

## DAFTAR PUSTAKA

- Arfah, R.A., Patong, A.R., Ahmad, A., dan Djide, M.N., 2014, Isolasi dan Identifikasi Bakteri Termofil Penghasil Amilase dari Sumber Air Panas Lejja Sulawesi Selatan, *Al-Kimia*, **2**,(2); 36-46.
- Arif, R.A., 2013, *Potensi Kitin Deasetilase dari Bacillus licheniformis HSA3-1a Untuk Produksi Kitosan dari Limbah Udang Putih (Penaeus merguensis) Sebagai Bahan Pengawet Bakso Ikan*, Tesis tidak Diterbitkan, Program Pascasarjana Universitas Hasanuddin, Makassar.
- Arif, R.A., Natsir, H., dan Dali, S., 2014, Enzymatic Production of Chitosan from the Waste Shrimp (*Penaeus merguensis*) and Antimicrobial Effect for Durability Against Fishballs, *Marina Chimica Acta*, **15**,(1); 2-7.
- Asnawi, A.H., 2006, *Keanekaragaman Bakteri Termofilik yang Terdapat dalam Sumber Air Panas di Taman Wisata Padusan Pacet, Kabupaten Mojokerto Jawa Timur Pacet, Kabupaten Mojokerto Jawa Timur*, Skripsi, Universitas Negeri Malang, Malang.
- Azuma, K., Osaki, T., Minami, S., dan Okamoto, Y., 2015, Anticancer and Anti-inflammatory Properties of Chitin and Chitosan Oligosaccharides, *Journal Function Biomater*, **6**; 33–49.
- Baehaki, A., Suhartono, M. T., Palupi, N. S., dan Nurhayati, T., 2008, Purifikasi dan Karakterisasi Protease dari Bakteri Patogen *Pseudomonas aeruginosa*, *Jurnal Teknol dan Industri Pangan*, **19**,(1).
- Bergey, D.H., dan Holt, J.G., 1994, *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology 9th Edition*, Williams & Wilkins Baltimore, Maryland.
- Bhuvanachandra, B., Sivaramakrishna, D., Alim, S., Preethiba, G., Rambabu, S., Swamy, M.J., dan Podile, A.R., 2021, New Class of Chitosanase from *Bacillus amyloliquefaciens* for the Generation of Chitooligosaccharides, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **69**,(1); 78-87.
- Brock, T.D., 1986, *Thermophiles: General, Molecular, 2nd Applied Microbiology*, A Willey Interscience Publication, New York.
- Bosso, C., Defaye, J., Domart, A., Gadelle, A., dan Pedersen, C., 1986, The Behavior of Chitin Towards Anhydrous Hydrogen Fluoride, Preparation of  $\beta$ -(1,4)-linked 2-acetamido-2-deoxy-D-glucopyranosyl oligosaccharide, *Carbohydrad Research.*, **156**; 57–68.
- Cappucino J.G., 1983, *Microbiology: A Laboratory Manual*, Addison Wesley Publishing, Massachusetts.

- Chasanah, E., Hariyadi, P., Witarto, A.B., Hwang, J.K., dan Suhartono, M.T., 2006, Biochemical Characteristics of Chitosanase From the Indonesian *Bacillus licheniformis* MB-2, *Molecular Biotechnology*, **33**; 93-102.
- Chasanah, E., Zilda, D.S., dan Uria, A.R., 2009, Screening and Characterization of Bacterial Chitosanase from Marine Environment, *Journal of Coastal Development*, **12**,(2); 64-72.
- Chasanah, E., 2004, *Characterization of Chitosanase of Bacillus Licheniformis MB-2 Isolated from Manado Hot Spring Water*, Disertasi, Bogor Agricultural University.
- Chasanah, E., 2010, Pengembangan Produk Kitoooligosakarida dari Limbah Industri Perikanan Udang Secara Enzimatis: Prosepek dan Kendala, *Squalen*, **5**,(2); 44-50.
- Chiang, C.L., Chang, C.T., dan Sung, H.Y., 2003, Purification and Properties of Chitosanase from a Mutant of *Bacillus subtilis* IMR-NK1, *Enzyme and Microbial Technology*, **32**; 260–267.
- Choi, Y.J., Kim, E.J., Piao, Z., Yun, Y.C., dan Shin, Y.C., 2004, Purification and Characterization of Chitosanase from *Bacillus* sp. Strain KCTC 0377BP and Its Application for the Production of Chitosan Oligosaccharides, *Applied and Environmental Microbiology*, **70**,(8); 4522-4531.
- Cowan, S.J., 1974, *Cowan and Steel's Manual for Identification of Medical Bacteria 2nd Ed.*, Cambridge University Press, Cambridge.
- Damayanti, S.C., Komala, O., dan Effendi, E.M., 2018, Identifikasi Bakteri dari Pupuk Organik Cair Isi Rumen Sapi, *Ekologia: Jurnal Ilmiah Ilmu Dasar dan Lingkungan Hidup*, **18**,(2); 63-71.
- Darma, S., Harsoprayitno, S., dan Setiawan B., 2010, Geothermal Energy Update: Geothermal Energy Development and Utilization in Indonesia, *Proceedings World Geothermal Congress 2010*, Bali.
- De Rossa, M., Gambacorta, A., dan Gliozzi, A., 1986, Structure, Biosynthesis and Physicochemical Properties of *Archaeobacterial* Lipids, *Microbiological Reviews*, **50**; 70-80.
- Dewi, I.M., 2008, *Isolasi Bakteri dan Uji Aktivitas Kitinase Termofilik Kasar dari Sumber Air Panas Tinggi Raja Simalungun Sumatera Utara*, Tesis, Sekolah Pasca Sarjana, Universitas Sumatera Utara.
- Doan, C.T., Tran, T., Nguyen, V.B., Nguyen, A.D., dan Wang, S.L., 2018, Reclamation of Marine Chitinous Materials for Chitosanase Production Via Microbial Conversion by *Paenibacillus macerans*, *Marine Drugs*, **16**,(429); 1-13.

- Doan, C.T., Tran, T.N., Nguyen, V.B., Nguyen, A.D., dan Wang, S.L., 2019, Production of a Thermostable Chitosanase from Shrimp Heads Via *Paenibacillus mucilaginosus* TKU032 Conversion and its Application in the Preparation of Bioactive Chitosan Oligosaccharides, *Marine drugs*, **17**(4); 217.
- Firliani, W., Agustien, A., dan Febria, F.A., 2015, Karakterisasi Bakteri Termofilik Penghasil Enzim Protease Netral, *Jurnal Biologi Universitas Andalas*, **4**(1); 9-14.
- Fukamizo, T., Juffer, A.H., Vogel, H.J., Honda, Y., Tremblay, H., dan Boucher, I., 2000, Theoretical Calculation of pKa Reveals an Important Role of Arg205 in the Activity and Stability of *Streptomyces* sp. N174 Chitosanase, *Journal of Biological Chemistry*, **275**(33); 25633–25640.
- Goosen, M.F.A., 1997, *Application of Chitin and Chitosan*, Technomic, USA.
- Haliza, W., 2003, Karakteristik Kitosanase Unik dari *Bacillus coagulans* LH 28.38 Asal Lahendong-Sulawesi Utara, Tesis, Fakultas Teknologi Pertanian, Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Haedar, N., Natsir, H., Fahrudin, dan Aryanti, W., 2017, Produksi dan Karakterisasi Enzim Kitinase dari Bakteri Kitinolitik Asal Kerang *Anadara granosa*, *Jurnal Alam dan Lingkungan*, **8**(15); 19-28.
- Harper, H. A., dan Murray, R. K., 2002, *Biochimie de Harper*, Presses Université Laval.
- Hirano, S., 1988, Production and Application of Chitin and Chitosan in Japan In Skjak-Braek, G., Anthonsen, T. and Sandford P. (eds.). Chitin and Chitosan, *Eselyer Applied Science*, London, United Kingdom, (37–43).
- Irena, A., 2010, *Isolasi Dan Optimasi Protease Bakteri Termofilik Dari Sumber Air Panas Tangkuban Perahu Bandung*, Skripsi, IPB, Bogor.
- Joles, P.P., dan Muzzareli R.A.A., 1999, *Chitin and Chitinase: Biochemistry of Chitinase*, Birkhauser Verlag, Switzerland.
- Kendra, D.F., Cristian, D., dan Hadwiger, L.A., 1989, Chitosan Oligomers from *Fusarium solani*/Pea Interaction, Chitinase / $\beta$ -glucanase Digestion of Sporeling and from Fungal Wall Chitin Actively Inhibit Fungal Growth and Enhance Disease Resistance, *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, **35**; 215–230.
- Kumar, S. dan Nussinov, R., 2001, How do Thermophilic Protein Deals with Heat? A review, *Cell Molecular Life Science*, **58**; 1216-1233.
- Kurniawan, H.M., 2011, *Isolasi dan Optimasi Ekstrinsik Bakteri Termoproteolitik Isolat Sumber Air Panas Semurup Kabupaten Kerinci, Jambi*, Tesis, Pascasarjana Universitas Andalas, Padang.

