

Produksi Kitosan Secara Enzimatik oleh *Bacillus* Sampah Perikanan

Enzymatic Chitosan Production by New Isolated *Bacillus* from Fisheries Waste

Kufah Nur Afifah¹, Maharani Pertiwi Koentjoro², Endry Nugroho Prasetyo^{1*}

¹Departemen Biologi FMIPA-ITS, Kampus ITS Keputih Sukolilo Surabaya 60111 Indonesia

²Laboratory of Environmental Microbiology-Shizuoka University,
Structural Biological Research Center, Photon Factory-KEK Japan

*Corresponding author: endry@bio.its.ac.id

Abstract: The ability of *Bacillus* sp. has been developed by isolation bacteria from fisheries waste to synthesis chitin deacetylase. This microorganism secretes extracellular chitin deacetylase and does not involve cell lysis. Chitin deacetylase has roles as bioconversion which converts chitin to chitosan with deacetylation N-acetylglucosamine residue in chitin. The bioconversion process of chitin into chitosan in this study is occurred by *Bacillus* sp. B3, *Bacillus* sp. B5, *Bacillus* sp. B6, and *Bacillus* sp. B12 through deacetylation enzymatic which is isolated from fisheries waste. The protein component of crude enzyme was measured using Bradford methods with BSA (Bovine Serum Albumin) as standard. The enzyme was purified by ammonium sulfate precipitation. Chitin deacetylase was characterized by measuring isoelectric point, enzyme activity, and protein component. While the functional groups of chitosan had characterized by FTIR and measured degree of deacetylation chitosan. The highest enzyme activity was achieved by *Bacillus* sp. B12 through ammonium sulphate purification at 75-90% fraction is 345.21U/ml with protein content is 0.0512 mg/ml. Chitin deacetylase from fourth *Bacillus* sp. has an isoelectric point at pH 5. The highest degree of deacetylation chitosan is 67% and the termination of acetyl groups had confirmed by IR spectra.

Keywords: *Bacillus* sp., chitin deacetylation, chitosan, enzymatically deacetylation, shrimp waste.

1. PENDAHULUAN

Kitin merupakan senyawa homopolimer polisakarida alami yang melimpah di alam dan memiliki rantai panjang berbasis glukosamin berbentuk linier (Tokuyasu *et al.*, 1999). Kitin memiliki berat molekul besar (>150 kDa) dan tidak bercabang (Wang & Chang, 1997; Oh *et al.*, 2000; Purwani, 2002), serta tersusun atas tiga macam struktur kristal *allomorphs* yaitu α -, β -, dan γ - (Beier *et al.*, 2013). Polimer kitin tersusun atas residu N-asetilglukosamin (GlcNac) yang dihubungkan oleh ikatan β -(1,4)-glikosidik (Cohen *et al.*, 1998; Shahidi *et al.* 1999; Patil *et al.*, 2000). Kitin merupakan senyawa berstruktur rumit sehingga memiliki tingkat kelarutan yang rendah pada beberapa pelarut umum (Zhou, 2010). Modifikasi kitin diperlukan untuk meningkatkan aplikasinya, sehingga perlu dilakukan perubahan gugus fungsi asetil menjadi gugus amina yang disebut deasetilasi (Kumar, 2000; Khan, 2001; Krajewska, 2004; Kim & Rajapakse, 2005).

Kitosan merupakan produk deasetilasi kitin yang memiliki potensi yang besar dalam bidang bioteknologi, biomedis, dan industri farmasi (Tsigos *et al.*, 1995). Pada umumnya, metode konvensional konversi kitin menjadi kitosan dilakukan dengan cara kimiawi menggunakan basa kuat NaOH atau KOH

(40-50%) pada temperatur tinggi (Peniston & Johnson, 1980). Akan tetapi metode tersebut menghasilkan kitosan dengan kualitas rendah ditunjukkan oleh struktur polimer yang tidak beraturan (Zhou, 2010). Solusi alternatif dan inovatif dalam biokonversi kitin menjadi kitosan berkualitas lebih baik yaitu dengan cara hidrolisis menggunakan kitin deasetilase (Tsigos *et al.*, 1995).

Umumnya mikroorganisme yang diketahui mampu menghasilkan kitin deasetilase adalah golongan fungi yaitu *Mucor rouxii* (Zhao *et al.*, 2010), *Serratia* sp. (Kaur *et al.*, 2012), dan *Colletotrichum lindemuthianum* (Tsigos *et al.*, 1995). Selain itu kitin deasetilase dapat diproduksi oleh bakteri yang teradaptasi pada lingkungan yang mengandung kitin misalnya sampah perikanan (Prameela *et al.*, 2010). Jayanti *et al.* (2015) melaporkan bahwa *Bacillus* sp. yang berhasil diisolasi dari sampah perikanan menunjukkan aktivitas kitin deasetilase sampai 360,37 U/ml.

Sampah perikanan berupa kulit udang mengandung kitin dan kalsium karbonat (Kumirska *et al.*, 2010). Kandungan kitin dalam kulit udang mencapai sekitar 20-30% dari keseluruhan massa udang (Prameela *et al.*, 2010). Aplikasi dari kitin kulit udang masih sangat rendah dan belum banyak dimanfaatkan (Zhou *et al.*, 2010), sehingga perlu

adanya peningkatan nilai ekonomi limbah kulit udang melalui kitin deasetilase.

Produksi kitosan menggunakan kulit udang dengan kitin deasetilase yang diproduksi dari sampah perikanan sebagai biokatalis akan lebih baik secara ekonomi dan belum banyak dilakukan, karena tidak membutuhkan energi yang besar dalam proses reaksinya. Oleh karena itu dalam penelitian ini dilakukan perbandingan produksi kitosan dari empat jenis kitin deasetilase hasil isolat sampah perikanan dengan kulit udang sebagai sumber kitin.

2. METODOLOGI

2.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Januari hingga Mei 2016 di Laboratorium Mikrobiologi dan Bioteknologi Jurusan Biologi, serta Laboratorium Karakterisasi Material Jurusan Teknik Material dan Metalurgi, Institut Teknologi Sepuluh Nopember.

2.2 Metode yang Digunakan

Penelitian ini diawali dengan persiapan media yang terdiri dari media kultur, media aklimatisasi, dan media fermentasi. Selanjutnya dilakukan peremajaan isolat bakteri. Bakteri yang digunakan terdiri dari *Bacillus* sp. B3, *Bacillus* sp. B5, *Bacillus* sp. B6, dan *Bacillus* sp. B12 hasil isolasi sampah perikanan di daerah Kenjeran Surabaya. Setiap bakteri dilakukan tahapan pengujian yang sama akan tetapi tidak dikonsorsiumkan. Selanjutnya dilakukan proses produksi kitin deasetilase melalui fermentasi cair pada media fermentasi dengan lama inkubasi mengacu pada profil pertumbuhan *Bacillus* sp. pada penelitian sebelumnya (Atmaja *et al.*, 2015). Isolasi kitin deasetilase dilakukan melalui metode sentrifugasi menggunakan *centrifuge*. Ekstrak kasar enzim yang dihasilkan dipurifikasi dengan metode presipitasi protein menggunakan ammonium sulfat. Selanjutnya dilakukan pengujian aktifitas kitin deasetilase dengan metode Tokuyasu *et al.* (1999) menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Karakterisasi enzim dilakukan melalui uji aktivitas, uji kandungan protein, dan titik isoelektrik enzim. Selanjutnya dilakukan produksi kitosan dari sumber kitin kulit udang secara enzimatis. Sumber kitin dan kitosan yang dihasilkan dikarakterisasi dengan menggunakan spektroskopi FTIR untuk mengetahui perubahan gugus fungsi dan dihitung nilai derajat deasetilasinya.

