

PENGARUH pH TERHADAP AKTIVITAS ENZIM KITINASE DARI ISOLAT *ACTINOMYCETES* DENGAN METODE SOMOGYI-NELSON

Welly Anggraeni

Program Studi Pendidikan Fisika IAIN Raden Intan Lampung

Diterima: 5 Agustus 2015 Disetujui: 10 Oktober 2015. Dipublikasikan: Oktober 2015

Abstract: The pH effect on chitinase enzyme activity of actinomycetes isolate by Somogyi-Nelson method has been done. Chitinase enzymes can be produced by chitinolytic microorganisms, actinomycetes. This actinomycetes is taken from Mangrove from Coastal Ringgung of Teluk Lampung Waters, and has been isolated in previous research. The actinomycetes isolates used were ANL-12, ANL-9, ANLd-2b-3, and ANL-4, with chitinolytic activity of 1.9 cm, 2.0 cm, 2.3 cm, and 5.0 cm. The ANL-4 isolate, which has the largest chitinolytic activity, was selected for the next process, the solid state fermentation process (SSF) by the Somogyi-Nelson method. For this SSF process is done in one place. Chitinase enzyme activity was measured using microplate reader by the somogyi-Nelson method. enzyme activity is calculated by measuring the amount of glucose released in $\mu\text{g} / \text{ml}$ rough enzyme / hour (U / mL) by substrate reaction under certain conditions. From the research data showed that the purification enzyme had optimum activity at pH 7.0 with unit activity of 11,166 U / mL , while on chitin substrate without washing with NaOH yield optimum activity at pH 6 with unit activity equal to 10,929 U / ml .

Abstrak: Telah dilakukan pengaruh pH terhadap aktivitas enzim kitinase dari isolat *actinomycetes* dengan metode Somogyi-Nelson. Enzim kitinase dapat diproduksi oleh mikroorganisme kitinolitik, yaitu *actinomycetes*. *Actinomycetes* ini diambil dari Lumpur Hutan Bakau asal Pantai Ringgung Perairan Teluk Lampung, dan telah diisolasi pada penelitian sebelumnya. Isolat *actinomycetes* yang digunakan adalah ANL-12, ANL-9, ANLd-2b-3, dan ANL-4, dengan memiliki aktivitas kitinolitik berturut-turut 1,9 cm, 2,0 cm, 2,3 cm, dan 5,0 cm. Isolat ANL-4 yang memiliki aktivitas kitinolitik terbesar ini dipilih untuk proses selanjutnya, yaitu proses *Solid State Fermentation* (SSF) dengan metode Somogyi-Nelson. Untuk proses SSF ini dilakukan dalam satu tempat. Aktivitas enzim kitinase diukur menggunakan *microplate reader* dengan metode Somogyi-Nelson. Aktivitas enzim dihitung dengan mengukur jumlah glukosa yang dilepaskan dalam $\mu\text{g}/\text{ml}$ enzim kasar/jam (U/mL) oleh reaksi substrat dengan kondisi tertentu. Dari data penelitian menunjukkan bahwa enzim hasil pemurnian mempunyai aktivitas optimum pada pH 7,0 dengan aktivitas unit sebesar 11,166 U/mL , sedangkan pada substrat kitin tanpa dicuci dengan NaOH menghasilkan aktivitas optimum pada pH 6 dengan aktivitas unit sebesar 10,929 U/mL .

Kata Kunci : *actinomycetes, kitin, kitinase, solid state fermentation (SSF)*

PENDAHULUAN

Udang di Indonesia pada umumnya diekspor dalam bentuk udang beku (30%-75%) yang telah dibuang bagian kepala, kulit, dan ekornya (Purwanti, 2014). Limbah kulit udang mengandung konstituen utama yang terdiri dari protein, kalsium karbonat, kitin, pigmen, abu, dan lain – lain.

Kitin, polimer berantai lurus tersusun atas residu N-asetilglukosamin melalui ikatan β -(1,4) yang terdapat berlimpah di alam setelah selulosa (Ghose, 1987; Lehninger, 1982; D. Nelson & Cox, 2000). Penyebaran kitin yang relatif luas menjadikan enzim pendegradasi kitin, kitin deasetilase, berpotensi diaplikasikan untuk menghidrolisis kitin menjadi kitosan (GA,

T, & Sandford, 1989; Lee, Joo, Cho, Ha, & Lee, 2000; Nita, 2009). Adanya konfigurasi β - tersebut membuat molekul glukosa mudah untuk membentuk serabut kristal fibriler yang kuat (Winarno, 1995), sehingga untuk merusaknya diperlukan suatu enzim yang spesifik (Alexander, 1977). Enzim spesifik yang digunakan untuk menghidrolisis kitin adalah enzim kitinase (Pratiwi, Susanto, & Yaninda Alpha Kusuma, 2015; Sri, 2004).

Enzim kitinase dapat diproduksi oleh mikroorganisme kitinolitik, salah satunya adalah *actinomycetes* (Remya & Vijayakumar, 2008; Suwandi, 1989), karena *actinomycetes* ini mampu untuk mensintesis metabolit senyawa yang memiliki aktivitas biologis dan spora dari *actinomycetes* sangat esensial untuk biokonversi (Lin & Tanaka, 2006; Xu, Li, & Jiang, 1996).