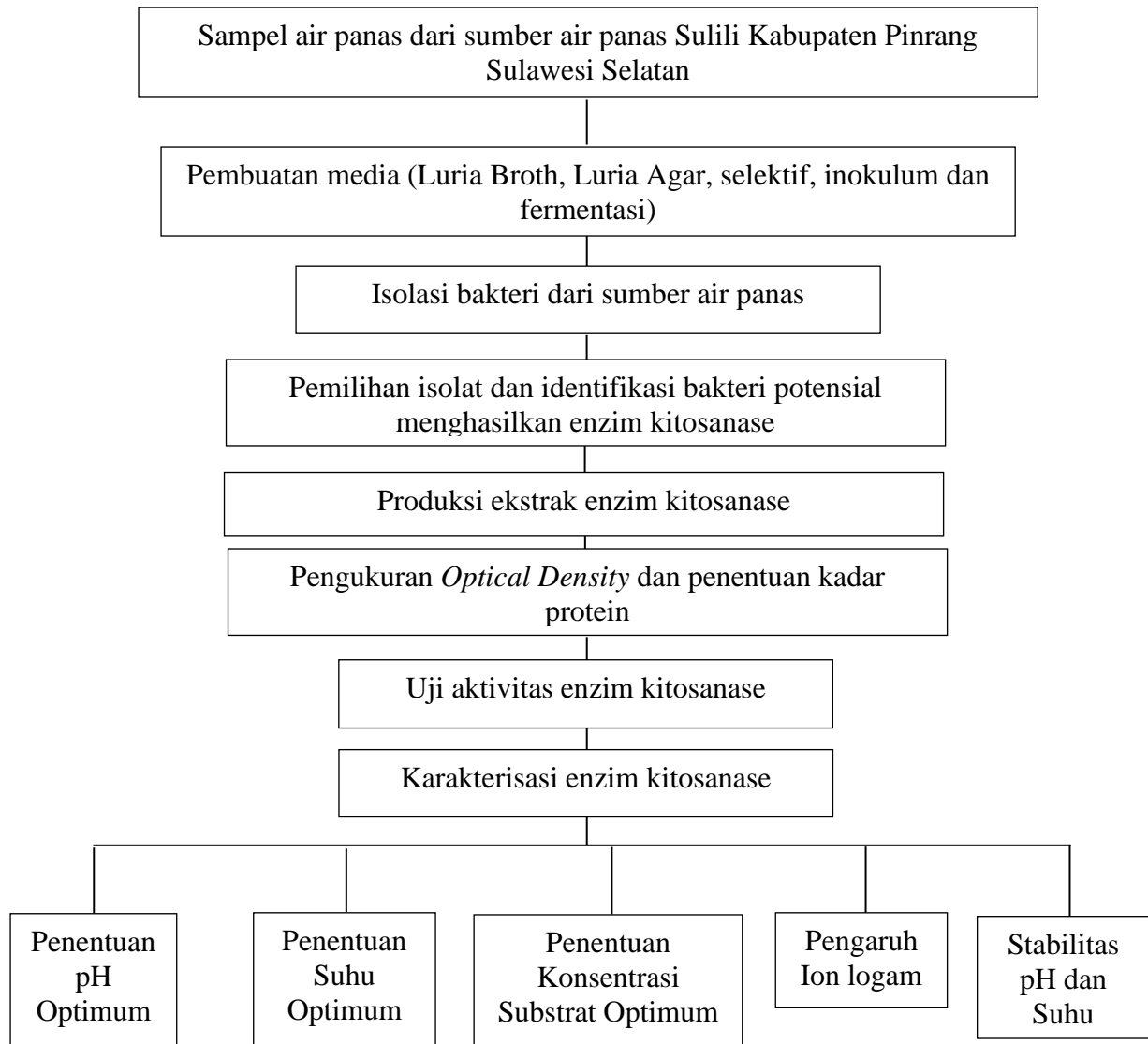
- Lehninger, A.L., 1998, Dasar-dasar Biokimia, Terjemahan oleh M. Thenawidjaja, Erlangga, Jakarta.
- Liang, T.W., Chen, Y.J., Yen, Y.H., dan Wang, S.L., 2007, The Antitumor Activity of the Hydrolysates of Chitinous Materials Hydrolyzed by Crude Enzyme from *Bacillus amyloliquefaciens* V656, *Process Biochem*, **42**; 527–534.
- Liang, T.W., Liu, C.P., Wu, C., dan Wang, S.L., 2013, Applied Development of Crude Enzyme from *Bacillus cereus* in Prebiotics and Microbial Community Changes in Soil, *Carbohydr. Polym*, **92**; 2141–2148.
- Liang, T.W., Chen, W.T., Lin, Z.H., Kuo, Y.H., Nguyen, A.D., Pan, P.S., dan Wang, S.L., 2016, An Amphiprotic Novel Chitosanase from *Bacillus mycooides* and Its Application in the Production of Chitooligomers with Their Antioxidant and Anti-Inflammatory Evaluation, *International Journal of Molecular Science*, **17**; 1-14.
- Liang, T.W., Chen, W.T., Lin, Z.H., Kuo, Y.H., Nguyen, A.D., Pan, P.S., dan Wang, S.L., 2017, An Amphiprotic Novel Chitosanase from *Bacillus mycooides* and its Application in the Production of Chitooligomers with their Antioxidant and Anti-inflammatory Evaluation, *International Journal of Molecular Science*, **17**; 1302.
- Lodhi, G., Kim, Y.S., Hwang, J.W., Kim, S.K., Jeon, Y.J., Je, J.Y., Ahn, C.B., Moon, S.H., Jeon, B.T., dan Park, P.J., 2014, Chitooligosaccharide and Its Derivatives: Preparation and Biological Applications, *BioMed Research International*, (1–13).
- Muharni, 2010, Isolasi dan Identifikasi Bakteri Penghasil Kitinase dari Sumber Air Panas Danau Ranau Sumatera Selatan, *Jurnal Penelitian Sains*, (06-09).
- Natsir, H., 2010, Kajian Enzim Kitinase Termotabil dari Bakteri Termofil: Produksi, Pemurnian, Karakterisasi, dan Aplikasi dalam Hidrolisis Kitin, Disertasi Tidak Diterbitkan, Program Pascasarjana, Universitas Hasanuddin, Makassar.
- Natsir, H., Chandra, D., Rukayadi, Y., Suhartono, M.T., Hwang, J.K., dan Pyun, Y.R., 2002, Biochemical Characteristics of Chitinase Enzyme from *Bacillus* sp. of Kamojang Creater, Indonesian, *Journal of Biochemistry Molecular Biology and Biophysics*, **6**,(4); 279–282.
- Natsir, H., Dali, S., dan Astin, T., 2009, Isolasi dan Karakterisasi Enzim Kitinase dari Bakteri Termofil Isolat ST-3.2b, *Jurnal Ilmiah Biologi Makassar*, **4**(1); 51-58.

- Natsir, H., Patong, A.R., Suhartono, M.T., dan Ahmad, A., 2010, Production and Characterization of Chitinase Enzymes from Sulili Hot Spring in South Sulawesi *Bacillus* sp. HSA,3-1a, *Indonesia Journal Chemistry*, **10**,(2); 256-260.
- Natsir, H., Patong, A.R., Suhartono, M.T., dan Ahmad, A., 2013, Isolation and Purification of Thermostable Chitinase *Bacillus licheniformis* Strain HSA3-1a from Sulili Hot Springs in South Sulawesi, Indonesia, *International Journal Pharmacy Bio Science*, **4**,(3); 1252-1259.
- Natsir, N.A.N., Natsir, H., dan Dali, S., 2014, Eksplorasi dan Karakterisasi Bakteri Termofil Penghasil Enzim Amilase dari Sumber Air Panas Panggo, Sulawesi Selatan, *Seminar Nasional Biokimia UIN Syarif Hidayatullah Jakarta*, Jakarta.
- Nurhidayati, S., Faturrahman, dan Ghazali, M., 2015, Deteksi Bakteri Patogen yang Berasosiasi dengan *Kappaphycus alvarezii* (Doti) Bergejala Penyakit Ice-Ice, *Jurnal Sains dan Teknologi Lingkungan*, **1**,(2); 24-30.
- Panjaitan. F.J., Bachtiar, T., Arsyad, J., Lele, O.K., dan Indriyani, W., 2020, Karakterisasi Mikroskopis dan Uji Biokimia Bakteri Pelarut Fosfat (BPF) dari *Rhizosfer* Tanaman Jagung Fase Vegetatif, *Jurnal Ilmu Pertanian dan Lingkungan*, **6**,(1); 9-17.
- Poernomo, A.T., dan Purwanto, D.A., 2003, Uji aktifitas crude enzim proteolitik *Bacillus subtilis* FNCC 0059 Hasil Fermentasi Curah, *Majalah Farmasi Airlangga*, **3**,(3); 103–107.
- Prescott, L.M., Harley, J.P., dan Danold, A.K., 2003, *Microbiology*, MC Grow Hill, New York.
- Putro, S., 1982, *Study of Suitability of Chitinolastic Microorganisms for Shrimp Waste for Fermentatio*, Disertasi, University of Washington.
- Puspita, E., 2007, *Studi Karakteristik Kitosanase dari Isolat Bacillus Licheniformis MB-2*, Skripsi, Departemen Ilmu dan Teknologi Pangan, Fakultas Teknologi Pertanian, Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Rahayu, S., 2014, *Isolasi dan Karakterisasi Protease dari Bakteri Sumber Air Panas Tamalantik Mamasa Sulawesi Barat*, Skripsi, Departemen Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Hasanuddin.
- Razak, A.R., Satrimafitrah, P., Hardi, J., Khoridah, E.N., Asmarni, Gita, M., dan Dahyana, 2018, Production of Chitosanase from Thermophylic Bacteria Isolated from Bora Hotspring, *Journal of Physics*, Conf. Series 1242 (2019) 012015, (1-6).

- Rochima, E., 2005, *Aplikasi Kitin Deasetilasi Termostabil dari Bacillus papandayan K29-14 Asal Kawah Kamojang Jawa Barat pada Pembuatan Kitosan*, Tesis, Sekolah Pascasarjana, Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Sarni, Natsir, H., dan Dali, S., 2015, Produksi dan Karakterisasi Enzim Kitosanase dari Isolat Bakteri *Klebsiella sp*, *Jurnal Techno*, **4**,(2); 8-15.
- Sarni, Natsir, H., dan Dali, S., 2016, Produksi Oligomer Kitosan dari Limbah Udang Windu (*Panaeus monodon*) Menggunakan Enzim Kitosanase dari Isolat Bakteri *Klebsiella sp*, *Inonesia. Journal Chemistry Research*, **3**; 283-289.
- Shahidi, F., Arachi, J.K.V., dan Jeon, Y.J., 1999, Food applications of chitin and chitosan, *Food Science Technology*, **10**,(2); 37–51.
- Sugiyono, Lintang, R.A.J., dan Sabe, R.A., 2003, *Penapisan dan Karakterisasi Protease Bakteri Termofilik Asal Mata Air Laut Panas Poso Sulawesi Tengah*, Skripsi tidak diterbitkan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Sam Ratulangi, Manado.
- Suhartono, M.T., 1989, *Enzim dan Bioteknologi*, Pusat Antar Universitas, Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Suhartono, M.T., 2000, Exploration of Indonesian Thermophiles Producing Thermostable Chitinolytic Enzymes, *Research Center for Biotechnology*, Bogor Agriculture University, Bogor.
- Sun, T., Qin, Y., Xu, H., Xie, J., Hu, D., Xue, B., dan Hua, X., 2017, Antibacterial Activities and Preservative Effect of Chitosan Oligosaccharide Maillard Reaction Products on *Penaeus vannamei*, *International Journal Biology Macromol*, **105**; 764–768.
- Thadathil, N. dan Velappan, S.P., 2014, Recent Developments in Chitosanase Research and Its Biotechnological Applications: A Review, *Food Chemistry*, **150**; 392-399.
- Thalib, A., 2011, Isolasi Bakteri yang Terdapat pada Kulit Udang, *Jurnal Ilmiah Agribisnis dan Perikanan*, **4**,(1); 14-22.
- Tongko, R., Esa, T., dan Hardjoeno, 2009, Akurasi Tes *Bactident Aminopeptidase* untuk Mengidentifikasi Bakteri Gram Negatif, *Indonesian Journal of Clinical Pathology and Medical Laboratory*, **16**,(1); 29-31.
- Umar, E.P., Nawir, A. Husain, J.R., Tamar, K.R., Maria, Jamaluddin, dan Wakila, M.H., 2020, Analisis Fluida dan Pemanfaatan Sumber Mata Air Panas Daerah Sulili Kabupaten Pinrang Provinsi Sulawesi-Selatan, *Jurnal Geosaintek*, **6**,(3); 161-170.

