/mL.
2. Hasil N-Glukosamin dari *actinomyces* 18D36A1 pada media cair serbuk kulit udang adalah sebesar 0,4198 mg/mL pada temperatur 29°C dan 0,397 mg/mL pada temperatur 52°C.

5.2. Saran

Pada penelitian yang telah dilakukan belum didapatkan nilai optimum untuk aktivitas enzim. Sehingga, penulis memberikan saran yaitu pada peneliitian selanjutnya perlu dilakukan optimasi konsentrasi substrat pada isolat 18D36A1 ini agar dapat meningkatkan aktivitas dan kualitas enzim serta menghasilkan produk akhir yang maksimal.

DAFTAR PUSTAKA

- Afriyani, R., Halisa, S., & Rolina, H. 2016. Faktor yang Berhubungan Dengan Pemberian MP-ASI pada Bayi Usia 0-6 Bulan di BPM Nurtala Palembang. *Jurnal Kesehatan*. 262-265.
- Ameh, A. O., Isa, M. T., Abutu, D., & Danlami, A. 2014. Kinetic modelling of the demineralization of shrimp exoskeleton using citric acid. *Leonardo Electronic Journal of Practices and Technologies*. 13(25): 99-108.
- Amelia, Ayu. 2013. Pengaruh Current Ratio, Debt to Equity Ratio, Dan Return On Equity Terhadap Pertumbuhan Laba Pada Perusahaan Sektor Makanan dan Minuman di Bursa Efek Indonesia Tahun 2008-2012. *Laporan Akhir*. Jurusan Akuntansi. Palembang: Politeknik Negeri Sriwijaya.
- Anitha, A., Sowmya, S., Kumar, P. T. S., Deepthi, S., Chennazhi, K. P., Ehrlich, H., Tsurkan, M., & Jayakumar, R. 2014. Chitin and chitosan in selected biomedical applications. *Progress in Polymer Science*. 39(9). 1644-1667.
- Arakane, Y., & Muthukrishnan, S. 2010. Insect chitinase and chitinase-like proteins. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 67(2): 201–216.
- Arif, A. R., Ischaidar., Natsir, H., Dali, S. 2013. *Isolasi Kitin dari Limbah Udang Putih (Penaeus merguensis) Secara Enzimatis*. Seminar Nasional Kimia 2013, Makassar, Laboratorium Biokimia, Jurusan Kimia, Fakultas MIPA Universitas Hasanuddin.
- Asmoro, F. W. 2016. Penentuan Kadar Glukosamin Dari Substrat Kulit Udang Menggunakan Bakteri Actinomycetes ANL-4 Sebagai Pendegradasi Dalam Variasi Waktu Inkubasi. *Skripsi*. Universitas Lampung.

- Azhar, M., Efendi, J., Syofyeni, E., Lesi, R. M., Novalina, S. 2010. *Pengaruh Konsentrasi NaOH Dan KOH Terhadap Derajat Deasetilasi Kitin Dari Limbah Kulit Udang*. Jurusan Kimia FMIPA Universitas Negeri Padang.
- Barka E. A., P. Vatsa, L. Sanchez, N. Gaveau-Vaillant, C. Jacquard, H. Klenk, C. Clément, Y. O. G. P. van Wezeld. 2016. Taxonomy, Physiology, And Natural Products of Actinobacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 80:1-43.
- Bentley, S. D., Chater, K. F., Cerdeño-Tárraga, A. M., Challis, G. L., Thomson, N. R., James, K. D., Harris, D. E., Quail, M. A., Kieser, H., Harper, D., Bateman, A., Brown, S., Chandra, G., Chen, C. W., Collins, M., Cronin, A., Fraser, A., Goble, A., Hidalgo, J., Hopwood, D. A. 2002. Complete Genome Sequence of The Model Actinomycetes *Streptomyces Coelicolor* A3(2). *Nature*. 417(6885): 141-147.
- Bhattacharya, D., Nagpure, A., & Gupta, R. K. 2007. Bacterial chitinases: Properties and potential. *Critical Reviews in Biotechnology*. 27(1): 21-28.
- Bhatti, A. A., Haq, S., & Bhat, R. A. 2017. Actinomycetes benefaction role in soil and plant health. *Microbial Pathogenesis*. 111: 458-467.
- Chan, K. O. W., & Ng, G. Y. F. 2011. A review on the effects of glucosamine for knee osteoarthritis based on human and animal studies. *Hong Kong Physiotherapy Journal*. 29(2): 42–52.
- Effendy. 2004. *Kromatogramfi Cair Kinerja Tinggi dalam Bidang Farmasi*. USU.
- El-Sersy, N. A., Abd-Elnaby, H., Abou-Elela, G. M., Ibrahim, H. A. H., & El-Toukhy, N. M. K. 2010. Optimization, Economization and Characterization of Cellulase Produced by Marine *Streptomyces Ruber*. *African Journal of Biotechnology*. 9(38): 6355–6364.
- Foucher, J.P., G.K. Westbrook, A. Boetius, S. Ceramicola, S. Dupre, J. Mascle, J. Mienert, O. Pfannkuche, C. Pierre, and D. Praeg. 2009. Structure and Drivers of Cold Seep Ecosystems. *Oceanography*. 22: 92-109.