Actinomycetes merupakan mikroorganisme yang paling efisien dalam menggunakan substrat bagi kelangsungan hidupnya (Ambarwati¹, S, Sembiring, & Subagus, n.d.; Hamidah, Ambarwati, & Peni, 2013; Sulistyani, 2013). Substrat kitin mudah dihidrolisis oleh *actinomycetes* menjadi karbohidrat yang lebih sederhana (Du Toit, Oliver, & Van Biljon, 1984; Volk & Wheeler, 1993), selanjutnya karbohidrat ini akan digunakan dalam memproduksi etanol dengan bantuan fermentasi (Holker, Hofer, & Lenz, 2004; M.Al-Tai, Amira, & Al, 1989; Samsuri et al., 2001).

Proses hidrolisis dan fermentasi ini dapat dilakukan dalam satu tempat, dimana proses ini disebut sebagai proses fermentasi keadaan padat atau disebut *Solid State Fermentation* (SSF) (Pandey, Ricardo, & Larroche. C, 2008; Pandey, Soccoll, & Mitchell, 2000). Proses SSF ini, pertama

kali dikenalkan oleh (Takagi, Abe, Suzuki, Emert, & Yata, 1977) yang berhasil mengkombinasikan enzim kitinase dan yeast *S. cerevisiae* untuk fermentasi gula menjadi etanol. Menurut (Mitchel, D., Krieger, & Berovic, 2006; Moo-Young, 1983) fermentasi keadaan padat (*solid state fermentation*) merupakan proses fermentasi yang melibatkan zat padat dalam suatu fasa cair. Dalam penerapan bioteknologi alternatif, pemanfaatan SSF menggunakan *actinomycetes* pendegradasi kitin pada udang dapat digunakan sebagai bioenergi dan bioproduk yang bermanfaat dengan biaya produksi yang murah (Angenent, Karim, Al-Dahlan, Wrenn, & Domiguez-Espinosa, 2004; Das & Singh, 2004; Rifaat, El-Said, Hassanein, & Selim, 2007; Sukara, 2006).

Berdasarkan hasil penelitian dari (Takagi et al., 1977), maka dalam penelitian ini difokuskan pada pengaruh pH terhadap aktivitas enzim kitinase dari isolat *actinomycetes* dengan metode Somogyi-Nelson. Metode Somogyi-Nelson adalah metode untuk menentukan jumlah perubahan glukosa dengan reagen tembaga dan reagen arsenomolibdat (N. Nelson, 1994). Metode Somogyi-Nelson ini dipilih karena memiliki kemampuan mendeteksi kisaran relatif perubahan gula yang tinggi, sedikit interferensi dari enzim dan biaya yang relatif lebih murah. Untuk proses fermentasi ini dapat dilihat dari karakteristik berdasarkan pH dan aktivitas enzim kitinase (berdasarkan jumlah glukosa yang direduksi) *actinomycetes* pada saat inkubasi (Ohno et al., 1996). Aktivitas enzim kitinase dihitung dari jumlah glukosa

yang dilepaskan dalam $\mu\text{g/mL}$ enzim kasar/jam (U/mL) enzim oleh reaksi substrat dengan kondisi tertentu (Mathivanan, 1995). Tujuan penelitian ini adalah untuk mempelajari kondisi pH optimum dan aktivitas enzim kitinase selama proses reaksi enzim substrat dan mempelajari substrat kitinolitik yang digunakan dalam aktivitas enzim kitinase (Suryanto & Yurnaliza, 2005).

METODE PENELITIAN

Media ISP - 2

Medium ISP-2 terdiri dari 4 g yeast ekstrak, 10 g malt ekstrak, 4 g dekstrosa, dan 20 g agar dilarutkan dalam 1 L air laut steril kemudian diautoklaf. Setelah media sedikit dingin, ditambahkan cycloheximide ($25 \mu\text{g/mL}$) dan nalidixic acid ($25 \mu\text{g/mL}$) (Magarvey, Keller, Bernan, Dworkin, & Sherman, 2004).

Larutan Mineral Garam

Larutan ini terdiri dari 0,4% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,6% NaCl, 0,1% K_2HPO_4 , 0,01% MgSO_4 , 0,01% CaCl, dan 0,5% kitin. Larutan disterilkan pada autoklaf selama 15 menit pada suhu 121°C .

Larutan Pereaksi Lowry

Campurkan 1 mL larutan B dan 1 mL larutan C dengan 98 mL larutan A. Larutan A yaitu 2 % Na_2CO_3 dalam NaOH 0,1 N. Larutan B berupa 1 % $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ dalam akuades. Larutan C terdiri dari 2 % KNa-tartarat dalam akuades. Larutan D adalah Folin - Ciocalteu 1 N.

Larutan Pereaksi Somogyi – Nelson

Larutan A (*copper reagent*) 28 g Na_2HPO_4 dan 40 g garam Rochelle (K-Na-tartarat) dilarutkan dalam 700 mL air destilasi. Larutan dipanaskan dan diaduk hingga larut kemudian didinginkan pada suhu ruang. 100 mL NaOH 1 N dan 80 mL 10% w/v $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ditambahkan 180 g Na_2SO_4 anhidrat kemudian dilarutkan hingga volume akhir mencapai 1 L. Larutan didiamkan pada suhu ruang selama dua hari. Setelah dua hari larutan disaring dan ditaruh dalam botol coklat.

Reagen B (*arsenomolybdate reagent*) 50 g ammonium molybdate dilarutkan dalam 900 mL air destilasi, 42 mL H_2SO_4 pekat ditambahkan dan diaduk. 6 g Natrium arsenat ($\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) dilarutkan dalam 25 mL air destilasi. Larutan ammonium molibdat dan asam ditambahkan pada larutan natrium arsenat. Selanjutnya diinkubasi pada suhu 37°C selama 2 hari. Setelah dua hari larutan disaring dan ditaruh dalam botol coklat.