- Uria, A.R. dan Chasanah, E., 2005, Chitosanase and Chitinase from Microorganism Associated With Marine Sponges, *Proceeding of 9 th Asian Food Conference*, Jakarta.
- Waluyo, L., 2004, *Mikrobiologi Umum*, UMM press, Malang.
- Winarno, 1983, *Buku Seri Teknologi Pangan*, Direktorat Pengembangan Penelitian dan Pengabdian pada Masyarakat, Institut Pertanian Bogor.
- Yoon, H.G., Kim, H.Y., Kim, H.K., Shin, D.H., Hong, B.S., dan Cho, H.Y., 2000, Thermostable Chitosanase from *Bacillus* sp. Strain CK4: Cloning and Expression of the gene and Characterization of the Enzyme, *Journal Enzyme Microbiological Technology*, **66**; 3727–3734.
- Yuli, P.E., Suhartono, M.T., Rukayadi, Y., Hwang, J.K., dan Pyun, Y.R., 2004, Characteristics of Thermostable Chitinase Cnzymes From the Indonesian *Bacillus* sp.13.26, *Enzyme Microbiology Technology*, **35**,(3); 147-153.
- Zhu, X.F., Wu, X.Y., dan Dai, Y., 2003, Fermentation Conditions and Properties of Chitosanase from *Acinetobacter* sp.-17, *Bioscience Biotechnology Biochem*, **67**,(2); 284–290.
- Zilda, D.S., Fawzya, Y.N., dan Chasanah, E., 2006, Karakterisasi Enzim Kitosanase dari Bakteri Kitinolitik T5a1 yang Diisolasi dari Terasi, *Jurnal Pascapanen dan Bioteknologi Kelautan dan Perikanan*, **1**,(1); 43-50.

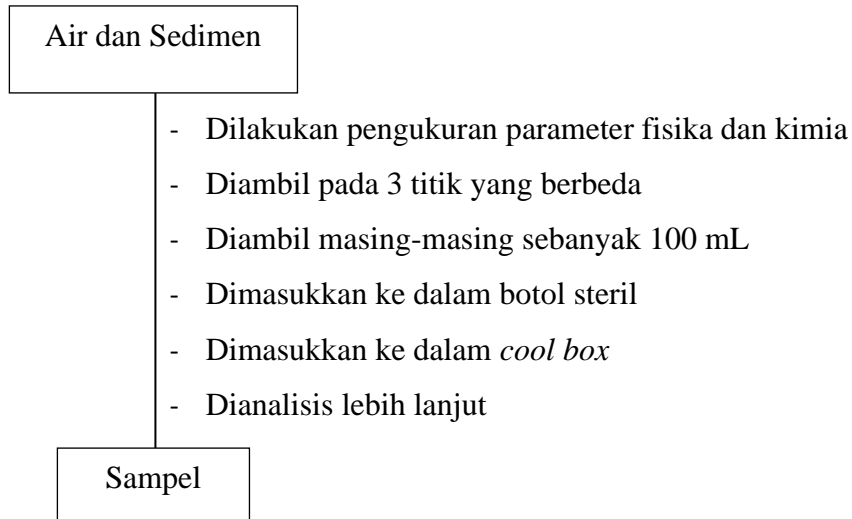
**Lampiran 1.** Diagram Alir



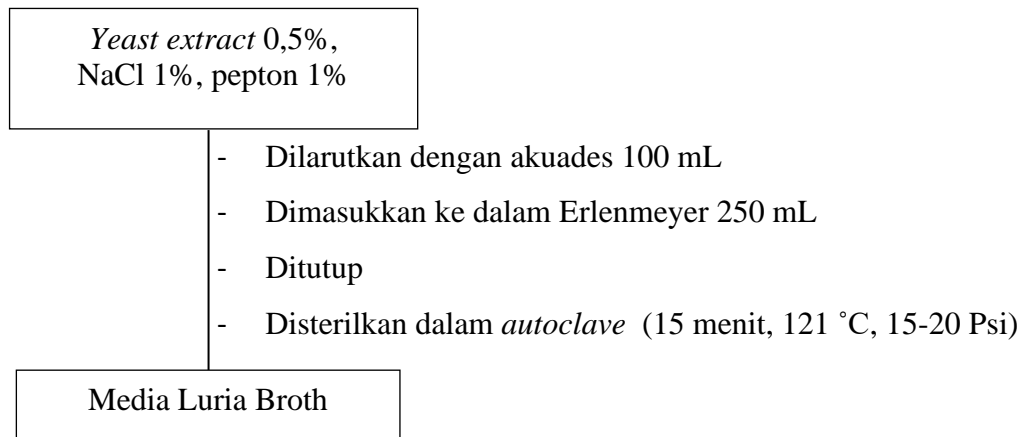


## Lampiran 2. Bagan Kerja

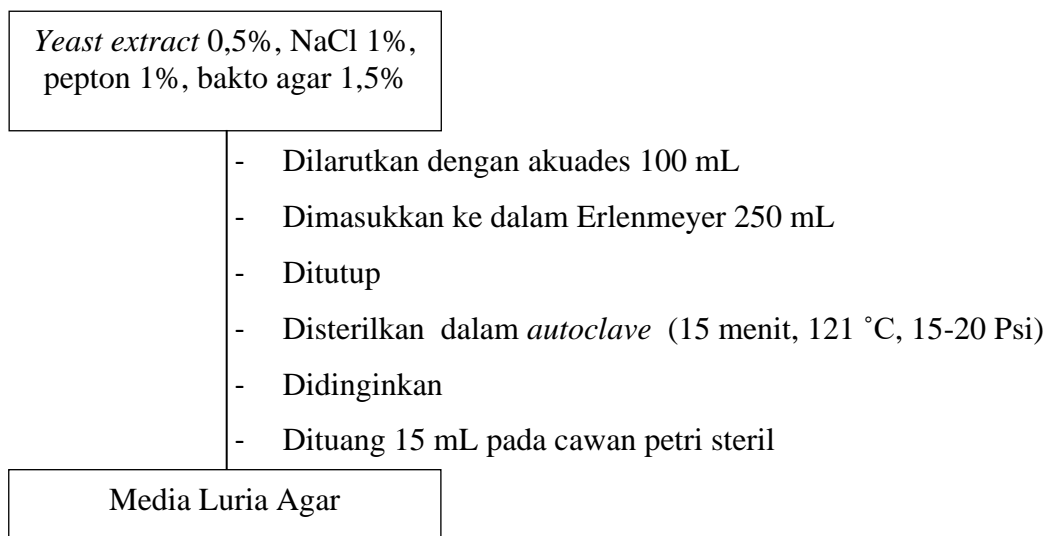
### 1. Pengambilan Sampel



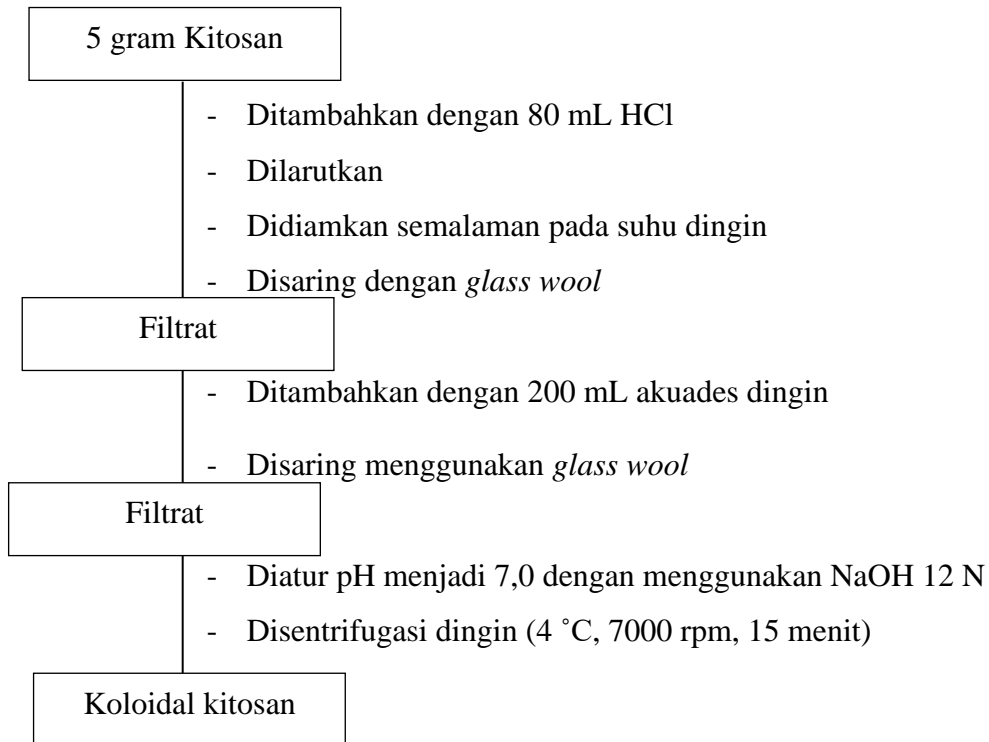
### 2. Pembuatan Media Luria Broth



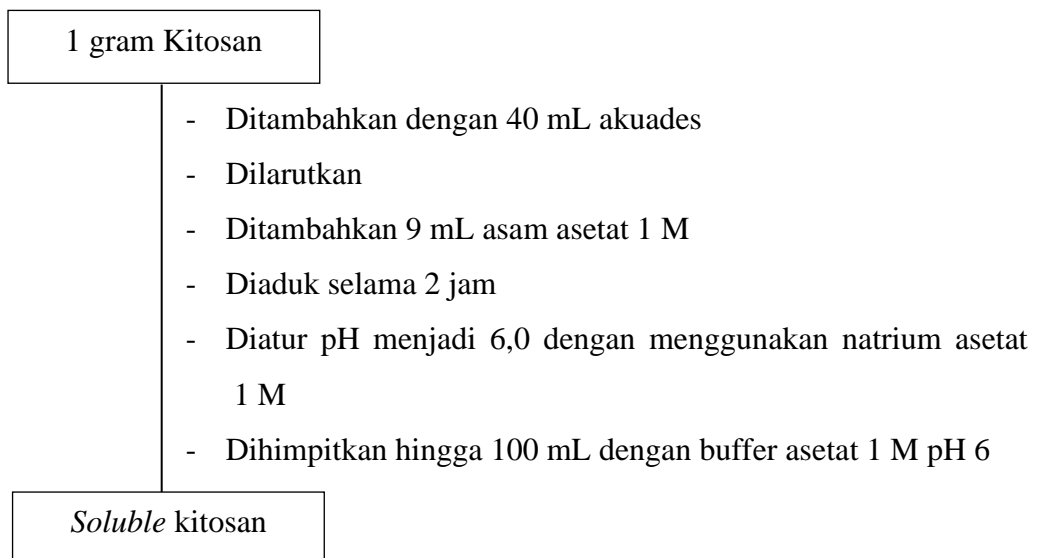
### 3. Pembuatan Media Luria Agar



#### 4. Pembuatan Koloidal Kitosan



#### 5. Pembuatan Soluble Kitosan



## 6. Pembuatan Media Selektif

*Yeast extract* 0,2%, pepton 1%, bakto agar 2%,  
CaCl<sub>2</sub> 0,015%, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,01%, NaCl 0,05%,  
MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 0,05%, koloidal kitosan 0,5%

- Dilarutkan dalam akuades 100 mL
- Dihomogenkan
- Dididihkan
- Disterilkan dalam *autoclave* (15 menit, 121°C, 15-20 Psi)
- Didinginkan
- Dituangkan ke dalam cawan petri steril

