

**EKSTRAKSI DAN UJI AKTIVITAS ENZIM KITINASE PADA
Actinomycetes 19C38A1 MENGGUNAKAN
MEDIA LIMBAH KULIT UDANG**

(Skripsi)

Oleh

**FIRDA TIARA ROCHMAN
NPM. 1817011095**



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

ABSTRAK

EKSTRAKSI DAN UJI AKTIVITAS ENZIM KITINASE PADA *Actinomyces* 19C38A1 MENGGUNAKAN MEDIA LIMBAH KULIT UDANG

Oleh

Firda Tiara Rochman

Kitinase adalah enzim yang dapat menghidrolisis kitin menjadi monomernya yaitu N-asetil glukosamin dengan cara menghidrolisis kitin secara acak pada ikatan glikosidik. *Actinomyces* jenis *Streptomyces* mudah untuk ditumbuhkan dan digunakan untuk menghasilkan antibiotik terbanyak. Penelitian ini bertujuan untuk memperoleh kondisi pH dan waktu optimum *Actinomyces* 19C38A1 sehingga dapat menghasilkan aktivitas enzim kitinase yang tinggi. Hasil identifikasi morfologi isolat *Actinomyces* 19C38A1 secara mikroskopis dapat disimpulkan merupakan spesies *Streptomyces*. Proses kultivasi dilakukan dengan menggunakan serbuk kulit udang selama 12 hari. Uji aktivitas kitinase dilakukan dengan spektrofotometer UV-Vis dengan metode DNS. Berdasarkan hasil analisis diperoleh aktivitas spesifik enzim kitinase tertinggi adalah pada waktu inkubasi hari ke-12 dengan pH 6 sebesar 154.99 U/mg. Hasil fraksinasi dengan pemurnian menggunakan ammonium sulfat adalah sebesar 304.815 U/mg. Hasil pemurnian dengan metode dialisis diperoleh aktivitas spesifik sebesar 528.852 U/mg.

Kata Kunci: *Actinomyces*, Enzim Kitinase, Kulit Udang, *Streptomyces*.

ABSTRACT

EXTRACTION AND ACTIVITY TEST OF KITINASE ENZYME ON Actinomycetes 19C38A1 USING SHRIMP SHELL WASTE MEDIA

By

Firda Tiara Rochman

Chitinase is an enzyme that can hydrolyze chitin into its monomer N-acetyl glucosamine by hydrolyzing chitin randomly at glycosidic bonds. Streptomyces actinomycetes are easy to grow and are used to produce the most antibiotics. This study aims to obtain the optimum pH and time conditions for Actinomycetes 19C38A1 so as to produce high chitinase activity. The results of microscopic identification of Actinomycetes 19C38A1 isolate can be concluded as a Streptomyces species. The cultivation process was carried out using shrimp shell powder for 12 days. Chitinase activity test was carried out with a UV-Vis spectrophotometer with the DNS method. Based on the results of the analysis, the highest specific activity of the chitinase enzyme was obtained on the 12th day of incubation with a pH of 6 of 154.99 U/mg. The result of fractionation by purification using ammonium sulfate was 304,815 U/mg. The results of purification using the dialysis method obtained a specific activity of 528,852 U/mg.

Keywords: Actinomycetes, Chitinase Enzyme, Shrimp Shell, Streptomyces.

**EKSTRAKSI DAN UJI AKTIVITAS ENZIM KITINASE PADA
Actinomycetes 19C38A1 MENGGUNAKAN
MEDIA LIMBAH KULIT UDANG**

Oleh

FIRDA TIARA ROCHMAN

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 : **EKSTRAKSI DAN UJI AKTIVITAS ENZIM
KITINASE PADA *Actinomyces* 19C38A1
MENGUNAKAN MEDIA LIMBAH KULIT
UDANG**

Nama : **Firda Tiara Rochman**

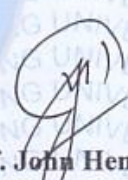
NPM : **1817011095**

Jurusan : **Kimia**

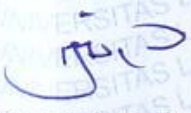
Fakultas : **Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam**




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


Prof. John Hendri, Ph.D.
NIP.195810211987031001

2. Ketua Jurusan Kimia FMIPA


Mulyono, Ph.D.
NIP. 197406112000031002

MENGESAHKAN

1. Tim Penguji

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

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

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

2. Plt. Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam



Plt. Dekan : **Dr. Heri Satria, M.Si.**
NIP. 197110012005011002

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

LEMBAR PERNYATAAN

Yang bertanda tangan dibawah ini :

Nama : Firda Tiara Rochman
Nomor Pokok Mahasiswa : 1817011095
Jurusan : Kimia
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Perguruan Tinggi : Universitas Lampung

Menyatakan dengan sebenar-benarnya dan sesungguhnya, bahwa skripsi saya berjudul "**Ekstraksi dan Uji Aktivitas Enzim Kitinase Pada *Actinomyces* 19C38A1 Menggunakan Media Limbah Kulit Udang**" adalah benar karya saya sendiri, baik gagasan, hasil dan analisisnya. Selanjutnya saya juga tidak keberatan jika sebagian atau seluruh data dalam skripsi tersebut digunakan oleh dosen atau program studi untuk kepentingan publikasi sepanjang nama saya disebutkan dan terdapat kesepakatan sebelum dilakukan publikasi.

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

Bandar Lampung, 10 April 2023
Yang menyatakan



Firda Tiara Rochman
NPM. 1817011095

RIWAYAT HIDUP

Penulis Bernama lengkap Firda Tiara Rochman dilahirkan di Palas Aji, pada tanggal 04 Juli 2000. Anak pertama dari empat bersaudara, putri dari Bapak Rohman dan Ibu Rani Marjuani.

Penulis mengawali Pendidikan Taman Kanak-Kanak di TK Islam pada tahun 2006 dan Sekolah Dasar di SD N Palas Aji pada tahun 2012. Penulis menyelesaikan Sekolah Menengah Pertama di MTs N 2 Lampung Selatan pada tahun 2015, kemudian melanjutkan Pendidikan Sekolah Menengah Atas di SMA N 2 Kalianda pada tahun 2018. Pada tahun 2018, penulis terdaftar sebagai mahasiswa Jurusan Kimia FMIPA Universitas Lampung melalui jalur SBMPTN yang diselesaikan pada tahun 2022.

Selama di perguruan tinggi, penulis pernah bergabung dalam bidang organisasi kemahasiswaan, sebagai Kader Muda Himpanan Mahasiswa Kimia (HIMAKI) periode 2018, dan kemudian menjadi anggota Biro Sosial Masyarakat periode 2019. Pada tahun 2021 Penulis melaksanakan KKN (Kuliah Kerja Nyata) selama 40 hari di Desa Bumi Restu, Kecamatan Palas, Kabupaten Lampung Selatan. Tepat ditahun yang sama, penulis melaksanakan PKL. (Praktik Kerja Lapangan) di Laboratorium Biopolimer dan UPT-LTSIT, Universitas Lampung. Penulis juga pernah menjadi asisten praktikum Biokimia dan Kimia Analisis untuk mahasiswa S1 Jurusan Biologi dan Biologi Terapan FMIPA Universitas Lampung pada tahun 2022.

MOTTO

Boleh jadi kamu membenci sesuatu padahal itu amat baik bagimu, dan boleh jadi pula kamu menyukai sesuatu padahal itu amat buruk bagimu, Allah mengetahui sedang kamu tidak mengetahui.
(QS Al-Baqarah: 216).

Allah tidak akan membebani seseorang melainkan sesuai dengan kadar kesanggupannya
(QS Al-Baqarah: 286).

Do what is right, not what is easy.
(Roy T. Bennett)

Opportunities don't happen. You create them.
(Chris Grosser).

The pain you feel today is the strength you will feel tomorrow. For every challenge encountered there is opportunity for growth.
(Anonim).

Dont let someone else's opinion of you become yor reality.
(Les Brown).

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

"Dengan menyebut nama Allah Yang Maha Pengasih Lagi Maha Penyayang"

Kupersembahkan karya sederhana ini kepada:

**Kedua Orangtuaku tercinta
Bapak Rohman dan Ibu Rani Marjuani**

Yang telah menjadi orang tua terhebat, yang tak pernah berhenti memberikan kasih sayang, mendidik dengan penuh kesabaran dan cinta. Kupersembahkan karya sederhana ini sebagai ucapan terimakasihku.

Adikku tersayang
**Ilham Taufiqurrohman, Aina Ramadhani Rohman,
dan Razka Abizard Rohman**

Atas semangat dan dukungan yang telah diberikan

Rasa hormat saya kepada:
**Ibu Dra. Aspita Laila, M.S., Bapak Prof. John Hendri, Ph.D.,
dan Bapak Prof. Andi Setiawan, M.Sc., Ph.D.**

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

Bapak Ibu dosen Jurusan Kimia yang telah memberikan ilmu kepadaku selama menempuh Pendidikan di kampus.

Keluarga besarku yang selalu mendoakan dan memberikan semangat untukku.

Serta
**Almamaterku Tercinta
Universitas Lampung**

SANWACANA

Puii syukur penulis ucapkan kepada Tuhan Yang Maha Esa atas segala limpahan rahmat dan hidayah-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul " Ekstraksi dan Uji Aktivitas Enzim Kitinase Pada *Actinomyces* 19C38A1 Menggunakan Media Limbah Kulit Udang " sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Sains pada Jurusan Kimia FMIPA Universitas Lampung.

Selama penyusunan skripsi ini, penulis telah banyak menerima masukan, arahan, bimbingan, dan bantuan dari berbagai pihak. Sehubungan dengan hal ini, penulis menyampaikan terimakasih kepada :

1. Ibu Dra. Aspita Laila, M.S. selaku dosen pembimbing I atas kesediaan dan keikhlasannya memberikan bimbingan, saran, arahan, dan motivasi sehingga penulis dapat menyelesaikan penelitian dan skripsi ini dengan baik. Semoga Allah SWT senantiasa memberikan kemudahan dan membalas kebaikannya.
2. Bapak Prof. John Hendri, Ph.D. selaku dosen pembimbing II yang telah memberikan ilmu, nasehat, dan bimbingan kepada penulis sehingga penelitian dan skripsi ini dapat diselesaikan dengan baik. Semoga Allah SWT membalas semua kebaikan bapak.
3. Bapak Prof. Andi Setiawan, M.Sc., Ph.D. selaku Penguji dan selaku Pembimbing Akademik atas segala masukan, bantuan, nasehat, motivasi, saran, dan ilmu yang bermanfaat kepada penulis. Semoga Allah SWT membalas semua kebaikan bapak.
4. Bapak Prof. Wasinton Simanjuntak, Ph.D. selaku Pembimbing Akademik atas segala masukan, bantuan, nasehat, motivasi, saran, dan ilmu yang

bermanfaat kepada penulis. Semoga Tuhan Yang Maha Esa membalas semua kebaikan bapak.