- Funkhouser J. D. Aronson N. N. 2007. Chitinase family GH18: Evolutionary Insights from The Genomic History of A Diverse Protein Family. *BMC Evolutionary Biology*. 7: 96-111.
- Gandhimathi, R., Seghal Kiran, G., Hema, T. A., Selvin, J., Rajeetha Raviji, T., & Shanmughapriya, S. 2009. Production and Characterization of Lipopeptide Biosurfactant by A Sponge-Associated Marine Actinomycetes Nocardioopsis Alba MSA10. *Bioprocess and Biosystems Engineering*. 32(6): 825-835.
- Gandjar, I. G. dan Rohman, A. 2007. *Kimia Farmasi Analisis*. Pustaka Pelajar. Yogyakarta.
- Ghorbani, N. R., Greiner, R., Alikhani, A. H., Hamed, J., & Yakhchali, B. 2013. Distribution Of Actinomycetes in Different Soil Ecosystems and Effect of Media Composition on Extracellular Phosphatase Activity. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*. 13(1): 223-236.
- Gohel, S. D., & Singh, S. P. 2012. Purification Strategies, Characteristics and Thermodynamic Analysis of A Highly Thermostable Alkaline Protease from A Salt-Tolerant Alkaliphilic Actinomycetes, Nocardioopsis Alba OK-5. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*. 889-890: 61-68.
- Gohel, V., Singh, A., Vimal, M., Ashwini, P., & Chhatpar, H. S. 2006. Bioprospecting and Antifungal Potential of Chitinolytic Microorganisms. *African Journal of Biotechnology*. 5(2): 54-72.
- Gupta, R., Gigras, P., Mohapatra, H., Goswami, V. K., & Chauhan, B. 2003. Microbial α -amylases: A Biotechnological Perspective. *Process Biochemistry*. 38(11): 1599-1616.
- Habbeche, A., Saoudi, B., Jaouadi, B., Haberra, S., Kerouaz, B., Boudelaa, M., Badis, A., & Ladjama, A. 2014. Purification and Biochemical Characterization of A Detergent-Stable Keratinase from A Newly Thermophilic Actinomycete Actinomyces Keratinilytica Strain Cpt.29 Isolate from Poultry Compost. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 117(4): 413-421.
- Han, Y., Yang, B., Zhang, F., Miao, X., & Li, Z. 2009. Characterization Of Antifungal Chitinase from Marine Streptomyces sp. DA11 Associated With

South China Sea Sponge Craniella Australiensis. *Marine Biotechnology*, 11(1): 132-140.

Hendri, J., dan Laila, A. 2013. *Kitin Kitosan*. Lembaga Penelitian Universitas Lampung. Universitas Lampung.

Herdyastuti N, Raharjo T.J, Mudasir, dan Matsjeh S. 2009. Chitinase and Chitinolytic Mikroorganism: Isolation, Characterization and Potential. *J. Chem.* 9: 37-47.

Hölker, U., & Lenz, J. 2005. Solid-state fermentation - Are there any biotechnological advantages? *Current Opinion in Microbiology*. 8(3): 301-306.