Larutan Buffer Pospat pH 6,5

Sebanyak 0,964 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ dan 0,8078 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ dilarutkan dalam 100 mL air kemudian dicek pH-nya. Ditambahkan NaOH atau H_3PO_4 bila dibutuhkan. Ini merupakan buffer pospat pH 6,5 1 M.

Pertumbuhan Actinomycetes

Strain *actinomycetes* yang digunakan adalah ANL-4 yang telah berhasil diisolasi dari sedimen mangrove pantai, ciri-ciri strain ini memiliki miselium *aerial* berwarna putih keabuan dan miselium substratnya berwarna krem keabuan. Strain

actinomycetes ditumbuhkan dalam media ISP-2. Selanjutnya 25 µg/mL cycloheximide dan 25 µg/mL nalidixic ditambahkan untuk menghindari kontaminasi jamur dan bakteri (Amorso, Clowell, & Hill, 1998).

Persiapan Inokulum

Spora kultur 7–9 hari dipisahkan dan taruh dalam tabung Erlenmayer 250 mL berisi 100 mL larutan mineral garam. Tabung diletakkan pada shaker dengan kecepatan 175 rpm pada suhu 30°C selama 5 hari.

Fermentasi Keadaan Padat (*Solid State Fermentation*)

Substrat yang digunakan adalah kitin, sebelum digunakan kitin direbus dengan 0,5% NaOH selama satu jam berdasarkan metode (Gray, Hendy, & Dunn, 1978; Sulistianingsih, 2006). Selanjutnya kitin dibilas dengan aquades, lalu disaring dan dikeringkan. Sebanyak 10 g substrat kitin dimasukkan dalam Erlenmayer 250 mL. Substrat kemudian dilembabkan dengan 5 mL larutan mineral garam yang terdiri dari 0,4% (NH₄)₂ SO₄, 0,6% NaCl, 0,1% KH₂PO₄, 0,01% MgSO₄, 0,01% CaCl. pH larutan dikondisikan pada 7,0 dan media disterilisasi pada 1 atm selama 15 menit. Sebanyak 5 mL kultur awal diinokulasikan dalam media kitin dan diinkubasi pada 25°C dengan *shaking* 175 rpm selama 5 hari.

Substrat *Collodial* kitin

Sebanyak 10 g substrat kitin dimasukkan dalam Erlenmayer 500 mL. Substrat kemudian dilembabkan dengan 10

mL larutan HCl, lalu di stirer selama 4 jam. Campuran tersebut ditambahkan dengan 50 mL larutan etanol 95%, di stirer kembali selama 30 menit dan didinginkan pada suhu 20°C. Selanjutnya campuran dicuci dengan 0,1 M buffer sodium phosphate (pH 7), dan di sentrifugasi selama 20 menit pada suhu 4°C. Hasil endapan yang didapatkan didiamkan selama 24 jam (Gijzen, Kuflu, Qutob, & Chernys, 2001; Mathivanan, 1995).

Uji Aktivitas Ekstrak Kasar Enzim

Sejumlah hasil dari fermentasi keadaan padat (*solid state fermentation*) dicampurkan dengan 10 mL air destilasi dengan membiarkan tabung pada *rotary shaker* selama 1 jam pada 200 rpm (Sheehan & Himmel, 1999). Campuran disaring menggunakan kain katun dan filtrat disentrifugasi pada 10.000 rpm selama 20 menit pada suhu 4°C. Supernatan yang diperoleh merupakan ekstrak kasar enzim (Fukamizo, 2000). Kadar protein ditentukan menggunakan metode Lowry dengan menggunakan standar BSA.

Assay Enzim

Pengujian aktivitas kitinase dilakukan menggunakan substrat *collodial* kitin 1% dalam buffer pospat pH 6,5. Aktivitas enzim merupakan jumlah dari glukosa yang dilepaskan dalam µg/mL enzim kasar/jam (U/mL) oleh reaksi substrat dengan kondisi tertentu (Mathivanan, 1995; Paturau, 1982; Rahayu, 1990). Jumlah gula pereduksi yang dilepaskan dalam uji aktivitas kitinase diukur dengan modifikasi metode Nelson dari metode Somogyi dalam (Andansari, Desty Rusdiana, & Achmad, 2014; Widayantil, Ciawi, & Wiwik Susanah, 2013). Total protein ditentukan dengan

menggunakan metode (Lowry, Rosebrough, Farr, & Randall, 1951).

Penentuan pH Optimum

Untuk menentukan pH optimum dilakukan uji aktivitas dengan menggunakan ekstrak kasar enzim kitinase pada variasi pH 6,0; 6,5; 7,0 dan 7,5. Ditambahkan 25 μL substrat enzim kitinase yang pH-nya telah diatur yaitu 6,0; 6,5; 7,0 dan 7,5 dalam *well microplate*. Sebanyak 25 μL ekstrak kasar enzim ditambahkan dalam setiap *well microplate*. Campuran diinkubasi pada temperatur 45°C selama 30 menit dan didinginkan, kemudian diinkubasi kembali di atas penangas air pada temperatur 70°C selama 15 menit. Kadar gula pereduksi dihitung menggunakan metode Somogyi-Nelson.