2.2.1 Persiapan Media

2.2.1.1 Persiapan Media Kultur

Media *Nutrient Agar* (NA) digunakan sebagai media kultur isolat *Bacillus* sp. B3, *Bacillus* sp. B5, *Bacillus* sp. B6, dan *Bacillus* sp. B12 hasil isolasi sampah perikanan. Sebanyak 28 gram serbuk NA dilarutkan dalam 1 liter akuades, dipanaskan pada suhu 100 °C sambil diaduk dengan menggunakan *magnetic stirrer*. Setelah homogen, media ditutup dengan sumbat dan disterilisasi dengan autoklaf pada suhu 121 °C dengan

tekanan 1,5 atm selama 15 menit. Selanjutnya media dituang pada cawan Petri steril dan dibiarkan memadat. Cawan Petri diwrap dan disimpan dalam lemari pendingin sebagai *stock media* (Thiel, 1999).

Media *Nutrient Broth* (NB) digunakan sebagai media peremajaan isolat *Bacillus* sp.. Sebanyak 13 gram serbuk NB dilarutkan dalam 1 liter akuades, dipanaskan pada suhu 100 °C sambil diaduk dengan menggunakan *magnetic stirrer*. Selanjutnya media NB dimasukkan ke dalam Erlenmeyer, ditutup dengan sumbat dan disterilisasi dengan autoklaf pada suhu 121 °C dengan tekanan 1,5 atm selama 15 menit (Thiel, 1999).

2.2.1.2 Persiapan Media Aklimatisasi

Media aklimatisasi digunakan untuk membiasakan bakteri tumbuh pada media yang mengandung kitin. Sumber kitin dalam media aklimatisasi berasal dari limbah kulit udang. Sebanyak 250 gram limbah kulit udang dibersihkan dengan air. Selanjutnya limbah kulit udang direbus dalam akuades dan dioven pada suhu 60 °C selama 24 jam hingga kering yang ditandai dengan berat kulit udang yang konstan. Limbah kulit udang yang kering ditumbuk dan disaring membentuk bubuk kitin kulit udang.

Media aklimatisasi dibuat dengan melarutkan 1 gram bubuk kitin kulit udang dalam 1 liter media NB. Kemudian ditambahkan 1 liter akuades dan dipanaskan hingga suhu 100 °C sambil diaduk dengan menggunakan *magnetic stirrer*. Selanjutnya media aklimatisasi ditutup dengan sumbat dan disterilisasi dengan autoklaf pada suhu 121 °C dengan tekanan 1,5 atm selama 15 menit.

2.2.1.3 Persiapan Media Fermentasi

Sumber kitin dalam media fermentasi berasal dari limbah kulit udang. Media fermentasi yang terdiri dari 0,5 % sumber kitin (bubuk kulit udang); 0,2 % *yeast extract*; 0,2 % ammonium sulfat ((NH₄)₂SO₄); 0,1 % KH₂PO₄; 0,1 % *tryptone*; dan 0,01 % MgSO₄·7H₂O dilarutkan dalam 1 liter akuades (Natsir, 2012). Larutan media dihomogenkan dengan menggunakan *magnetic stirrer* pada suhu 70 °C. Selanjutnya media fermentasi ditutup dengan sumbat dan disterilisasi dengan autoklaf pada suhu 121 °C dengan tekanan 1,5 atm selama 15 menit (Park *et al.*, 2000).

2.2.2 Mikroorganisme

Bakteri yang akan digunakan dalam penelitian ini adalah *Bacillus* sp. B3, *Bacillus* sp. B5, *Bacillus* sp. B6, dan *Bacillus* sp. B12 koleksi Laboratorium Mikrobiologi dan Bioteknologi Jurusan Biologi, FMIPA, ITS. Masing-masing bakteri dilakukan perlakuan yang sama hingga tahap produksi kitosan, akan tetapi tidak dikonsorsiumkan.

2.2.2.1 Peremajaan isolat *Bacillus* sp.

Peremajaan isolat dilakukan dengan menumbuhkan kembali keempat isolat bakteri, yaitu *Bacillus* sp. B3, *Bacillus* sp. B5, *Bacillus* sp. B6, dan *Bacillus* sp. B12 ke media NA slant. Masing-masing isolat bakteri diambil satu ose dan digoreskan pada media NA slant yang berbeda secara aseptis dan diinkubasi pada suhu



ruang selama 24 jam hingga tumbuh koloni bakteri. Selanjutnya isolat disimpan di lemari pendingin sebagai stock culture. Isolat yang telah berumur 24 jam diremajakan pada Erlenmeyer yang berisi 50 ml medium NB sebanyak tiga ose dan diinkubasi pada suhu optimum 50°C selama 24 jam.

Sebanyak 10 ml Kultur *Bacillus* sp. yang telah diinkubasi pada media NB diinokulasikan pada 90 ml media aklimatisasi dan diinkubasi pada suhu optimum 50°C selama 24 jam. Selanjutnya, sebanyak 10 ml inokulum yang telah teraklimatisasi pada media aklimatisasi diinokulasikan ke dalam 90 ml media starter dan diinkubasi pada suhu optimum 50°C selama 24 jam. Media starter memiliki komposisi yang sama dengan media fermentasi. Selanjutnya, sebanyak 10 ml inokulum starter diinokulasikan ke dalam 100 ml media fermentasi dan diinkubasi pada suhu optimum 50°C hingga mencapai awal fase eksponensial sesuai kurva pertumbuhan *Bacillus* sp. pada penelitian sebelumnya (Atmaja *et al.*, 2015).

2.2.3 Produksi Kitin Deasetilase

Kitin deasetilase diperoleh dengan cara fermentasi cair oleh masing-masing isolat *Bacillus* sp. yang telah teraklimatisasi pada media fermentasi. Ekstrak kasar enzim (filtrat kultur) diperoleh dengan metode sentrifugasi inokulum yang telah diinkubasi pada media fermentasi dengan kecepatan 8000 rpm selama 15 menit pada suhu 4 °C (Ariningsih, 2003). Selanjutnya diambil bagian supernatan yang dihasilkan dan dilakukan purifikasi, pengukuran kandungan protein, dan pengujian aktivitas enzimnya.