Howard, R. L., Abotsi, E., Van Rensburg, E. L. J., & Howard, S. 2003. Lignocellulose biotechnology: Issues of bioconversion and enzyme production. *African Journal of Biotechnology*. 2(12): 702-733.

Huang, C. J., Wang, T. K., Chung, S. C., & Chen, C. Y. 2005. Identification Of An Antifungal Chitinase from A Potential Biocontrol Agent, Bacillus Cereus 28-9. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*. 38(1): 82-88.

Ifuku, S. 2015 Chitin Nanofibers: Preparations, Modifications, and Applications. Handbook of Polymer Nanocomposites. *Processing, Performance and Application*. 165-178.

Islam, R., & Datta, B., 2015. Diversity Of Chitinases and Their Industrial Potential. *Int. J. Appl. 430 Res.* 1: 55-60.

Itoi, S., Y. Kanomata, Y. Koyama, K. Kadokura, S. Uchida, T. Nishio, and H. Sugito. 2007. Identification of a Novel Endochitinase from a Marine Bacterium *Vinrio proteolyticus* strain No.442. *J. Biochemica et Biophysica Acta*.1774: 1099-1107.

Jamialahmadi, K. 2019. Beneficial Applications of Glucosamine. *In Molecular Nutrition Carbohydrates*. Elsevier Inc.

- Kawaroe, M, Prartono, T, Sunuddin, A, Sari, D.W, Augustine, D. 2010. *Mikroalga: Potensi dan Pemanfaatannya Untuk Produksi Bio Bahan Bakar*. PT Penerbit IPB Press. Bogor.
- Keller, M. A., Piedrafita, G., & Ralser, M. 2015. The Widespread Role of Non-Enzymatic Reactions in Cellular Metabolism. *Current Opinion in Biotechnology*. 34: 153-161.
- Kirubakaran, S. I., & Sakthivel, N. 2007. Cloning and Overexpression of Antifungal Barley Chitinase Gene in *Escherichia coli*. *Protein Expression and Purification*. 52(1): 159-166.
- Kuhad, R. C., Gupta, R., & Singh, A. 2011. Microbial Cellulases and Their Industrial Applications. *Enzyme Research*, 2011(1).
- Lee, Y. G., Chung, K. C., Wi, S. G., Lee, J. C., & Bae, H. J. 2009. Purification And Properties of A Chitinase from *Penicillium* sp. LYG 0704. *Protein Expression and Purification*. 65(2): 244-250.
- Li, Q., Chen, X., Jiang, Y., & Jiang, C. 2016. Morphological Identification of Actinobacteria. *Actinobacteria - Basics and Biotechnological Applications*.
- Liu, D., Cai, J., Xie, C. chu, Liu, C., & Chen, Y. hua. 2010. Purification and Partial Characterization of A 36-Kda Chitinase from *Bacillus Thuringiensis* Subsp. Colmeri, and Its Biocontrol Potential. *Enzyme and Microbial Technology*. 46(3-4): 252-256.
- Margavey, N.A., J. M. Keller, V. Bernan, M. Dworkin, and D. H. Sherma. 2004. Isolation and Characterization of Novel Marine-Derived Actinomycetes Taxa Rich in Bioactive Metabolites. *Applied and Enviromental Microbiology*. 12: 7520-7529.
- Matsumoto, K.S. 2006. Fungal Chitinases, in : Guevara-Gonzales R.G and Torres-Pacheco I (Eds). *Advances in Agricultural and Food Biotechnology. Reseach Signpost, India*. 289-304.
- Menristek. 2003. *Budidaya Udang Windu*. Jakarta.