Metode Somogyi – Nelson

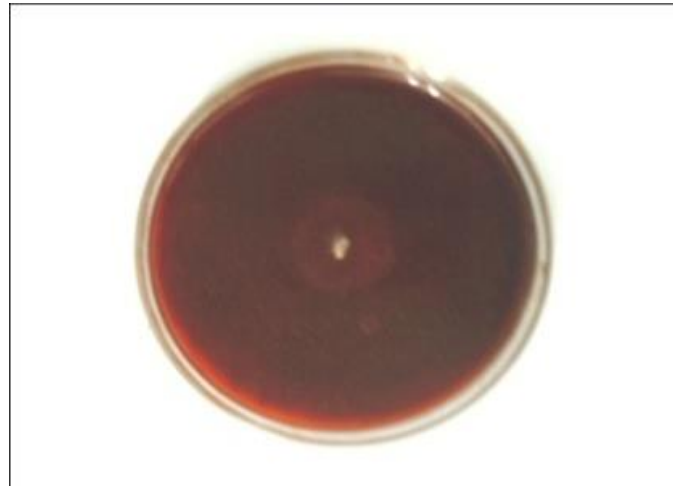
Mikroassay untuk gula pereduksi merupakan modifikasi dari uji aktivitas Somogyi-Nelson dalam 96 *well* mikroplate. Substrat tanpa enzim digunakan sebagai kontrol. Sebanyak 25 μL substrat dalam buffer pospat pH 6,5 dan 25 μL sampel ditaruh dalam setiap *well*. Plat diinkubasi pada suhu 45°C selama 30 menit. Sebanyak 75 μL *copper reagent* ditambahkan dalam setiap *well*. Untuk menghentikan hidrolisis plat diinkubasi pada suhu 80°C selama 10 menit. Sebanyak 20 μL *arsenomolybdate reagent* ditambahkan dan *well* dihomogenkan. Serapan absorbansi diukur pada panjang gelombang 630 nm. Kadar glukosa yang terbentuk ditentukan dengan menggunakan kurva standar glukosa konsentrasi 100 sampai 2000 $\mu\text{g/mL}$.

Total Protein

Mikroassay untuk total protein merupakan modifikasi dari metode (Lowry et al., 1951). Dalam 96 *well* mikroplate, sebanyak 40 μL sampel ditambahkan ke dalam setiap *well*. Kemudian ditambahkan 200 μL reagen Lowry yang telah dimodifikasi (awalnya kompleks (II)-protein akan terbentuk sebagaimana metode biuret), dihomogenkan selama 30 detik dan didiamkan pada suhu ruang selama 10 menit. Ditambahkan 20 μL larutan D, dihomogenkan selama 30 detik dan diinkubasi pada suhu ruang selama 30 menit. Serapan diukur pada panjang gelombang 630 nm, konsentrasi protein ditentukan dengan menggunakan kurva standar *Bovine Serum albumin* (BSA).

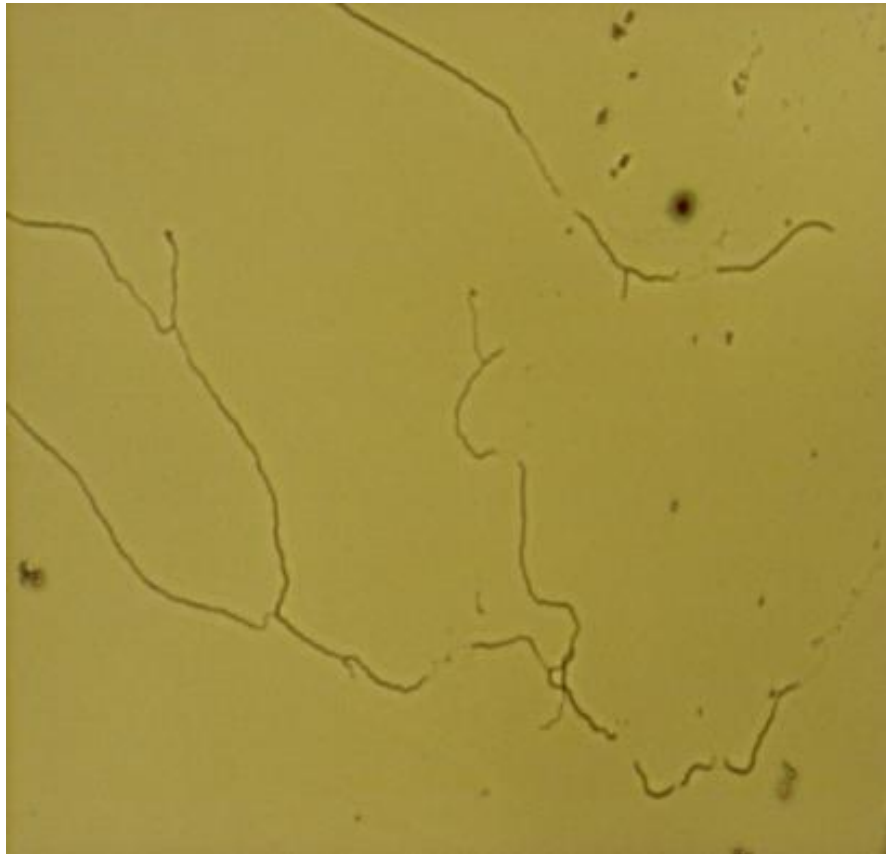
HASIL DAN PEMBAHASAN

Strain *actinomycetes* ini ditumbuhkan dalam media ISP-2, isolat *actinomycetes* yang digunakan adalah ANL-4, isolat ini telah berhasil diisolasi dari sedimen mangrove pantai dengan ciri-ciri strain ini memiliki miselium *aerial* berwarna putih keabuan dan miselium substratnya berwarna krem keabuan dengan memiliki indeks kitinolitik sebesar 5 cm (Gambar 1), serta memiliki kemiripan dengan gambar mikroskopis dari *streptomyces sp* yang telah berhasil diisolasi dari tanah oleh (Nikolova, Stefka, Vanya, & Lyubomira, n.d.; Sutedjo & Kartasapoetra, 1991), sehingga dapat dikatakan bahwa isolat ANL-4 termasuk ke dalam genus *streptomyces* (Gambar 2).