5. Bapak Mulyono, Ph.D. selaku Ketua Jurusan Kimia FMIPA Universitas Lampung.
6. Bapak dan Ibu dosen Jurusan Kimia FMIPA Universitas Lampung atas seluruh ilmu yang telah diberikan.
7. Orang tuaku tercinta, Bapak Rohman dan Ibu Rani Marjuani yang selalu mendoakan, menasehati, dan memberikan semangat yang tiada henti. Semoga Allah SWT memberikan kesehatan, perlindungan serta kemudahan dalam segala urusan.
8. Adikku tersayang, Ilham Taufiqurrohman, Aina Ramadhani Rohman, dan Razka Abizard Rohman yang telah memberikan semangat dan keceriaan.
9. Keluarga besarku yang tidak dapat disebutkan satu persatu, terimakasih atas doa dan dukungannya.
10. Teman pejuang wisudaku Fauzia Sabrina, Lily Nur Safitri, Lupia Widya Astuti, dan Mey Dhea Tami Putri yang selalu memberikan dukungan, saran, bantuan dan semangat dalam perjalanan kuliah selama ini baik suka maupun duka. Semoga Allah SWT selalu memberikan kemudahan bagi kita semua. Wishing you all the luck in the world!
11. Teman-temanku tersayang, Mezi, Feby, Lifta, Virgin, Vika, Putri zenever, Riska, Rizky, Yola, Kak Dila, Wahyu, Ando, Hanni. Terimakasih untuk semuanya, kebersamaan, bantuan, doanya, semangat, motivasinya, dukungannya. I appreciate it guys! Thank you for everything.
12. Mba Nafila Khansa Salsabila selaku pembimbing di laboratorium untuk segala ilmu, pengalaman, motivasi, kritik dan saran kepada penulis sehingga penulis dapat menyelesaikan tugas akhir dengan baik.
13. Rekan seperjuangan penelitian, Annisa Larasati, Larasati Gadis Ermadi, Irma Fitria Ananda terimakasih atas kebersamaan, canda tawa, dan waktu yang telah kita habiskan bersama di Laboratorium. Semoga Allah SWT memudahkan segala urusan kita semua.
14. Kakak-kakak satu bimbingan Kak Fendi Setiawan, Mba Ochi, Kak Rizky, Kak Ridho, Kak Muhlis, Mba Merr, Mba Rana, Kak Ikrom, Mba Iacun,

Mba Caca, Mba Zara, Mba Saras, Mba Nia, Mba Aisyah dan yang tidak bisa disebutkan satu per satu. Terimakasih atas segala bantuan yang telah diberikan selama ini. Semoga Allah membalas semua kebaikan dan semoga Allah SWT memudahkan segala urusan kita semua.

15. Teman-teman Laboratorium Biopolimer dan UPT- LTSIT, Indra, Lanang, Mega, Rey, Ika, Dinara, Chasya, bang Ichan dan yang tidak bisa disebutkan satu per satu. Terimakasih atas segala bantuannya selama penulis melakukan penelitian.
16. Teman-teman kelas Mari (B)ersinar atas segala bantuan, canda tawa, dan semangat yang diberikan kepada penulis selama perkuliahan.
17. Teman-teman Kimia Angkatan 2018 terimakasih atas kebersamaan, canda tawa, suka duka, bantuan, dan doa yang mengiringi selama ini. Semoga sukses dan Allah AWT selalu melindungi dan memudahkan urusan kita semua.
18. Senior dan Junior saya di Jurusan Kimia Angkatan 2015, 2016, 2017, 2019, dan 2020 atas segala kebaikan dan bantuan kepada penulis.
19. Almamaterku tercinta Universitas Lampung.
20. Semua pihak yang tidak dapat penulis sebutkan satu per satu yang telah membantu penulis menyelesaikan skripsi ini.

Semoga Allah SWT membalas segala keikhlasan dan bantuan semua pihak yang telah membantu penulis dalam menyelesaikan skripsi ini. Penulis menyadari bahwa dalam penulisan ini masih terdapat banyak kesalahan dan kekurangan, namun penulis berharap semoga skripsi ini bermanfaat bagi pembaca.

Bandar Lampung, 09 April 2023

Firda Tiara Rochman

DAFTAR ISI

	Halaman
DAFTAR ISI	xiv
DAFTAR TABEL	xvi
DAFTAR GAMBAR	xvii
DAFTAR LAMPIRAN	xviii
I. PENDAHULUAN	1
A. Latar Belakang	1
B. Tujuan Penelitian.....	4
C. Manfaat Penelitian.....	4
II. TINJAUAN PUSTAKA	5
A. Limbah Kulit Udang	5
B. Kitin	6
C. Enzim Kitinase	8
D. <i>Actinomycetes</i>	12
E. Ekstraksi	14
F. Pemurnian Enzim Kitinase	14
G. Fraksinasi dengan menggunakan Ammonium Sulfat	15
H. Dialisis.....	16
I. Metode Pengujian Aktivitas Enzim Kitinase Spectrofotometri UV-Vis.....	17
III. METODE PENELITIAN	21
A. Waktu dan Tempat	21
B. Alat dan Bahan	21
C. Prosedur Penelitian.....	22
1. Persiapan Sampel Kulit Udang dan Koloid Kitin	22
2. Pembuatan Media Koloid Kitin	22

3. Peremajaan Enzim Kitinase Isolat <i>Actinomyces</i> 19C38A1.....	22
4. Identifikasi Morfologi <i>Actinomyces</i>	23
5. Pembuatan Inokulum <i>Actinomyces</i> 19C38A1.....	23
6. Kultivasi <i>Actinomyces</i> 19C38A1 pada Media	
Kulit Udang.....	24
7. Uji Aktivitas Kasar Enzim Kitinase.....	24
8. Pemurnian Enzim Kitinase	25
8.1. Fraksinasi Kitinase dengan Ammonium Sulfat	25
8.2. Dialisis	27
IV. HASIL DAN PEMBAHASAN	30
A. Persiapan Sampel Kulit Udang dan Koloid Kitin	31
B. Penapisan Isolat <i>Actinomyces</i> 19C38A1	31
C. Identifikasi Morfologi <i>Actinomyces</i> 19C38A1.....	32
D. Kultivasi <i>Actinomyces</i> 19C38A1 pada Media	
Kulit Udang.....	33
E. Aktivitas Ekstrak Kasar Enzim Kitinase	34
F. Pemurnian Enzim Kitinase	35
1. Fraksinasi Kitinase dengan Ammonium Sulfat.....	35
2. Dialisis	40
V. KESIMPULAN DAN SARAN	43
A. Kesimpulan	43
B. Saran.....	43
DAFTAR PUSTAKA	44
LAMPIRAN.....	50

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Data Hasil Ekstrak Kasar Enzim Kitinase	34
2. Data Hasil Fraksinasi hari ke-12 pH 6	36
3. Data Hasil Fraksinasi Pola 0-20% dan 20-85%	38
4. Hasil Pemurnian	41
5. Demineralisasi dan Deproteinasi.....	51
6. Standar Glukosamin.....	57
7. Kurva Standar BSA (Bovine Serum Albumin	58
8. Perhitungan Ekstrak Kasar Enzim Kitinase	60
9. Perhitungan Fraksinasi Pola 20-85%	61
10. Perhitungan Dialisis Pola 20-85%	61

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Limbah Kulit Udang	6
2. Struktur Kimia Kitin	7
3. Jenis Rantai Spora yang dihasilkan oleh <i>Actinomycetes</i>	14
4. Spektrofotometri UV-Visible	19
5. Skema Fraksinasi dengan Ammonium Sulfat	26
6. Skema Prosedur Penelitian	28
7. Koloid Kitin	31
8. (a) Peremajaan Isolat (b) Isolat Zona Bening	31
9. (a) Rantai Spora <i>Actinomycetes</i> Strain 19C38A (b) Rantai Spora <i>Streptomyces</i> (Barka et al, 2016)	33
10. (a) Suspensi <i>Actinomycetes</i> , (b) Kulit Udang Kering yang ditambahkan pH, (c) Media Kulit Udang yang telah diinkubasi ditambahkan aquades sebanyak 100 mL	34
11. Grafik Ekstrak Kasar Enzim Kitinase	35
12. Grafik Fraksinasi Ekstrak Kasar Enzim Kitinase pH 6	37
13. Grafik Fraksinasi Pola 0-20% dan 20-85%	39
14. Hasil Dialisis	40
15. Grafik Aktivitas Spesifik Optimum Enzim Kitinase	42
16. Kurva Standar Glukosamin	57
17. Grafik Standar Glukosamin	58

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Pembuatan Reagen DNS (Dinitrosalicylic Acid).....	51
2. Pembuatan Reagen Bradford	52
3. Persentase Demineralisasi dan Deproteinasi	53
4. Uji Aktivitas Enzim Kitinase sebelum pemurnian	54
5. Pemurnian Enzim Kitinase.....	55
5a. Fraksinasi Kitinase dengan Ammonium Sulfat.....	55
5b. Dialisis	56
6. Kurva Standar Glukosamin	57
7. Kurva Standar BSA (Bovine Serum Albumin).....	58
8. Penentuan Kadar Protein, Aktivitas Unit Enzim dan Aktivitas Spesifik Enzim serta Kemurnian	59
9. Perhitungan Ekstrak Kasar Enzim Kitinase, Fraksinasi, Dialisis	60
9a. Ekstrak Kasar Enzim	60
9b. Fraksinasi pola 20-85%	61
9c. Dialisis pola 20-85%	61

I. PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

Pemanfaatan limbah kulit udang hingga saat ini belum optimal, limbah dari proses produksi dari industri ini dapat menimbulkan bau yang tidak sedap dan dapat merusak estetika lingkungan akibat penumpukan dan tidak termanfaatkan. Limbah kulit udang hanya dimanfaatkan sebagai pakan ternak. Secara umum limbah kulit udang memiliki kandungan yang dapat dimanfaatkan sebagai faktor pemicu pertumbuhan bagi mikroorganisme. Menurut Marzuki *et al.* (2019) mengatakan bahwa limbah cangkang kulit udang ini memiliki kandungan 15-20% kitin, 25-40% protein, dan 45-50% kalsium karbonat. Limbah tersebut mudah sekali busuk sehingga dapat menimbulkan pencemaran lingkungan. Padahal limbah tersebut masih banyak mengandung protein, lemak, kalsium karbonat, kitin, pigmen, abu dan lainnya.

Sedangkan salah satu pemanfaatan limbah kulit udang yang mempunyai prospek untuk dikembangkan dan memiliki nilai ekonomis cukup tinggi adalah mengolahnya menjadi kitin, kitosan dan glukosamin. Langkah ini sudah mulai dilakukan oleh beberapa negara maju, bahkan dikembangkan menjadi industri. Memanfaatkan limbah hasil laut ini membantu mengatasi masalah lingkungan dan mempromosikan nilai ekonomis produksi laut (Haliza.,dkk, 2012).

Kitin merupakan komponen utama pada jaringan penyokong Crustacea. Kitin merupakan biopolimer yang banyak terdapat di alam yang tersusun atas β -1,4-N-asetil-D-glukosamin (GlcNac). Struktur kitin berupa polisakarida linear yang terdiri dari N-asetilglukosamin yang dihubungkan dengan ikatan β -1,4. Kitin dan senyawa turunannya memiliki nilai ekonomis yang tinggi karena aktivitas biologisnya yang banyak dimanfaatkan di bidang industri maupun biomedika (Brzezinska et al., 2013).

Kitinase adalah sekelompok enzim hidrolitik yang memutus ikatan β -1,4- glikosidik antara dua N-asetil-D-glukosamin (GlcNAc) berturut-turut dari rantai kitin. Enzim kitinase mampu menghidrolisa senyawa polimer kitin menjadi kitin oligosakarida atau monomer N-asetil glukosamin dengan menghidrolisis kitin secara acak pada ikatan glikosidik. Enzim kitinase dapat dihasilkan oleh bakteri, fungi, tanaman, dan hewan. 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. Dalam proses pengolahan udang, biasanya bagian kepala dan kulit udang dibuang atau dijadikan pakan ternak. Sebagian besar limbah udang ini mengandung kitin. Kelompok crustacea merupakan penghasil kitin terbesar dibandingkan dengan beberapa organisme penghasil kitin lainnya, misalnya serangga, nematoda, jamur dan tumbuhan (Herdyastuti *et al.*, 2009).

Enzim bekerja secara optimal tergantung kepada pH, suhu, konsentrasi substrat dan lama inkubasi (Pomeranz, 2012). Produksi enzim kitinase dari mikroorganisme lebih baik dibandingkan kitinase dari sumber yang lain karena kemudahannya berkembang biak dalam waktu yang relatif singkat. Produksi enzim kitinase dilakukan dengan menumbuhkan isolat bakteri pada media yang mengandung kitin, sebagai substrat dan diinkubasi pada waktu, pH, dan suhu tertentu. Faktor waktu, pH, dan suhu inkubasi perlu dikontrol untuk mendapatkan produksi enzim yang maksimal.

Enzim kitinase dapat diproduksi oleh mikroorganisme kitinolitik, salah satunya

adalah *Actinomycetes* (Remya & Vijayakumar, 2008). Salah satu bakteri yang menghasilkan kitinase adalah *Actinomycetes*, yaitu kumpulan mikroorganisme yang strukturnya merupakan bentuk antara bakteri dan jamur, yang menghasilkan zat-zat anti mikroba dari asam amino yang dikeluarkan oleh bakteri fotosintetik dan bahan organik. *Actinomycetes* ini merupakan sumber kitinase, mudah didapatkan, mudah dikembangbiakkan, dan memiliki nilai ekonomi yang tinggi. Untuk memperoleh satu jenis bakteri *Actinomycetes* dari suatu bahan yang mengandung campuran mikroba, dapat dilakukan dengan cara isolasi mikroorganisme. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui kondisi optimum pertumbuhan *Actinomycetes* sehingga dapat menghasilkan enzim kitinase dalam jumlah yang tinggi.