Media selektif

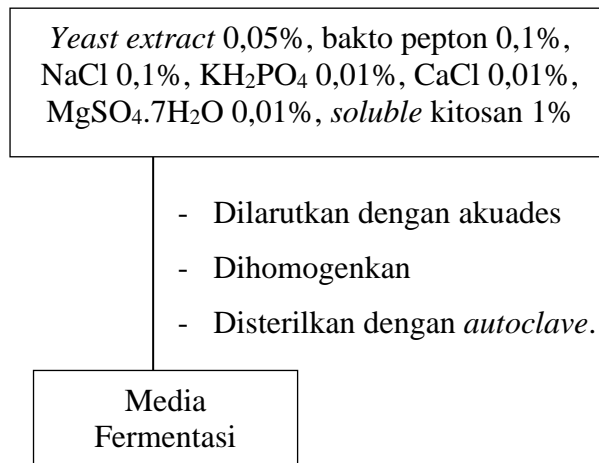
## 7. Pembuatan Inokulum

*Yeast extract* 0,5%, pepton 0,01%,  
CaCl<sub>2</sub> 0,01%, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,01%, NaCl 0,1%,  
MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 0,01% dan *soluble*  
kitosan 1%

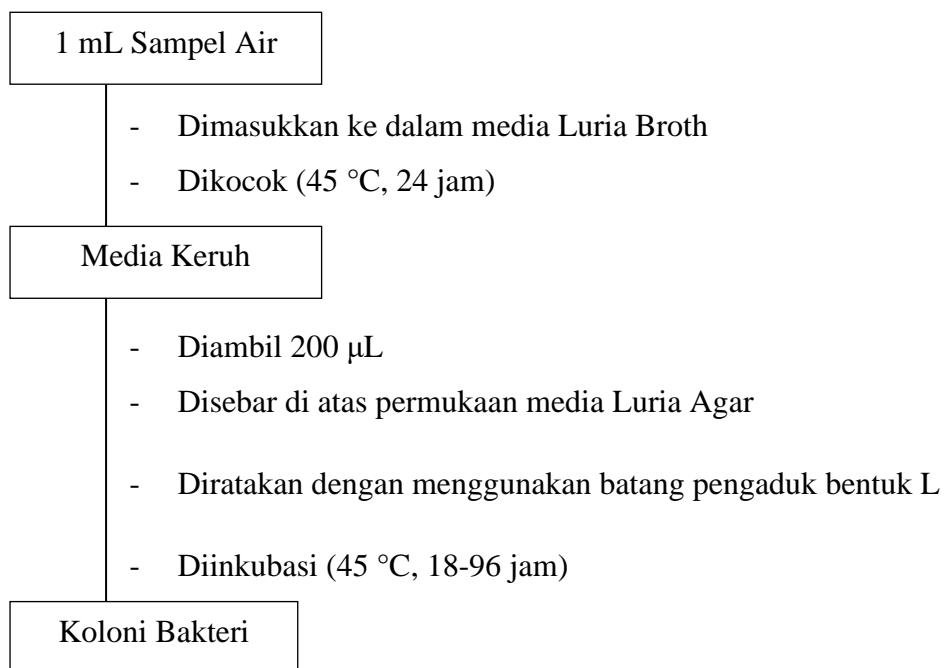
- Dilarutkan dalam akuades 100 mL
- Dihomogenkan dan dipanaskan sampai larut
- Disterilkan (15 menit, 121 °C, 15-20 Psi)
- Dituang ke dalam Erlenmeyer steril
- Diambil 2 hingga 3 ose bakteri yang telah tumbuh
- Diinokulasikan ke dalam media inokulum yang telah disiapkan
- Dikocok ke dalam shaker (40 °C, 180 rpm, 18-24 jam) untuk diinokulasikan lebih lanjut dalam media fermentasi

Media Inokulum  
Aktif

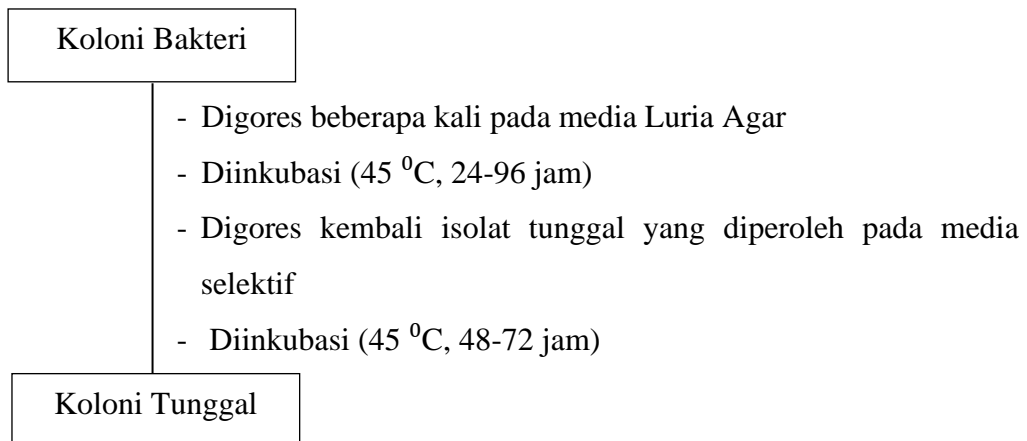
## 8. Pembuatan Media Fermentasi



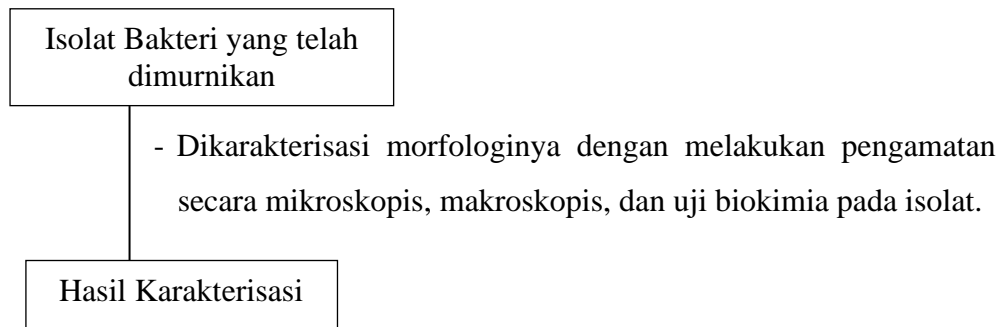
## 9. Isolasi Mikroba dari Sumber Air Panas



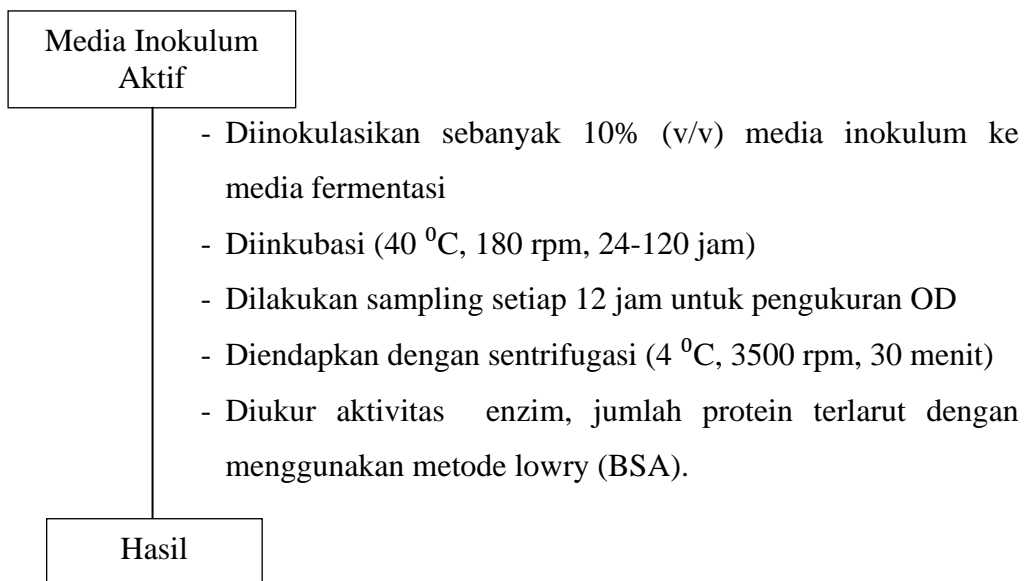
## 10. Pemurnian dan Pemilihan Isolat penghasil kitosanase



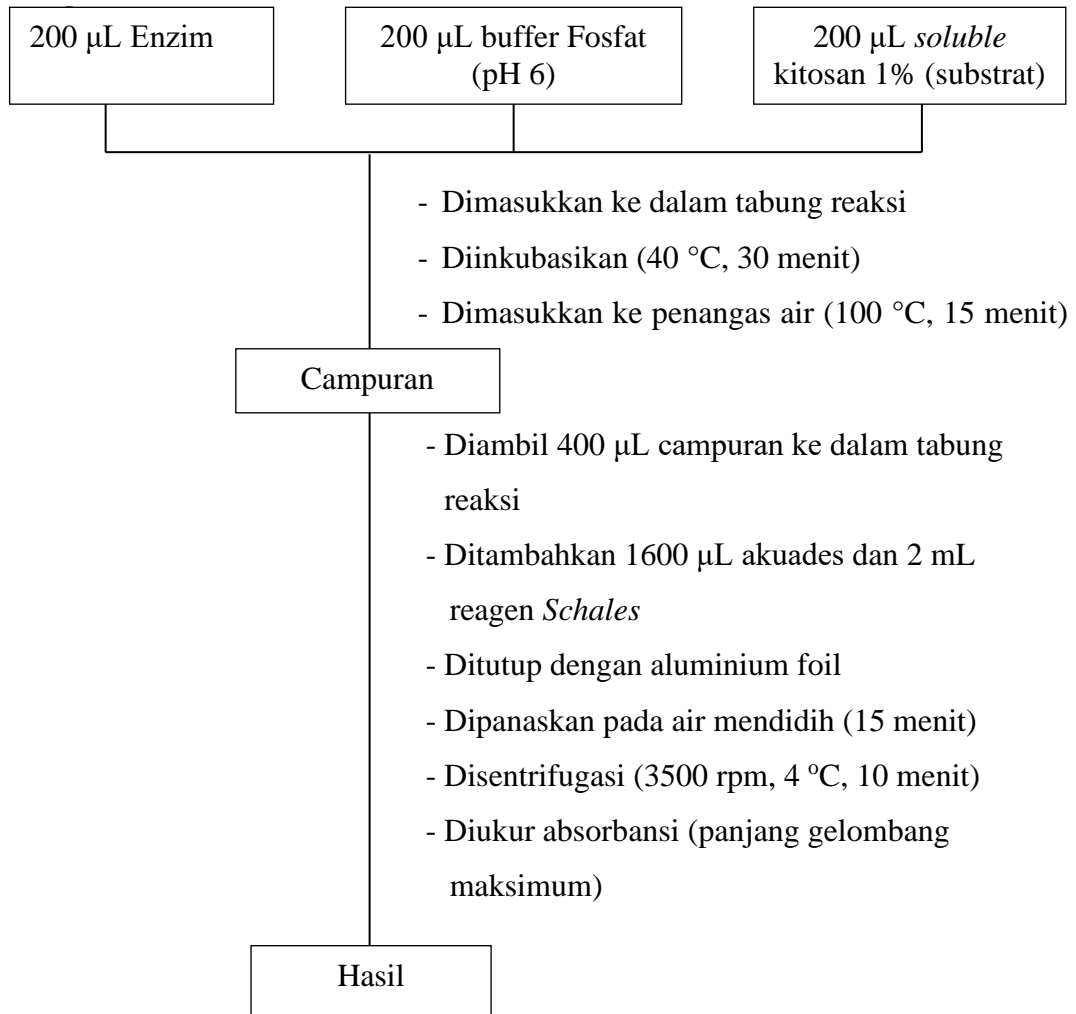
## 11. Uji Morfologi Bakteri Penghasil Enzim Kitosanase