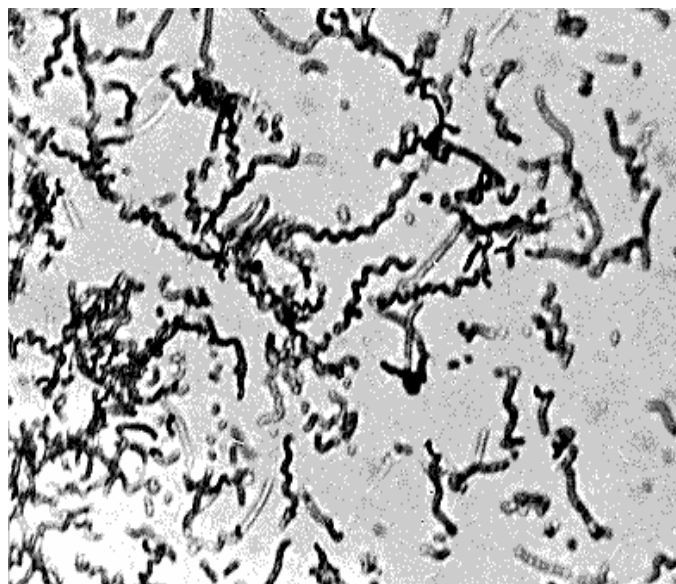


ANL-4

Gambar 1. Actinomycetes ANL-4 yang mempunyai kemampuan dalam mendegradasi kitin pada media *mineral-salt agar plate* dengan Kitin 1% dengan pewarnaan *Congo Red* 1 %



ANL-4



(Nikolova et al., n.d.)

Gambar 2. Isolat actinomycetes secara mikroskopik

Isolat *actinomycetes* yang akan diisolasi enzimnya, ditumbuhkan pada media *mineralsalt* sebanyak 100 mL kemudian media tersebut ditambahkan dengan 5 mL media *mineralsalt* yang didalamnya terdapat isolat *actinomycetes* (ANL-4), selanjutnya dikultivasi pada *orbital shaker* dengan kecepatan 175 rpm selama 5 hari. Hasil kultivasi yang didapat berwarna kuning kekeruhan, warna tersebut menunjukkan adanya pertumbuhan *actinomycetes*. Setiap isolat *actinomycetes* mempunyai warna yang berbeda-beda, jika dikultivasi dalam media *mineralsalt*. Setelah dikultivasi selama 5 hari, isolat *actinomycetes* (ANL-4) yang ada pada media *mineralsalt* dipisahkan antara biomasa dengan filtratnya. Kemudian filtrat yang diperoleh di sentrifus, dan hasil dari sentrifus tersebut merupakan ekstrak kasar enzim kitinase (Tsujiyo, Okami, Tanno, & Inamori, 1993).

Dalam proses fermentasi keadaan padat (SSF) ini menggunakan dua substrat

yaitu kitin dicuci dengan NaOH dan kitin tanpa dicuci NaOH. NaOH ini berperan sebagai pencuci untuk menghilangkan zat pengotor yang ada didalam kitin, dan dapat memutus gugus asetamida, sehingga pada penelitian ini tujuan menggunakan dua substrat tersebut adalah untuk membandingkan hasil antara kitin dicuci dengan NaOH dan kitin tanpa dicuci NaOH.

Aktivitas enzim kitinase ditentukan berdasarkan jumlah dari glukosa yang dilepaskan dalam $\mu\text{g/mL}$ enzim kasar/jam (U/mL) enzim oleh reaksi substrat dengan kondisi tertentu (Mathivanan et al., 1995). Aktivitas unit terbesar dimiliki oleh *collodial* kitin (kitin dicuci dengan NaOH) dibandingkan dengan *collodial* kitin (kitin tanpa dicuci NaOH) (Tabel 1). Substrat *collodial* kitin (kitin tanpa dicuci NaOH) sedikit menunjukkan adanya aktivitas kitinolitik pada media *mineralsalt*. Hal ini dimungkinkan aktivitasnya telah hilang setelah masa inkubasi 7 hari. Kemampuan suatu mikroorganisme dalam