2.2.4 Purifikasi Kitin Deasetilase

Purifikasi kitin deasetilase dilakukan melalui metode presipitasi protein yang terlarut pada supernatan dengan menggunakan ammonium sulfat, sehingga senyawa protein dan nonprotein dapat terpisah (Sakai *et al.*, 1998). Purifikasi ekstrak kasar enzim dilakukan dengan teknik salting out, yaitu dengan menambahkan ammonium sulfat (NH₄)₂SO₄ ke dalam supernatan secara bertahap (Uria *et al.*, 2005) dengan fraksi 0-30 %, 30-45 %, 45-60 %, 60-75 %, dan 75-90 % dengan metode sebagai berikut:

a. Pengendapan 0-30 %

Sebanyak 3,52 gram (NH₄)₂SO₄ ditambahkan sedikit demi sedikit ke dalam 20 ml larutan ekstrak kasar enzim sambil diaduk. Setelah (NH₄)₂SO₄ larut sempurna kemudian dibiarkan selama 1 jam. Selanjutnya endapan enzim disentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm, pada suhu 4°C selama 30 menit sehingga dihasilkan supernatan I dan endapan I.

b. Pengendapan 30-45 %

Sebanyak 1,88 gram (NH₄)₂SO₄ ditambahkan sedikit demi sedikit ke dalam gelas Beaker 50 ml yang berisi supernatan I sambil diaduk. Setelah (NH₄)₂SO₄ larut sempurna kemudian dibiarkan selama 1 jam. Selanjutnya endapan enzim disentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm, pada suhu 4°C selama 30 menit sehingga dihasilkan supernatan II dan endapan II.

c. Pengendapan 45-60 %

Sebanyak 1,97 gram (NH₄)₂SO₄ ditambahkan sedikit demi sedikit ke dalam gelas Beaker 50 ml yang berisi

supernatan II sambil diaduk. Setelah (NH₄)₂SO₄ larut sempurna kemudian dibiarkan selama 1 jam. Selanjutnya endapan enzim disentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm, pada suhu 4°C selama 30 menit sehingga dihasilkan supernatan III dan endapan III.

d. Pengendapan 60-75 %

Sebanyak 2,06 gram (NH₄)₂SO₄ ditambahkan sedikit demi sedikit ke dalam gelas Beaker 50 ml yang berisi supernatan III sambil diaduk. Setelah (NH₄)₂SO₄ larut sempurna kemudian dibiarkan selama 1 jam. Selanjutnya endapan enzim disentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm, pada suhu 4°C selama 30 menit sehingga dihasilkan supernatan IV dan endapan IV.

e. Pengendapan 75-90 %

Sebanyak 2,15 gram (NH₄)₂SO₄ ditambahkan sedikit demi sedikit ke dalam gelas Beaker 50 ml yang berisi supernatan IV sambil diaduk. Setelah (NH₄)₂SO₄ larut sempurna kemudian dibiarkan selama 1 jam. Selanjutnya endapan enzim disentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm, pada suhu 4°C selama 30 menit sehingga dihasilkan supernatan V dan endapan V (Ariningsih, 2003).

Supernatan yang dihasilkan selama presipitasi enzim digunakan untuk fraksi selanjutnya, sedangkan natan yang dihasilkan di setiap fraksi dibagi menjadi dua bagian untuk pengujian aktivitas enzim dan kandungan kadar protein.

2.2.5 Karakterisasi Protein Kitin Deasetilase

2.2.5.1 Uji Aktivitas Kitin Deasetilase

Pengujian aktivitas kitin deasetilase dilakukan dengan menggunakan metode Tokuyasu *et al.*, (1999) yang telah dimodifikasi. Larutan digesti yang terdiri dari 0,1 ml ekstrak kasar enzim, 10 mg bubuk kitin, dan 1 ml buffer diinkubasi pada suhu optimum 50 °C (Atmaja *et al.*, 2015) selama 20 menit. Selanjutnya aktivitas enzim diterminasi dengan penambahan asam asetat 33 % sebanyak 200 µl. Penggunaan asam asetat dalam terminasi aktivitas enzim dikarenakan asam asetat merupakan salah satu produk dari reaksi kitin menjadi kitosan (Dische & Borenfreund, 1950).

Untuk pengontrolan, penambahan enzim dilakukan sesaat setelah penambahan asam asetat. Setelah digesti, konsentrasi residu glukosamin yang terbentuk dari reaksi deaminasi dihitung berdasarkan oksidasi NaNO₂, dengan metode spektrofotometrik menggunakan indol HCl sesuai dengan Dische dan Borenfreund (1950) yang telah dimodifikasi sebagai berikut: sebanyak 200 µl larutan digesti dipipet dan ditambahkan 200 µl asam asetat 33 % dan 200 µl NaNO₂ 5 %. Selanjutnya, Larutan divorteks dan dibiarkan selama 10 menit pada suhu ruang. Ditambahkan 500 µl asam askorbat 0,1 mM dan digoyang selama 30 menit pada suhu ruang. Selanjutnya ditambahkan 800 µl HCl 5% dan 80 µl indol 1% dalam etanol sebagai penghasil karakteristik warna yang spesifik. Kemudian campuran reaksi dididihkan dalam air mendidih selama 5 menit hingga terbentuk warna merah kejinggaan. Larutan kemudian didinginkan, ditambah etanol absolut 800 µl dan divortek. Konsentrasi glukosamin yang terbentuk diketahui melalui reaksi pembentukan warna coklat

kemerahan yang terjadi dan diukur pada panjang gelombang 492 nm.

Satu unit aktifitas enzim dinyatakan sebagai jumlah enzim yang memproduksi 1 μmol residu glukosamin permenit. Selanjutnya nilai unit aktivitas tersebut dikonversi ke dalam satuan aktivitas, yaitu unit/ml. Standar yang digunakan adalah konsentrasi glukosamin pada 26,167 mg/10 ml akuades.

2.2.5.2 Uji Kandungan Protein

a. Pembuatan Pereaksi Bradford

Sebanyak 100 mg *Coomassie Brilliant Blue G-250* dilarutkan dalam 50 ml etanol 95 % dan ditambahkan 100 ml asam fosfat 85 %. Campuran diencerkan dengan menggunakan akuades sampai warna melarut sempurna. Selanjutnya campuran disaring dengan menggunakan kertas saring Whatman No.1 hingga volume 1000 ml (Bradford, 1976). Larutan yang dihasilkan disimpan sebagai *stock* pereaksi Bradford (Hendaryah, 2006).

b. Kurva Standar Protein

Kurva standar protein digunakan untuk menentukan konsentrasi protein yang terkandung dalam sampel enzim (Setyahadi, 2006). Larutan standar dibuat dengan melarutkan 100 mg *Bovine Serum Albumin* (BSA) dengan konsentrasi 0,1 hingga 1 mg/ml pada 50 ml akuades. Larutan dikocok perlahan dan jangan sampai berbusa. Setelah homogen, ditambahkan akuades hingga volume 1000 ml. Konsentrasi akhir larutan standar adalah 1 mg/ml BSA (Lampiran 6).

