

**PENENTUAN KADAR GLUKOSAMIN DARI KULIT UDANG SECARA
FERMENTASI PADAT OLEH STRAIN *ACTINOMYCETES* ISOLAT
19A07A1 GORONTALO DENGAN VARIASI pH DAN WAKTU**

Skripsi

Oleh

**LARASATI GADIS ERMADI
NPM 1817011050**



**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS LAMPUNG
BANDAR LAMPUNG
2023**

ABSTRAK

PENENTUAN KADAR GLUKOSAMIN DARI KULIT UDANG SECARA FERMENTASI PADAT OLEH STRAIN *ACTINOMYCETES* ISOLAT 19A07A1 GORONTALO DENGAN VARIASI pH DAN WAKTU

Oleh

Larasati Gadis Ermadi

Actinomycetes merupakan organisme penghasil enzim kitinase yang dapat mendegradasi kitin dengan memutus ikatan β -1,4-glikosidik pada kitin yang menghasilkan monomer dan oligomer N-Asetilglukosamin. Fermentasi kulit udang dilakukan menggunakan metode fermentasi media padat / *Solid-State Fermentation* (SSF) dengan enzim kitinase yang diproduksi oleh isolat *Actinomycetes* 19A07A1. Tahapan penelitian yang dilakukan meliputi penapisan serta identifikasi morfologi isolat 19A07A1, penentuan kondisi optimum pada fermentasi kulit udang oleh isolat 19A07A1, dan analisis kadar glukosamin. Berdasarkan identifikasi morfologi, isolat 19A07A1 termasuk dalam organisme *Brevibacterium linens*. Isolat tumbuh pada media kulit udang dikondisi optimum hari ke-14 dan pH 8 dengan kadar glukosamin yang didapatkan sebesar 2,61 mg/mL dan aktivitas enzim spesifik sebesar $3,84 \mu\text{mol t}^{-1}\text{mg}^{-1}$ menggunakan Spektrofotometer UV-Vis. Ekstrak kasar enzim hasil fermentasi dilakukan analisis glukosamin dengan menggunakan Kromatografi Lapis Tipis (KLT) dan *High-Pressured Liquid Chromatography* (HPLC), dimana didapatkan glukosamin dengan nilai *Retention Factor* (RF) 0,8 dan konsentrasi glukosamin 0,39 mg/mL pada waktu retensi 2,498 menit.

Kata kunci : *Actinomycetes*, *Brevibacterium linens*, SSF, Limbah kulit udang, Glukosamin

ABSTRACT

DETERMINATION OF GLUCOSAMINE CONTENT FROM SOLID FERMENTATION SHRIMP SHELL BY ACTINOMYCETES STRAIN ISOLATE 19A07A1 GORONTALO WITH VARIATION OF pH AND TIME

By

Larasati Gadis Ermadi

Actinomycetes are chitinase-producing organisms that can degrade chitin by breaking the β -1,4-glycosidic bond in chitin to produce N-acetylglucosamine monomers and oligomers. Shrimp shell fermentation was carried out using the Solid-State Fermentation (SSF) method with the chitinase enzyme produced by Actinomycetes isolate 19A07A1. The stages of the research carried out included screening and identifying the morphology of isolate 19A07A1, determination of the optimum conditions for shrimp shell fermentation by isolate 19A07A1, and analyzing glucosamine levels. Based on morphological identification, isolate 19A07A1 belongs to *Brevibacterium linens*. The isolate grown on shrimp shell media at optimum conditions on day 14 and pH 8 with glucosamine levels obtained of 2.61 mg/mL and specific enzyme activity of 3.84 $\mu\text{mol t}^{-1} \text{mg}^{-1}$ using a spectrophotometer UV-Vis. The crude extract of fermented enzymes was analyzed for glucosamine using Thin Layer Chromatography (TLC) and High-Pressured Liquid Chromatography (HPLC), where glucosamine was obtained with a Retention Factor (RF) value of 0.8 and a glucosamine concentration of 0.39 mg/mL at the retention of time 2.498 minutes.

Keywords : Actinomycetes, *Brevibacterium linens*, SSF, Shrimp shells waste, Glucosamine

**PENENTUAN KADAR GLUKOSAMIN DARI KULIT UDANG SECARA
FERMENTASI PADAT OLEH STRAIN *ACTINOMYCETES* ISOLAT
19A07A1 GORONTALO DENGAN VARIASI pH DAN WAKTU**

Oleh

LARASATI GADIS ERMADI

Skripsi

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

Pada

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



**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS LAMPUNG
BANDAR LAMPUNG
2023**

Judul : **PENENTUAN KADAR GLUKOSAMIN DARI
KULIT UDANG SECARA FERMENTASI PADAT
OLEH STRAIN *ACTINOMYCETES* ISOLAT
19A07A1 GORONTALO DENGAN VARIASI pH
DAN WAKTU**

Nama : **Larasati Gadis Ermadi**

NPM : **1817011050**


Jurusan : **Kimia**

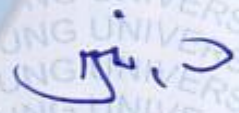
Fakultas : **Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam**



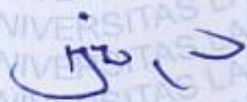
MENYETUJUI

1. **Komisi Pembimbing**


Prof. John Hendri, Ph.D.
NIP. 19681021198703001


Mulyono, Ph.D.
NIP. 197406112000031002


2. **Ketua Jurusan Kimia FMIPA**


Mulyono, Ph.D.
NIP. 197406112000031002

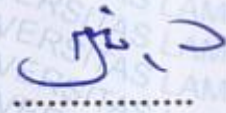
MENGESAHKAN

1. Tim Penguji

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



Sekretaris : **Mulyono, Ph.D.**



Anggota : **Dr. Nurhasanah, S.Si., M.Si.**



2. Pn. Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam



Dr. Heri Satria, M.Si.
NIP. 197110012005011002

Tanggal Lulus Ujian Skripsi : **28 Maret 2023**

SURAT PERNYATAAN

Yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama : Larasati Gadis Ermadi

Nomor Pokok Mahasiswa : 1817011050

Jurusan : Kimia

Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

Perguruan Tinggi : Universitas Lampung

Dengan ini menyatakan bahwa skripsi yang berjudul **Penentuan Kadar Glukosamin dari Kulit Udang Secara Fermentasi Padat oleh *Strain Actinomyces* Isolat 19A07A1 Gorontalo dengan Variasi pH dan Waktu** adalah benar karya saya sendiri. Selanjutnya saya juga tidak keberatan jika sebagian atau seluruh data di dalam skripsi tersebut digunakan oleh dosen atau program studi untuk kepentingan publikasi, sepanjang nama saya disebutkan dan terdapat kesepakatan sebelum dilakukan publikasi. Demikian pernyataan ini saya buat dengan sadar dan sebenarnya untuk digunakan sebagaimana mestinya.

Bandar Lampung, 10 April 2023

Yang Menyatakan



Larasati Gadis Ermadi
NPM. 1817011050

RIWAYAT HIDUP

Penulis dilahirkan di OKU Timur pada tanggal 19 April 2001, sebagai anak ke dua dari tiga bersaudara, putri dari Bapak Iwan Ermadi dan Ibu Ilona Wati.

Jenjang pendidikan diawali dari 3 tahun sekolah Dasar (SD) di SD Charitas 02 Mojosari dan 3 tahun di SDN Blondo 3 yang diselesaikan pada tahun 2012.

Penulis melanjutkan 1 tahun sekolah menengah pertama (SMP) di SMPN 1 Mungkid dan 2 tahun di SMPN 1 Belitang yang diselesaikan pada tahun 2015.

Penulis melanjutkan pendidikan di Sekolah Menengah Atas (SMA) Negeri 1 Belitang dan selesai pada tahun 2018. Tahun 2018 penulis terdaftar sebagai mahasiswa Kimia FMIPA Universitas Lampung melalui jalur Seleksi Bersama Masuk Perguruan Tinggi Negeri (SBMPTN).

Selama menjadi mahasiswa, penulis pernah mengikuti organisasi kemahasiswaan dimulai menjadi Kader Muda HIMAKI (KAMI) periode 2018. Pada tahun 2019, penulis menjadi anggota pengurus Himpunan Mahasiswa Kimia (HIMAKI) di biro Penerbitan.