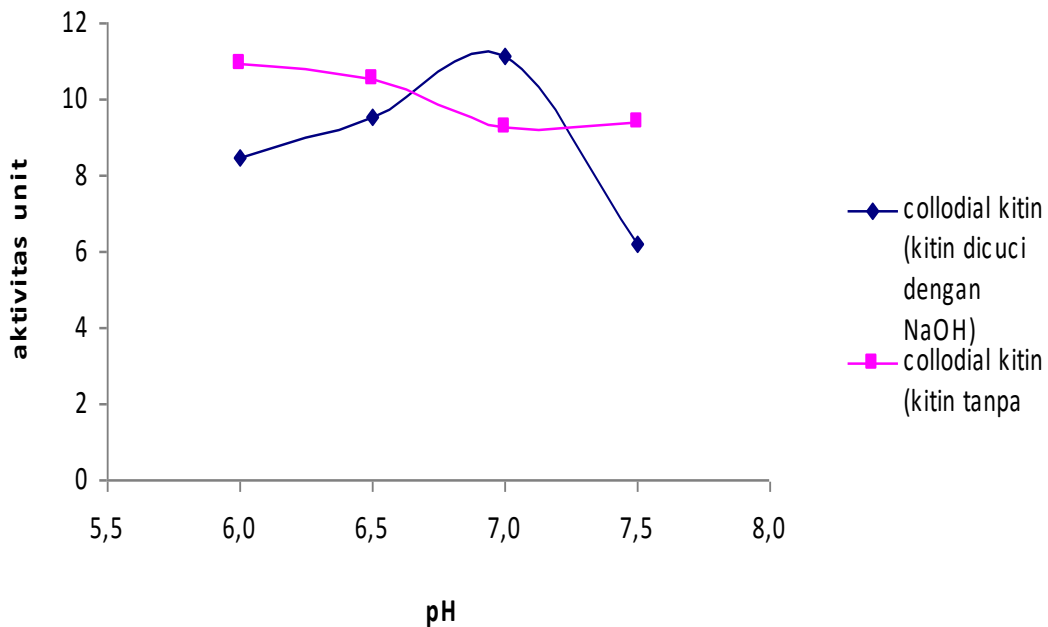
mensekresikan enzim adalah berbeda-beda. Tergantung pada jenis mikroba itu sendiri maupun media yang digunakan.

Tabel 1. Aktivitas unit enzim kitinase, kadar protein, dan aktivitas spesifik

No	Substrat	Aktivitas Unit (U/mL)	Kadar protein (mg/mL)	Aktivitas spesifik (U/mg)
1	Colloidal kitin (Kitin tanpa dicuci NaOH)	$4,1399 \times 10^{-5}$	4,58708	$9,04 \times 10^{-6}$
2	Colloidal kitin (Kitin dicuci dengan NaOH)	$4,3157 \times 10^{-5}$	6,05631	$7,12 \times 10^{-6}$

Ekstrak kasar enzim yang dihasilkan selanjutnya digunakan sebagai sampel utama untuk mengetahui pengaruh pH terhadap substrat selama reaksi. Penentuan pH optimum dilakukan dengan cara mereaksikan substrat dengan enzim dengan variasi pH yaitu 6,0; 6,5; 7,0; dan 7,5 dimana substrat yang digunakan adalah

kitin yang telah dicuci dengan menggunakan NaOH dan tanpa dicuci dengan NaOH (Suryanto & Yurnaliza, 2005). Berikut ini hasil dari penentuan pH optimum enzim kitinase dengan substrat yang telah dicuci dengan NaOH dan tanpa dicuci dengan NaOH yang diperlihatkan pada Gambar 3.



Gambar 3. Kurva pH optimum untuk enzim kitinase

Pada Gambar 3 dapat dilihat bahwa enzim kitinase dengan substrat yaitu kitin yang telah dicuci dengan NaOH menghasilkan aktivitas optimum pada pH 7,0 dengan aktivitas unit sebesar 11,166

U/mL, sedangkan pada substrat kitin tanpa dicuci dengan NaOH menghasilkan aktivitas optimum pada pH 6 dengan aktivitas unit sebesar 10,929 U/mL. Berdasarkan uraian di atas, terjadi

peningkatan pH optimum dari enzim kitinase dengan substrat yang telah dicuci dengan NaOH dibandingkan enzim kitinase dengan substrat tanpa dicuci dengan NaOH. Hal ini diperkirakan karena NaOH dapat bersifat sebagai pencuci untuk menghilangkan zat pengotor dan dapat memutus gugus asetamida. Hal ini juga disebabkan adanya pengaruh terhadap struktur ion pada enzim sehingga perubahan pH lingkungan akan berpengaruh terhadap efektifitas bagian aktif enzim dalam membentuk ion kompleks enzim substrat (Permatasari, Gulo, & Lesmini, n.d.).

Aktivitas maksimum dicapai pada suatu pH tertentu, dan penyimpangan-penyimpangan dari pH tersebut menyebabkan berkurangnya aktivitas. Hal ini disebabkan adanya pertumbuhan mikroorganisme dipengaruhi oleh berbagai keadaan fisik dan kimiawi, karena enzimlah yang mengkatalisis reaksi-reaksi yang berhubungan dengan proses kehidupan (Zhang, Himmel, & Mielenz, 2006). Maka keadaan-keadaan tersebut sebenarnya mempengaruhi enzim dan juga mempengaruhi pertumbuhan.

SIMPULAN DAN SARAN

Simpulannya adalah ANL-4 memiliki aktivitas kitinolitik pada media *mineralsalt agar* dengan kitin 1% (w/v) dengan indeks kitinolitik sebesar 5 cm. pH optimum yaitu pH 7,0 dengan aktivitas unit sebesar 11,166 U/mL (kitin dicuci dengan NaOH) dan pH 6,0 dengan aktivitas unit sebesar 10,929 U/mL (kitin tanpa dicuci NaOH). Penelitian selanjutnya disarankan adalah untuk mempelajari karakter spesifik dari isolat *actinomyces* ANL-4 yang mempunyai aktivitas kitinolitik paling besar serta mempelajari karakteristik enzim kitinase terhadap substrat dengan

menggunakan teknik analisis HPLC dan FTIR.