Terdapat beberapa penelitian sebelumnya yang menjelaskan tentang kemampuan *Actinomycetes* dalam mendegradasi substrat berupa limbah kulit udang. Contohnya antara lain penelitian dari Welly (2015) Penelitian ini untuk melihat kemampuan *actinomycetes* dalam mendegradasi kitin. Pada penelitian Soeka (2009) ini bertujuan untuk mendapatkan isolat unggul *actinomycetes* penghasil enzim kitinase. Terdapat variasi pH dan suhu pada penelitian ini. Pengaruh pH terhadap aktivitas kitinase dengan berbagai variasi bufer dengan pH 3–9. Pengaruh suhu terhadap aktivitas kitinase tertinggi yaitu pada suhu 30–80° C. Setiap enzim mempunyai pH optimum yaitu kisaran pH dimana enzim menunjukkan aktivitas maksimum dengan stabilitas yang tinggi. Aktivitas enzim juga akan meningkat dengan meningkatnya suhu sampai suhu optimumnya, tetapi setelah melewati suhu optimumnya aktivitas enzim akan menurun.

Pada penelitian ini dilakukan berbeda karena media yang digunakan yaitu koloid kitin serta terdapat variasi waktu inkubasi dan variasi pH. Pada variasi waktu dilakukan untuk mengetahui waktu optimum untuk memperoleh aktivitas terbaik enzim kitinase. Pada penentuan pH optimum enzim kitinase dilakukan dengan cara memvariasikan pH menggunakan buffer fostat pada pH 6,7,dan 8 untuk mendapatkan pH optimum enzim kitinase.

B. Tujuan Penelitian

Adapun tujuan dari penelitian ini adalah sebagai berikut :

1. Memperoleh ekstrak enzim kitinase dari media limbah kulit udang hasil degradasi *Actinomyces* 19C38A1.
2. Mengetahui kondisi optimum pertumbuhan *Actinomyces* 19C38A1 sehingga dapat menghasilkan enzim kitinase dalam jumlah yang tinggi.

1.3. Manfaat Penelitian

Manfaat dari penelitian ini adalah untuk mendegradasi kulit udang menjadi oligomer kitosan serta memperoleh pH dan waktu optimum enzim kitinase menggunakan isolat *Actinomyces* 19C38A1.

II. TINJAUAN PUSTAKA

A. Limbah Kulit Udang

Di Indonesia udang merupakan komoditas yang memainkan peranan penting sebagai sumber kitin karena hasil pengolahannya banyak menghasilkan limbah. Volume ekspor udang (kupas dan tanpa kepala) sekitar 135 ribu ton per tahunnya dengan limbah kulit udang sekitar 60 ribu ton. Dari hasil survei Badan Riset Kelautan dan Perikanan (BRKP) diketahui bahwa dari 100 ton kulit udang mengandung sekitar 13 ton kitin. Pengolahan udang menghasilkan limbah 50-60% dari berat utuh dengan kandungan kitin 20-30%. Udang di Indonesia pada umumnya diekspor dalam bentuk udang beku (30%- 75%) yang telah dibuang bagian kepala, kulit, dan ekornya (Purwanti, 2014). Kandungan kitin pada kulit kepiting memang lebih tinggi dibandingkan pada kulit udang, tetapi karena bahan baku yang mudah diperoleh adalah udang, maka proses kitin dan kitosan biasanya lebih memanfaatkan limbah udang.

Pabrik pembekuan udang (cold storage) yang mengolah udang untuk ekspor dalam bentuk udang beku tanpa kepala (headless) dan kulit (peeled) menghasilkan limbah berupa kulit keras (cangkang) sekitar 50-60% yang dibuang atau hanya digunakan sebagai campuran makanan ternak (Herdyastuti et al., 2009)

Limbah udang mengandung protein sekitar 30 – 40%, kalsium karbonat 30– 50% dan kitin 20–30% (Kurita, 2006). Kulit udang juga mengandung karotinoid berupa astaxantin, daging dan sedikit lemak. Kulit dan kepala udang mengandung kitin yang cukup besar dibandingkan dengan cangkang atau kulit crustaceae lainnya.



Gambar 1. Limbah Kulit Udang

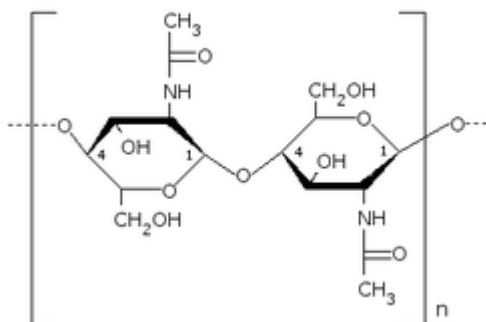
B. Kitin

Kitin adalah senyawa polimer polisakarida linier dan rantai panjangnya di alam, urutan kedua terbesar setelah selulosa dalam biosfer. Kelimpahan kitin tersebar luas di lingkungan biosfer seperti krustasea (kepiting, udang, dan lobster), komponen struktural laut zooplankton exoskeleton (karang dan ubur-ubur), dinding sel jamur, dan kulit serangga (Gohel *et al.*, 2006). Ukuran molekul yang besar dan kelarutan yang rendah dalam kitin menyebabkan penggunaan yang terbatas dan menjadikan kitin sebagai sumber kontaminasi senyawa organik utama. Kitinase diperoleh dari mikroorganisme kitinolitik, mikroorganisme yang dapat mendegradasi kitin melalui enzim yang diproduksi dan digunakan sebagai sumber karbon dan nitrogen (Shakeel dan Ikram, 2017).

Kitin merupakan homopolimer dari β - 1,4 N-asetil-D-glukosamin dan merupakan polimer kedua terbanyak di alam setelah selulosa. Senyawa ini dapat ditemukan pada cangkang udang, kepiting, molusca, serangga dan beberapa dinding sel jamur dan alga. Kitin merupakan zat padat yang tidak larut dalam air, tetapi dapat larut dalam pelarut organik seperti asam sulfat, asam nitrat, asam fosfat, dan asam formiat anhidrat. Kitin juga dapat terurai secara enzimatik dengan menggunakan enzim kitinase. Monomer N-asetil-Dglukosamin pada polimer kitin dihubungkan dengan ikatan hidrogen yang sangat kuat antara gugus $-NH$ dari satu monomer dan gugus $C=O$ dari monomer yang berdekatan, sehingga membentuk formasi fibril yang bersifat stabil dan kaku. Kitin bersifat tidak larut air dan hanya larut

dalam pelarut asam mineral pekat seperti HCl (Herdyastuti *et al.*, 2009).

Berdasarkan penyusun rantai polimernya, kitin fibril dibedakan menjadi tiga jenis, yaitu α -kitin, β -kitin dan γ -kitin dengan perbedaan pada susunan rantai kristalnya (Enibu, 2007).



Gambar 2. Struktur Kimia Kitin (Setyahadi, 2006)

Kitin merupakan bahan yang tidak beracun dan bahkan muda terurai secara hayati (biodegradable). Bentuk fisiknya merupakan padatan amorf yang berwarna putih dengan kalor spesifik $0,373 \pm 0,30$ kal/g/ $^{\circ}$ C. Kitin sebagai biopolimer kristalin, terdapat dalam bentuk 3 kristal di alam, yaitu α , β dan γ -kitin. Kitin- α berbentuk kristal ortorombik dengan setiap unit selnya mengandung 4 cincin N-asetil-D-glukosamin yang ditautkan dengan 2 ikatan glikosidik β (-1-4) dan tertata secara anti paralel, rapat dan kompak. Kitin- β berbentuk kristalin monoklin dan setiap unitnya terdiri dari 2 cincin N-asetil-D-glukosamina dan 2 molekul air yang tertata secara paralel. Sedangkan struktur kitin- γ diduga dalam 2 penataan, yaitu dua rantai paralel dan 1 anti paralel. Kitin hampir tidak larut dalam air, asam encer dan basa, tetapi larut dalam asam format, asam metanasulfonat, N,N-dimetilasetamida yang mengandung 5% litium klorida, heksafluoroisopropil alkohol, heksafluoroaseton dan campuran 1,2-diklorometana-asam trikloroasetat

dengan perbandingan 35:65%. Asam mineral pekat seperti H₂SO₄, HNO₃ dan H₃PO₄ dapat melarutkan kitin sekaligus menyebabkan rantai panjang kitin terdegradasi menjadi satuan-satuan yang lebih kecil (Arif, 2013).

Sumber kitin terbanyak diperoleh dari kelas crustaceae seperti udang, rajungan, dan kepiting. Sumber kitin terdapat pula pada bagian kulit ulat hongkong (Budiutami et al., 2012). Kandungan kitin dari beberapa spesies diantaranya pada kepiting sebesar 60 %, udang 42-57 %, cumi-cumi 40%, dan kerang 14-35%, serta ulat hongkong sebesar 12,8%.

Kitin yang terdapat pada cangkang masih terikat dengan protein, CaCO₃ Kitosan sebagai polimer yang tersusun dari 2-amino-2-deoksi- β -D-glukosa dapat diperoleh dengan cara mengolah kitin. Pengubahan molekul kitin menjadi kitosan diperoleh dengan cara mengubah gugus asetamida (-NHCOCH₃) pada kitin menjadi gugus amina (-NH₂) pada kitosan (Purwanti A, 2014).

C. Enzim Kitinase

Kitinase adalah enzim yang menghidrolisis senyawa kitin pada ikatan β -1,4-glikosidiknya dan menghasilkan monomer N-asetil-D-glukosamin (NAG). Hasil hidrolisis kitinase dapat digunakan sebagai anti tumor, suplemen, mengontrol kadar gula dalam darah, bahan dasar pembuatan benang operasi, dan agen anti inflamasi (Pratiwi *et al.*, 2014).

Kitinase merupakan enzim yang mempunyai kemampuan menghidrolisis kitin menjadi turunan kitin yang sangat banyak manfaatnya. Degradasi kitin secara enzimatik telah banyak dilakukan karena merupakan metode yang sederhana, cepat dan reproduksibel untuk menghasilkan senyawa turunan kitin atau kitin oligosakarida.

Kitinase dihasilkan oleh mikroorganisme kitinolitik yang sebagian besar terdapat di lingkungan tanah dan air (Haliza *et al.*, 2012). Karakteristik kitinase bervariasi tergantung pada jenis mikroorganisme penghasil dan jenis substrat kitin yang

dipilih. Sebagian besar kitinase lebih spesifik terhadap substrat kitin koloidal, namun pada beberapa penelitian jugamenyebutkan bahwa kitin dalam bentuk flake menghasilkan aktivitas spesifik yang lebih baik. Secara umum, aktivitas optimum enzim kitinase berada pada kisaran temperatur 30-40°C dan pH 5-7 serta kestabilan enzim kitinase berada pada kisaran temperatur 30-45°C dan pH 4-8 (Hamid et al., 2014). Namun ada juga beberapa kitinase yang memiliki kestabilan di luar kondisi-kondisi tersebut. Kitinase telah banyak digunakan untuk pengolahan limbah dan agen biokontrol hama tanaman. Hasil hidrolisis kitinase dapat digunakan sebagai anti tumor, suplemen kesehatan, mengontrol kadar gula dalam darah, bahan dasar pembuatan benang operasi, dan agen antiinflamasi (Pratiwi, et al., 2014).

Enzim yang dihasilkan oleh mikroorganisme dapat berupa enzim ekstraseluler maupun enzim intraseluler. Keuntungan dari enzim ekstraseluler adalah enzim disekresikan ke luar sel sehingga lebih mudah untuk diisolasi dan lebih tahan terhadap panas maupun senyawa kimia. Stabilitas dan aktivitas optimum enzim ekstraseluler biasanya menyerupai sel mikroorganismenya. Enzim bekerja secara optimal tergantung kepada pH, suhu, konsentrasi substrat dan lama inkubasi (Pomeranz, 2012).