Pada tahun 2021 penulis melaksanakan Kuliah Kerja Nyata (KKN) di desa Sidodadi Kecamatan Belitang, Kabupaten OKU Timur. Penulis juga melakukan Praktik Kerja Lapangan pada tahun 2021 di Laboratorium Biopolimer dan di Unit Pelaksana Teknis Laboratorium Terpadu dan Sentra Inovasi Teknologi (UPT LTSIT) FMIPA Universitas Lampung. Pada tahun 2022 penulis menyelesaikan

penelitian yang dilakukan di Laboratorium Biopolimer dan di Unit Pelaksana Teknis Laboratorium Terpadu dan Sentra Inovasi Teknologi (UPT LTSIT) FMIPA Universitas Lampung dengan judul “Penentuan Kadar Glukosamin dari Kulit Udang Secara Fermentasi Padat oleh *Strain Actinomyces* Isolat 19A07A1 Gorontalo dengan Variasi pH dan Waktu”.

MOTTO

"Keep Going, You Can Do It"

PERSEMBAHAN

Dengan mengucapkan

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

Alhamdulillah Puji Syukur Kehadirat Allah SWT Yang Maha Pengasih dan Maha Penyayang atas Rahmat, Karunia, dan Hidayah-Nya

Dengan segala kerendahan hati, kupersembahkan karya kecil ini sebagai tanda cinta, hormat, tanggung jawab, dan baktiku

Kepada :

Kedua Orang Tuaku

Bapak Iwan Ermadi dan Ibu Ilona Wati

Yang telah menjadi sumber kebahagiaan dan kekuatan untukku, yang telah memberikan kasih sayang, do'a, kesabaran, dukungan, serta nasihat untuk senantiasa tetap berpegang teguh pada agama Allah SWT.

Kakak dan adikku tersayang,

Putri Safirilla Ermadi dan Galilea Emona Ermadi

Atas dukungan dan Semangat yang diberikan.

Bapak Prof. John Hendri, Ph.D., dan Bapak Mulyono, Ph.D., dan Bapak Ibu Dosen Jurusan Kimia

Yang telah membimbingku selama menempuh pendidikan sarjana di Jurusan Kimia Universitas Lampung.

Seluruh sahabat dan teman-teman terdekatku yang selama ini telah memberikan banyak dukungan, bantuan dan motivasi kepadaku

Serta

Almamaterku Tercinta
Universitas Lampung

SANWACANA

Segala puji dan syukur atas kehadiran Allah SWT. yang telah memberikan kesehatan bagi penulis sehingga atas rahmat dan hidayah-Nya skripsi ini dapat diselesaikan. Shalawat beriring salam selalu tercurah kepada baginda Muhammad SAW. beserta para pengikutnya yang semoga mendapatkan syafaatnya di yaumul akhir kelak, Aamiin.

Alhamdulillahirobbil'aalamiin, penulis telah menyelesaikan skripsi ini dengan judul "*Penentuan Kadar Glukosamin dari Kulit Udang Secara Fermentasi Padat oleh Strain Actinomyces Isolat 19A07A1 Gorontalo dengan Variasi pH dan Waktu*" sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar sarjana Ilmu Sains di Universitas Lampung. Penulis mengucapkan terima kasih kepada seluruh pihak yang telah memberikan bantuan baik berupa, arahan, masukan, informasi, serta dukungan moril maupun materiil. Oleh karena itu, pada kesempatan kali ini penulis mengucapkan terima kasih kepada:

1. Allah SWT atas kenikmatan dan karunia yang telah diberikan sehingga skripsi ini dapat terselesaikan.
2. Ibu, kakak dan adik dari penulis yang selalu memberi semangat serta dukungan.
3. Bapak Prof. John Hendri, Ph.D. selaku pembimbing I atas segala nasihat, bimbingan, bantuan, dan saran sehingga penelitian dan skripsi ini dapat diselesaikan dengan baik.
4. Bapak Mulyono, Ph.D. selaku pembimbing II atas bimbingan dan saran sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini.
5. Ibu Dr. Nurhasanah, S.Si., M.Si. selaku penguji yang telah membimbing, memberi arahan dan semua ilmu yang telah diberikan.

6. Ibu Dr. Yuli Ambarwati, S.Si., M.Si. selaku pembimbing akademik yang telah memberikan nasihat serta saran hingga penulisan skripsi ini selesai.
7. Bapak Mulyono, Ph.D. selaku Ketua Jurusan Kimia yang telah menyetujui skripsi; Bapak dan Ibu Staf administrasi FMIPA Unila.
8. Bapak Dr. Eng. Heri Satria, S.Si., M.Si. selaku PLT. Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam.
9. Annisa Larasati, dan Firda Tiara Rochman selaku rekan yang selalu membantu, menasehati dan memberikan semangat kepada penulis selama penelitian.
10. Nabila Anastasya, Luke Lin, dan Irma Fitria Ananda yang selalu mendukung dan menemani penulis.
11. Teman-teman Kimia Angkatan 2018 yang telah membantu hingga terselesainya skripsi ini.
12. Dan seluruh pihak terkait yang tidak bisa penulis sebutkan satu per satu yang secara langsung atau tidak langsung telah memberikan dukungan dan bantuannya, baik secara moril dan materiil sehingga pelaksanaan penelitian dapat terlaksana dengan baik.

Bandar Lampung, 09 April 2023
Penulis,

Larasati Gadis Ermadi

DAFTAR ISI

	Halaman
DAFTAR ISI	xiv
DAFTAR TABEL	xvi
DAFTAR GAMBAR	xvii
I. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Tujuan Penelitian.....	2
1.3 Manfaat Penelitian.....	3
II. TINJAUAN PUSTAKA	4
2.1 Penapisan (<i>Screening</i>).....	4
2.2 <i>Actinomyces</i>	4
2.3 Kitin.....	5
2.4 Glukosamin	6
2.5 Enzim Kitinase	8
2.6 Fermentasi Padat (<i>Solid State Fermentation</i>).....	9
2.7 Spektrofotometri Uv-Vis	10
2.8 Kromatografi Cair Kinerja Tinggi.....	12
2.9 Kromatografi Lapis Tipis (KLT).....	12
III. METODE PENELITIAN	14
3.1 Waktu dan Tempat	14
3.2 Alat dan Bahan	14
3.3 Prosedur Penelitian.....	15
3.3.1 Persiapan Sampel Kulit Udang dan Koloid Kitin	15
3.3.2 Pembuatan Media Koloid Kitin	15
3.3.2 Penapisan Isolat <i>Actinomyces</i> 19A07A1	16
3.3.4 Pembuatan Larutan Inokulum <i>Actinomyces</i> 19A07A1	16

3.3.5 Kultivasi <i>Actinomyces</i> Secara SSF pada Kulit Udang.....	17
3.3.6 Analisis Data.....	18
IV. HASIL DAN PEMBAHASAN	20
4.1 Koloid Kitin.....	20
4.2 Morfologi Isolat <i>Actinomyces</i> 19A07A1	21
4.3 Kultivasi <i>Actinomyces</i> Isolat 19A07A1.....	23
4.3.1 Waktu Optimum Pertumbuhan Isolat <i>Actinomyces</i> 19A07A1	24
4.3.2 pH Optimum Pertumbuhan Isolat <i>Actinomyces</i> 19A07A1	26
4.4 Analisis Ekstrak Filtrat SSF oleh <i>Actinomyces</i> Isolat 19A07A1.....	29
4.4.1 Kadar Protein	29
4.4.2 Aktivitas Enzim Kitinase	30
4.4.3 Kadar Glukosamin	31
V. KESIMPULAN DAN SARAN	37
5.1 Kesimpulan.....	37
5.2 Saran	37
DAFTAR PUSTAKA	38
LAMPIRAN.....	44

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Data kadar glukosamin variasi waktu pada pH 7	25
2. Data kadar glukosamin variasi pH pada hari ke-14	28
3. Data pengukuran kadar protein	30
4. Data pengukuran aktivitas enzim spesifik.....	31
5. Data perhitungan nilai faktor retensi (RF)	33
6. Data analisis HPLC	35
7. Data pengukuran konsentrasi glukosamin analisis HPLC	36
8. Data pengukuran larutan standar BSA.....	47
9. Data pengukuran larutan standar glukosamin	48