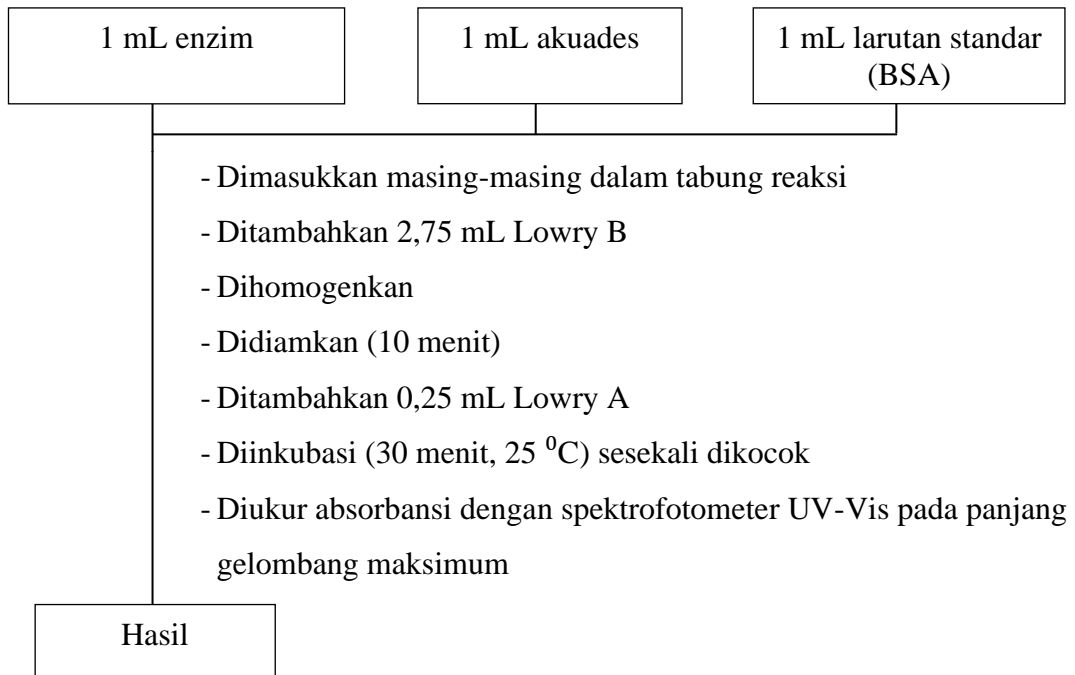
## 12. Produksi Ekstrak Kitosanase



### 13. Pengukuran Aktivitas Enzim Kitosanase

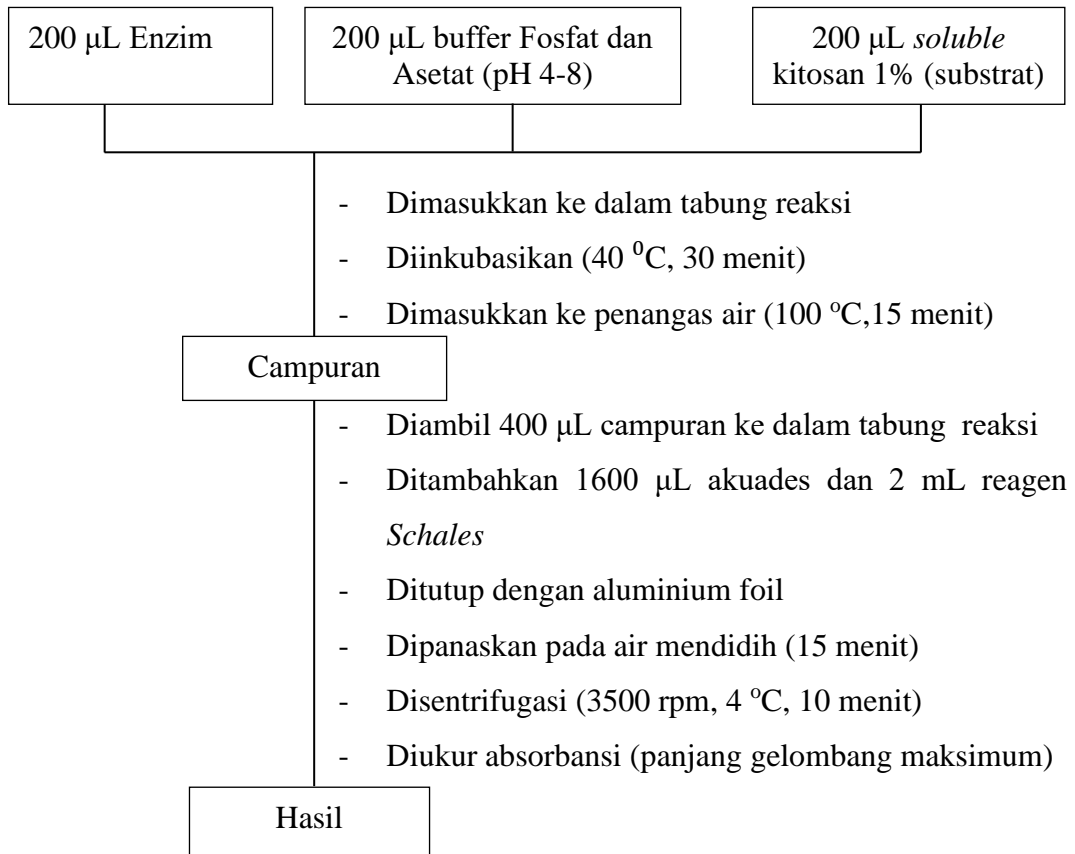


#### 14. Penentuan Kadar Protein dengan Metode Lowry

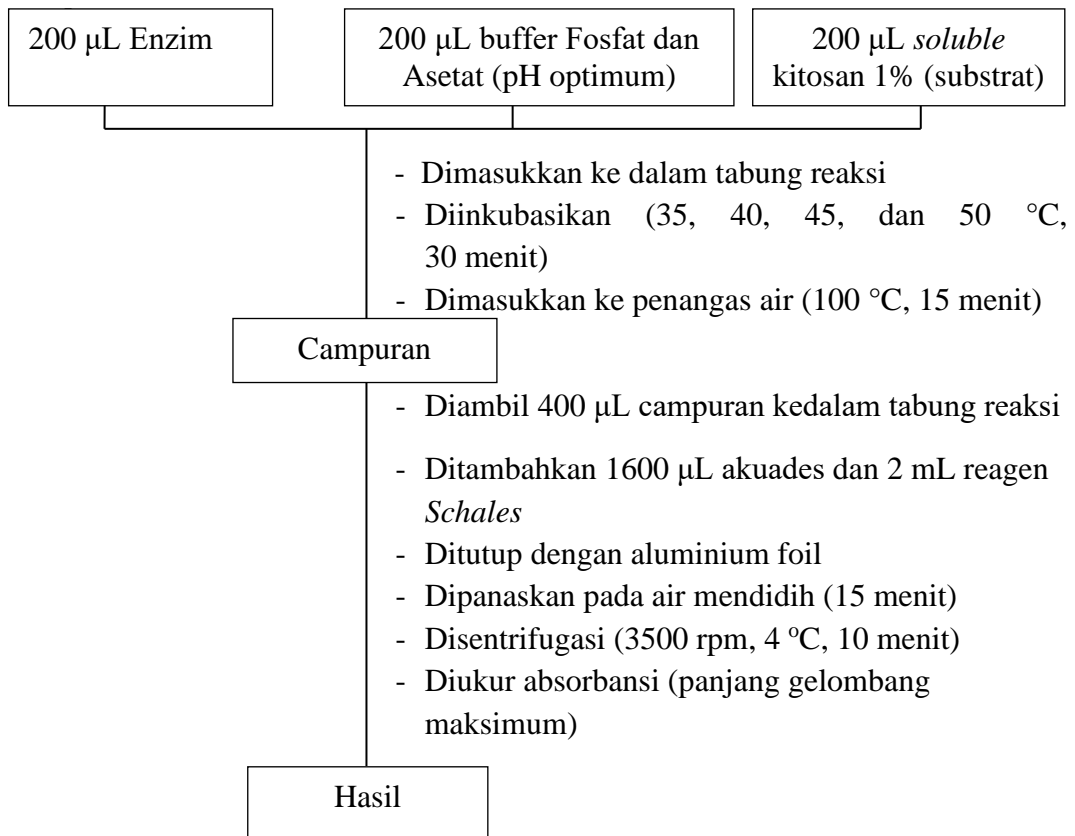


#### 15. Karakterisasi Enzim Kitosanase dari Mikroba Termofilik

##### a. Penentuan pH Optimum

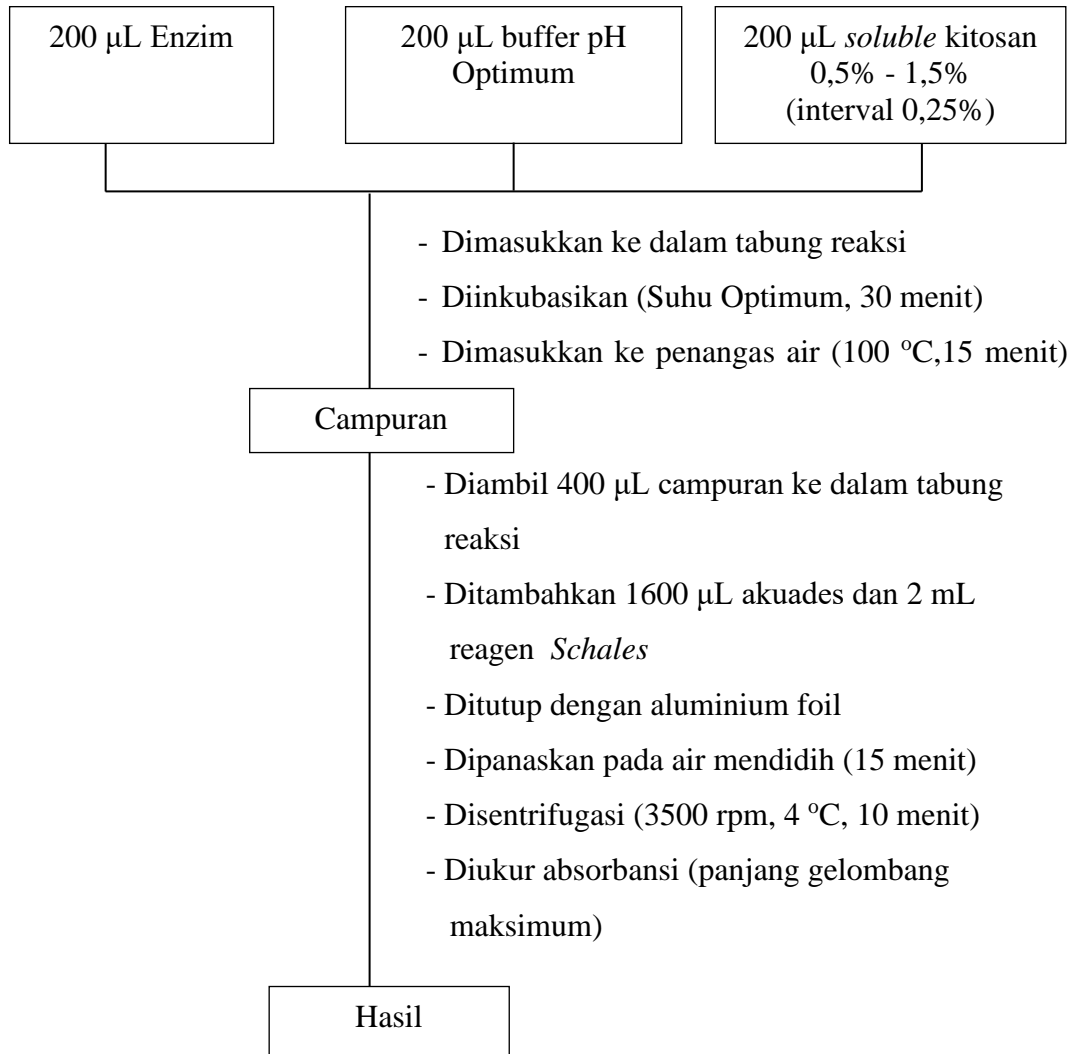


## b. Penentuan Suhu Optimum

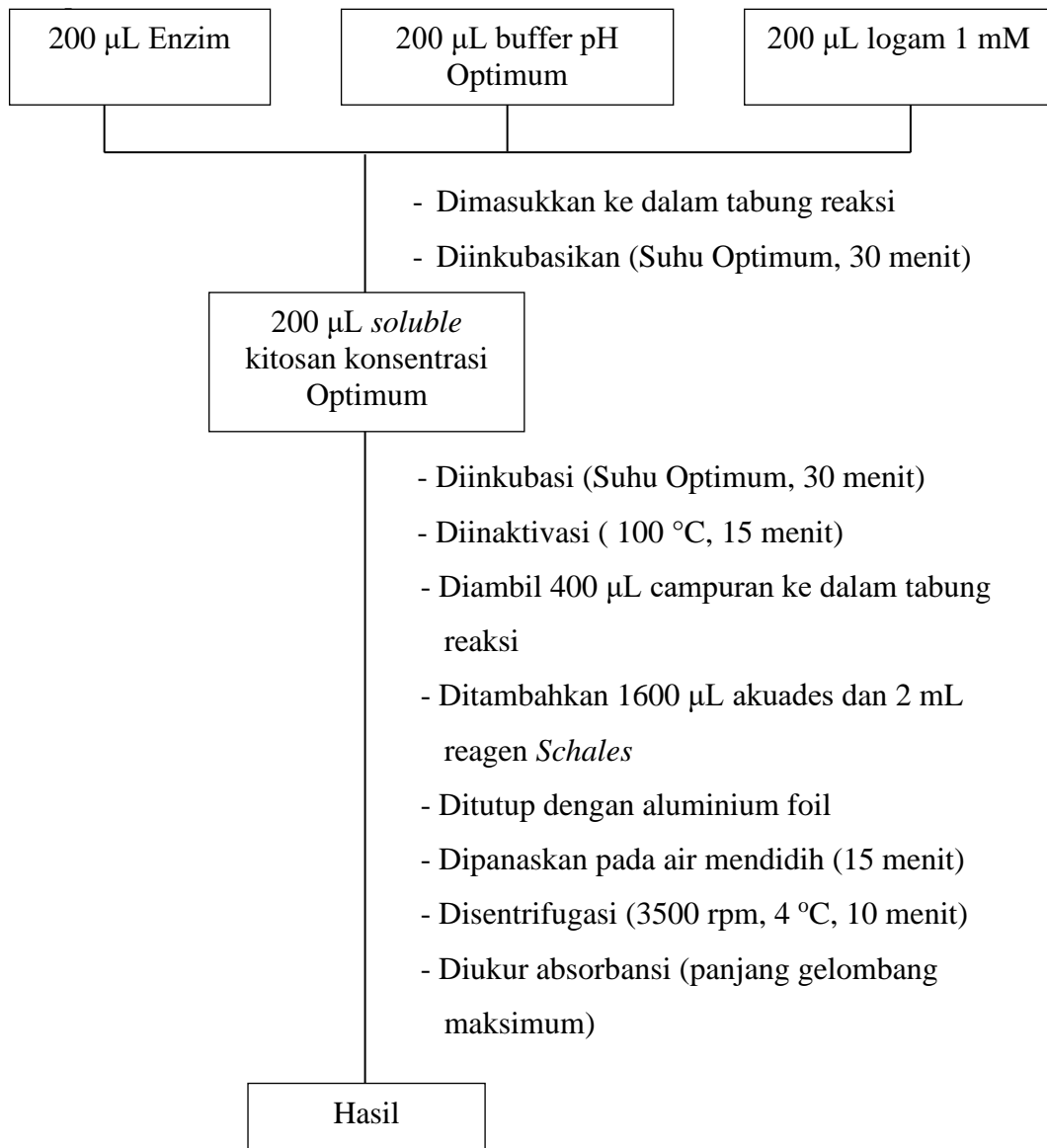




### c. Penentuan Konsentrasi Substrat



#### d. Pengaruh Ion Logam





**Lampiran 3.** Pembuatan Reagen *Schales*, Lowry A dan Lowry B

- Reagen *Schales* sebagai stok dibuat dengan cara melarutkan 52,995 gram  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  dan 0,5 gram *Pottasium ferri cianida* ke dalam 1 L akuades.
- Komposisi Reagen Lowry A; larutan asam *phospho-tungstic-phospho molybdic (foolin)* : akuades (1 : 1).
- Komposisi reagen Lowry B;  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  2% dalam NaOH 0,1 N :  $\text{CuSO}_4$  1% : Natrium-Kalium-Tartrat (100 : 1 : 1).

**Lampiran 4.** Pembuatan Standar Glukosamin (Puspita, 2007)

$$[\text{Glukosamin}] = \frac{0,009 \text{ gram glukosamin}}{9 \text{ mL akuades}} \times 10^6 = 1000 \text{ } \mu\text{g/mL}$$