Adapun aktivitas enzim tergantung pada :

a. Efek temperatur terhadap aktivitas enzim

Temperatur optimum adalah kondisi ketika enzim memiliki aktivitas maksimal pada temperatur tertentu . Temperatur optimum berpengaruh terhadap laju reaksi enzimatik , jika reaksi tersebut dilangsungkan dalam berbagai suhu , kurva hubungan tersebut akan menunjukkan suhu tertentu , yang menghasilkan laju reaksi yang maksimum (Sadikin , 2012)
Bertambahnya suhu sampai dengan temperatur optimum kenaikan kecepatan reaksi enzim karena bertambahnya energi menyebabkan terjadinya kinetik yang mempercepat gerak enzim dan substrat. Namun apabila enzim berada di atas suhu optimumnya menurun. Hal ini terjadi karena enzim termasuk mengalami denaturasi pada suhu tinggi. Denaturasi ini menyebabkan perubahan pada konformasi enzim akibat adanya

perenggangan ikatan hidrogen yang bersifat reversibel sehingga dapat mempengaruhi sisi aktif enzim untuk berikatan dengan substrat (Mulyani dkk., 2009).

b. Efek pH terhadap aktivitas enzim

Perubahan pH akan mempengaruhi kecepatan reaksi enzim, karena berubahnya derajat ionisasi gugus asam dan basa dari enzim. Sebagian besar enzim, mempunyai rentang pH optimum aktivitas enzim dan mempunyai tingkat stabilitas yang tinggi. Sebagian besar enzim mempunyai pH optimum yang mendekati netral, sebagian kecil lainnya mempunyai pH optimum yang sangat rendah (sekitar 2,0) atau sangat tinggi (sekitar 9,0). Pertumbuhan mikroorganisme dipengaruhi oleh pH, dan biasanya pH optimum pertumbuhan sel berbeda dengan pH optimum aktivitas enzim. Pada umumnya pH optimum untuk beberapa enzim adalah sekitar larutan netral atau asam lemah. Reaksi–reaksi enzimatik sangat dipengaruhi oleh suhu. Suhu dapat menentukan aktivitas maksimum dari enzim. Suhu optimum tergantung pula pada jenis enzim, susunan cairan, dan lamanya percobaan.

c. Efek konsentrasi enzim terhadap aktivitas enzim

Pada enzim dengan derajat kemurniannya tinggi, terdapat suatu hubungan linear antara jumlah enzim dan taraf aktivitas pada batas-batas tertentu. Konsentrasi enzim pada umumnya sangat kecil, bila dibandingkan dengan konsentrasi substrat. Saat konsentrasi enzim meningkat, aktivitas enzim juga bertambah.

d. Efek konsentrasi substrat terhadap aktivitas enzim

Konsentrasi substrat laju reaksi mula - mula meningkat dengan bertambahnya konsentrasi substrat . Akan tetapi setelah peningkatan konsentrasi substrat lebih lanjut, akan tercapai aktivitas enzim maksimum. Pada keadaan konsentrasi substrat yang berlebihan mengakibatkan terjadinya kejenuhan pembentukan kompleks enzim yang mengakibatkan

sebagian besar substrat tidak diubah menjadi produk . Penambahan substrat lebih lanjut tidak berakibat terhadap laju reaksi enzim.

Hal ini disebabkan karena pada saat konsentrasi yang sangat tinggi , seluruh bagian aktif enzim telah diaktifkan oleh substrat , sehingga pada saat itu laju reaksi berada dalam keadaan maksimum (Sadikin , 2012)

e. Efek aktivator, inhibitor dan kofaktor terhadap aktivitas enzim

Senyawa kofaktor yang berupa ion logam ada yang berpotensi meningkatkan aktivitas kerja suatu enzim yang disebut sebagai aktivator enzim, ada pula ion logam yang menghambat aktivitas enzim disebut inhibitor enzim (Sumardjo, 2006).

Inhibitor adalah senyawa yang menurunkan kecepatan reaksi enzimatik. Aktivitas suatu enzim dapat dihambat oleh suatu senyawa yang dikenal sebagai inhibitor. Inhibitor digolongkan menjadi 2 jenis utama, yaitu: a) yang bekerja secara tidak dapat balik (irreversible), b) yang bekerja secara dapat balik (reversible). Penghambat yang irreversible adalah golongan yang bereaksi dengan, atau merusakkan suatu gugus fungsional pada molekul enzim yang penting bagi aktivitas katalitiknya.

Sedangkan suatu senyawa, unsur atau ion yang dapat meningkatkan aktivitas kerja suatu enzim disebut aktivator enzim. Kebanyakan aktivator adalah ion-ion anorganik, terutama ion logam atau kation. Ion-ion logam ini umumnya ditambahkan dalam bentuk garam, misalnya ion Ca^{2+} dalam bentuk garam klorida. Kation-kation lain yang telah diketahui dapat mengaktifkan enzim adalah Na^+ , K^+ , Rb^+ , Cs^+ , Mg^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , dan Al^{3+} .

Aktivitas enzim juga dipengaruhi oleh kofaktor, yaitu komponen non protein dari enzim yang menentukan aktivitas katalitiknya. kofaktor, yaitu gugus non protein dari enzim yang menentukan aktivitas katalitiknya. Kofaktor dapat berupa koenzim yang tidak terikat kuat dalam enzim yang biasanya berupa molekul organik, dan gugus prostetik yang terikat kuat

dalam enzim yang biasanya berupa molekul anorganik (ion-ion logam), seperti ion logam Fe^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} dan Ca^{2+} .

Banyaknya manfaat enzim kitinase dan senyawa turunan kitin mengakibatkan meningkatnya kebutuhan enzim kitinase sehingga perlu dilakukan pengembangan produksi enzim kitinase dari sumber lokal yang melimpah di alam serta harganya yang relatif murah. Salah satunya adalah penggunaan limbah yang mengandung kitin. Kitin merupakan komponen dinding sel penyusun peptodoglikan mikroba yang banyak ditemukan pada eksoskeleton serangga, krustasea, dan dinding sel jamur (Chen et al., 2010). Di Indonesia udang dan kepiting merupakan komoditas yang penting sebagai sumber kitin karena hasil pengolahannya banyak menghasilkan limbah.

D. *Actinomycetes*

Actinomycetes merupakan bakteri berbentuk benang yang mampu menyintesis antibiotik dan memproduksi enzim hidrolitik ekstraselular yang meliputi, nuklease, lipase, selulase, xilanase, lipase, kitinase, dan protease, yang berpengaruh terhadap nematoda. *Actinomyetes* khususnya jenis *Streptomyes* mudah untuk ditumbuhkan dan digunakan untuk memproduksi berbagai antibiotik (Busti et al., 2006).

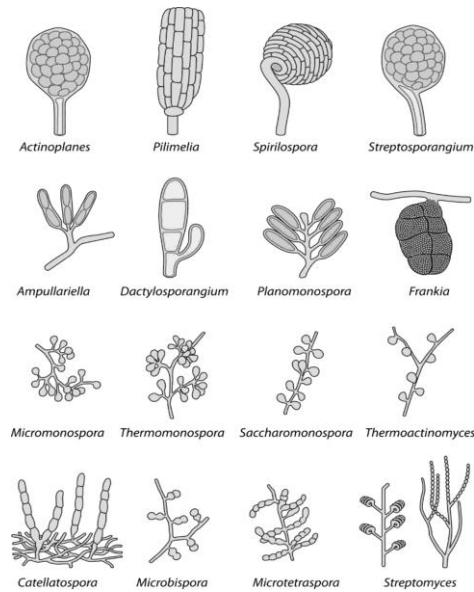
Actinomycetes adalah bakteri gram-positif berfilamen, ditandai oleh siklus hidup yang kompleks yang dimiliki oleh filum *Actinobacteria*, jenis ini mewakili salah satu unit taksonomi terbesar di antara 18 garis keturunan utama yang saat ini dikenal dalam domain bacteria (Ventura et al., 2007). Terlihat secara morfologi, *Actinomycetes* berbentuk filamen-filamen seperti jamur berfilamen (filamentous fungi) yang merupakan eukariotik multiseluler, namun organisme ini memenuhi semua kriteria seperti bakteri yaitu bersel prokariotik (Magarvey et al., 2004).

Actinomycetes merupakan sekelompok bakteri gram-positif dengan kandungan guanin dan sitosin yang tinggi dalam DNA mereka dan bersifat terestrial atau

akuatik. Mereka termasuk golongan uniseluler seperti bakteri, tidak memiliki dinding sel yang berbeda, namun menghasilkan miselium yang tidak bersekat dan lebih ramping. *Actinomycetes* berkembang biak dengan pembelahan biner atau dengan menghasilkan spora atau konidia. Mereka biasa tumbuh dan berkembangbiak di tanah, air tawar, dan laut. *Actinomycetes* menghasilkan berbagai metabolit sekunder dengan kepentingan farmakologi dan komersial yang tinggi. Selain itu mereka juga berfungsi untuk mendegradasi atau menguraikan segala macam zat organik seperti selulosa, polisakarida, lemak protein, asam organik, dan sebagainya (Anandan *et al.*, 2016).

Actinomycetes merupakan salah satu prokariot yang mirip fungi. Ada dua hal penting yang membedakan antara fungi dan prokariot (bakteri) yaitu: 1). *Actinomycetes* tidak mempunyai nukleus, sehingga dimasukkan ke dalam prokariot, 2). Bentuk hifa *Actinomycetes* dengan diameter 0,5 – 1,0 μm , sehingga lebih kecil dari hifa jamur (3-8 μm) (Waluyo, 2009). *Actinomycetes* memiliki kandungan metabolit aktif yang lebih banyak dari mikroba lainnya, seperti antibiotik, agrokimia, enzim, immunosupresan, antiparasit, dan antikanker.

Pengamatan morfologis *Actinomycetes*, termasuk perpanjangan dan percabangan miselium vegetatif, perkecambahan spora, pembentukan miselium udara, warna miselium udara dan substrat, dan produksi pigmen, telah digunakan untuk mengidentifikasi *Actinomycetes*. Mikroskop optik digunakan untuk mengamati bentuk spora, miselium udara dan substrat miselium, dan pemindaian mikroskop electron (SEM) digunakan untuk mempelajari spora, permukaan spora, dan struktur spora (Anandan *et al.*, 2016; Q. Li *et al.*, 2016). Beberapa jenis spora dari *Actinomycetes* dapat dilihat pada Gambar 3 sebagai berikut :



Gambar 3. Jenis rantai spora yang dihasilkan oleh *Actinomycetes* (Barka *et al.*, 2016)

E. Ekstraksi

Ekstrak adalah hasil dari sediaan sari pekat tumbuh-tumbuhan ataupun hewan dengan cara ekstraksi yakni dengan penarikan zat pokok yang yang digunakan dari bahan mentah dengan menggunakan pelarut. Dalam menentukan metode ekstraksi diperlukan beberapa faktor yang perlu dipertimbangkan, diantaranya sifat dari bahan yang akan diekstraksi dan kepentingan dalam memperoleh ekstrak yang sempurna atau mendekati sempurna (Ansel, 2008). Dalam proses ekstraksi suatu bahan atau hewan, banyak faktor yang dapat mempengaruhi kandungan senyawa hasil ekstraksi diantaranya : jenis, konsentrasi pelarut, metode ekstraksi dan suhu yang digunakan untuk ekstraksi (Senja, 2014).

F. Pemurnian Enzim Kitinase

Selanjutnya dilakukan ekstraksi enzim dan pemurnian enzim. ekstraksi enzim dilakukan dengan cara sentrifugasi. Purifikasi atau pemurnian merupakan tahap yang penting untuk mendapatkan enzim kitinase yang berkualitas. Keberhasilan

purifikasi dilihat dari tingkat kemurnian, rendemen, dan aktivitas spesifik. Semakin tinggi tingkat kemurnian enzim maka semakin tinggi pula aktivitas spesifik enzim (Haliza dkk., 2012). Tahap purifikasi dapat dilakukan bertahap antara lain ekstraksi, pemisahan enzim seperti presipitasi, sentrifugasi, dialisis dan filtrasi. Tahap pemurnian dengan dialisis dilakukan untuk memisahkan senyawa dengan berat molekul lebih rendah dari sampel menuju larutan buffer melalui membran semipermeabel. Protein dengan berat molekul tinggi akan tertahan dalam kantong dialisis.