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Struktur kitin	6
2. Struktur Glukosamin dan Glukosa	7
3. Skema kerja spektrofotometri UV-Vis.....	11
4. Skema dari sistem untuk HPLC.	12
5. Koloid Kitin	21
6. Isolat Actinomycetes 19A07A1 pada media agar kitin.....	21
7. Morfologi Isolat Actinomycetes 19A07A1.....	22
8. Zona bening isolat Actinomycetes 19A07A1 (a) hari ke-2 (b) hari ke-7 (c) hari ke-14.	23
9. Pertumbuhan inokulum isolat Actinomycetes 19A07A1.....	23
10. Penampakan kultur isolat 19A07A1 secara SSF pada pH 7 (a) hari ke-0 (b) hari ke-2 (c) hari ke-4 (d) hari ke-6 (e) hari ke-8 (f) hari ke-10 (g) hari ke-12 (h) hari ke-14.....	24
11. Data hasil kultivasi variasi waktu pada pH 7	26
12. Penampakan kultur isolat 19A07A1 secara SSF hari ke-14 (a) pH 6 (b) pH 7 (c) pH 8	27
13. Data hasil kultivasi variasi pH pada Hari ke-14.....	28
14. Analisis KLT (a) Sampel standar glukosamin (b) Sampel hari ke-14 pH 8 (c) Sampel hari ke-14 pH 6	32
15. Analisis HPLC pada sampel isolat 19A07A1 (a) Sampel pH 6 (b) Sampel pH 8 (c) Standar glukosamin 0,7 mg/mL.....	34
16. Kurva standar BSA	47
17. Kurva standar glukosamin	48

I. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Indonesia merupakan negara yang menghasilkan 30-70% limbah cangkang kulit udang yang berpotensi memberikan dampak buruk atau dampak negatif terhadap lingkungan. Marzuki *et al.* (2019) mengatakan bahwa limbah cangkang kulit udang ini memiliki kandungan 15-20% kitin, 25-40% protein, dan 45-50% kalsium karbonat

Kitin yang berada pada kulit udang termasuk polimer karbohidrat alam terbarukan paling melimpah kedua setelah selulosa. Kitin terdiri dari N-acetyl D-glukosamin yang terhubung dengan ikatan β -1,4 glikosidik yang merupakan polisakarida struktural, komponen utama eksoskeleton krustasea, serangga, moluska, artropoda, plankton, dan jamur. Kitin dapat dibiokonversi menjadi suatu produk kitin oligosakarida dan *N-acetylglucosamine* (Vandecasteele *et al.*, 2021) yang dapat diaplikasi dalam industri biomedis seperti untuk penyembuhan luka, pengawet makanan, pengembangan obat, rekayasa jaringan, antioksidan, dan dalam industri biomedis, kitin dapat digunakan dalam makanan, pertanian, lingkungan, dan bahan tekstil (Tolesa *et al.*, 2019). Kitin dapat didegradasi menjadi monomer GlcNAc (N-Asetil Glukosamin) dan GlcN (Glukosamin) dengan bantuan suatu enzim kitinase. N-Asetil Glukosamin dan Glukosamin adalah suatu senyawa yang banyak digunakan dalam pengobatan penyakit sendi, radang usus, dalam kosmetik GlcNAc meningkatkan kualitas kulit, sebagai zat aditif dalam susu dan bisa digunakan untuk produksi bioetanol melalui fermentasi (Kaisler *et al.*, 2019).

Actinomyces adalah kelompok bakteri yang dikenal karena kemampuannya untuk mendegradasi berbagai biomolekul, termasuk kitin. *Actinomyces* dapat

mendegradasi kitin dengan memproduksi suatu enzim kitinase, yaitu enzim yang menghidrolisis polimer kitin menjadi molekul yang lebih kecil seperti N-Asetil Glukosamin (Cheba *et al.*, 2018). Enzim Kitinase memecah kitin dari bagian terdalam dari rantai glikosida dan mengubahnya menjadi oligomer sederhana. Kitinase diklasifikasikan menjadi dua kelompok berdasarkan spesifisitas substratnya: eksokitinase dan endokitinase. Eksokitinase memutus ikatan dari ujung rantai kitin dimana memutus monomer GlcNAc individu satu per satu. Sedangkan endokitinase memutus rantai kitin dari bagian dalam. Enzim kitinase ini dapat ditumbuhkan pada media spesifik yaitu pada koloid kitin (Mukhtar *et al.*, 2017). Masui dan Kitamoto (2017) mengatakan bahwa untuk memproduksi enzim kitinase dapat digunakan metode *Solid State Fermentation* (SSF) karena dapat menghasilkan aktivitas enzim yang tinggi dan dapat menggunakan berbagai macam substrat.

Pada penelitian ini dilakukan fermentasi media padat (SSF) kulit udang dengan menggunakan strain *Actinomyces* 19A07A1 yang berasal dari perairan Gorontalo, Indonesia. Berdasarkan hasil penelitian pendahuluan (Larasati, 2022) isolat *Actinomyces* 19A07A1 menghasilkan diameter zona bening 4,5 cm dan kadar glukosamin 0,98 mg/mL. Hasil ini menunjukkan bahwa isolat 19A07A1 dapat menghasilkan glukosamin yang lebih unggul dari isolat lain yang telah diuji. Kulit udang di fermentasi menggunakan metode fermentasi padat (SFF) pada variasi waktu dan pH oleh Isolat 19A07A1 dan digunakan Spektrofotometer UV-Vis untuk didapatkannya kondisi optimumnya dalam memproduksi glukosamin sebagai gula pereduksi. Kemudian konsentrasi glukosamin ditentukan dengan menggunakan *High-Pressured Liquid Chromatography* (HPLC).

1.2 Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah sebagai berikut :

1. Mendapatkan kondisi optimum isolat *Actinomyces* 19A07A1 dalam mendegradasi substrat kulit udang untuk mendapatkan glukosamin.

2. Mendapatkan informasi tentang aktivitas enzim kitinase yang dihasilkan isolat *Actinomyces* 19A07A1.
3. Mendapatkan informasi tentang konsentrasi glukosamin hasil degradasi pada substrat kulit udang menggunakan enzim kitinase yang dihasilkan isolat *Actinomyces* 19A07A1.

1.3 Manfaat Penelitian

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi tentang metode SSF untuk memproduksi glukosamin oleh isolat *Actinomyces* 19A07A1 pada media kulit udang dengan waktu dan pH optimum.

II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Penapisan (*Screening*)

Penapisan ialah suatu metode untuk memperoleh sampel unggul yang diteliti. Teknik penapisan (*Screening*) ini dapat disebut dengan teknik mutagenesis yang diperlukan pada pengetahuan dalam fisiologi mikroba. Dilakukannya penapisan, dapat mengembangkan atau menumbuhkan suatu organisme baru, penapisan ini dapat menambah pengetahuan pada struktur dan fungsi suatu organisme yang dapat membantu dalam memanipulasi genetik organisme. Bumi memiliki sejumlah besar lingkungan yang bervariasi dan unik, dari alam ekstrem seperti gurun dataran tinggi dan mata air panas, hingga lingkungan buatan manusia seperti fasilitas pengolahan limbah industri, dari mana, dengan metode dan teknik yang tepat, kita dapat mengisolasi dan mengevaluasi produk potensial baru dengan menggunakan teknik penapisan (*Screening*) (Steel dan Stowers, 1991).

2.2 *Actinomycetes*

Actinomycetes adalah mikroorganisme yang berada pada berbagai habitat ekologi, seperti pada tanah, air tawar, dan lingkungan laut lainnya. *Actinomycetes* ini dapat menghasilkan suatu metabolit sekunder dan senyawa lainnya yang berfungsi atau bermanfaat bagi makhluk hidup secara biologis seperti antibiotik, antitumor, vitamin, enzim, bahan nutrisi, pestisida, antiparasit, dan lainnya (Benhadj *et al.*, 2018). *Actinomycetes* juga dikatakan sebagai bakteri gram positif yang disimpulkan dari sifat siklus hidupnya yang kompleks dimana sifat ini dimiliki oleh filum *Actinobacteria* yang merupakan salah satu taksonomi terbesar pada salah satu keturunan pada domain *Bacteria*. *Actinomycetes* berbentuk filamen

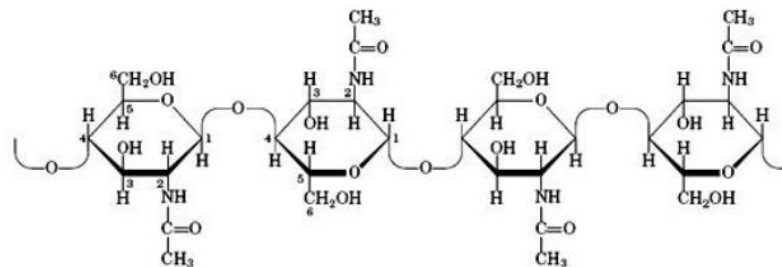
seperti jamur (filamentous fungi) yang merupakan eukariotik multiseluler dan memenuhi kriteria sifat bakteri bersel prokariotik (Brzezinska *et al.*, 2013). *Actinomycetes* memiliki morfologi unik dimana bakteri ini memproduksi kumpulan hifa (*hyphae*) untuk membentuk *mycelium* dan akan berkembang biak dengan sporulasi. Hampir semua *Actinomycetes* membentuk substrate *mycelium* ketika tumbuh pada media padat dan *Actinomycetes* ini terkenal dalam memproduksi warna yang berbeda tergantung pada media dan waktu tumbuhnya (Watson, 2020).