[Glukosamin] $\mu\text{g/mL}$	Volume Glukosamin ( $\mu\text{L}$ )	Volume Akuades ( $\mu\text{L}$ )
0	0	4000
10	40	3960
20	80	3920
40	160	3840
80	320	3680
160	640	3360

- Pipet 400  $\mu\text{l}$  dari stock glukosamin dan masukan kedalam tabung reaksi, ditambah 1600  $\mu\text{l}$  akuades dan 2000  $\mu\text{l}$  pereaksi *Schales*
- Didihkan selama 15 menit
- Diukur absorbansinya pada panjang gelombang maksimum (419 nm)
- Buat kurva standar dengan absorbansi sebagai ordinat (Y) dan konsentrasi Glukosamin sebagai absis (X).

## Lampiran 5. Tabel dan Perhitungan

### a. Indeks kitinolitik

$$IK = \frac{\text{Diameter zona bening}}{\text{Diameter koloni}}$$

Hasil pengukuran seleksi bakteri penghasil enzim kitosanase

Isolat	H+1	H+2	H+3	H+4
A.3-1	1,18	<b>1,56</b>	1,33	1,25
A.3-2	-	-	-	-
S.2-1	-	-	-	-
S.3-1	1,25	<b>1,25</b>	1,36	1,33

### b. Penentuan *Optical Density* (OD)

*Optical Density* (OD) pada  $\lambda_{600}$

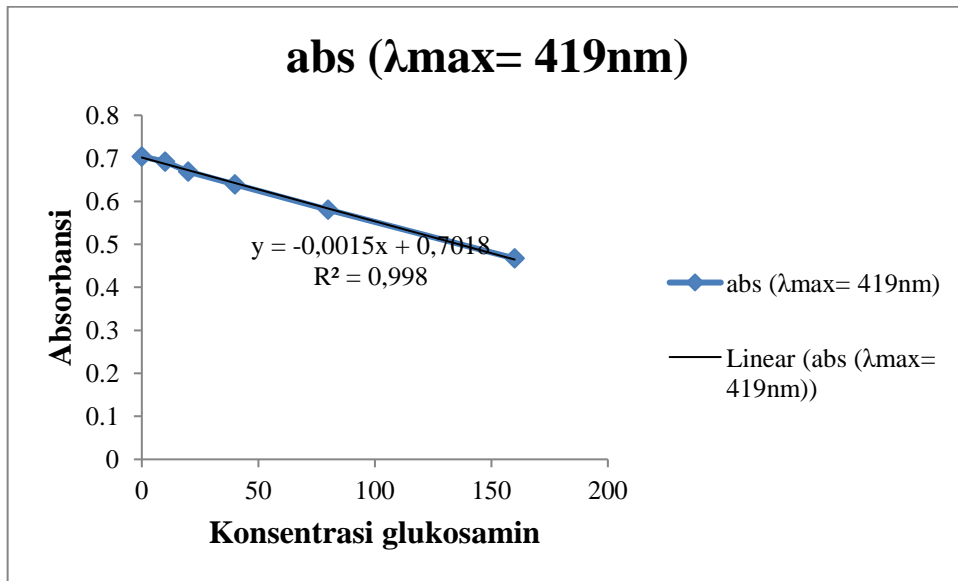
Waktu Inkubasi	OD A.3-1	OD S.3-1
0	0,074	0,08
12	0,177	0,189
24	0,217	0,242
36	0,296	0,305
48	0,35	0,354
60	0,426	0,415
72	0,44	0,436
<b>84</b>	<b>0,445</b>	<b>0,436</b>
96	0,413	0,371
108	0,34	0,251

Diperoleh waktu optimum produksi pada jam ke-84 dengan nilai OD sebesar 0,445 pada isolat A.3-1 dan 0,436 pada isolat S.3-1.