DAFTAR PUSTAKA

- Alexander, M. (1977). *Introduction to Soil Microbiology* (2nd ed.). New York: John Wiley and Sons.
- Ambarwati¹, S, T. A., Sembiring, L., & Subagus, W. (n.d.). Uji Aktivitas Antibakteri Isolat Actinomycetes Dari Rizosfer Padi (*Oryza Sativa*) Terhadap Salmonella Typhosa dan Staphylococcus Aureus. *Seminar Nasional X Pendidikan Biologi FKIP UNS, 1*, 1–6.
- Amorso, R., Clowell, M., & Hill, R. (1998). Mercury-resistant Actinomycetes From The Chesapeake Bay. *FEMS Microbiol Lett, 162*, 177–184.
- Andansari, S. E., Desty Rusdiana, S., & Achmad, R. (2014). Konversi Rumput Laut Menjadi Monosakarida Secara Hidrotermal. *Jurnal Teknik Pomits, 3*(2), 126–129.
- Angenent, L., Karim, K., Al-Dahlan, M., Wrenn, B., & Domiguez-Espinosa, R. (2004). Production Of Bionergy and Biochemicals from Industrial and Agricultural Wastewater. *Trends in Biotechnology, 22*, 477–485.
- Das, H., & Singh, S. (2004). Useful Byproduct From Cellulosic Wasters Of Agriculture and Food Industry a-critical Appraisal. *Crit Rev Food Sci Nutr, 44*, 77–89.
- Du Toit, P., Oliver, S., & Van Biljon, P. (1984). Sugar cane bagasse as a possible source of fermentable carbohydrates: Characteristics of bagasse with regard to monosaccharide, hemicellulose and amino acid composition. *Bio-Technology and Bioengineering, 26*, 1071–1078.

- Fukamizo, T. (2000). Chitinolytic enzymes: catalysis, substrate binding, and their application. *Curr Prot Peptide Sci, 1*, 105–124.
- GA, S.-B., T, A., & Sandford, P. (1989). Chitin and Chitosan: Sources, Chemistry, Biochemistry, Physical Properties and Applications. *Elsevier ApplSci, London*, 561.
- Ghose, T. (1987). Measurement of cellulase activities. *Pure & Appl. Chem, 59(2)*, 257–268.
- Gijzen, M., Kuflu, K., Qutob, D., & Chernys, J. (2001). A class I chitinase from soybean seed coat. *J Exp Bot, 52*, 2283–2289.
- Gray, P., Hendy, N., & Dunn, W. (1978). Digestion By Cellulolytic Enzymes Of Alkali Pretreated Bagasse. *J. Aust. Inst. Agric. Sci*, 210–212.
- Hamidah, Ambarwati, & Peni, I. (2013). Isolasi dan identifikasi isolat actinomycetes dari rizosfer padi (*Oryza sativa* L.) Sebagai Penghasil Antifungi. *Naskah Publikasi*, 1–15.
- Holker, U., Hofer, M., & Lenz, J. (2004). Biotechnological advantages of laboratory-scale solid state fermentation with fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology, 64*, 175–186.
- Lee, J. S., Joo, D. S., Cho, S. Y., Ha, J. H., & Lee, E. H. (2000). Purification and characterization of extracellular chitinase produced by marine bacterium, *Bacillus* sp. LJ-25. *J. Microbiol. Biotechnol, 10*, 307–311.
- Lehninger. (1982). *Dasar-dasar Biokimia*. Jakarta: Erlangga.
- Lin, Y., & Tanaka, S. (2006). Ethanol fermentation from biomass resources: current state and prospects. *Applied Microbiology and Biotechnology, 69(6)*, 627–642.
- Lowry, O., Rosebrough, N., Farr, A., & Randall, R. (1951). Protein Measurement With The Folin Phenol Reagent. *J. Biol. Chem, 193*, 265–275.
- M. Al-Tai, Amira, & Al, E. (1989). Cellulase Production from Actinomycetes isolated from Iraqi Soils: I Characterization of A Cellulolytic Streptomyces SP. Strain AT7. *Journal of Islamic Academy of Sciences, 2(2)*, 185–188.
- Magarvey, N. ., Keller, J. ., Bernan, V., Dworkin, M., & Sherman, D. . (2004). Isolation and Characterization of Novel Marine-Derived Actinomycete Taxa Rich in Bioactive Metabolites. *Applied and Environmental Microbiology, 70(12)*, 7520–7529.
- Mathivanan, N. (1995). Studies on Extracellular Chitines and Secondary Metabolites Produced By *Fusarium Chlamydosporum*, an Antagonist to *Puccinia Arachidis*, the Rust Pathogen Of Groundnut. *University of Madras Chennai*.
- Mitchel, D., N., Krieger, & Berovic, M. (2006). Solid-State Fermentation Bioreactors. *Springer-Verlag Berlin*.
- Moo-Young, M. . (1983). Principles Of Solid State Fermentation. *Arnold Publishers*.
- Nelson, D., & Cox, M. (2000). *Lehninger: Principles of Biochemistry*. Madison: University of Wisconsin.
- Nelson, N. (1994). A Photometric Adaptation Of The Somogyi Method For The Determination Of Glucosa. *J. Biol. Chem, 153*, 375–380.
- Nikolova, Stefka, A., Vanya, S., & Lyubomira, Y. (n.d.). Taxonomic Study Of Streptomyces sp. Strain 34-1. *Journal Of Culture Collections, 5*, 10–15.
- Nita, K. (2009). Pemanfaatan Limbah Kulit Udang Sebagai Bahan Baku