Actinomycetes laut diperkirakan memiliki mikroorganisme seperti genus *Dietzia*, *Rhodococcus*, *Streptomyces*, *Saccharomonospora sp*, *Genera salinispora*, *Marinispora*, dan lainnya. Mikroorganisme ini tumbuh dengan memanfaatkan lingkungan laut, seperti dari air laut yang memiliki garam yang dibutuhkan untuk persyaratan pertumbuhan mikroorganisme laut (Sharma *et al.*, 2020). Pada isolat 19A07A1 yang telah diidentifikasi dan dilaporkan merupakan mikroorganisme *Saccharomonospora sp*. Isolat ini memiliki bentuk morfologi spora yaitu *Monospora*.

2.3 Kitin

Kitin merupakan suatu polimer linier yang sebagian besar tersusun dari monomer β -(1,4)- N-asetil-D-glukosamin, (Qin and Liming, 2019). Kitin adalah biopolimer (polimer alami yang diproduksi oleh organisme hidup) yang melimpah di alam setelah selulosa. Kitin umumnya ditemukan dalam bentuk kristal mikrofibril pada komponen struktural krustasea, serangga, sel-sel jamur dan mikroorganisme lainnya. Kitin terdistribusi luas di lingkungan biosfer seperti pada kulit krustasea (kepiting, udang, dan lobster), ubur-ubur, komponen struktur eksternal insekta, dinding sel fungi (22- 40%), alga, nematoda ataupun tumbuhan (Komi and Michael, 2017). Rantai kitin antara satu dengan yang lainnya berasosiasi melalui ikatan hidrogen yang sangat kuat antara gugus N-H dari satu rantai dengan gugus C=O dari rantai lain yang berdekatan. Ikatan hidrogen ini menyebabkan kitin

tidak larut dalam air dan membentuk serabut (fibril) (Suryanto dan Yurnaliza, 2005).



Gambar 1. Struktur kitin (Marzuki et al., 2019)

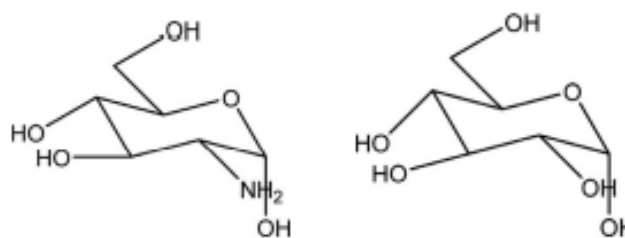
Secara umum, cangkang krustasea mengandung 15-20% kitin, 25-40% protein, dan 45-50% kalsium karbonat (Marzuki *et al.*, 2019). Sifat kaku dari cangkang disebabkan karena melimpahnya kalsium karbonat didalamnya. Karakteristik dari kitin antara lain bewarna putih, tidak larut dalam pelarut encer polar dan nonpolar, memiliki sifat biokompabilitas, biodegradabilitas, antibakteri, nontoksik, dan mempunyai bioaktivasi serta daya absorpsi yang ditentukan oleh sifat fisika dan kimianya. Kitin bersifat hidrofobik, tidak larut dalam air, alkohol, dan hampir semua pelarut organik, sehingga penggunaannya terbatas. Oleh karena itu, senyawa kitin perlu didegradasi menjadi oligomer/monomer yang mudah larut sehingga dapat digunakan dalam penguraian limbah, bahan obat-obatan, pembuatan makanan, dan bioteknologi. Selain itu, kitin dapat digunakan dalam bidang industri, seperti kromatografi, pembuatan kertas, tekstil, pertanian, farmasi, makanan, dan lainnya (Sanjivkumar *et al.*, 2020).

2.4 Glukosamin

Glukosamin ($C_6H_{13}NO_5$) adalah gula mengandung amina yang diperoleh dari hasil hidrolisis kitin. Hasil dari hidrolisis kitin ini akan membentuk monomer sederhana glukosamin yaitu GlcNAc dan GlcN yang dapat digunakan dalam banyak industri seperti pada industri kesehatan, makanan, kosmetik, pertanian, dan lainnya (Kaisler *et al.*, 2019). Dialam, glukosamin tersebar luas sebagai

komponen utama dari rangka luar Krustasea, *Antropoda*, dan Cendawan. Glukosamin juga ditemukan dimatriks tulang rawan sendi dan cairan sendi manusia, bahkan di hampir semua jaringan lunak dalam tubuh manusia, konsentrasi tertinggi ditulang rawan (Miller dan Clegg, 2011). Pada manusia, glukosamin sebagai salah satu komponen biosintesis glikosaminoglikan (GAG). GAG ini akan berikatan secara kovalen pada inti protein proteoglikan, salah satu komponen matriks jaringan kartilago yang akan menjaga integritas struktur dan fungsi jaringan kartilago. Glukosamin yang diproduksi oleh tubuh berada dalam bentuk glukosamin-6-fosfat dan dihasilkan dari glukosa yang mengikuti jalur biosintesis heksosamin (Oegema *et al.*, 2002). Keberadaan glukosamin didalam tubuh memiliki peranan penting untuk kesehatan dan kelenturan sendi (EFSA, 2009).

Glukosamin adalah suatu senyawa polimer yang merupakan gula dengan gugus amino. Secara struktural glukosamin terkait dengan senyawa glukosa yang mana kedua struktur ini dibedakan pada adanya penggantian hidroksil dengan amina pada salah satu gugusnya. Glukosamin cukup dekat dengan glukosa hanya dengan interaksi yang lebih baik dengan substrat protein karena memiliki satu titik interaksi ikatan hydrogen dan nitrogen (Mtewa *et al.*, 2021).



Gambar 2. Struktur Glukosamin dan Glukosa

Glukosamin merupakan prekursor utama untuk biosintesis berbagai makromolekul seperti asam hialuronat, proteoglikan, glikosaminoglikan (GAGs), glikolipid, dan glikoprotein. Secara struktural glukosamin adalah basa lemah sehingga sediaan glukosamin yang beredar harus distabilkan dalam bentuk garam. Glukosamin

ditemukan dalam berbagai bentuk seperti glukosamin sulfat, hidroklorida, N-asetilglukosamin atau garam klorohidrat, dan isomer dekstraoratorik (Persiani *et al.*, 2005). Glukosamin juga ditemukan dipasaran dalam bentuk glukosamin hidroklorida (HCl), cocrystals atau coprecipitates glukosamin sulfat dan kalium atau natrium klorida (Dahmer, 2008).

2.5 Enzim Kitinase

Kitinase adalah sekelompok enzim hidrolitik yang memutus ikatan β -1,4-glikosidik antara dua N-asetil-D-glukosamin (GlcNAc) berturut-turut dari rantai kitin. Kitinase ini juga merupakan sekelompok enzim yang terdiri endokitinase, eksokitinase, dan *N*-acetyl- β -D-glucosaminidase. Enzim kitinase dapat diperoleh dari beberapa mikroorganisme, seperti bakteri, fungi, tanaman, hewan, dan serangga (Zhang *et al.*, 2018). Saat ini, enzim kitinase 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 kitinase mampu menghidrolisa polimer kitin menjadi senyawa yang lebih sederhana dengan menghidrolisis kitin secara acak pada ikatan glikosidik (Arnold *et al.*, 2020).

Harman *et al.*, (1993) dan Sahai *et al.*, (1993) membagi kitinase dalam tiga tipe yaitu :

1. Endokitinase yaitu kitinase yang 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 kitotetraose.
2. Eksokitinase dinamakan juga kitobiodase atau kitin 1,4- β - kitobiodase, yaitu enzim yang mengatalisis secara aktif pembebasan unit-unit diasetilkitobiose tanpa ada unit-unit monosakarida atau polisakarida yang dibentuk. Pemotongan hanya terjadipada ujung non reduksi mikrofibril kitin dan tidak secara acak.

3. β -1,4-N-asetilglukosaminidase merupakan suatu kitinase yang bekerja pada pemutusan diasetilkitobiose, kitotriose dan kitotetraose dengan menghasilkan monomer-monomer GlcNAc.

2.6 Fermentasi Padat (*Solid State Fermentation*)

Fermentasi padat (*Solid State Fermentation*, SSF) adalah metode fermentasi ketika mikroorganisme tumbuh berkembang dimaterial padat tanpa adanya cairan, dimana penggunaan SSF ini sangat bagus dalam memproduksi berbagai macam enzim yang berbeda (Karimi *et al.*, 2021). Fermentasi ini memerlukan kelembapan untuk pertumbuhan mikroba yang ada dalam kondisi terserap atau dalam kompleks dengan matriks padat. Salah satu aplikasi dari metode ini yang paling penting adalah produksi enzim. Selain itu, terdapat keuntungan lain yaitu produktivitas volumetrik yang tinggi, melibatkan perlengkapan yang murah, rendemen produk lebih baik, dan sebagainya (Bhargav *et al.*, 2008).