Untuk pembuatan blanko dilakukan hal yang sama, namun larutan standar yang digunakan adalah akuades. Nilai yang diperoleh dibuat grafik dengan persamaan $Y = ax + b$, dimana Y adalah nilai absorbansi dan x adalah nilai konsentrasi protein (Bradford, 1976).

c. Pengukuran Konsentrasi Protein

Pengukuran konsentrasi protein pada sampel dilakukan dengan mereaksikan 0,1 μl ekstrak kasar enzim dengan 5 ml reagen bradford. Selanjutnya, diukur absorbansinya dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 595 nm. Kemudian nilai absorbansi dimasukkan ke dalam kurva standar untuk menentukan konsentrasi protein yang terkandung dalam sampel enzim (Bradford, 1976).

2.2.5.3 Pengujian Titik Isoelektrik

Titik isoelektrik merupakan titik dimana jumlah muatan positif dan negatif protein adalah sama, sehingga protein pada enzim tidak bergerak apabila diletakkan pada medan listrik. Pada pH isoelektrik (pI), protein memiliki daya kelarutan minimal, sehingga menyebabkan protein mengendap (Burgess *et al.*, 2002).

Sebanyak 1 ml kitin deasetilase dimasukkan ke dalam 6 buah tabung reaksi bersih dan kering. Selanjutnya masing-masing tabung reaksi ditambahkan 1 ml buffer asetat dengan variasi pH 3, 4, 5, 6, 7, dan 8. Campuran dikocok dan dicatat derajat kekeruhannya setelah 0, 10, dan 30 menit. Diamati berapa tabung yang terbentuk endapan maksimal. Selanjutnya semua tabung dipanaskan diatas penangas

air. Pembentukan endapan kekeruhan paling cepat atau paling banyak merupakan pH titik isoelektrik (Ueda *et al.*, 1995).

2.2.6 Pretreatment Substrat Kitin Kulit Udang

Perlakuan pendahuluan terhadap substrat kitin kulit udang bertujuan untuk mengubah konformasi kristalin kitin yang rapat sehingga enzim lebih mudah berpenetrasi ke dalam substrat untuk mendeasetilasi polimer kitin (Martinou *et al.*, 1995). Sebanyak 10 gram kitin kulit udang direndam dalam 100 ml NaOH 60% pada suhu 60 °C selama 180 menit. Selanjutnya kitin dibilas dengan akuades hingga pH netral dan dikeringkan pada suhu 60 °C selama 1 malam (Emmawati, 2007).

2.2.7 Deasetilasi Enzimatis oleh Kitin Deasetilase

Sebanyak 10 mg kitin pasca perlakuan pendahuluan diinkubasi dengan 0,1 ml kitin deasetilase dan 1 ml buffer fosfat pada suhu 50 °C selama 48 jam. Selanjutnya endapan kitosan yang dihasilkan dibilas dengan akuades, dikeringkan, dan dihitung nilai derajat deasetilasinya menggunakan spektrofotometer UV-Vis.

2.2.8 Karakterisasi Kitosan

2.2.8.1 Analisis FTIR

FTIR (*Fourier Transform Infrared Spectroscopy*) merupakan suatu metode yang digunakan untuk mengidentifikasi gugus fungsi senyawa organik (Khopkar, 2003). Sampel kitosan dimasukkan ke dalam pellet press secara merata, dihubungkan ke pompa kompresi hydraulic dengan kekuatan 100 ton (kg newton), dan dipompa vakum selama 15 menit. Pellet yang terbentuk diusahakan memiliki ketebalan 0,3 mm (transparan). Pellet press dibuka secara hati-hati. Pellet yang dihasilkan dipindahkan dengan menggunakan spatula ke dalam sel holder. Alat pencatat spektrofotometri IR diatur dengan kecepatan kertas pada posisi "normal" dan ekspansi transmisi "10x". Selanjutnya dilakukan pengecekan skala kertas dengan cara membuat spektrum dari "film polysterin" (Rifai, 2007). Kitosan diukur pada panjang gelombang 400–4000 cm^{-1} , setiap spektrum terdiri dari 64 kali pengamatan dengan resolusi sebesar 2 cm^{-1} (Biskup *et al.*, 2012).

2.2.8.2 Analisis Derajat Deasetilasi Kitosan

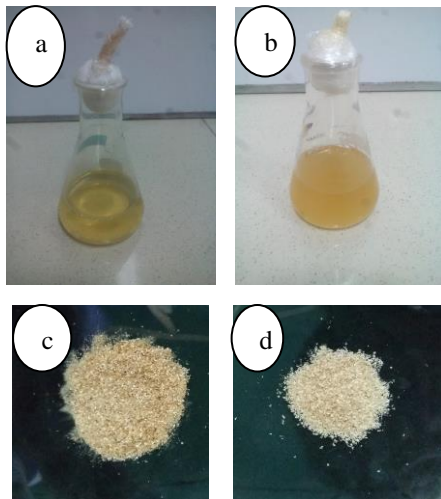
Derajat deasetilasi menunjukkan besarnya gugus asetil dari kitin yang berhasil dikonversi menjadi gugus amino pada kitosan. Semakin tinggi derajat deasetilasi kitosan, maka kualitas kitosan tersebut semakin baik (Khan *et al.*, 2001). Analisis derajat deasetilasi kitin dan kitosan dilakukan melalui reaksi deaminasi yang menghasilkan residu glukosamin berdasarkan oksidasi NaNO_2 , dengan metode spektrofotometrik menggunakan indol HCl sesuai dengan Dische dan Borenfreund (1950) yang telah dimodifikasi.



3. HASIL DAN PEMBAHASAN

3.1 Produksi dan Isolasi Kitin Deasetilase

Produksi kitin deasetilase dilakukan pada Erlenmeyer 250 ml selama 48 jam dengan mikroba fermentasi masing-masing adalah empat jenis *Bacillus* yang berbeda. Perubahan warna medium fermentasi kitin oleh empat jenis *Bacillus* yang berbeda dapat dilihat pada Gambar 3.1.



Gambar 3.1 Visualisasi Medium Produksi Kitin Deasetilase (a) Sebelum Fermentasi dan (b) Setelah 48 Jam Fermentasi, serta Visualisasi (a) Kitin Sebelum Deasetilasi dan (b) Kitosan Pasca Deasetilasi Enzimatis

Pada Gambar 3.1a dan Gambar 3.1b dapat dilihat bahwa hasil fermentasi selama 48 jam pada medium kitin kulit udang menunjukkan adanya perubahan warna dan aroma pada medium produksi. Perubahan warna disebabkan oleh pertambahan jumlah koloni bakteri sehingga menghasilkan warna medium yang keruh. Sedangkan perubahan aroma yang khas disebabkan adanya reaksi degradasi sumber karbon yang menghasilkan senyawa asam (Deliani, 2008). Gambar 3.1c dan Gambar 3.1d menunjukkan perbedaan tekstur dari kitin sebelum deasetilasi dan kitosan yang dihasilkan dari deasetilasi enzimatis. Perubahan tekstur terjadi akibat adanya hidrolisis kitin oleh kitin deasetilase sehingga membentuk tekstur kitin yang lebih halus dan menghasilkan warna kitosan yang lebih cerah (Ischaidar *et al.*, 2014).