Pemurnian dengan pengendapan menggunakan garam ammonium sulfat telah umum dilakukan. Penggunaan garam ammonium sulfat lebih banyak digunakan karena garam ini mempunyai kelarutan yang tinggi, pH moderat, harga relatif lebih murah, tidak bersifat toksik, dan tidak mempengaruhi enzim (Rochima, 2006.).

G. Fraksinasi dengan menggunakan Ammonium sulfat

Garam yang digunakan dalam penelitian ini adalah ammonium sulfat.

Ammonium sulfat dipilih karena murah, larut pada suhu rendah, fleksibel terhadap berbagai pH dan mudah larut dibandingkan garam lainnya sehingga memudahkan saat pemisahan dengan endapan protein menggunakan sentrifugasi. Fraksinasi bertingkat dengan menggunakan ammonium sulfat untuk memperoleh endapan protein yang berbeda beda terhadap konsentrasi netral garam sehingga diperoleh F₁ , F₂ , F₃ , F₄ dan F₅ . Garam yang biasa digunakan untuk mengendapkan enzim dan protein adalah ammonium sulfat. Hal ini dikarenakan ammonium sulfat memiliki beberapa kelebihan yaitu (1). kebanyakan enzim tahan terhadap garam tersebut (tidak terdenaturasi), (2). memiliki kelarutan yang besar dalam air, (3). mempunyai daya pengendap yang cukup besar, (4). mempunyai efek penstabil terhadap kebanyakan enzim.

Dalam proses fraksinasi bertingkat ini , molekul amonium sulfat akan berkompetisi dengan molekul protein untuk berikatan dengan molekul air .

Amonium sulfat bersifat lebih polar daripada protein . Berdasarkan prinsip like dissolve like maka air bersifat polar akan cenderung tertarik ke molekul

ammonium sulfat sehingga protein akan mengendap , dan proses ini disebut *salting out*. Garam amonium sulfat sangat efektif untuk mengendapkan protein karena sebagian besar protein tahan terhadap garam tersebut , kelarutannya besar dalam air , mempunyai efek menstabilkan terhadap sebagian besar enzim dan merupakan garam divalen yang mempunyai kekuatan ion yang lebih besar daripada garam monovalen . Pada tahap fraksinasi amonium sulfat bertingkat diperoleh fraksi - fraksi enzim dengan tingkat kejenuhan F_1 (0-20 %) , F_2 (20-40 %) , F_3 (40-60 %) , F_4 (60-80 %) dan F_5 (80-100 %) dimana dalam salah satu fraksi tersebut akan diperoleh kinitase dengan aktivitas spesifik tertinggi . Pelarut yang bersifat polar mampu mengekstrak senyawa alkaloid kuartener, komponen fenolik, karotenoid, tanin, gula, asam amino, dan glikosida. Pelarut non polar mampu mengekstrak senyawa kimia seperti lilin, lipid, dan minyak yang mudah menguap (Putranti, 2013).

Proses pengendapan enzim dengan menggunakan garam anorganik memiliki dua tujuan utama, yaitu sebagai tahap awal pemurnian enzim dan meningkatkan konsentrasi enzim. Penambahan garam anorganik kedalam larutan enzim akan mempengaruhi kelarutan enzim. Pada konsentrasi garam rendah, maka kelarutan beberapa enzim dalam air bertambah, efek ini dikenal dengan *salting in*. Pada konsentrasi garam cukup tinggi, maka kelarutan enzim dalam air akan menurun, sehingga enzim dapat mengendap secara sempurna dari larutan, efek ini dikenal dengan *salting out*. Efek *salting out* disebabkan karena adanya konsentrasi garam yang tinggi akan menarik sebagian besar molekul air yang menghidrolisis protein, sehingga mengurangi kelarutan enzim tersebut (Wiseman, 1985).

H. Dialisis

Dialisis adalah proses pemisahan terlarut berdasarkan ukuran molekul tersebut. Pada proses dialisis, protein dapat dipisahkan dari senyawa dengan berat molekuler low yang ada di dalam ekstrak sel atau jaringan. Molekul protein ditahan di dalam kantong seperti selofan yang terbuat dari senyawa berpori yang sangat halus.

Secara umum, proses dialisis berlangsung sebagai berikut, larutan protein atau enzim dimasukkan ke dalam suatu kantong dialisis yang terbuat dari membran ukuran pori tertentu. Jika kantong yang mengandung larutan enzim tersebut diletakkan di dalam buffer sambil diputar dengan jenis pengaduk, maka molekul kecil yang terdapat di dalam larutan enzim seperti garam anorganik akan keluar melewati pori-pori membran, sedangkan molekul enzim yang berukuran besar tetap bertahan di dalam kantong dialisis. Keluarnya molekul kecil akan menyebabkan distribusi ion-ion yang tidak seimbang di dalam dan di luar kantong dialisis. Untuk memperkecil pengaruh ini digunakan larutan buffer dengan konsentrasi yang rendah di luar kantong dialisis (Lehninger, 1982).

Salah satu metode yang digunakan untuk meningkatkan kemurnian enzim adalah dialisis. Prinsip dialisis yaitu memisahkan molekul-molekul besar dari molekul-molekul kecil dengan bantuan membran semipermeable. Dialisis berfungsi untuk memisahkan garam-garam anorganik agar tidak mengganggu tahap pemurnian enzim selanjutnya. Dialisis dapat dilakukan dengan menggunakan kantong selofan, kantong ini memiliki ukuran pori-pori yang lebih kecil dari ukuran protein sehingga protein tidak dapat keluar dari kantong selofan. Penggunaan kantong selofan memiliki beberapa keuntungan yaitu mudah digunakan, memiliki harga yang relatif murah dan mudah didapatkan (Kristanti, 2001).

I. Metode Pengujian Aktivitas Enzim Kitinase Spektrofotometri UV-Vis

Metode spektrofotometri merupakan metode pengukuran secara kuantitatif yang didasarkan pada sifat pantulan atau transmisi suatu material sebagai fungsi panjang gelombang. Spektrofotometer merupakan jenis alat fotometer (alat untuk mengukur intensitas cahaya) yang dapat mengukur intensitas sebagai fungsi dari panjang gelombang sumber cahaya. Peralatan spektrofotometer UV-vis beberapa dimanfaatkan untuk penentuan asam urat dalam urin karena merupakan prosedur yang menarik dan banyak digunakan dalam analisis, salah satunya analisis suatu percobaan dalam laboratorium (Hamzah, 2013).

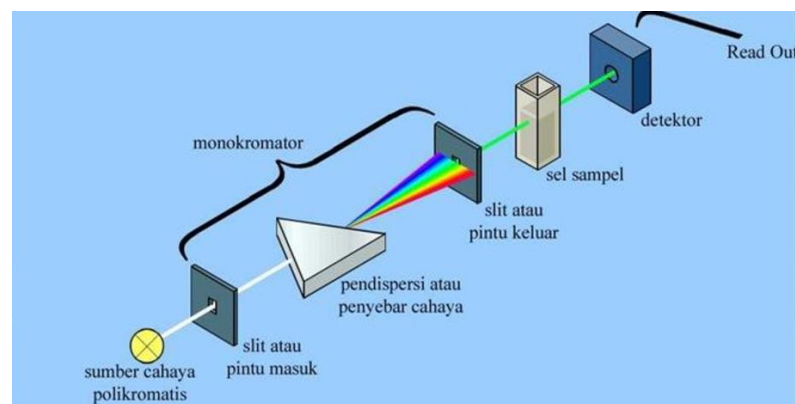
Radiasi atau cahaya putih yang dilewatkan melalui larutan berwarna, maka radiasi dengan panjang gelombang tertentu akan diserap (absorpsi) secara selektif dan radiasi lainnya akan diteruskan (transmisi). Absorbansi adalah perbandingan intensitas sinar yang diserap dengan intensitas sinar datang. Nilai absorbansi ini akan bergantung pada kadar zat yang terkandung di dalamnya, semakin banyak kadar zat yang terkandung dalam suatu sampel maka semakin banyak molekul yang akan menyerap cahaya pada panjang gelombang tertentu sehingga nilai absorbansi semakin besar (absorbansi akan berbanding lurus dengan konsentrasi zat yang terkandung didalam suatu sampel). Cahaya yang diserap dan dapat terukur disebut sebagai absorbansi (A) sedangkan cahaya yang dihamburkan dapat terukur sebagai transmitansi (T) melalui dasar-dasar hukum Lambert-Beer. Hukum Lambert-Beer menyatakan bahwa jumlah radiasi cahaya tampak yang diserap atau ditransmisikan oleh suatu larutan merupakan suatu fungsi eksponen dari konsentrasi zat dan ketebalan dari sel (kuvet) (Neldawati *et al.*, 2013).

Spektrofotometri merupakan salah satu metode dalam kimia analisis yang digunakan untuk menentukan komposisi suatu sampel baik secara kuantitatif dan kualitatif yang didasarkan pada interaksi antara materi dengan cahaya. Peralatan yang digunakan dalam spektrofotometri disebut spektrofotometer. Cahaya yang dimaksud dapat berupa cahaya visibel, UV dan inframerah, sedangkan materi dapat berupa atom dan molekul namun yang lebih berperan adalah elektron valensi (Khopkar, 2003). Spektroskopi UV-Vis telah menjadi salah satu teknik spektroskopi absorpsi yang banyak dimanfaatkan karena relatif sederhana dan praktis digunakan dalam berbagai jenis analisis, misalnya senyawa organik, anorganik, maupun dalam bidang mikrobiologi (Day *et al.*, 2002).

Spektrofotometri Uv-Vis digunakan untuk mengukur aktivitas enzim kitinase pada isolat (biakan) murni. Aktivitas enzim kitinase dihitung berdasarkan N-asetil glukosamin yang terbentuk dari hidrolisis kitin dimana N-asetil glukosamin digunakan sebagai kurva standar. Pengukuran menggunakan spektrofotometer UV-Vis yang diukur dengan absorbansi pada panjang gelombang 540-585nm.

Spektrofotometer ultra-violet dan sinar tampak dalam analisis kimia adalah untuk analisis kualitatif dan kuantitatif. Metode spektrofotometri ultra-violet dan sinar tampak berdasarkan pada hukum Lambert-Beer. Hukum tersebut menyatakan bahwa jumlah radiasi cahaya tampak, ultra-violet dan cahaya-cahaya lain yang diserap atau ditransmisikan oleh suatu larutan merupakan suatu fungsi eksponen dari konsentrasi zat dan tebal larutan. Metode ini memerlukan suatu proses pengompleksan sehingga dapat membentuk warna yang spesifik pada larutan agar terukur dalam spektrofotometer UV-Vis (Kurniawati dan Djarot, 2016).

Prinsip kerja spektrofotometer UV-Vis yaitu sinar polikromatis dari sumber sinar melewati monokromator menghasilkan sinar monokromatis, kemudian sinar tersebut dilewatkan melalui kuvet yang berisi larutan sampel sehingga menghasilkan sinar yang ditransmisikan dan diterima oleh detektor untuk diubah menjadi energi listrik yang kekuatannya dapat diamati oleh alat pembaca



Gambar 4. Spektrofotometri UV-Visible (Suhartati, 2017).

Spektrofotometer UV-Vis adalah instrumen yang berfungsi untuk mengukur serapan yang diperoleh dari interaksi kimia antara radiasi elektromagnetik dengan atom atau molekul dari zat kimia yang diamati pada daerah UV-Vis. Prinsip dasar dari spektrofotometer UV-Vis adalah hasil interaksi antara gelombang elektromagnetik dengan molekul yang menghasilkan spektrum-spektrum tertentu yang berbeda pada setiap senyawa. Pengukuran ini dapat

terjadi apabila energi tersebut ditransmisikan, diemisikan atau direfleksikan sebagai fungsi dari panjang gelombang.