- Pembuatan Membran Ultrafiltrasi. *Inotek*, 13(2), 113–120.
- Ohno, T., Armand, S., Hata, T., Nikaidou, N., Henrissat, B., Mitsutomi, M., & Watanabe, T. (1996). A modular family 19 chitinase found in the prokaryotic organism *Streptomyces griseus*. *J Bacteriol*, 178, 5065–5070.
- Pandey, A., Ricardo, C., & Larroche, C. (2008). Current Developments in Solid-state Fermentation. *Asiatech Publishers, INC. New Delhi*.
- Pandey, A., Soccoll, C., & Mitchell, D. (2000). New developments in solid-state fermentation: I –Bioprocesses and products. *Process Biochemistry*, 35, 1153–1169.
- Paturau, J. (1982). *Byproducts of the Cane Sugar Industry* (2nd ed.). Amsterdam: Elsevier.
- Permatasari, H. R., Gulo, F., & Lesmini, B. (n.d.). Pengaruh Konsentrasi H₂SO₄ Dan NaOH Terhadap Delignifikasi Serbuk Bambu (*Gigantochloa Apus*). *Program Studi Pendidikan Kimia FKIP Universitas Sriwijaya*, 131–140.
- Pratiwi, R. S., Susanto, T. E., & Yaninda Alpha Kusuma, W. (2015). Enzim Kitinase Dan Aplikasi Di Bidang Industri. *Jurnal Pangan Dan Agroindustri*, 3(3), 878–887.
- Purwanti, A. (2014). Evaluasi Proses Pengolahan Limbah Kulit Udang Untuk Meningkatkan Mutu Kitosan Yang Dihasilkan. *Jurnal Teknologi*, 7(1), 83–90.
- Rahayu, K. (1990). *Enzim Mikroba*. Yogyakarta: Universitas Gajah Mada.
- Remya, M., & Vijayakumar, R. (2008). Isolation and characterization of marine antagonistic actinomycetes from west coast of India. *Medicine and Biology*, 15(1), 13 – 19.
- Rifaat, H. ., El-Said, O. ., Hassanein, S. ., & Selim, M. S. M. (2007). Protease Activity of Some Mesophilic Streptomycetes Isolated from Egyptian Habitats. *Journal Of Culture Collections*, 5, 16–24.
- Samsuri, M., Gozan, M., Mardias, R., Baiquni, M., Hermansyah, H., Wijanarko, A., & Schwarz, W. (2001). The Cellulosome and Cellulose Degradation By Anaerobic Bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol*, 56, 634–649.
- Sheehan, J., & Himmel, M. (1999). Enzymes, energy, and the environment: a strategic perspective on the U.S. Department of Energy's Research and Development Activities for Bioethanol. *Biotechnol Prog*, 15, 817–827.
- Sri, R. (2004). Karakteristik biokimiawi enzim termostabil penghidrolisis kitin. *Makalah Pengantar Falsafah Sains*, (Pps 702), 1–9.
- Sukara, E. (2006). Biotrends. *Majalah Populer Bioteknologi*, 1(2).
- Sulistianingsih. (2006). Teknik Pengomposan Limbah Padat Industri Gula dan Aplikasinya pada Lahan Pertanian Tebu di PT GMP. In *Laporan PU*. Unila. Bandar Lampung.
- Sulistiyani, N. (2013). Keragaman Isolat Actinomycetes Berdasarkan Analisis RFLP Terhadap Gen NRPS. *Jurnal Ilmiah Kefarmasian*, 3(1), 81–94.
- Suryanto, D. E. ., & Yurnaliza. (2005). Eksplorasi Bakteri Kitinolitik : Keragaman Genetik Gen Penyandi Kitinase pada Berbagai Jenis Bakteri dan Pemanfaatannya. *USU*.
- Sutedjo, M., & Kartasapoetra, G. (1991). *Mikrobiologi Tanah*. Jakarta: Ineka Cipta.
- Suwandi, U. (1989). *Mikroorganisme*

- Penghasil Antibiotik*. Jakarta: Pusat Penelitian dan Pengembangan PT. Kalbe Farma.
- Takagi, M., Abe, S., Suzuki, G., Emert, G., & Yata, N. (1977). A Method For Production Of Alcohol Direct From Cellulose Using Cellulase and Yeast. *Proceedings Of The Bioconversion*.
- Tsujibo, H., Okami, Y., Tanno, H., & Inamori, Y. (1993). Cloning, sequence, and expression of a chitinase gene from a marine bacterium, *Alteromonas* sp. strain O-7. *J. Bacteriol*, 175, 176–181.
- Volk, W. ., & Wheeler, M. . (1993). *Mikrobiologi Dasar, Penerjemah Markham Edisi Kelima*. Jakarta: Erlangga.
- Widayantil, N. P., Ciawi, Y., & Wiwik Susanah, R. (2013). Pengaruh Konsentrasi Ammonium sulfat ((Nlfu)zSOa) Sebagai Sumber Nitrogen Terhadap Produksi Bioetanol Berbahan Baku *Glocilaria* sp. *Journal Kimia (Journal Of Hemistry)*, 7(1), 1–10.
- Winarno, F. (1995). *Enzim Pangan*. Jakarta: Gramedia Pustaka Utama.
- Xu, L., Li, Q., & Jiang, C. (1996). Diversity Of Soil Actinomycetes in Yunan, China. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(1), 244–248.
- Zhang, Y., Himmel, M., & Mielenz, J. (2006). Outlook for cellulase improvement: Screening and selection strategies *Biotechnology Advances*. *Elsevier. Amsterdam*.