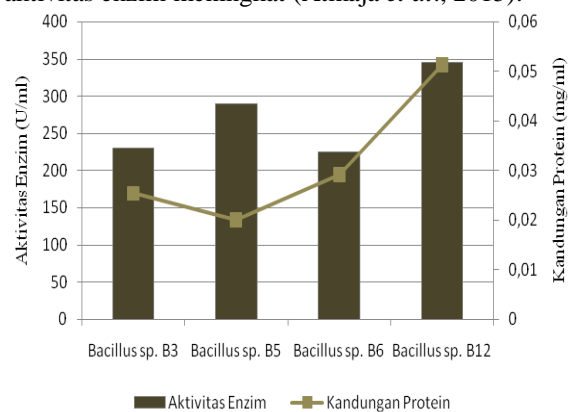
Isolasi kitin deasetilase dilakukan ketika bakteri memasuki awal fase stasioner (pada jam ke-48) yang mengacu pada profil pertumbuhan *Bacillus* sp. pada penelitian sebelumnya (Atmaja *et al.*, 2015). Pada fase stasioner, pertumbuhan bakteri sebanding dengan laju kematian bakteri. Hal ini terjadi akibat berkurangnya nutrisi dalam medium pertumbuhan bakteri serta akumulasi produk samping metabolisme (Madigan *et al.*, 2012). Selama masa pertumbuhan, bakteri menghidrolisis sumber kitin kulit udang dengan menghasilkan ekstraselular enzim berupa kitin deasetilase (Natsir *et al.*, 2012). Hasil reaksi hidrolisis

kitin deasetilase digunakan bakteri sebagai sumber karbon untuk memenuhi kebutuhan nutrisi bakteri (Ischaidar *et al.*, 2014).

3.2 Purifikasi dan Karakterisasi Kitin Deasetilase

Purifikasi kitin deasetilase dilakukan melalui presipitasi (pemekatan protein) secara bertingkat menggunakan garam ammonium sulfat (Sakai *et al.*, 1998). Tingkatan fraksinasi amonium sulfat yang memiliki aktivitas kitin deasetilase tertinggi ditunjukkan pada fraksi pemurnian 75-90% seperti pada Gambar 3.2.

Dari keempat kitin deasetilase yang dihasilkan, aktivitas tertinggi pada fraksi pemurnian 75-90% ditunjukkan oleh *Bacillus* sp. B12 dengan nilai aktivitas kitin deasetilase sebesar 345,21U/ml dan kandungan protein sebesar 0,0512 mg/ml. Kitin deasetilase dari keempat bakteri *Bacillus* sp. yang dihasilkan setelah purifikasi memiliki nilai aktivitas yang lebih tinggi jika dibandingkan dengan aktivitas *crude* enzim sebelum purifikasi (Lampiran 7), yaitu sebesar 159,8 U/ml dan kandungan protein sebesar 0,1537 mg/ml. Purifikasi enzim dapat meningkatkan kemampuan gugus fungsional protein, sehingga aktivitas enzim meningkat (Atmaja *et al.*, 2015).



Gambar 3.2 Aktivitas dan Kandungan Protein Kitin

Deasetilase pada Fraksi Pemurnian Tertinggi

Protein memiliki gugus yang mudah terionisasi, seperti gugus karboksil dan gugus amina. Umumnya asam amino dalam protein memiliki kisaran nilai pH titik isoelektrik (pI) yang berbeda. Berdasarkan hasil pengujian, kitin deasetilase dari keempat bakteri *Bacillus* sp. terkoagulasi pada pH

Hasil tersebut sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Ischaidar *et al.*, (2014) yang menyatakan bahwa kitin deasetilase yang dihasilkan oleh *Bacillus licheniformis* memiliki nilai titik isoelektrik pada pH 5. Titik isoelektrik merupakan suatu kondisi molekul protein memiliki muatan positif dan negatif yang sama, sehingga molekul protein akan bermuatan nol (Tsigos *et al.*, 1995). Pada pH isoelektrik (pI), protein memiliki polaritas minimal, sehingga menyebabkan protein mengalami koagulasi (Burgess *et al.*, 2002).

3.3 Produksi dan Isolasi Kitosan

Produksi kitosan dilakukan pada substrat kitin kulit udang dengan perlakuan pendahuluan (*pretreatment*) alkali sebelum deasetilasi kitosan secara enzimatis. Penggunaan alkali dalam *pretreatment* substrat kitin bertujuan untuk mengubah konformasi kristalin kitin yang rapat sehingga enzim lebih mudah berpenetrasi untuk mendeasetilasi polimer kitin (Martinou *et al.*, 1995). Deasetilasi polimer kitin akan berlangsung mulai dari permukaan kitin, kemudian memasuki wilayah amorf dari kitin, dan secara bertahap deasetilasi terjadi sampai ke wilayah kristalin kitin (Chang *et al.*, 1997).

Penggunaan larutan NaOH konsentrasi tinggi (>40%(b/v)) berfungsi memutus ikatan antar gugus karboksil (C=O) dengan atom nitrogen (N-) dari kitin yang memiliki struktur kristal tebal dan panjang (Angka & Suhartono, 2000). Tingginya konsentrasi NaOH menyebabkan gugus fungsional amino (-NH³⁺) yang mensubstitusi gugus asetil kitin di dalam sistem larutan semakin aktif, sehingga proses deasetilasi semakin baik (Martinou *et al.*, 1995).

Kitin hasil deasetilasi alkali digunakan sebagai substrat dalam proses produksi kitosan secara enzimatis. Deasetilasi kitosan secara enzimatis dilakukan pada percobaan kombinasi suhu optimum 50°C dan waktu inkubasi enzim selama 24 jam. Pada penelitian ini, kitin yang digunakan dalam reaksi deasetilasi enzimatis sebanyak 70 mg, dan menghasilkan kitosan sebanyak 54 mg. Karakteristik kitosan hasil deasetilasi enzimatis dikonfirmasi melalui pengukuran nilai derajat deasetilasi dan analisis gugus fungsi kitosan.

3.4 Karakterisasi Kitosan Hasil Deasetilasi Enzimatis

Derajat deasetilasi menunjukkan besarnya presentase gugus asetil (CH₃CO-) pada kitin yang berhasil dikonversi menjadi gugus amina (-NH₂) pada kitosan (Khan *et al.*, 2001). Menurut Liu *et al.*, (2006), kitosan memiliki dua gugus kromofor yaitu N-asetil glukosamin dan glukosamin hasil deasetilasi kitin, sehingga dapat dianalisis nilai absorbansinya menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Pemutusan gugus asetil oleh kitin deasetilase akan menghasilkan residu senyawa kitosan berupa glukosamin. Peningkatan kandungan glukosamin dalam kitosan hasil deasetilasi enzimatis ditunjukkan pada Tabel 3.1.