Penentuan aktivitas kitinase dari ekstrak kasar enzim dilakukan dengan menggunakan koloid kitin. Penggunaan koloid kitin sebagai substrat pada proses pengukuran aktivitas kitinase disamping lebih murni juga memiliki kelarutan yang lebih besar dibandingkan dengan kulit kepiting preparatif. Karena substrat dalam bentuk koloid, enzim lebih mudah kontak dengan substrat pada permukaan yang lebih luas.

Aktivitas enzim dipengaruhi oleh beberapa faktor lingkungannya seperti temperatur, keasaman (pH), konsentrasi substrat, konsentrasi enzim dan aktivator. Ada beberapa faktor utama yang mempengaruhi aktivitas enzim adalah konsentrasi enzim, substrat, senyawa inhibitor dan aktivator, pH serta temperatur lingkungan.

Enzim membutuhkan pH tertentu untuk menjalankan aktivitasnya. Enzim membutuhkan pH yang berbeda-beda. Ada enzim yang dapat bekerja optimal pada pH tinggi dan ada pula yang bekerja optimal pada pH yang rendah. Jika pH terlalu tinggi atau terlalu rendah enzim akan mengalami denaturasi dan ini akan mengakibatkan menurunnya aktivitas enzim (Dewi, 2008).

III METODE PENELITIAN

A. Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Juni 2022 sampai Desember 2022 di Laboratorium Biopolimer dan Laboratorium UPT-LTSIT Universitas Lampung, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Lampung.

B. Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain : pipet tetes, cawan petri, gelas beaker, erlenmeyer, gelas ukur, labu ukur, corong pisah 100 mL, botol kaca, jarum ose, labu evap, kertas saring, micro tip biru, bunsen, *magnetic stirrer*, batang pengaduk, spatula, tabung reaksi, kapas, kasa, indikator universal, spatula, pengaduk, neraca analitik, blender, oven, laminar air flow, inkubator, autoclave Tomy SX-700, sentrifuse Hitachi CF 16RX II, mikroskop Zeiss axio A1, *Rotary evaporator* Buchii/R210, drying oven Jisico, dan spektrofotometer UV-Vis.

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian yaitu kulit udang, koloid kitin, agar plain, isolat 19C38A1, aquades, Bovine Serum Albumin (BSA), Dinitrosalicylic Acid (DNS), air laut buatan, HCl, NaOH, Na(K) tartrat, Ammonium sulfat, dan buffer fosfat.

C. Prosedur Penelitian

1. Persiapan Sampel Kulit Udang dan Koloid Kitin

Limbah kulit dibersihkan dan dikeringkan sehingga diperoleh kulit udang kering yang akan digunakan sebagai bahan baku substrat. Kitin dibuat dengan merujuk pada Hendri dkk (2007). Kitin dibuat dari limbah kulit udang kering yang ditambahkan NaOH 3,5% dengan perbandingan 1 : 10, diaduk pada magnetic stirrer selama 1 jam dan disaring. Residu ditambahkan HCl 12N dengan perbandingan yang sama yaitu 1 : 10, lalu diaduk dengan magnetic stirrer, disaring, dan dilakukan pencucian dengan aquadest 2 L dan disentrifus selama 5 menit dengan kecepatan 7000 rpm dan residu yang terbentuk di ambil serta dicuci kembali dengan aquadest sebanyak 2 L dan di sentrifus kembali, perlakuan ini di ulangi sampai pH netral. Setelah itu, residu yang sudah terbentuk dipindahkan ke dalam wadah dan disimpan di kulkas.

2. Pembuatan Media Koloid Kitin

Tahapan berikutnya adalah pembuatan media koloid kitin sebagai substrat. Media koloid kitin dibuat dengan merujuk pada Setiawan (2022). Media koloid kitin dibuat dengan perbandingan 1:2 antara kitin dan agar, dimana terdiri dari 1% koloid kitin : 2% agar swallow yang dilarutkan dalam 175 mL air laut buatan, disterilisasi dengan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C, selama 15 menit. Larutan dituangkan ke dalam cawan petri dan didiamkan hingga memadat.

3. Peremajaan Enzim Kitinase Isolat *Actinomyces* 19C38A1

Pembuatan media koloid kitin sebagai substrat. Media koloid kitin dibuat dengan merujuk pada Saima and Roohi (2013) dengan beberapa modifikasi. Media koloid kitin dibuat dengan perbandingan 1:2, dimana terdiri dari 1% koloid kitin : 2% agar yang dilarutkan dalam 175 mL air laut buatan. Dilanjutkan dengan sterilisasi

menggunakan autoklaf pada suhu 121°C, selama 15 menit. Larutan dituangkan ke dalam cawan petri dan didiamkan hingga memadat.

Isolat *Actinomycetes* 19C38A1 diperoleh dari perairan Gorontalo koleksi laboratorium UPT LTSIT Unila, dilakukan penapisan enzim kitinase dari isolat *Actinomycetes* 19C38A1 dengan menggunakan media koloid kitin. Proses penapisan diawali dengan penggoresan isolat *Actinomycetes* di atas media koloid kitin dengan 3 media koloid yang digores dengan metode zig-zag dan 3 media dengan metode zona bening dan isolat diinkubasi pada temperatur ruang selama 14 hari.

4. Identifikasi Morfologi *Actinomycetes*

Isolat terpilih diidentifikasi menggunakan metode *coverslip culture* merujuk pada (Prakash and Bhargava, 2016). *Coverglass* ukuran 22x22 mm ditempelkan ke media agar pada sudut 45° dan diinokulasikan koloni mikroba strain terpilih berdekatan dengan *coverglass*. Diinkubasi 7 sampai 14 hari, setelah itu *coverglass* diambil secara perlahan dari media agar dan ditempelkan pada kaca objek. Diamati dibawah mikroskop dan diidentifikasi morfologinya serta didokumentasikan hasilnya.

5. Pembuatan Inokulum *Actinomycetes* 19C38A1

Media cair kitin dibuat dengan merujuk pada Prrasomsri et al (2012). Dilakukan pembuatan inokulum dari isolat yang sudah diinkubasi pada temperatur ruang selama 14 hari pada suhu 25°C. Ditimbang 0,2 gram koloid kitin dan ditambahkan 20 mL air laut buatan kedalam per botol kaca lalu dihomogenkan serta diberi sumbat setelah itu di autoklaf, didiamkan sampai dingin lalu dimasukkan strain 3 kali ose setelah itu diinkubasi selama 14 hari.

6. Kultivasi *Actinomyces* 19C38A1 pada Media Kulit Udang

Produksi kitinase dilakukan pada botol kaca yang terisi 20 gram kulit udang kering sebagai media produksi. Ditambahkan 20 mL buffer fosfat pH 6 atau 7 atau 8. Disterilisasi pada 1 atm selama 15 menit. Tahap selanjutnya media diinokulasi dengan 20 ml suspensi *actinomyces* dan diinkubasi pada temperatur ruang. Diisolasi 14 hari dengan tahapan menurut Suresh (2012). Pada tahapan ini dilakukan variasi waktu inkubasi dan variasi pH. Pada variasi waktu dilakukan selama 14 hari yang diisolasi per-2 hari, dilakukan untuk mengetahui waktu optimum untuk memperoleh aktivitas terbaik enzim kitinase. Pada penentuan pH optimum enzim kitinase dilakukan dengan cara memvariasikan pH menggunakan buffer fosfat pada pH 6,7,8, untuk mendapatkan pH optimum enzim kitinase. Media kulit udang yang telah diinkubasi ditambahkan 100 ml akuades dan dihomogenkan. Media kulit udang disentrifus selama 15 menit dan supernatan yang dihasilkan merupakan ekstrak kasar enzim. Pengujian enzim kitinase dilakukan menggunakan alat spektrofotometer UV-Vis.

7. Uji Aktivitas Kasar Enzim Kitinase

Hasil kultivasi selama 14 hari yang diisolasi per-2 hari dilanjutkan ke tahap ekstraksi yang merujuk pada Indrawati *et al.*, (2019) yang ditambahkan 100 mL aquades yang dishaker pada kecepatan 175 rpm selama 2 jam. disentrifugasi dengan kecepatan 7000 rpm selama 15 menit pada temperatur 4°C. Supernatan selanjutnya disaring menggunakan kertas saring dan filtrat yang dihasilkan adalah ekstrak kasar enzim. Ekstrak kasar enzim tersebut di uji aktivitasnya dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis dengan metode Mandels.

Uji aktivitas enzim dilakukan dengan merujuk pada Vahed *et al* (2013). Uji konsentrasi aktivitas enzim memiliki tahapan yang sama dengan uji glukosamin, hanya saja pada uji aktivitas enzim terdapat proses reaksi dengan substrat. Uji aktivitas enzim, filtrat (1 ml.) dan substrat (1 mL koloid kitin 1%) diinkubasi pada suhu 40°C selama 30 menit sebelum ditambahkan reagen DNS (2 mL), setelah itu dipanaskan pada 100°C selama 10 menit dan didinginkan. Dibaca absorbansi nya

menggunakan spektrofotometer UV-Vis dengan panjang gelombang 540 nm. Kontrol tiap sampel dibuat dengan perlakuan yang berbeda yaitu penambahan substrat setelah proses inkubasi. Blanko dan larutan standar dengan variasi konsentrasi digunakan sebagai standar. Satu unit aktivitas kitinase didefinisikan sebagai jumlah enzim yang diperlukan untuk melepaskan 1 μmol glukosamin dalam satu menit. Uji aktivitas enzim kitinase dilakukan 3 kali pembacaan.

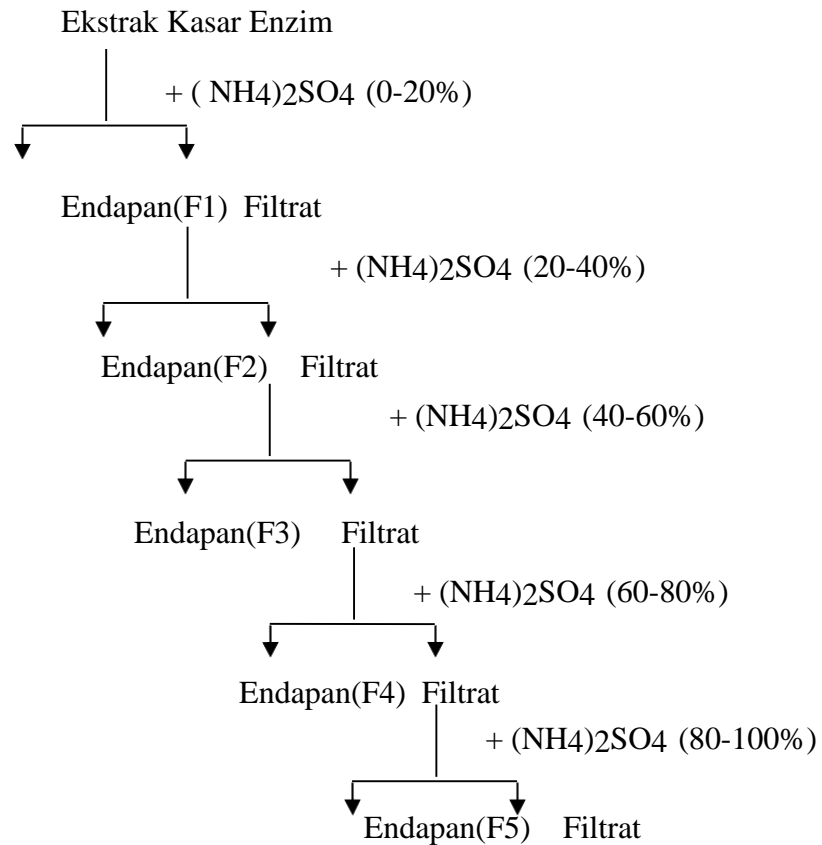
Adapun pada uji kadar protein digunakan 2 mL reagen Bradford yang direaksikan dengan 400 μl filtrat, kemudian diukur absorbansinya dengan panjang gelombang 595 nm. Metode Bradford merupakan uji dengan tujuan untuk mengukur konsentrasi protein total dalam larutan. Pada uji Bradford melibatkan pewarna *Coomassie Brilliant Blue* (CBB) yang akan berikatan dengan protein dalam suatu larutan. Warna yang dihasilkan dapat diukur absorbansinya pada panjang gelombang 465-595 nm (cahaya tampak) (Anam, 2010).