Berdasarkan Mitchell *et al.* (2006) menjelaskan tahapan-tahapan proses SSF, antara lain :

a. Persiapan Substrat

Substrat dipotong, dihaluskan, atau dibentuk menjadi butiran kecil.

Selanjutnya ditambahkan air dan nutrisi yang berfungsi untuk menambah ketersediaan gizi. Setelah itu substrat akan dikeringkan.

b. Persiapan inokulum

Spora hifa dari hasil inokulum banyak digunakan dalam proses SSF Inokulum dibuat dengan tujuan untuk meningkatkan kelangsungan hidup mikroorganisme sebagai starter awal proses SSF.

c. Persiapan wadah

Wadah harus dibersihkan dan disterilkan sebelum dipakai dalam proses SSF.

d. Inokulasi dan pengerjaan

Tahapan ini dilakukan dengan menyebarkan substrat secara hati-hati pada media steril agar terhindar dari kontaminasi mikroorganisme lain yang tidak diinginkan.

e. Proses SSF (Kultivasi)

Terdapat beberapa hal yang harus diperhatikan dalam berlangsungnya proses ini seperti pH, temperatur, waktu inkubasi, dan kelembaban.

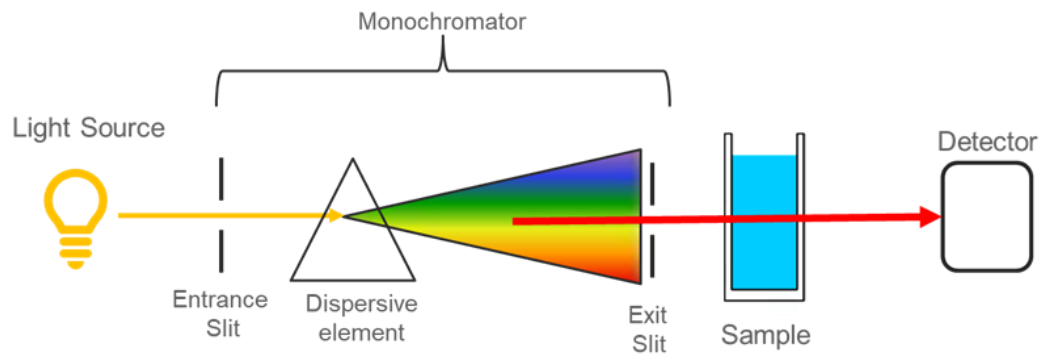
f. Ekstrak Hasil Kultivasi

Tahapan ini diperlukan bantuan alat untuk memisahkan substrat padat dari medium, seperti penggunaan kertas saring dan sentrifugasi.

2.7 Spektrofotometri Uv-Vis

Spektrofotometer terdiri atas spektrometer dan fotometer. Spektrofotometer menghasilkan sinar dari spektrum dengan panjang gelombang tertentu dan fotometer adalah alat pengukur intensitas cahaya yang ditranmisikan atau yang diabsorpsi. (Dewi *et al.*, 2019). Spektrofotometer tersusun atas sumber spektrum yang kontinu, monokromator, sel pengabsorpsi untuk larutan sampel atau blanko dan suatu alat untuk mengukur perbedaan absorpsi antara sampel dan blanko ataupun pembanding (Khopkar, 2002).

Spektroskopi UV-Vis melibatkan absorpsi dengan panjang gelombang 200-1100 nm dan rentang 100-800 nm dengan sinar UV-Vis, maka jika disimpulkan, untuk dilakukannya analisis dan untuk mendapatkan keakuratan yang lebih baik maka digunakan panjang gelombang 220-780 nm. Absorpsi cahaya ultraviolet/tampak oleh molekul organik terbatas hanya untuk beberapa gugus fungsi (kromofor) yang mengandung elektron valensi dari energi eksitasi yang rendah (Rocha *et al.*, 2018). Spektrum UV-Vis merupakan spektrum yang kompleks dan nampak seperti pita absorpsi berlanjut, hal ini dikarenakan gangguan yang besar dari transisi rotasi dan vibrasi pada transisi elektronik memberikan kombinasi garis yang tumpang tindih (overlapping) (Hunger and Weitkamp, 2001).



Gambar 3. Skema kerja spektrofotometri UV-Vis (Anonim, 2023).

Ada beberapa hal yang harus diperhatikan dalam analisis dengan spektrofotometri ultraviolet (Rohman, 2007), yaitu:

1. Penentuan panjang gelombang serapan maksimum

Panjang gelombang yang digunakan untuk analisis kuantitatif adalah panjang gelombang dimana terjadi absorpsi maksimum. Untuk memperoleh panjang gelombang serapan maksimum dapat diperoleh dengan membuat kurva hubungan antara absorpsi dengan panjang gelombang dari suatu larutan baku dengan konsentrasi tertentu.

2. Pembuatan kurva kalibrasi

Dilakukan dengan membuat seri larutan baku dalam berbagai konsentrasi kemudian absorpsi tiap konsentrasi diukur lalu dibuat kurva yang merupakan hubungan antara absorpsi dengan konsentrasi. Kurva kalibrasi yang lurus menandakan bahwa hukum Lambert-Beer terpenuhi

3. Pembacaan absorpsi sampel

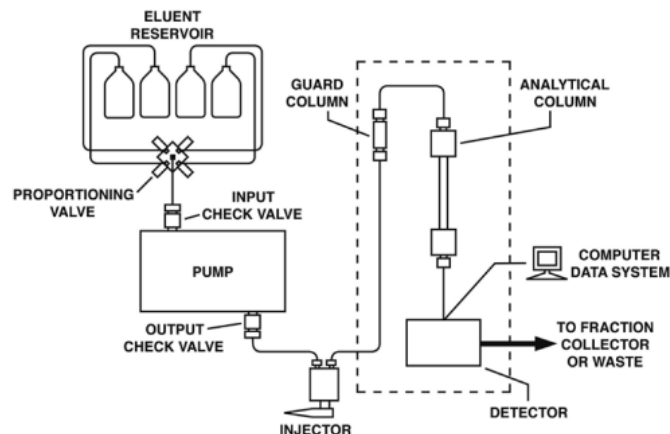
Absorpsi yang terbaca pada spektrofotometer hendaknya antara 0,2 sampai 0,8 atau 15% sampai 70% jika dibaca sebagai transmittan. Hal ini disebabkan karena pada kisaran nilai absorpsi tersebut kesalahan fotometrik yang terjadi adalah paling minimal.

Spektrofotometer UV-Vis dapat melakukan penentuan terhadap sampel yang berupa larutan, gas, atau uap. Untuk sampel yang berupa larutan perlu diperhatikan pelarut yang dipakai (Mulja dan Suharman, 1995), antara lain:

1. Pelarut yang dipakai tidak mengandung sistem ikatan rangkap terkonjugasi pada struktur molekulnya dan tidak berwarna.
2. Tidak berinteraksi dengan molekul senyawa yang dianalisis.
3. Kemurniannya harus tinggi untuk analisis

2.8 Kromatografi Cair Kinerja Tinggi

Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (*High Performance Liquid Chromatography*, HPLC) merupakan teknologi kolom dan komponen instrumental (pompa, katup injeksi, dan detektor). Menurut Reuhs (2017), HPLC dapat diterapkan pada analisis senyawa apapun dengan kelarutan dalam cairan yang dapat digunakan sebagai fase gerak. Walau HPLC sering digunakan sebagai teknik analisis, namun HPLC juga dapat digunakan dalam aplikasi persiapan.



Gambar 4. Skema dari sistem untuk HPLC (Reuhs, B. L. 2017).

2.9 Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Kromatografi lapis tipis adalah hasil penggabungan biologi dan metode deteksi kimia, dimana teknik yang efektif dan murah yang dapat menganalisis pemisahan dan isolasi komponen tunggal dari campuran dalam suatu sampel. Selain itu juga, dapat digunakan sebagai identifikasi senyawa seperti asam amino, amida, alkaloid

dan sebagainya. Selain itu, KLT dapat melakukan Identifikasi suatu senyawa yang spesifik perlu digunakan suatu pereaksi khusus (Marston. 2011).