- Miller, K. L., & Clegg, D. O. 2011. Glucosamine and Chondroitin Sulfate. *Rheumatic Disease Clinics of North America*. 37(1), 103–118.
- Mitchell, V.W., & Bakewell, C. 2006. Male Versus Female Consumer Decision Making Styles. *Journal of Business Research*. 59 (12).
- Mitra, P., & Chakrabarty, P. K. 2005. An Extracellular Protease With Depilation Activity from *Streptomyces Nogalator*. *Journal of Scientific and Industrial Research*. 64(12): 978-983.
- Muharni & H Widjajanti. 2010. Skrining Bakteri Kitinolitik Antagonis Terhadap Pertumbuhan Jamur Akar Putih (*Rigidoporus lignosus*) Dari Rizosfir Tanaman Karet. *Jurnal Penelitian Sains*. 14(1) :50-56.
- Narayana, K. J. P., & Vijayalakshmi, M. 2009. Chitinase Production by *Streptomyces* sp. ANU 6277. *Brazilian Journal of Microbiology*. 40(4): 725-733.
- Natsir, H. 2002. Eksplorasi Mikroba Asidofilik Penghasil Enzim Pendegradasi Kitin. *Marina Chimica Actahal*. 3(1): 3-6.
- Nguyen, K. D., & Kobayashi, T. 2020. Chitin Hydrogels Prepared at Various Lithium Chloride/ N, N -Dimethylacetamide Solutions by Water Vapor-Induced PHase Inversion. *Journal of Chemistry*.
- Ninawe, S., Lal, R., & Kuhad, R. C. 2006. Isolation Of Three Xylanase-Producing Strains of Actinomycetes and Their Identification Using Molecular Methods. *Current Microbiology*. 53(3): 178-82.
- Nurkanto, A. 2007. Identifikasi Aktinomisetes Tanah Hutan Pasca Kebakaran Bukit Bangkirai Kalimantan Timur dan Potensinya Sebagai Pendegradasi Selulosa dan Pelarut Fosfat. *Biodiversitas*. 8: 314-319.
- Ongkiko, A. G. M., Fernando, L. A. T., & Diaz, L. J. L. 2016. Continuous Extraction Process of Chitin from Discarded Shells of Philippine Blue Swimming Crab (*Portunus pelagicus*). *Philippine Engineering Journal*. 37(2): 37-52.

- Pandey, A., Nigam, P., Soccol, C.R., Soccol, V.T., et al. 2000. Advances In Microbial Amylases. *Biotechnology and Applied Biochemistry*. 31: 135-152.
- Patil, R. S., Ghormade, V., & Deshpande, M. V. 2000. Chitinolytic Enzymes: An Exploration. *Enzyme and Microbial Technology*. 26(7): 473–483.
- Purnomo, E. H., A. B. Sitanggang, D. Indrasti. 2012. *Studi Kinetika Produksi Glukosamin dalam Water-miscible Solvent dan Proses Separasinya*. Prosiding Seminar Hasil-hasil Penelitian IPB. 247-261.
- Robinson, P. K. 2015. Enzymes: Principles and Biotechnological Applications. *Essays in Biochemistry*. 59: 1-41.
- Rohani, N. 2000. Deproteinasi Kulit Udang Windu Menggunakan Isolat Bakteri *Bacillus* sp. *Skripsi*. Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Rohman, A. 2007. *Kimia Farmasi Analisis*. Yogyakarta: Pustaka Pelajar.
- Sahai, A. S., & Manocha, M. S. 1993. Chitinases Of Fungi and Plants: Their Involvement in Morphogenesis and Host-Parasite Interaction. *FEMS Microbiology Reviews*. 11(4): 317-338.
- Saima, Kuddus, M., Roohi, & Ahmad, I. Z. 2013. Isolation of Novel Chitinolytic Bacteria and Production Optimization of Extracellular Chitinase. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*. 11(1): 39-46.
- Saksono, H. 2013. Ekonomi Biru: Solusi Pembangunan Daerah Berciri Kepulauan Studi Kasus Kabupaten Kepulauan Anambas. *Pusat Penelitian dan Pengembangan Pemerintahan Umum dan Kependudukan Badan Penelitian dan Pengembangan (BPP)- Kementerian Dalam Negeri*. Jakarta.
- Salsabila, N. K. 2020. Penapisan Actinomycetes yang Berasosiasi Dengan Spons Sebagai Sumber Enzim Kitinase Menggunakan Media Limbah Kulit Udang. *Skripsi*. Universitas Lampung.
- Sastrohamidjojo, H. 2007. *Spektroskopi*. Yogyakarta: Liberty.