8. Pemurnian Enzim Kitinase

Pemurnian enzim kitinase pada tahapan ini dilakukan sebagai perbandingan hasil enzim kitinase yang diperoleh antara sebelum pemurnian dengan setelah pemurnian enzim. Ekstrak kasar enzim yang telah diperoleh yang sudah didapatkan waktu optimum dan pH optimum dilakukan proses pemurnian dengan metode fraksinasi dengan ammonium sulfat dan dialisis sebagai berikut :

8.1. Fraksinasi Kitinase dengan Ammonium Sulfat

Ekstrak kasar enzim yang diperoleh dimurnikan dengan cara fraksinasi menggunakan garam ammonium sulfat pada berbagai derajat kejenuhan yaitu (0-20)%; (20-40)%; (40-60)%, (60-80)%, dan (80-100)%. Adapun skema fraksinasi dengan ammonium sulfat ditunjukkan pada Gambar 5.



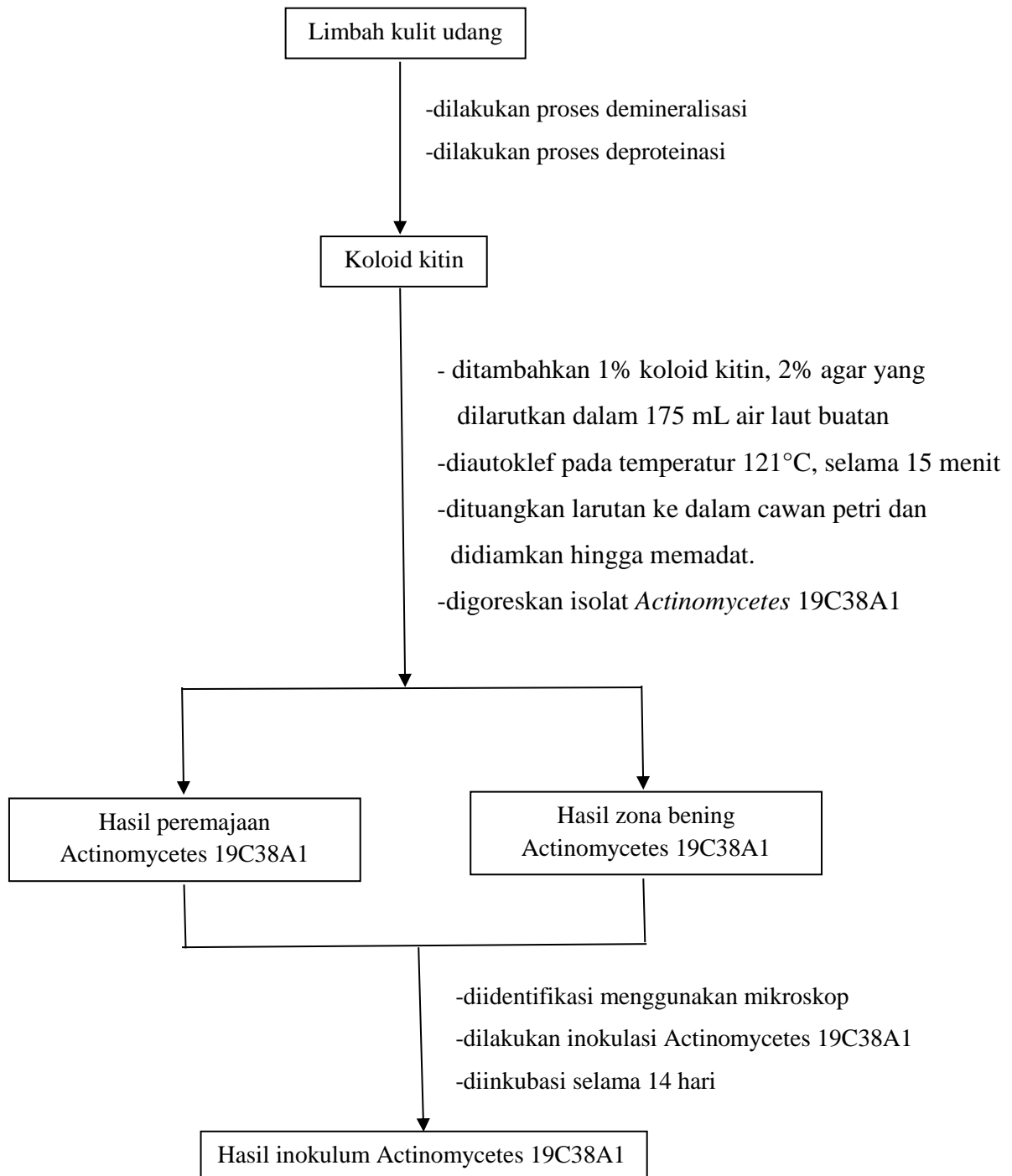
Gambar 5. Skema Fraksinasi dengan Ammonium Sulfat.

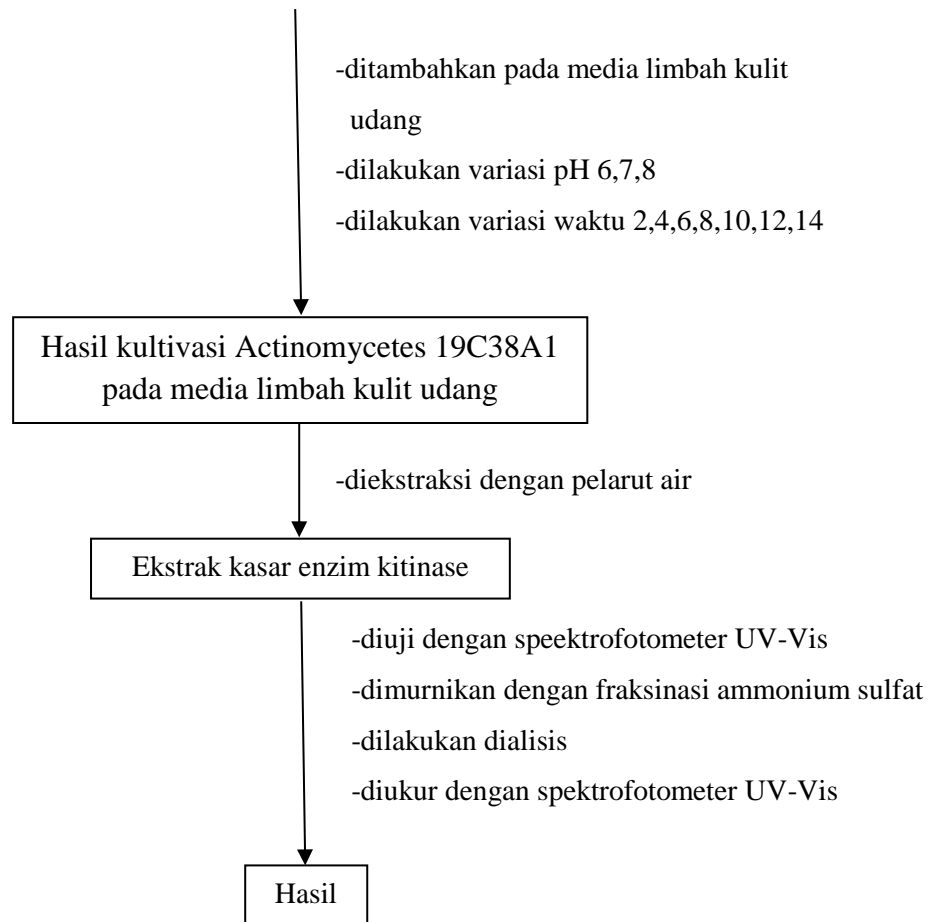
Ekstrak kasar enzim ditambahkan garam ammonium sulfat secara perlahan sambil diaduk dengan *magnetic stirrer*. Endapan protein enzim yang didapatkan pada tiap fraksi kejenuhan ammonium sulfat dipisahkan dari filtratnya dengan sentrifugasi dengan kecepatan 5000 rpm selama 15 menit pada temperatur 4°C. Endapan yang diperoleh dilarutkan dengan buffer fosfat 0,1 M pH 6. Filtrat yang didapat dari fraksi 0-20% digunakan untuk diendapkan kembali dengan fraksi kejenuhan 20-40% dengan prosedur yang sama hingga fraksi kejenuhan 80-100% (Yandri *et al.*,2010).

8.2. Dialisis

Tahap dialisis ini merujuk pada Gangwar *et al.*, (2016) enzim hasil fraksinasi dimasukkan ke dalam kantong selofan dan didialisis dengan buffer fosfat 0,01 M pH 6 selama 24 jam pada temperatur 4°C. Selama proses dialisis, dilakukan pergantian buffer setiap 4 jam agar konsentrasi ion-ion di dalam selofan dapat dikurangi. Proses ini dilakukan secara kontinyu sampai ion-ion di dalam selofan dapat diabaikan. Uji aktivitas dilakukan dengan metode Mandels dengan menggunakan Spektrofotometer UV-Vis dan diukur kadar proteinnya dengan metode bradford.

Skema Prosedur Penelitian





Gambar 6. Skema prosedur penelitian

V. KESIMPULAN DAN SARAN

A. Kesimpulan

Berdasarkan hasil yang didapat dari penelitian ini maka dapat disimpulkan sebagai berikut:

1. Kitin dari limbah kulit udang dapat menghasilkan aktivitas kitinase optimum secara fermentasi padat kulit udang dengan isolat *Actinomyces* setelah diinkubasi selama 12 hari pH 6.
2. Aktivitas optimum ekstrak kasar enzim kitinase dengan aktivitas unit yang diperoleh adalah 0.2224 U/mL, kadar protein 0.00143 mg/mL, aktivitas spesifik sebesar 154.99 U/mg.
3. Fraksinasi pola 20-85% diperoleh hasil optimum dengan aktivitas unit yang cukup tinggi yaitu 0.3914 U/mL, kadar protein sebesar 0.0013 mg/mL dan aktivitas spesifik sebesar 304.8150 U/mg.
4. Dialisis optimum yang dihasilkan pada penelitian ini adalah dengan aktivitas unit yang diperoleh adalah 0.4327 (U/mL), kadar protein sebesar 0.0008 (mg/mL) dan aktivitas spesifik sebesar 528.852 (U/mg).
5. Tingkat kemurnian pada tahap fraksinasi adalah 1.97 kali sedangkan tahap pemurnian pada tahap dialisis adalah 3.41 kali.

B. Saran

Berdasarkan hasil penelitian yang diperoleh, disarankan penelitian lebih lanjut mengenai fermentasi padat kulit udang dengan variasi temperatur dan waktu, serta melakukan uji menggunakan kromatografi dan elektroforesis.

DAFTAR PUSTAKA

- Arif, A., R. 2013. “Potensi Kitin Deasetilase dari *Bacillus Licheniformis* HSA3-1A untuk Produksi Kitosan dari Limbah Udang Putih (*Penaeus Merguensis*) Sebagai Bahan Pengawet Bakso Ikan”. Program Pascasarjan Universitas Hasanuddin. Makassar.
- Agustina, S., I. M. D., Swantara, I. N., dan Suartha. 2015. Isolasi kitin, karakterisasi, dan sintesis kitosan dari kulit udang. *Jurnal Kimia*. 9(2) : 271- 278.
- Anam, K. 2010. *Pengukuran Kadar Protein dengan Metode Bradford*. Bioteknologi Sekolah Pascasarjana Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Anandan, R., Dharumadurai, D., and Manogaran, G. P. 2016. An Introduction to Actinobacteria. *Intech tourism*. 13.
- Anggraini, W. 2015. Pengaruh Ph Terhadap Aktivitas Enzim Kitinase dari Isolat Actinomycetes dengan Metode Somogyi-Nelson. *Jurnal Ilmiah Pendidikan Fisika Al-Biruni*. 4(2).
- Ansel, H., C. 2008. *Pengantar Bentuk Sediaan Farmasi*. Penerbit Universitas Indonesia (UI-Press). Jakarta.
- Awaliyah, K., Anastasya, A., Nursan., dan Risnawati. 2016. *Isolasi Protein dan Western Blot*. Kediri.
- Barka, E. A., Vatsa, P., Sanchez, L., Gaveau-Vaillant, N., Jacquard, C., Meier-Kolthoff, J. P., Klenk, H. P., Clément, C., Ouhdouch, Y., and van Wezel, P. 2016. Correction for Barka et al., Taxonomy, Physiology, and Natural Products of Actinobacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 80(4) : 1–43.
- Brzezinska, M.S., Jankiewicz, U., Burkowska, A., and Walczak, M. 2013. Chitinolytic microorganisms and their possible application in environmental protection. *Current Microbiology* 68 (1) : 71-81.
- Budiutami, A., Sari, N. K., dan Priyamto, S. 2012. Optimasi proses ekstraksi kitin menjadi kitosan dari limbah kulit ulat hongkong. 1(1) : 46-53.