KLT dilakukan pada tempat tertutup yang sesuai yang berisi pelarut dal pelat berlapis dimana kedua hal ini dibutuhkan untuk melakukan pemisahan dan analisis semikuantitatif kualitatif. Dasar perlakuan KLT menurut Joseph dan Bernard (2003) dapat dilakukan sebagai berikut :

1. Sedikit sampel tertentu ditempatkan didekat salah satu fase diam, paa lapisan tipis sorben, untuk membentuk zona inti.
2. Kemudian sampel akan dikeringkan. Pada bagian akhir fase diam dengan zona awal akan dipace ke-fase gerak. Hal ini biasanya merupakan campuran dua pelarut murni didalam ruang tertutup. Jika terpilih fase gerak maka komponen campuran bermigrasi pada kecepatan yang berbeda selama pergerakan fase gerak melalui fase diam, hal ini disebut sebagai pengembangan kromatogram.
3. Ketika Fase gerak telah bergerak pada jarak yang sesuai, fase diam akan dihilangkan dan fase gerak akan cepat mengering.
4. Zona pada suatu sampel akan terdeteksi disiang hari atau dibawah sinar ultraviolet (UV dengan atau tanpat aplikasi reagen visualisasi yang sesuai (Joseph dan Bernard, 2003).

III. METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat

Penelitian ini telah dilakukan pada bulan Mei 2022 sampai dengan Desember 2022 di Unit Pelaksana Teknis Laboratorium Terpadu dan Sentra Inovasi Teknologi (UPT LTSIT) dan Laboratorium Biopolimer Jurusan Kimia, Fakultas MIPA Universitas Lampung.

3.2 Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan yaitu alat-alat gelas (gelas beaker, cover slip, Erlenmeyer, tabung reaksi, gelas ukur, dan labu ukur), cawan petri, spatula, pengaduk, kapas, kasa, karet gelang, tisu, jarum ose, lampu spirtus, indikator universal, mikropipet, microtube, neraca analitik, *magnetic stirrer*, blender, oven, *hot plate*, *laminar air flow* (LAF), kuvet, inkubator, Hospitex Diagnostic, mikroskop Zeiss Axio Imager A1, autoclave Tomy SX-700, sentrifius Hitachi CF 16RX II, dan spektrofotometer UV-Vis Cary WinUV.

Adapun bahan-bahan yang digunakan yaitu kulit udang, isolat *Actinomyces* 19A07A1, akuades, HCl Teknis, NaOH Teknis, BSA (Bovine Serum Albumin), plat silika gel F254, pelarut isopropil alkohol, 25% ammoniak, etanol PA, pereaksi ninhidrin, agar swallow, air laut buatan, DNS, dan Na-K tartrat.

3.3 Prosedur Penelitian

3.3.1 Persiapan Sampel Kulit Udang dan Koloid Kitin

Limbah kulit udang dikumpulkan untuk bahan baku dibersihkan dan dioven sampai keringkan sehingga diperoleh kulit udang kering yang digunakan sebagai substrat.

Kitin dibuat dengan merujuk pada Hendri *et al.* (2007). Kitin dibuat dari limbah kulit udang kering yang dilakukan proses demineralisasi dan deproteinasi. Demineralisasi dilakukan dengan menambah HCl 1.25N dengan perbandingan 1 : 10 (m/v) , lalu diaduk dengan magnetis stirrer pada temperatur 90°C selama 1 jam, kemudian disaring, dan dilakukan pencucian dengan akuades sampai pH netral. Selanjutnya residu dikeringkan dalam oven dan ditimbang. Setelah didapatkan berat hasil proses demineralisasi, kemudian dilakukan proses deproteinasi dimana residu ditambahkan NaOH 3,5% dengan perbandingan 1 : 10 (m/v), diaduk pada magnetis stirrer selama 2 jam pada temperatur 65°C, kemudian dicuci dengan menggunakan akuades sampai pH netral dan dikeringkan dalam oven, kemudian ditimbang.

Setelah didapatkan kitin, maka dilanjutkan pembuatan koloid kitin dengan menambahkan HCl pekat dengan perbandingan 1 : 10 (m/v) dan diaduk dengan magnetic stirrer selama 2 jam. Setelah diaduk, larutan dilakukan pencucian sampai pH netral dengan akuades dan disentrifugasi selama 5 menit dengan kecepatan 7000 rpm untuk mendapatkan endapan yang kemudian dicuci lagi dengan akuades sampai pH netral.

3.3.2 Pembuatan Media Koloid Kitin

Residu yang terbentuk merupakan kitin (kulit udang yang telah dideproteinasi dan demineralisasi). Selanjutnya adalah tahapan pembuatan media koloid kitin sebagai substrat. Media padat dan media cair koloid kitin dibuat dengan merujuk pada Setiawan *et al.* (2022). Pembuatan media memiliki perbandingan 1 : 2 yaitu

1% koloid kitin : 2% agar swallow yang dilarutkan pada air laut buatan, pada media cair hanya digunakan 1% koloid kitin. Larutan media ini kemudian diautoclave dengan temperatur 121°C selama 15 menit. Kemudian larutan dituang kedalam cawan petri dan didiamkan sampai mengeras dibawah sinar UV.

3.3.2 Penapisan Isolat *Actinomycetes* 19A07A1

Media koloid kitin digunakan dalam peremajaan isolat *Actinomycetes* 19A07A1 yang didapat dari koleksi UPT LTSIT yang berasal dari Gorontalo. Proses penapisan dan peremajaan diawali dengan penggoresan diatas media agar koloid kitin. Isolat 19A07A1 diinkubasi pada media koloid kitin selama 14 hari dan hasil pertumbuhan bentuk hifa serta spora diamati. Penapisan serta peremajaan isolat ini dilakukan dengan tahapan yang sama namun pada penapisan isolat dilakukan untuk memelihara isolat agar tetap hidup dan dapat digunakan dalam tahapan selanjutnya. Proses penapisan *Actinomycetes* 19A07A1 diidentifikasi mengikuti Goodfellow *et al.* (2012), dengan cara menancapkan cover slip dengan sudut kemiringan 45° dan diinkubasi selama 7 hari. Setelah tumbuh, isolat kemudian diidentifikasi spora dengan menggunakan mikroskop imager dengan perbesaran 400 M.

3.3.4 Pembuatan Larutan Inokulum *Actinomycetes* 19A07A1

Pembuatan larutan *Actinomycetes* dilakukan dengan mengikuti Suresh (2012), menggunakan media cair (suspensi) koloid kitin yang ditambahkan *Actinomycetes* 19A07A1 dengan memindahkan isolat menggunakan jarum ose kedalam larutan media cair dan diinkubasi selama 14 hari.

3.3.5 Kultivasi *Actinomyces* Secara SSF pada Kulit Udang

Kultivasi isolat 19A07A1 dilakukan berdasarkan Suresh (2012) pada fermentasi media padat (SSF). Fermentasi dilakukan pada variasi waktu dan pH untuk mendapatkan kondisi optimum pertumbuhan isolat 19A07A1.

3.3.5.1 Kultivasi *Actinomyces* dengan Variasi Waktu

Kultivasi secara SSF dilakukan berdasarkan Setiawan *et al.* (2021) menggunakan 3 gram kulit udang yang telah dibersihkan dan dihaluskan sebagai media produksi. 10 ml larutan inokulum *Actinomyces* diinokulasi pada media kulit udang pada variasi waktu pertumbuhan 2, 4, 6, 8, 10, 12, dan 14 hari dengan 3 kali pengulangan. Pengambilan ekstrak hasil inkubasi dengan menambahkan 20 ml akuades, kemudian dikocok, dan disentrifus selama 10 menit pada kecepatan 7000 rpm. Filtrat hasil sentrifus diuji dengan spektrofotometer Uv-Vis untuk mengetahui kadar glukosamin. Hasil absorbansi optimum menjadi kondisi optimum untuk variasi selanjutnya.

3.3.5.2 Kultivasi *Actinomyces* dengan Variasi pH

Kultivasi penentuan pH optimum dilakukan merujuk kepada Setiawan *et al.* (2021) menggunakan metode SSF. Digunakan 3 gram kulit udang sebagai media yang divariasikan pada pH 6, 7, dan 8 menggunakan NaOH 0,1 N dan HCl 0,1N. Media kemudian diinokulasi dengan 10 ml larutan inokulum *Actinomyces* dan diinkubasi selama waktu optimum yang telah didapatkan. Hasil dari pertumbuhan ditambahkan 20 ml akuades, dikocok, dan disentrifus selama 10 menit dengan kecepatan 7000 rpm. Filtrat yang dihasilkan diuji menggunakan spektrofotometer Uv-Vis untuk mengetahui pH optimum dalam menghasilkan kadar glukosamin yang unggul.