Tabel 3.1 Karakteristik Kitosan Hasil Deasetilasi Enzimatis

Parameter	Kitin	Kitosan			
		A	B	C	D
Glukosamin (µM/ml)	219	585	454	483	533
Derajat Deasetilasi (%)	< 50	63	52	55	59

A. *Bacillus* sp. B3

B. *Bacillus* sp. B5

C. *Bacillus* sp. B6

D. *Bacillus* sp. B12

Berdasarkan Tabel 3.1, kitin hasil deasetilasi enzimatis memiliki nilai derajat deasetilasi lebih dari 50%, hal ini menunjukkan bahwa kitin mengalami deasetilasi dengan adanya pemutusan gugus asetil sehingga dihasilkan kitosan. Menurut Synowiecki *et al.*, (2003), kitin yang memiliki nilai derajat deasetilasi lebih dari 50% dapat disebut sebagai kitosan.

Produksi kitosan dilakukan pada substrat kitin yang memiliki nilai derajat deasetilasi kurang dari 50% dan menghasilkan kitosan dengan nilai derajat deasetilasi tertinggi sebesar 63%. Derajat deasetilasi awal yang rendah menunjukkan banyaknya residu asetil yang belum terpotong, sehingga ketersediaan substrat untuk reaksi enzimatis semakin banyak (Emmawati, 2007). Hal ini dapat menyebabkan nilai derajat deasetilasi kitosan setelah reaksi enzimatis mengalami peningkatan sebesar 20,6% jika dibandingkan dengan nilai derajat deasetilasi kitin sebelum reaksi enzimatis.

Berdasarkan Tabel 4.1, nilai derajat deasetilasi tertinggi (sebesar 63%) ditunjukkan oleh kitosan hasil deasetilasi enzimatis kitin deasetilase yang diproduksi oleh *Bacillus* sp. B3 yang memiliki aktivitas enzim sebesar 224,95 U/ml, sedangkan kitin deasetilase dari *Bacillus* sp. B12 yang memiliki aktivitas enzim lebih tinggi (sebesar 345,217 U/ml) menghasilkan kitosan dengan nilai derajat deasetilasi yang lebih rendah, yaitu sebesar 59%. Hal ini dimungkinkan adanya perbedaan struktur protein dan nilai afinitas enzim yang diproduksi oleh masing-masing isolat *Bacillus* sp., serta adanya spesifikasi substrat aplikasi sehingga mempengaruhi kemampuan enzim dalam mendeasetilasi substrat kitin.

Analisis gugus fungsi kitin dilakukan terhadap substrat kitin kulit udang, sedangkan analisis gugus fungsi kitosan dilakukan terhadap kitosan hasil deasetilasi enzimatis oleh *Bacillus* sp. B3 dan *Bacillus* sp. B12 yang memiliki nilai derajat deasetilasi tertinggi berdasarkan Tabel 4.1.

Karakteristik nilai derajat deasetilasi kitosan yang menunjukkan banyaknya presentase gugus asetil yang terpotong dikonfirmasi melalui analisis gugus fungsi menggunakan spektroskopi FTIR (*Fourier Transform Infrared Spectroscopy*) seperti yang ditunjukkan pada Gambar 3.4.

Kisaran absorbansi kitin dan kitosan pada spektra FTIR berada pada panjang gelombang 4000-400 cm⁻¹ (Brugnerotto *et al.*, 2001). Pita serapan pada panjang gelombang 3270,52 cm⁻¹ pada kitin menunjukkan vibrasi gugus (N-H), sedangkan pada kitosan mengalami pergeseran peak dengan intensitas serapan yang lebih rendah, yaitu pada panjang gelombang 3255,41 cm⁻¹ untuk kitosan *Bacillus* sp. B3, dan panjang gelombang 3255,76 cm⁻¹ untuk kitosan *Bacillus* sp. B12.

Kisaran absorbansi pada panjang gelombang 3120,6 hingga 3599,1 cm⁻¹ menunjukkan vibrasi gugus (O-H) yang terkandung dalam kitin dan kitosan. Serapan gugus (O-H) pada kitin memiliki intensitas serapan yang lebih tinggi, yaitu pada panjang gelombang 3270,52 cm⁻¹, sedangkan pada kitosan



mengalami pergeseran peak dengan intensitas serapan $3255,41\text{cm}^{-1}$ kitosan *Bacillus* sp. B3, dan pada panjang gelombang $3255,76\text{cm}^{-1}$ pada kitosan *Bacillus* sp. B12. Hal ini berkaitan dengan adanya pretreatment NaOH pada substrat kitin, sehingga kitin yang digunakan memiliki kandungan gugus (O-H) yang tinggi. Sedangkan pada kitosan memiliki gugus (O-H) yang relatif lebih rendah karena adanya proses pengeringan kitosan pasca deasetilasi enzimatis sehingga dihasilkan bubuk kitosan yang halus dan kering.

Pita serapan pada panjang gelombang $1626,45\text{cm}^{-1}$ pada kitin menunjukkan vibrasi gugus (C=O) dengan intensitas serapan yang tinggi jika dibandingkan dengan intensitas serapan gugus (C=O) oleh kitosan *Bacillus* sp. B3 yang teramati pada panjang gelombang $1620,88\text{cm}^{-1}$ dan kitosan *Bacillus* sp. B12 yang teramati pada panjang gelombang $1618,58\text{cm}^{-1}$. Hal ini menunjukkan bahwa kitin memiliki jumlah gugus C=O yang lebih banyak jika dibandingkan dengan kitosan yang telah mengalami deasetilasi enzimatis. Menurut Tokuyasu *et al.*, (1999), deasetilasi kitin dilakukan melalui reaksi pemutusan ikatan karbon rangkap (C=O) pada gugus asetil kitin sehingga dihasilkan kitosan

4. KESIMPULAN

Produksi kitosan oleh kitin deasetilase *Bacillus* sampah perikanan diperoleh derajat deasetilasi tertinggi (sebesar 63%) ditunjukkan oleh kitosan *Bacillus* sp. B3 dengan nilai aktivitas enzim sebesar $230,45\text{ U/ml}$. Nilai aktivitas enzim tertinggi ditunjukkan oleh *Bacillus* sp. B12 (sebesar $345,217\text{ U/ml}$) dan memiliki nilai derajat deasetilasi kitosan sebesar 59%. Kitosan *Bacillus* sp. B5 memiliki derajat deasetilasi terendah (sebesar 52%) dengan nilai aktivitas enzim sebesar $289,483\text{ U/ml}$. Kitosan *Bacillus* sp. B6 memiliki nilai derajat deasetilasi sebesar 55% dengan nilai aktivitas enzim sebesar $224,95\text{ U/ml}$. Deasetilasi enzimatis kitin mampu meningkatkan derajat deasetilasi kitosan dan telah dikonfirmasi adanya pemutusan gugus asetil melalui spektra FTIR.

5. UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada PT. Gudang Garam Tbk Direktorat Produksi Gempol Pasuruan yang telah memberikan bantuan finansial dalam publikasi di Prosiding Seminar Nasional Biology Education Conference Surakarta 2017.

6. DAFTAR PUSTAKA

Abelson, John., Simon, Melvin., and Pyle, Anna. 2014. *Methods in Enzymology*. Elsevier Inc. and Characterization of Chitin Deacetylase from *Absidia Coerulea*. *Journal Biochemistry*. 117, 257-263 (1995).

Angka, S. L. dan M. T. Suhartono. 2000. *Pemanfaatan Limbah Hasil Laut. Bioteknologi Hasil Laut*.

Pusat Kajian Sumberdaya Pesisir Dan Lautan. Institut Pertanian Bogor, Bogor.

Ariningsih, A., Noor, A., dan Natsir, N. 2003. *Usaha biokonversi*

Atmaja, Q.I and Nugroho, P. 2015. Chitin Deacetylase Production by Newly Thermophilic Isolate *Bacillus* sp. SK II-5. *Proceeding Seminar Biomaterial and Enzyme Technology*. Biology ITS: Surabaya.

Biskup, R., Jarosinska, D., Rokita, B., Ulanski, P., Rosiak, J. 2012. *Determination of Degree Deacetylation of Chitosan Comparison Methods*. *Progress on Chemistry and Application of Chitin*, vol. XVII 2012.

Blair, D.E., Hekmat, O., Schuttelkopf, A.W., Shrestha, B., Tokuyasu, K., Withers, S.G., van Aalten, D.M.F. 2006. Structure and Mechanism of Chitin Deacetylase from the Fungal Pathogen *Colletotrichum lindemuthianum*. *Biochemistry*, 45, 9416–9426.

Bradford, M. M. 1976. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry* 72, 248-254 (1976).

Brugnerotto, J., J. Lizardi, F. M. Goycoolea, W. Argüelles Monal, J. Desbrières, M. Rinaudo. 2001. *Polymer*. 42, 3569.

Burgess, Thomson, Anthony C. Grabski and Richard R. 2002. Preparation of protein samples for SDS-polyacrylamide gel electrophoresis: procedures and tips¹. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 62: 191-201.

Caufrier, F., Martinou, A., Dupont, C., Bouriotis, V. 2003. Carbohydrate esterase family 4 enzymes: Substrate specificity. *Carbohydrate Research*. 338, 687–692.

Chang KLB, Tsai G, Lee J, Fu W. 1997. Heterogenous N-deacetylation of chitin in alkaline solution. *Carbohydrate Research*. 303: 327-332.

Dahiya, N., Tewari, R., Tiwari, R.P., and Hoondal, G.S. 2005. Chitinase from *Enterobacter* sp. NRG4: Its Purification, Characterization and Reaction Pattern. *Elect. Journal Biotechnology* 8(2):134–145.

Deliani. 2008. Pengaruh Lama Fermentasi Terhadap Kadar Protein, Lemak, Komposisi Asam Lemak dan Asam Fitat pada Pembuatan Tempe. *Tesis*. Medan: Universitas Sumatera Utara.

Dische, Z dan E. Borenfrund. 1950. A Spectrophotometric method

Emmawati, A., Laksmi Jenie, B.S., dan Fawzya, Y.N.,. 2007. Kombinasi Perendaman dalam Natrium Hidroksida dan Aplikasi Kitin Deasetilase terhadap Kitin Kulit Udang untuk Menghasilkan Kitosan dengan Berat Molekul Rendah. *Jurnal Teknologi Pertanian* 3(1) : 12-18, Agustus 2007 for the microdetermination of hexosamines. *Journal Biology Chemistry* 1949, 184:517-522