### c. Penentuan Aktivitas Ekstrak Kasar Enzim Kitosanase

Absorbansi standar Glukosamin pada  $\lambda_{419}$

Konsentrasi Glukosamin ( $\mu\text{g/mL}$ )	abs ( $\lambda_{\text{max}}=419\text{nm}$ )
0	0,704
10	0,692
20	0,669
40	0,639
80	0,58



**Gambar 18.** Kurva hubungan konsentrasi standar glukosamin (ppm) terhadap absorbansi pada  $\lambda_{291}$

Contoh perhitungan aktivitas enzim kitosanase pada inkubasi waktu 36 jam:

$$y = -0,0015x + 0,7018$$

$$\begin{aligned} [\text{Glc}]_{\text{sampel}}(\mu\text{g/mL}) &= \frac{A_{\text{sampel}} - \text{Intercept}}{\text{Slope}} \\ &= \frac{0,587 - 0,7018}{-0,0015} \\ &= 76,5333 \mu\text{g/mL} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} [\text{Glc}]_{\text{kontrol}}(\mu\text{g/mL}) &= \frac{A_{\text{kontrol}} - \text{Intercept}}{\text{Slope}} \\ &= \frac{0,671 - 0,7018}{-0,0015} \\ &= 20,5333 \mu\text{g/mL} \end{aligned}$$

Berdasarkan persamaan (1) maka diperoleh:

$$\begin{aligned} \text{Aktivitas Enzim (U/mL)} &= [X_s - X_k] \times \frac{1000}{200} \times \frac{600}{400} \times \frac{1}{30} \times \frac{1}{\text{BM}} \\ &= [76,5333 - 20,5333] \times \frac{1000}{200} \times \frac{600}{400} \times \frac{1}{30} \times \frac{1}{215,6} \\ &= 0,0649 \text{ U/mL} \end{aligned}$$

Aktivitas ekstrak kasar enzim Kitosanase Isolat A.3-1 per waktu inkubasi

<b>A.3-1</b>	<b>abs</b>	<b>U/mL</b>
0	0,67	0,0008
12	0,657	0,0108
24	0,65	0,0162
<b>36</b>	<b>0,587</b>	<b>0,0649</b>
48	0,613	0,0448
60	0,625	0,0356
72	0,635	0,0278
84	0,64	0,0240
96	0,655	0,0124
108	0,66	0,0085

Aktivitas ekstrak kasar enzim Kitosanase Isolat S.3-1 per waktu inkubasi

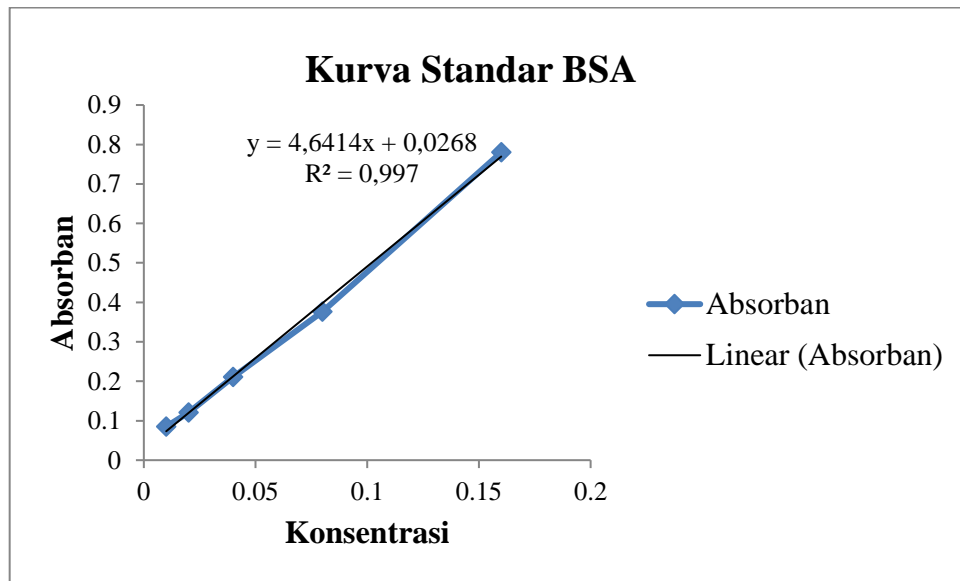
<b>S.3-1</b>	<b>abs</b>	<b>U/mL</b>
0	0,668	0,0023
12	0,654	0,0131
<b>24</b>	<b>0,626</b>	<b>0,0348</b>
36	0,627	0,0340
48	0,633	0,0294
60	0,638	0,0255
72	0,643	0,0216
84	0,652	0,0147
96	0,664	0,0054
108	0,667	0,0031

Diperoleh aktivitas tertinggi pada isolat A.3-1 dengan waktu inkubasi selama 36 jam yaitu sebesar 0,0649 U/mL, dan isolat kode S.3-1 dengan waktu inkubasi selama 24 jam sebesar 0,0348 U/mL.

#### **d. Penentuan Kadar Protein dan Aktivitas Spesifik Ekstrak Kasar Enzim Kitosanase**

<b>Konsentrasi standar (mg/mL)</b>	<b>Absorban</b>
0,01	0,085
0,02	0,121
0,04	0,211
0,08	0,376
0,16	0,78





**Gambar 19.** Kurva hubungan konsentrasi BSA terhadap absorbansi pada  $\lambda_{670}$

Contoh perhitungan kadar protein dan aktivitas spesifik pada waktu inkubasi 36 jam:

$$y = 4,6414x + 0,0268$$

$$x = \frac{y - 0,0268}{4,6414}$$

$$x = \frac{0,229 - 0,0268}{4,6414}$$

$$= 0,043564 \text{ mg/mL}$$

$$\text{Kadar protein} = x \times \text{FP} = 0,043564 \times 100 = 4,3564 \text{ mg/mL}$$

$$\text{Aktivitas Spesifik} = \frac{\text{Aktivitas enzim (U/mL)}}{\text{Kadar protein (mg/mL)}}$$

$$\text{Aktivitas Spesifik} = \frac{0,0649 \text{ U/mL}}{4,3564 \text{ mg/mL}} = 0,0149 \text{ U/mg}$$

Waktu inkubasi (Jam)	Absorbansi (y)	x (mg/mL)	FP	Kadar protein (mg/mL)	Aktivitas (U/mL)	Aktivitas spesifik (U/mg)
0	0,147	0,0259	100	2,5897	0,0008	0,0003
12	0,101	0,0160	100	1,5987	0,0108	0,0067
24	0,145	0,0255	100	2,5466	0,0162	0,0064
36	0,229	0,0436	100	4,3564	0,0649	<b>0,0149</b>
48	0,173	0,0315	100	3,1499	0,0448	0,0142
60	0,15	0,0265	100	2,6544	0,0356	0,0134
72	0,126	0,0214	100	2,1373	0,0278	0,0130
84	0,116	0,0192	100	1,9218	0,0240	0,0125
96	0,106	0,0171	100	1,7064	0,0124	0,0073
108	0,095	0,0147	100	1,4694	0,0085	0,0058

Diperoleh aktivitas spesifik tertinggi pada jam ke-36 yaitu sebesar 0,0149 U/mg.

#### e. Karakterisasi Ekstrak Kasar Enzim Kitosanase

##### 1) Penentuan pH Optimum

Variasi pH	Absorbansi sampel	[Glukosamin] ( $\mu\text{g/mL}$ )	Aktivitas (U/mL)
4	0,528	115,8667	0,0356
5	0,5	134,5333	0,0587
<b>6</b>	<b>0,494</b>	<b>138,5333</b>	<b>0,0757</b>
7	0,516	123,8667	0,0557
8	0,576	83,86667	0,0170

Diperoleh aktivitas tertinggi pada pH 6 yaitu sebesar 0,0757 U/mL.

##### 2) Penentuan Suhu Optimum

Variasi suhu ( $^{\circ}\text{C}$ )	Absorbansi sampel	[Glukosamin] ( $\mu\text{g/mL}$ )	Aktivitas (U/mL)
35	0,485	144,5333	0,0278
<b>40</b>	<b>0,494</b>	<b>138,5333</b>	<b>0,0757</b>
45	0,54	107,8667	0,0479
50	0,46	161,2	0,0433

Diperoleh aktivitas tertinggi pada suhu 40  $^{\circ}\text{C}$  yaitu sebesar 0,0757 U/mL.

### 3) Penentuan Konsentrasi Substrat Optimum

Variasi konsentrasi (%)	Absorbansi sampel	[Glukosamin] ( $\mu\text{g/mL}$ )	Aktivitas (U/mL)
0,5	0,638	42,53333	0,0077
0,75	0,56	94,53333	0,0402
<b>1</b>	<b>0,51</b>	<b>127,8667</b>	<b>0,0788</b>
1,25	0,538	113,2	0,0788
1,5	0,574	91,86667	0,0788

Diperoleh aktivitas tertinggi pada konsentrasi substrat soluble kitosan 1% yaitu sebesar 0,0788 U/mL.

### 4) Penentuan Pengaruh Penambahan Ion Logam

Variasi ion logam klorida	Konsentrasi (mM)	Absorbansi	Aktivitas (U/mL)	Aktivitas relatif
Kontrol	-	0,474	0,1761	100%
$\text{K}^+$	1	0,481	0,1707	96,93%
	10	0,498	0,1575	89,44%
	50	0,526	0,1359	77,17%
$\text{Na}^+$	1	0,462	0,1853	105,22%
	10	0,412	0,2240	127,20%
	50	0,392	0,2395	136,00%
$\text{Mg}^{2+}$	1	0,452	0,2887	163,94%
	10	0,448	0,1962	111,41%
	50	0,554	0,1142	64,85%
$\text{Ca}^{2+}$	1	0,462	0,1853	105,22%
	10	0,445	0,1985	112,72%
	50	0,442	0,2008	114,03%
$\text{Ba}^{2+}$	1	0,478	0,1730	98,24%
	10	0,526	0,1359	77,17%
	50	0,564	0,1065	60,48%
$\text{Co}^{2+}$	1	0,412	0,2240	127,20%
	10	0,328	0,2657	150,88%
	50	0,316	0,2982	169,34%
$\text{Zn}^{2+}$	1	0,484	0,1683	95,57%
	10	0,492	0,1622	92,11%
	50	0,564	0,1065	60,48%

Contoh perhitungan aktivitas relatif (%) KCl (K<sup>+</sup>) pada konsentrasi 1 mM:

$$\begin{aligned} \text{Aktivitas relatif (\%)} &= \frac{\text{Aktivitas dengan KCl}}{\text{Aktivitas kontrol (tanpa logam)}} \times 100\% \\ &= \frac{0,1767}{0,1761} \times 100\% \\ &= 99,83\% \end{aligned}$$

### 5) Penentuan Stabilitas pH

Waktu inkubasi	pH 6		pH 7	
	Absorban	Aktivitas (U/mL)	Absorban	Aktivitas (U/mL)
0 Menit	0,428	0,0680	0,508	0,0649
30 Menit	0,399	0,0657	0,53	0,0618
60 Menit	0,412	0,0587	0,552	0,0557
90 Menit	0,41	0,0557	0,566	0,0541
120 Menit	0,408	0,0557	0,55	0,0495
150 Menit	0,412	0,0518	0,546	0,0487
24 Jam	0,422	0,0441	0,577	0,0348

Contoh perhitungan aktivitas relatif (%) stabilitas pH 7 pada waktu inkubasi 0 menit ke 150 menit:

$$\begin{aligned} \text{Aktivitas relatif (\%)} &= \frac{\text{Aktivitas kitosanase 150 menit}}{\text{Aktivitas kitosanase 0 menit}} \times 100\% \\ &= \frac{0,0487}{0,0649} \times 100\% \\ &= 75,0385\% \end{aligned}$$

Aktivitas kitosanase menurun 29,9615% setelah diinkubasi 150 menit dengan buffer pH 7.