3.3.6 Analisis Data

3.3.6.1 Penentuan Kadar Protein dan Aktivitas Enzim Kitinase

Analisis ini mengacu kepada Goncalves *et al.* (2012) menggunakan spektrofotometer Uv-Vis dengan panjang gelombang 540 nm. Uji aktivitas enzim menambahkan substrat (1 mL koloid kitin 1%) pada filtrat (1 mL) dan diinkubasi pada temperatur 40°C selama 30 menit. Sampel didinginkan dan ditambahkan reagen DNS (2 mL). Blanko dan larutan standar glukosamin dengan variasi konsentrasi digunakan sebagai standar.

Pada analisis protein diuji sebanyak 400 µl filtrat dan ditambahkan 2 mL reagen bradford, lalu diukur absorbansi pada panjang gelombang 595 nm. Uji ini digunakan blanko dan larutan BSA dengan variasi konsentrasi sebagai standar. Uji aktivitas enzim kitinase dan protein dilakukan masing-masing 3 kali pengulangan.

3.3.6.2 Penentuan Kadar Glukosamin Secara Spektrofotometri Uv-Vis

Uji konsentrasi glukosamin dilakukan berdasarkan Goncalves *et al.* (2012), yaitu 2 mL filtrat ditambahkan 2 mL reagen DNS dan dipanaskan pada 100°C selama 10 menit. Sampel dibaca absorbansi pada panjang gelombang 540 nm menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Uji ini dilakukan sebanyak 3 kali pembacaan.

3.3.6.3 Penentuan Kadar Glukosamin Secara Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Uji KLT dilakukan merujuk kepada Setiawan *et al.* (2022) dengan adanya modifikasi. Uji KLT bertujuan untuk mengetahui adanya komponen glukosamin, dimana dilakukan menggunakan fase diam berupa plat silika gel F254 dan variasi pelarut isopropil alkohol (IPA), air, dan 25% ammoniak yang divisualisasi menggunakan pereaksi ninhidrin. Uji KLT dilakukan juga pada larutan standar glukosamin

3.3.6.4 Penentuan Kadar Glukosamin Secara *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC)

Uji HPLC dilakukan berdasarkan Setiawan *et al.* (2022) dengan adanya modifikasi dimana digunakan 3 microtube pada satu filtrat, sebanyak 250 μ L filtrat ditambahkan etanol p.a hingga volume 1 mL, lalu disentrifugasi.

Kemudian, supernatan dibuang dan endapan ditambahkan akuades hingga volume 1 mL. Sampel sebanyak 12 μ L diinjeksi dan diuji dengan HPLC pada kolom Agilent HC-C18, fasa gerak asetonitril dan air (70:30) serta laju alir 1 mL/menit.

V. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Adapun kesimpulan yang diperoleh dari penelitian ini adalah sebagai berikut :

1. *Actinomyces* isolat 19A07A1 teridentifikasi sebagai organisme *Brevibacterium linens* mampu mendegradasi kitin pada kondisi optimum hari ke-14 pada pH 8.
2. Glukosamin yang dihasilkan dari kultur SSF oleh *Actinomyces* isolat 19A07A1 pada waktu dan pH optimum adalah 2,61 mg/mL.
3. Aktivitas spesifik enzim kitinase pada hari ke-14 dan pH 8 adalah sebesar 3,84 $\mu\text{mol t}^{-1}\text{mg}^{-1}$.
4. Hasil analisis KLT didapatkan faktor retensi pada hari ke-14 dan pH 8 sebesar 0,8 dan konsentrasi glukosamin sebesar 0,39 mg/mL menggunakan HPLC

5.2 Saran

Berdasarkan hasil penelitian ini didapatkan waktu optimum selama 14 hari yang cukup lama. Maka, disarankan bagaimana cara untuk dapat mempercepat waktu pertumbuhan dalam menghasilkan enzim kitinase.

DAFTAR PUSTAKA

- Anonim. 2023. Instrumentation of a UV-Visible Spectrophotometer. <https://jascoinc.com/learning-center/theory/spectroscopy/uv-vis-spectroscopy/>. Diakses pada tanggal 26 Januari 2023.
- Arnold, N. D., Brück, W. M., Garbe, D., & Brück, T. B. 2020. Enzymatic Modification of Native Chitin and Conversion to Specialty Chemical Products. *Journal of Marine Drugs*. 18(2), 93.
- Banik S, Mukherjee PK, & Ghosh P. 2016. Chitinases and their applications: A review. *3 Biotech*. 6(1):1-9.
- Benhadj, M., Gacemi-Kirane, D., Menasria, T., Guebla, K., & Ahmane, Z. 2019. Screening of rare *Actinomycetes* isolatd from natural wetland ecosystem (Fetzara Lake, northeastern Algeria) for hydrolytic enzymes and antimicrobial activities. *Journal of King Saud University - Science*, 31(4), 706–712.
- Biswas, R., Pal, A., & Bala, A. 2012. *Solid State Fermentation*. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*. 4(4), 873-880.
- Brzezinska, M. S., Jankiewicz, U., & Walczak, M. 2013. Biodegradation of chitinous substances and chitinase production by the soil actinomycete *Streptomyces rimosus*. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 84, 104–110.
- Cheba, B. A., Zaghloul, T. I., & El-Mahdy, A. R. 2018. Demineralized crab and shrimp shell powder: Cost effective medium for bacillus Sp. R2 growth and chitinase production. *Procedia Manufacturing*, 22, 413–419.
- Dahmer, M., & Schiller, R. M. 2008. Glucosamine. *Journal of American Family Physician Ann Intern Med*. Universitat Potsdam Druckhaus Schmergow. Germany. 78:470-476.
- Devriese LA & de Vuyst L. 1999. *Brevibacterium linens: Role in Food Fermentation and Biotechnology*. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 75(3-4):309-319.

- Dewi, R., Krisman, Zulkarnain, Rahmawati, & Husain S., T. S. L. 2019. *Characterization of optical properties of thin film Ba1-xSrxTiO3 (x = 0,70; x= 0,75; and x=0,80) using ultraviolet visible spectroscopy. The 8th National Physics Seminar 2019.*
- Dua P. 2018. *Solid State Fermentation for enhanced production of bioactive compounds by Actinomycetes. Applied Microbiology and Biotechnology*, 102(3), 979-995.
- EFSA [European Food Safety Authority]. 2009. Scientific Opinion on the substantiation of a health claim related to glucosamine hydrochloride and reduced rate of cartilage degeneration and reduced risk of development of osteoarthritis pursuant. Parma, Italy. European Food Safety Authority 7(10): 1358.
- Goodfellow, M., Kämpfer, P., Busse, H.-J., Trujillo, M.E., Suzuki, K., Ludwig, W., & Whitman, W.B. (Eds.). 2012. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd ed.; *Springer*: New York, NY, USA.
- Goncalves, C., Rodriguez-Jasso, R. M., Gomes, N., Teixeira, J. A., & Belo, I. 2012. Adaption of dinitrosalicylic acid method to microtiter plates. *Anal. Methods*. 2 : 2046-2048.
- Hamdi, M., Hammami, A., Hajji, S., Jridi, M., Nasri, M., & Nasri, R. 2017. Chitin extraction from blue crab (*Portunus segnis*) and shrimp (*Penaeus kerathurus*) shells using digestive alkaline proteases from *P. segnis* viscera. *International Journal of Biological Macromolecules*, 101, 455–463.
- Harman, G. E., Hayes, C. K., Lorito, M., Broadway, R. M., Di Petro, A., Peterbauer, C., & Tronsmo, A. 1993. Chitinolytic enzymes of *Trichoderma harzianum* : Purification of chitobiosidase and endochitinase. *Phytopathology*. 83 : 313-318.
- Harris, T. K., & Keshwani, M. M. 2009. *Chapter 7 Measurement of Enzyme Activity. Guide to Protein Purification, 2nd Edition*, 57–71.
- Hendri, J., Indriani, D., Laila, A., & Suka, I. G. 2007. Pembuatan Asetilglukosamin Secara Enzimatik Dari Kulit Udang dan Kepiting. *Jurnal Ilmiah MIPA (JIM)*. 10 (2).
- Joseph Sherma & Bernard Fried. 2003. *Handbook of Thin-Layer Chromatography*. LLafayette College Easton, Pennsylvania. U. S. A.
- Karimi, F., Mazaheri, D., & Saei Moghaddam, M. 2021. Solid-state fermentation as an alternative technology for cost-effective production of bioethanol as useful renewable energy. *Biomass Conversion and Biorefinery*. 11(3), 661-675.