- for the microdetermination of hexosamines. *J. Biol. Chem.* 1950,
- Ghormade, V., Kulkarni, V., Doiphode, N., Rajamohanam, P.R., dan Deshpande, M.V. 2010. Chitin Deacetylase: A Comprehensive Account on Its Role in Nature and its Biotechnological Applications. *Current Research, Technology And Education Topics In Applied Microbiology And Microbial Biotechnology Formatex.*
- Gohel, V., Singh, A., Vimal, M., Ashwini, P., and Chhatpar, H. S. 2006. Bioprospecting and Antifungal Potential of Chitinolytic Microorganism. *African Journal Biotechnology* 5(2):54–72.
- Gooday, G.W., 1990. The Ecology of Chitin Degradation. In: KC. Marshall (Ed): *Advances and Biotechnology*. Vol. 34 : 715–719.
- Hendarsyah, D., Setyahadi, S., dan Bunasor, T.K. 2006. Karakterisasi Kitin Deasetilase Termotabil Isolasi Bakteri Asal Pancuran Tujuh Baturaden, Jawa Tengah. *Jurnal Teknologi dan Industri Pangan*, Vol.XVII No. 1 Th. 2006.
- Howling, G.I., Dettmar, P., Goodard, P., Hampson, F, Domish, M., Wood. 2001. *J. Biomaterial* 22:2959-2966.
- Ischaidar., Natsir, H., dan Dali, S., 2014. Production and Application of Chitin Deacetylase from *Bacillus licheniformis* HSA3-la as Biotermicide. *Marina Chimica Acta*, April 2014 Vol. 15 No. 1.
- Jayanti, R and Nugroho, P. 2015. Pra-Production of Chitin Deacetylase from Fisheries Waste Bacteria. *Proceeding Seminar Biomaterial and Enzyme Technology*. Biology ITS: Surabaya.
- Kafetzopoulos, D., A. Martinou dan V. Bouriotis.1993. Bioconversion of Chitin and Chitosan : Purification and Characterization of Chitin Deacetylase from *Mucor rouxii*. Proc. Natl. Acad. Sci. (90) : 2564 – 2568. *Applied Biology Science*. USA.
- Kamil Z., M. Rizk, M. Saleh and S. Moustafa. 2007. Isolation and Identification of Rhizosphere Soil Chitinolytic Bacteria and Their Potential in Antifungal Biocontrol. *Global Journal of Molecular Sciences* 2:2, 57-66, 2007. IDOSI Publications.
- Kaur, K., Dattajirao, V., Shrivastava, V., dan Bhardwaj, U. 2012. Isolation and Characterization of Chitosan-Producing Bacteria from Beaches of Chennai, India. *Enzyme Research* Volume 2012, Article ID 421683.
- Khan, Tanveer., Peh, Khiang., Seng, Hung. 2001. Reporting Degree of Deacetylation Value of Chitosan: The Influence of Analytical Methods. *Journal Pharm Pharmaceut Sci.* 5(3): 205-212.
- Khopkar. 2003. *Konsep Dasar Kimia Analitik*. Universitas Indonesia Press: Jakarta
- kitin asal kepiting rajungan menjadi khitosan. *Marina Chimica Acta*, April 2003, hal. 9-12.
- Liu, Dasheng., Wei, Yuan., Yao, Pingjia., amd Jiang, Linbin. 2006. Determination of the Degree of Acetylation of Chitosan by UV Spectrophotometry Using Dual Standards. *Carbohydrate Research.*
- Madigan, M. T., Martinko, J.M., Stahl, D.A., dan Clark, D.P. 2012. Brock: *Biology of Microorganisms* Thirteenth Edition. Pearson Education Inc. United States of America.
- Martinou, A., Kafetzopoulos, D., and Bouriotis, V. 1995. Chitin Deacetylation by Enzymatic Means: Monitoring of Deacetylation Processes. *Journal Carbohydrate Research.* 273(2): 235–242.
- Min, B.M., Lee, S., Lim, J., Lee, T., Kang, P., Park, W. 2004. Chitin and Chitosan Nanofibers: Electrospinning and Deacetylation of Chitin Nanofibers. *Polymer* 45:7137-7142.
- Muharni. 2010. Isolasi dan Identifikasi Bakteri Penghasil Kitinase dari Sumber Air Panas Danau Ranau Sumatera Selatan. *Jurnal Penelitian Sains Edisi Khusus Juni (D)* 10, 06-09.
- Muzzarelli, R.A. & Rocchetti, R. 1985. Determination of the Degree of Acetylation of Chitosans by First Derivative Ultraviolet Spectrometry. *Carbohydrate Polymers* 5. (1985) 461-472.
- Nasran S., Farida A., dan Ninoek I. 2003. Produksi Kitinase dan Kitin Deasetilase dari *Vibrio harveyi*. *Jurnal Penelitian Perikanan Indonesia* 5:9.
- Natsir, Hasnah., Dali, Seniwati., dan Fattah, Nurlaeli. 2012. *Potensi Protease dan Kitin Deasetilase dari Bacillus licheniformis HSA3-1a untuk Produksi Kitosan sebagai Bahan Pengawet Alami Produk Perikanan*. Universitas Hasanudin.
- Oh, Y.S., Shih, I.L., Tzeng, Y.M., and Wang, S.L. 2000. Protease Produced by *Pseudomonas aeruginosa* K-187 and its Application in Deproteinization of Shrimp and Crab Shell Wastes. *J. Enzyme Microbiology Technology.* 27: 3–10.
- Okafor, N. 2007. *Modern Industrial Microbiology and Biotechnology*. Science Publishers. USA.
- Park, S.H., Lee, J.H, and Lee, H.K. 2000. Purification and Characterization of Chitinase from a Marine Bacterium, *Vibrio* sp. 98CJ11027. *Journal Microbiology.* 38(4): 224–229.
- Patil, R.S., Ghormade, V., Deshpande, MV. 2000. Chitinolytic Enzymes: *An Exploration Technology* 26, 473-483.
- Prameela, K., Mohan, C.M., Smitha, P.V., dan Hemalatha, K.P.J. 2010. Bioremediation of Shrimp Biowaste by Using Natural Probiotic for Chitin and Carotenoid Production an Alternative Method to Hazardous Chemical Method. *International Journal of Applied Biology and Pharmaceutical Technology* Volume: I: Issue-3: Nov-Dec -2010.
- Raval R., Raval, K., dan Moerschbacher BM. 2013. *Enzymatic Modification of Chitosan Using Chitin Deacetylase Isolated from Bacillus cereus*. Volume 2 issue 1 2:617. Scientificreports.
- Rifai, D. 2007. *Isolasi dan Identifikasi Kitin dan Kitosan dari Cangkang Hewan Mimi (Horseshoe crab) menggunakan Spektrofotometri Infra Merah*. Universitas Islam Negeri (UIN): Malang.



- Rinaudo, M. 2006. Chitin and Chitosan Preparation from Marine Sources, Structure, Properties and Application. *Marine Drugs* 2015, 13, 1133-1174.
- Rudall, K.; Kenchington, M. W. 1969. *Biology Review* 1973, 49, 597
- Sakai K, Yokota A, Kurokawa H, Wakayama M, Moriguchi M. 1998. Purification and Characterization of Three Thermostable Endochitinase of a Noble Bacillus sp. Strain, MH-1, Isolated from Chitin Containing Compost. *Appl. Environ. Microbiol.* p. 3397-3402.
- Synowiecki, J.; Al-Khateeb, N.A. 2003. Production, Properties, and Some New Applications of Chitin and Its Derivatives. *Crit. Review Food Science and Nutrient*, 43, 145–171.
- Tanaka, T., Fujiwara, S., Nishikori, S., Fukui, T., Takagi Masahiro, and Imanaka, T. 1999. A Unique Chitinase with Dual Active Site and Triple Substrate Binding Sites from the Hyperthermophilic Archaeon *Pyrococcus kodakaraensis* KOD1. *Journal Applied Environmental Microbiology*. 65(12): 5338–5344.
- Thatte, M.R. 2004. *Synthesis and Antibacterial Assessment of Water-soluble Hydrophobic Chitosan Derivatives Bearing Quaternary Ammonium Functionality*. PhD. Disertation. Louisiana State University, LA. 126 pp.
- Thiel, Teresa. 1999. *Nutrient Broth, Agar Plates and Slants*. Microbiological applications: laboratory manual in general Microbiology.
- Tokuyasu, K., Kaneko, S., Hayashi, K., and Mori, Y. 1999. Production of Recombinant Chitin Deacetylation in the Culture Medium of *Escherichia coli* Cells. *Journal FEBS*. 458: 23–26.
- Tsigos, I., Martinou, A., Kafetzopoulos, D., dan Bouriotis, V. 1995. *Chitin Deacetylases: New, Versatile Tools in Biotechnology*. Tibtech July 2000 (Vol. 18).
- Ueda M, Fujiwara A, Kawaguchi T, Arai M. 1995. Purification and Some Properties of Six Chitinase from *Aeromonas* sp. No.10S-24. *Biosci. Biotech. Biochem.* 59 (11) : 2162-2164.
- Uma C, Arulraj C, Ravikumar G, et.al. 2012. Production and Purification of Chitinase by *Streptomyces* sp. from soil. *Journal Advamnce Science Research*. 3:3, 25-29.
- Uria, A., Chasanah, E., Fawzya Y. 2005. Optimization of *Bacillus* sp. K29-14 Chitinase Production Using Marine Crustacean Waste. *Journal of Coastal Development*. Volume 8, Number 2, February 2005 : 155-162
- Wang, S.L. and Chang, W.T. 1997. Purification and Characterization of Two Bifunctional Chitinase/Lysozymes Extracellularly Produced by *Pseudomonas aeruginosa* K-187 in a Shrimp and Crab Shell Powder Medium. *Journal Applied Environment Microbiology*. 63(2): 380–386.
- Widdel, Friedrich. 2007. *Theory and Measurement of Bacterial Growth*. Mikrobiologie. Universitat Bremen. York. Marcel Dekker.
- Zhou, G., Zhang, H., He, Y., dan He, L. 2010. Identification of a Chitin Deacetylase Producing Bacteria Isolated from Soil and its Fermentation Optimization. *African Journal of Microbiology Research* Vol. 4(23), pp. 2597-2603, 4 December, 2010