- Busti E., dan Yushi, O. 2006. Media conditions for growing Actinomycetes. *Microbial Res.* 424-427.
- Chen, J. K., Shen, C. R., Liu, C. L. 2010. N-acetylglucosamine: Production and applications. *Journal of Marine Drugs.* 8 : 2493-2516.
- Day, R. A., dan Underwood, A. L. 2002. *Analisis Kimia Kuantitatif Edisi Keenam.* Erlangga. Jakarta.
- Dewi, I. M. 2008. *Isolasi Bakteri dan Uji Aktivitas Kitinase Termofilik Kasar dari Sumber Air Panas Tinggi Raja, Simalungun, Sumatera Utara.* Program Pascasarjana Universitas Sumatera Utara. Medan.
- Enibu, A. 2007. *Characterisation of Chitin and a Study of Its Acid-Catalysed Hydrolysis.* Norwegian University of Science and Technology.
- Gangwar, M., Singh, V., Pandey, A. K., Tripathi, C. K. M., and Mishra, B.N. 2016. Purification and Characterization Of A Chitinase From *Streptomyces violascens* NRRL B2700. *Indian Journal of Experimental Biology.* 54 : 64-71.
- Gohel, V., Singh, A., Vimal, M., Ashwini, P., and Chhatpar, H. S. 2006. Bioprospecting and antifungal potential of chitinolytic microorganism. *African. J. Biotechnol.* 5(2) : 54-72.
- Goyal, S. 2012. E-Learning: Future of Education. *Journal of Education and Learning.* 6(2) : 239-242.
- Haliza, W., dan Suhartono, M. T. 2012. Karakteristik kitinase dari mikrobia. *Buletin Teknologi Pascatanan Pertanian.* 8 (1) : 1-14.
- Hamid, R., Khan, M. A., Ahmad, M., Ahmad, M. M., Musarrat, J., Javed, S. 2014. Chitinases: An Update. *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences.* 5(1) : 21-29.
- Hamzah, H. H., Zain, Z. M., Musa, N. L. W., Lin, Y., Trimbee, E. 2013. Spectrophotometric determination of uric acid in urine based-enzymatic method uricase with 4 aminodiphenylamine diazonium sulfate (variamine blue RT salt). *Journal Analytical Bioanalytical Technique.* (57):1-6.
- Hendri, J., Desi, I., Aspita, L., dan Irwan G. S. 2007. Pembuatan Asetilglukosamin Secara Enzimatik Dari Kulit Udang dan Kepiting. *Jurnal Ilmiah MIPA (JIM).* 10 (2).
- Hendry, J. 2008. *Teknik Deproteinasi Kulit Rajungan (Portonius pelagious) secara Enzimatik dengan menggunakan Bakteri Pseudomonas aeruginosa untuk Pembuatan Polimer Kitin dan Deasetilasinya.* Universitas Lampung. Lampung.

- Herdyastuti, N, T. J., Raharjo, M., and Matsjeh, S. 2009. Chitinase And chitinolytic microorganism : Isolation, characterization and potential. *Indon. J. Chem.* 9 (1) : 37-47.
- Indrawati, D., Susilowati, A., Atmojo, D. P., dan Mulyana, N. 2019. Efektivitas enzim kasar kitinase dari jamur *Trichoderma viride* yang diiradiasi oleh sinar gamma terhadap degradasi cangkang telur nematoda *Haemonchus contortus* pada ternak domba. *Jurnal Ilmu-Ilmu Peternakan*.
- Karmas, E. 1982. *Poultry and Seafood Technology*. Noyes Data Corporation. USA.
- Khopkar, S. M. 2003. *Konsep Dasar Kimia Analitik*. UI Press. Jakarta.
- Kristanti, N. D. 2001. *Pemurnian Parsial dan Karakterisasi Lipase Ekstraseluler dari Kapang *Rhizopus oryzae* TR 32*. Tesis. Program Pascasarjana IPB. Bogor.
- Kumala, T., A. Jayuska, dan P. Ardiningsih. 2015. Uji Aktivitas Antibakteri Isolat *Actinomycetes* 9ISP1 dari Spons Asal Perairan Pulau Randayan. *Jurnal JKK*. 4(2) : 30-36.
- Kurniawati., Suerni., dan Djarot, S. 2016. Perbandingan Kadar Fe (II) dalam Tablet Penambah Darah secara Spektrofotometri UV-Vis yang Dipreparasi Menggunakan Metode Destruksi Basah dan Destruksi Kering. *J. Sains dan Seni* 5. 1: 2337-3520.
- Kurita, K. 2006. Chitin and Chitosan: Functional Biopolymers from Marine Crustaceans. *Macromolecular Biotechnology*. 8(3) : 203–226.
- Lehninger, A. L. 1982, *Dasar-dasar Biokimia Jilid 1 Alih Bahasa, Maggi Thenawijaya*. Erlangga, Jakarta.
- Li, Q., Chen, X., Jiang, Y., and Jiang, C. 2016. Morphological Identification of Actinobacteria. *Intech, i(tourism)*. 13.
- Magarvey, N., Keller, J., Bernan, V., Dworkin, M., and Sherman, D. 2004. Isolation and Characterization of Novel Marine-Derived Actinomycete Taxa Rich in Bioactive Metabolites. *Applied and Environmental Microbiology*. 70(12) : 7520–7529.
- Marganov. 2003. *Potensi Limbah Udang Sebagai Penyerap Logam Berat (Timbal, Kadmium, dan Tembaga) di Perairan Dissertation*. IPB. Bogor.
- Marguerite,R. 2012. *Physical properties of chitosan and derivatives in sol and gel states. In Chitosan-Based Systems for Biopharmaceuticals: Delivery, Targeting and Polymer Therapeutics*. Chichester, UK: John Wiley & Sons, 23–44.

- Marzuki, I., Alwi, R. S., Erniati, M. S., dan 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.
- Mulyani, N. S., Asy'ari, M., dan Prasetyoningsih, H. 2009. Penentuan Konsentrasi Optimum Oat Spelt Xylan Pada Produksi Xilanase dari *Aspergillus niger* Dalam Media PDB (Potato Dextrose Broth). *Journal Kimia Sains & Aplikasi*. (12) : 1 – 10.
- Narayana, K., Vijayalakshmi, M. 2009. Chitinase Production by *Streptomyces* sp. ANU 6277. *J. Microbial*. 40 : 725-733.
- Neldawati., Ratnawulan., dan Gusnedi. 2013. Analisis nilai absorbansi dalam penentuan kadar flavonoid untuk berbagai jenis daun tanaman obat. *Pillar of Physics*. 2 : 76-83.
- Prakash, P. Y., and Bhargava, K. 2016. A modified micro chamber agar spot slide culture technique for microscopic examination of filamentous fungi. *Journal of Microbiological Methods*. 123 : 126–129.
- Prrasomsri, D., Upprachan, S., and Malison, K. 2012. *Isolation of Actinomycetes for Chitinase Production*. Science and Engineering Symposium. Thailand.
- Pratiwi, R.S., Susanto, T.E., Wardani, Y. A. K., Sutrisno, A. 2014. Enzim kitinase dan aplikasi di bidang industri. *Jurnal Pangan dan Agroindustri*, 3(3) : 878-887.
- Pomeranz, Y. 2012. *Functional Properties of Food Components*. Elsevier. Florida.
- Purwanti, A. 2014. Evaluasi Proses Pengolahan Limbah Kulit Udang Untuk Meningkatkan Mutu Kitosan Yang Dihasilkan. *Jurnal Teknologi*. 7(1) : 83–90.
- Putranti, R. I. 2013. *Skrining Fitokimia dan Aktivitas Antioksidan Ekstrak Rumput Laut Sargassum duplicatum dan Turbinaria ornata dari Jepara*. Tesis. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, UNDIP. Semarang.
- Remya, M., dan Vijayakumar, R. 2008. Isolation and characterization of marine antagonistic actinomycetes from west coast of India. *Medicine and Biology*. 15(1) : 13 – 19.
- Reny, I. S., Wuryanti., dan Sriatun. 2013. Isolasi dan Karakterisasi Kitinase dari Isolat Jamur Akuatik Kitinolitik berasal dari Kupu-kupu (Lepidoptera). Diponegoro University, Semarang. *Jurnal Kimia Sains dan Aplikasi* 16 (3): 97-101.

- Rochima, E. 2006. Pemurnian dan karakterisasi Kitin Deasetilase Termotabil dari *Bacillus papandayan* Asal Kawah Kamojang Jawa Barat. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Padjadjaran, Jatinagor. Bandung. 8 : 193-209.
- Rondang, T. 2002. *Proses Pembuatan Asam Lemak Secara Langsung dari Buah Kelapa Sawit*. Jurusan Teknik Kimia. Sumatera.
- Sadikin, M. 2012. *Biokimia Enzim*. Widya Medika. Jakarta.
- Saima, M. K., and Roohi, I. Z. A. 2013. Isolation of Novel Chitinolytic Bacteria and Production Optimization of Extracellular Chitinase. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*. 11 : 39–46.
- Senja., Yulia., Rima. 2004. Perbandingan Metode Ekstraksi dan Variasi Pelarut Terhadap Rendemen dan Aktivitas antioksidan Ekstrak Kubis Ungu (*Brassica oleracea L var. Capitata f. Rubra*). *Journal of Faculty Of Pharmacy Universitas Gadjah Mada*. Bandung.
- Setiawan, A., Setiawan F., Juliasih, N.L.G.R., Widyastuti, W., Laila, A., Setiawan WA., Djailani, F.M., Mulyono , M., Hendri, J., and Arai, M. 2022. *Fungicide Activity of Culture Extract from Kocuria palustris 19C38A1 against Fusarium oxysporum*. *Journal of Fungi*. 8(3) : 280.
- Setyahadi, S. 2006. *Pengembangan proses produksi secara mikrobiologi*. Presented at Seminar Nasional Chitin-Chitosan. THP FPIK-IPB. Bogor.
- Shakeel, A., dan Ikram, S. 2017. Chilosan : Derivates, Composites, and Application. *John Willey and Sons, Inc*. 6.8.
- Suhartati, T. 2017. *Dasar-Dasar Spektrofotometri UV-Vis dan Spektrofotometri Massa untuk Penentuan Senyawa Organik Lampung*. AURA.
- Sumardjo, D. 2006. *Pengantar kimia*. Buku Kedokteran EGC. Jakarta.
- Vahed, M., Motalebi, E., Rigi, G., Noghabi, K. A., Soedi, M. R., Sadeghi, M., and Ahmadian, G. 2013. Improving The Chitinolytic Activity Of *Bacillus pumilus* SG2 By Random Mutagenesis. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 23(11) : 1519-1528.
- Ventura, M., Canchaya, C., Tauch, A., Chandra, G., Fitzgerald, G.F., Chater, K.F., and Van Sinderen, D. 2007. Genomics of Actinobacteria: Tracing the evolutionary history of an ancient phylum. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 71 : 495-548.
- Waluyo, L. 2009. *Mikrobiologi Lingkungan*. UMM Press. Malang.

- Wiseman, A. 1985. *Handbook of Enzyme Biotechnology 2rd*. Guelford. England.
- Yandri, Y., Suhartati, T., and Hadi, S. 2010. Purification and Characterization of Extracellular α -Amilase Enzyme from Local Bacteria Isolate *Bacillus subtilis* ITBCCB148. *European Journal of Scientific Research*. 39 (1) : 64-74.
- Yati, S. S. 2009. Kondisi optimum produksi dari *Actinomyces* dengan Karakterisasi pH dan suhu enzim. *Jurnal Berkala Penelitian Hayati*. 57-61.