- Kaisler, M., Lambertus, A.M., Van den Broek., & Carmen G. Boeriu. 2019. Chitin and Chitosan: Properties and Applications, First Edition : Chitin and Chitosan as Sources of Bio-Based Building Blocks and Chemicals, 235–237.
- Kodama, Y., Mizutani, M., Sakakibara, Y., & Kitani, S.. 2018. *Actinomycetes* as a source of bioactive natural products. *Natural Product Reports*. 35(10), 1463-1493.
- Komi, D. E. A., & Michael, R. H. 2017. Chitin and Chitosan : Production and Application of Versatile Biomedical Nanomaterials. *International Journal Adv Res*. Vol. 4(3) : 411-427.
- Krishnaiah, D., & Subbaiah, C. V. 2002. Optimization of solid-state fermentation conditions for the production of glucosamine by *Streptomyces albidoflavus* NRRL B-2465. *Biotechnology letters*. 24(16), 1343-1347.
- Larasati, G.E. 2022. Penapisan *Actinomycetes* Sebagai Kandidat Glukosamin Dari Sampel Gorontalo. *Praktik Kerja Lampangan (PKL)*. Bandar Lampung.
- Li Y., Chen Y., & Liu Y. 2015. Production of chitinase by *Actinomycetes* in solid-state fermentation using shrimp shells as the substrate. *Process Biochemistry*, 50(5), 740-744.
- Lin, L., Akinyemi, I. A., Jaouani, A., Hu, Q., Li, Y., & Chen, S. 2019. *Solid State Fermentation* of lignocellulosic materials for the production of bioactive compounds by *Actinomycetes*. *Frontiers in Microbiology*, 10, 2671.
- Li, Z., Yu, H., Li, C., Li, Y., & Chen, F. 2010. Production of glucosamine by solid-state fermentation using *Pleurotus ostreatus* and corn cob as substrate. *World journal of microbiology & biotechnology*. 26(12), 2169-2174.
- Lloyd R. Snyder & Joseph J. Kirkland. 2012. *Practical HPLC Method Development*. John Wiley & Sons, Inc. America.
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., Bender, K. S., Buckley, D. H., Stahl, D. A., & Brock, T. D. 2020. *Brock biology of microorganisms* (16th ed.). Pearson.
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., Bender, K. S., Buckley, D. H., & Stahl, D. A. 2015. *Brock biology of microorganisms* (14th ed.). Pearson Education.
- Marston, A. 2011. Thin-layer chromatography with biological detection in phytochemistry. *Journal of Chromatography A*. 1218(19), 2676–2683.
- Marzuki, I., Alwi, R. S., Erniati, Mudyawati, Sinardi, & Iryani, A. S. 2019. Chitosan Performance of Shrimp Shells in The Biosorption Ion Metal of Cadmium, Lead and Nickel Based on Variations pH Interaction. *Journal of Advances in Engineering Research* 165(ICMEME 2018), 6–11.

- Miller, K. L., & Clegg, D. O. 2011. Glucosamine and Chondroitin Sulfate. *Journal of Rheum Dis Clin N Am.* 37 : 103- 18.
- Mtewa, A. G., Annu, A., Weisheit, A., Tolo, C. U., & Ogwang, P. E. 2021. *Glucosamine and chondroitin in osteoarthritis treatment. In Preparation of Phytopharmaceuticals for the Management of Disorders.* Elsevier Inc.
- Oegema, T. R., Carpenter, R. J., Hofmeister, F., Thompson, R. C., Talmadge, K. W., & Glant, T. T. 2002. Effect of Oral Glucosamin on Cartilage and Meniscus in Normal and Chymopapain-Injected Knees of Young Rabbits. *Arthritis and Rheumatism.* 46 (9) : 2495-2503.
- Persiani, S., Roda, E., Rovati, L.C., Locatelli, M., Giacovelli, G., & Roda, A. 2005. Glucosamine oral bioavailability and plasma pharmacokinetics after increasing doses of crystalline glucosamine sulfate in man. *Osteoarthritis Cartilage.* 2005;13:1041-46.
- Qin, Z., & Zhao, L. 2019. The History of Chito/Chitin Oligosaccharides and Its Monomer. In: Zhao, L. (eds) *Oligosaccharides of Chitin and Chitosan.* Springer, Singapore.
- Reuhs, B. L. 2017. High-Performance Liquid Chromatography. *Food Analysis,* 213–226.
- Rocha, F. S., Gomes, A. J., Lunardi, C. N., Kaliaguine, S., & Patience, G. S. 2018. Experimental Methods in Chemical Engineering: Ultraviolet Visible Spectroscopy UV-Vis. *The Canadian Journal of Chemical Engineering.* 96 :2515.
- Sahai, A. S., & Manocha, M. S. 1993. Chitinases of Fungi and Plants : Their Involvement in Morphogenesis and Host-Parasite Interaction. *FEMS Microbiol Rev.* 11 : 317-338.
- Sanjivkumar, M., Vijayalakshmi, K., Silambarasan, T., Sholkamy, E. N., & Immanuel, G. 2020. Biosynthesis, statistical optimization and molecular modeling of chitinase from crab shell wastes by a mangrove associated actinobacterium *Streptomyces olivaceus* (MSU3) using Box-Behnken design and its antifungal effects. *Bioresource Technology Reports,* 11, 100493.
- Setiawan, A., Setiawan, F., Juliasih, N. L. G. R., Widyastuti, W., Laila, A., Setiawan, W. A., Djailani, F. M., Mulyono, M., Hendri, J., & Arai, M. 2022. Fungicide Activity of Culture Extract from *Kocuria palustris* 19C38A1 against *Fusarium oxysporum*. *Journal of Fungi,* 8(3), 162.
- Sharma M, Singh A, & Singh H. 2002. Extracellular esterase from *Brevibacterium linens*: Purification, characterization and potential applications. *Bioresource Technology.* 83(2):131-137.

- Sharma, R., & Singh, D. 2014. *Solid State Fermentation: Bioresource Technology*, 172, 1-15.
- Sharma, R. K., Singz, V., Tiwari, N., Butcher, R. J., & Katiyar, D. 2020. Synthesis, antimicrobial and chitinase inhibitory activities of 3-amidocoumarins. *Bioorganic Chemistry*. 103700.
- Shirlinf, E. B. & D. Gottlieb. 1966. Methods for characterization of Streptomyces species. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 16: 313-340.
- Steel, D. B. & Stowers, M. D. 1991. Techniques For Selection Of Industrially Important Microorganisms. *Annu. Rev. Microbiol.* 45 : 89-106.
- Subramani, R., & Aalbersberg, W. 2012. Marine *Actinomycetes*: An ongoing source of novel bioactive metabolites. *Microbiological Research*, 167(10), 571–580.
- Sudaryati, Y., Triana, E., Mikrobiologi, B., Lipi, P. B.-, Raya, J., Bogor, J., & Cibirong, K. 2016. Pemanfaatan Limbah Kulit Udang untuk Menghasilkan Enzim Kitinase dari *Streptomyces macrosporeus* InaCC A454. *Jurnal Kimia Terapan Indonesia*. 18, 91–101.
- Suresh, P. V. 2012. Biodegradation of shrimp processing bio-waste and concomitant production of chitinase enzyme and N-acetyl-D-glucosamine by marine bacteria : production and process optimization. *World Journal Microbiol Biotechnol.* 28 : 2945-2962.
- Suryanto, D. & Yurnaliza. 2005. Eksplorasi Bakteri Kitinolitik : Keragaman Genetik Gen Penyandi Kitinase pada Berbagai Jenis Bakteri dan Pemanfaatannya. USU. Medan.
- Vandecasteele, B., Amery, F., Ommeslag, S., Vanhoutte, K., Visser, R., Robbens, J., De Tender, C., & Debode, J. 2021. Chemically versus thermally processed brown shrimp shells or Chinese mitten crab as a source of chitin, nutrients or salts and as microbial stimulant in soilless strawberry cultivation. *Science of the Total Environment*, 771, 145263.
- Van Der Zee, F. P. T., & Van Der Maarel, M. J. E. C. 1995. Optimization of solid-state fermentation processes. *Critical Reviews in Biotechnology*, 15(2), 95-121.
- Wulandari, S., & Sulistyani, N. 2016. Pengaruh Media Terhadap Pertumbuhan Isolat *Actinomycetes* Kode AL35 Serta Optimasi Produk Metabolit Antibakteri Berdasarkan Waktu Fermentasi Dan pH. *Media Farmasi: Jurnal Ilmu Farmasi*, 13(2), 186.
- Zhang, A., Yumei, H., Guoguang, W., Jie, Z., Weiliang, D., Kequan, C., & Pingkai, O. 2018. Molecular Characterization of a Novel Chitinase CmChi1

From Chitinolytic bacter *meiyuanensis* SYBC-H1 and its Use in N-Acetyl-D-Glucosamine Production. *International Journal of Biotechnol for Biofuels*. 11:179.