- Singh, L. S., Sharma, H., & Talukdar, N. C. 2014. Production of Potent Antimicrobial Agent by Actinomycetes, *Streptomyces Sannanensis* Strain SU118 Isolatd from Phoomdi in Loktak Lake of Manipur, India. *BMC Microbiology*. 14(1): 1-13.
- Siregar, A. F. A. Sabdono., D. Pringgenies. 2012. Potensi Antibakteri Ekstrak Rumput Laut Terhadap Bakteri Penyakit Kulit *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus epidermidis*, dan *Micrococcus luteus*. *Journal of Marine Research*. 1(2): 152-160.
- Soeka, Y.S. dan Triana, E. 2016. Pemanfaatan Limbah Kulit Udang untuk Menghasilkan Enzim Kitinase dari *Streptomyces macrosporeus* InaCC A454. *J. Kim. Terap. Indonesia*. 18(1): 91-101.
- Soeka, Y.S., Triana, E., dan Setianingrum, N. 2010. Aktivitas Aktinomisetes Dari Bangka-Belitung Koleksi Bidang Mikrobiologi, Puslit Biologi- Lipi Dalam Memproduksi Enzim Kitinase. *J. Tek. Ling*. 11(3): 417-423.
- Suryanto, D., Munir, E. dan Yunarliza. 2005. *Eksplorasi Bakteri Kitinolitik: Keragaman Gen Penyandi Kitinase pada Berbagai Jenis Bakteri dan Pemanfaatannya*. Laporan Hasil Penelitian Hibah Bersaing Perguruan Tinggi. Universitas Sumatra Utara.
- Toharisman, A. 2007. *Peluang Pemanfaatan Enzim Kitinase di Industri Gula*. Pusat Pengembangan Penelitian Geologi Kelautan (P3GL).
- Ton, N. M. N., Nguyen, M. D., PHam, T. T. H., & Le, V. V. M. 2010. Influence Of Initial pH and Sulfur Dioxide Content In Must On Wine Fermentation by Immobilized Yeast In Bacterial Cellulose. *International Food Research Journal*. 17(3). 743-749.
- Vahed, M., Motalebi, E., Rigi, G., Noghabi, K. A., Soudi, M. R., Sadeghi, M., & Ahmadian, G. 2013. Improving The Chitinolytic Activity of *Bacillus Pumilus* SG2 by Random Mutagenesis. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 23(11): 1519-1528.

- Van, L. L. C., Rep, M., & Pieterse, C. M. J. (2006). Significance of Inducible Defense-Related Proteins In Infected Plants. *Annual Review of Phytopathology*, 44. 135–162.
- Waites, M. J, Morgan, N. L., Rockey, J. S., dan Higton, G. 2001. Industrial Microbiology: An Introduction. *Blackwell Science Ltd., London*: 12-13.
- Wang, S. L., Chen, S. J., & Wang, C. L. 2008. Purification and Characterization of Chitinases and Chitosanases from A New Species Strain *Pseudomonas* sp. TKU015 Using Shrimp Shells As A Substrate. *Carbohydrate Research*. 343(7), 1171–1179.
- Widyastuti, Setiawan, F. Afandy, C. A., Irawan, A., Laila, A., Juliasih, N. L. G. R., Setiawan, W. A., Arai, M. Hendri, J., Setiawan, A. 2022. Antifungal Agent Chitooligosaccharides Derived from Solid-State Fermentation of Shrimp Shell Waste by *Pseudonocardia antitumoralis* 18D36-A1. *Fermentation* 2022. 8: 353.
- Yanlinastuti, Anggraini, D., Fatimah, S., Nampira, Y. 2011. Penentuan Kadar Zirkonium Dalam Paduan U-Zr Menggunakan Spektrofotometer UV-Vis Dengan Pengompleks Arsenazo III. *Seminar Nasional SDM Teknologi Nuklir VII Yogyakarta*. 1978-0176.
- Younes, I., Ghorbel-Bellaaj, O., Nasri, R., Chaabouni, M., Rinaudo, M., & Nasri, M. (2012). Chitin and chitosan preparation from shrimp shells using optimized enzymatic deproteinization. *Process Biochemistry*. 47(12): 2032-2039.
- 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.
- Zhang, F., Chen, J. J., Ren, W. Z., Nie, G. X., Ming, H., Tang, S. K., & Li, W. J. 2011. Cloning, Expression and Characterization of An Alkaline Thermostable GH9 Endoglucanase from *Thermobifida Halotolerans* YIM 90462 T. *Bioresource Technology*. 102(21): 10143-10146.