Perhitungan aktivitas relatif (%) stabilitas pH 7 pada waktu inkubasi 0 menit ke 30 menit:

$$\begin{aligned} \text{Aktivitas relatif (\%)} &= \frac{\text{Aktivitas kitosanase 30 menit}}{\text{Aktivitas kitosanase 0 menit}} \times 100\% \\ &= \frac{0,0618}{0,0649} \times 100\% \\ &= 95,2234\% \end{aligned}$$

Aktivitas kitosanase menurun 4,7766% setelah diinkubasi 30 menit dengan buffer pH 7.

#### 6) Penentuan Stabilitas Suhu

Waktu inkubasi	Suhu 40 °C		Suhu 45 °C	
	Absorban	Aktivitas (U/mL)	Absorban	Aktivitas (U/mL)
0 Menit	0,428	0,068	0,464	0,0603
30 Menit	0,399	0,0657	0,436	0,0526
60 Menit	0,412	0,0587	0,426	0,0464
90 Menit	0,41	0,0557	0,416	0,0448
120 Menit	0,408	0,0557	0,36	0,0448
150 Menit	0,412	0,0518	0,351	0,0379
24 Jam	0,427	0,0402	0,44	0,0247

Contoh perhitungan aktivitas relatif (%) stabilitas suhu 40 °C pada waktu inkubasi 0 menit ke 150 menit:

$$\begin{aligned}
 \text{Aktivitas relatif (\%)} &= \frac{\text{Aktivitas kitosanase 150 menit}}{\text{Aktivitas kitosanase 0 menit}} \times 100\% \\
 &= \frac{0,0518}{0,068} \times 100\% \\
 &= 76,1765 \%
 \end{aligned}$$

Berarti aktivitas kitosanase menurun 23,8235% setelah diinkubasi 150 menit pada suhu 40 °C.

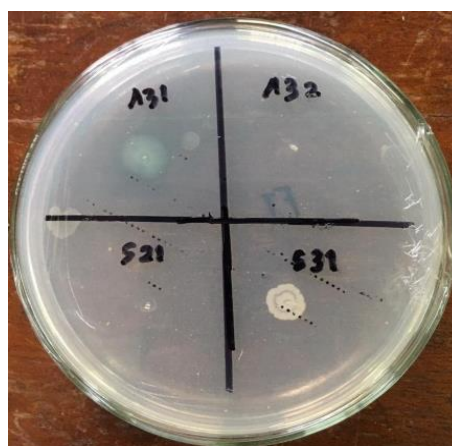
**Lampiran 6. Dokumentasi**



Pengambilan sampel



Isolasi bakteri termofilik



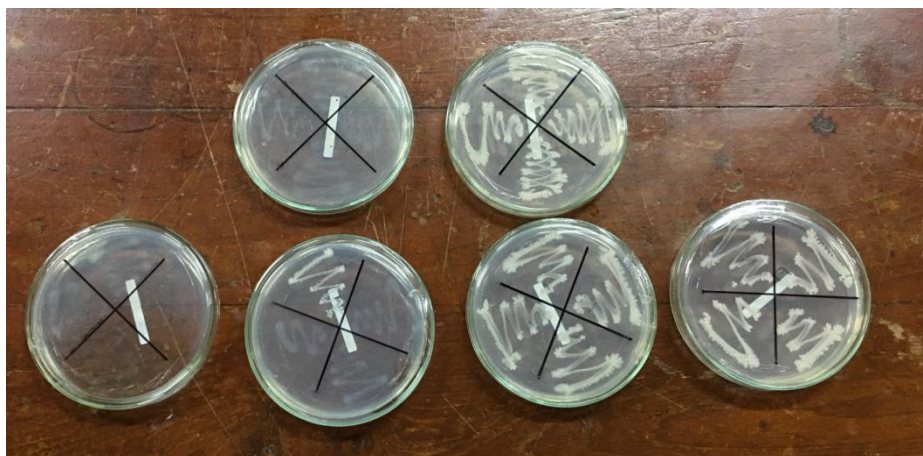
Media selektif kitosan



Uji biokimia isolat A31



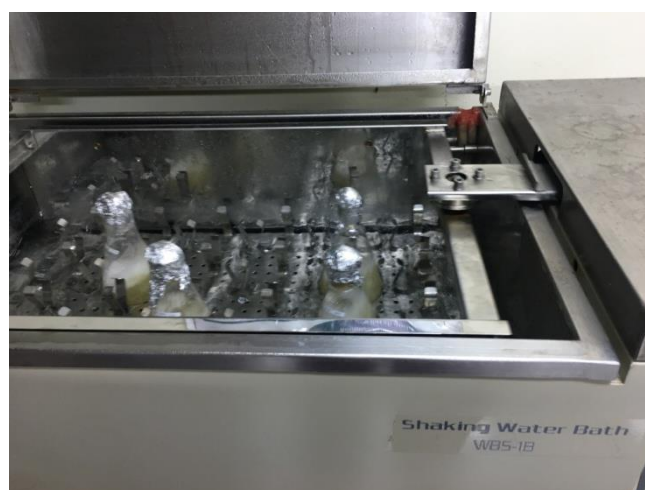
Uji biokimia isolat S3



Perbanyak bakteri untuk produksi enzim



Media fermentasi



Pengukuran OD



Standar BSA Metode Lowry





Pengukuran kadar protein sampel metode lowry

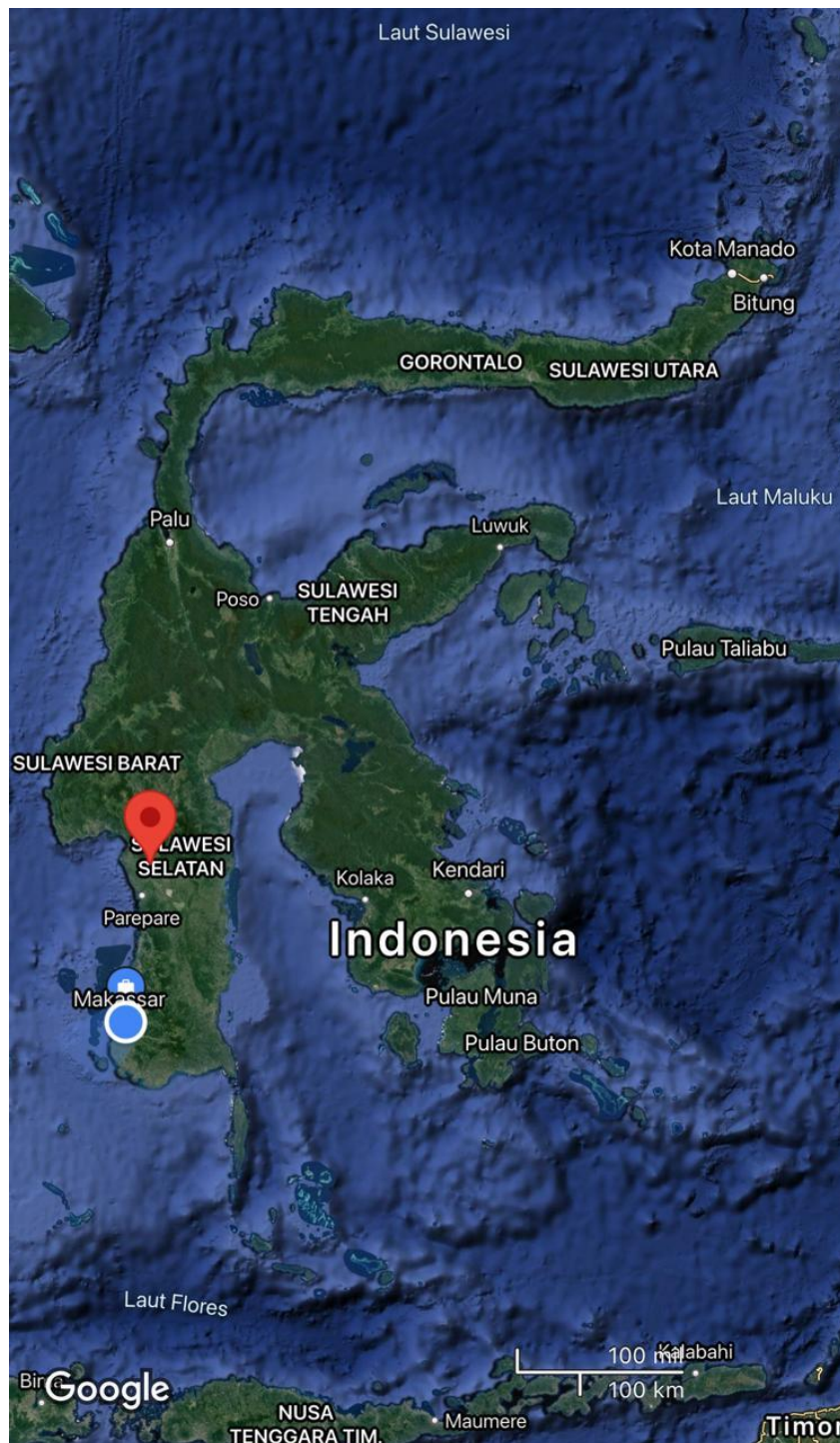


Pengukuran aktivitas enzim

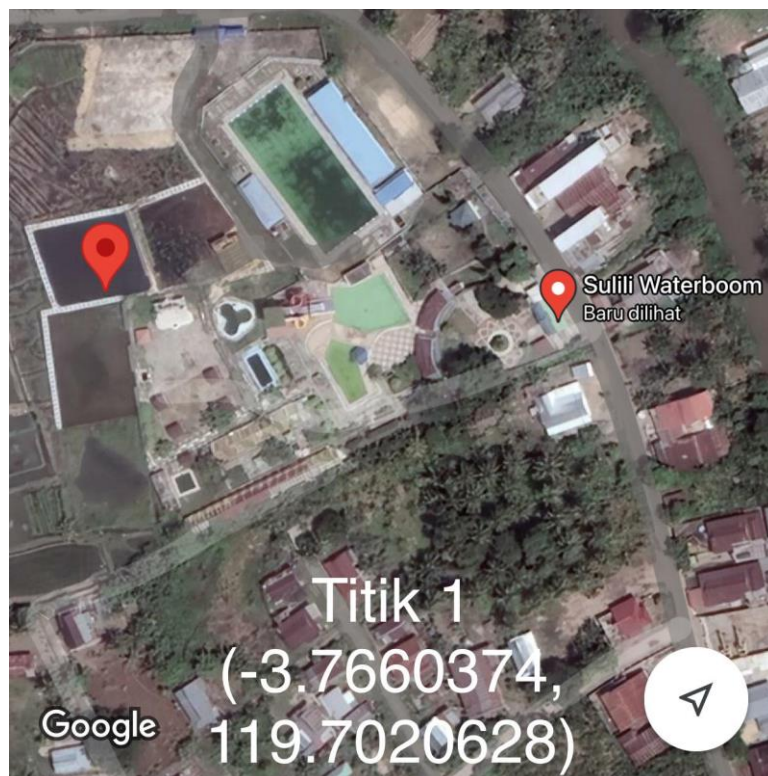


Standar Glukosamin

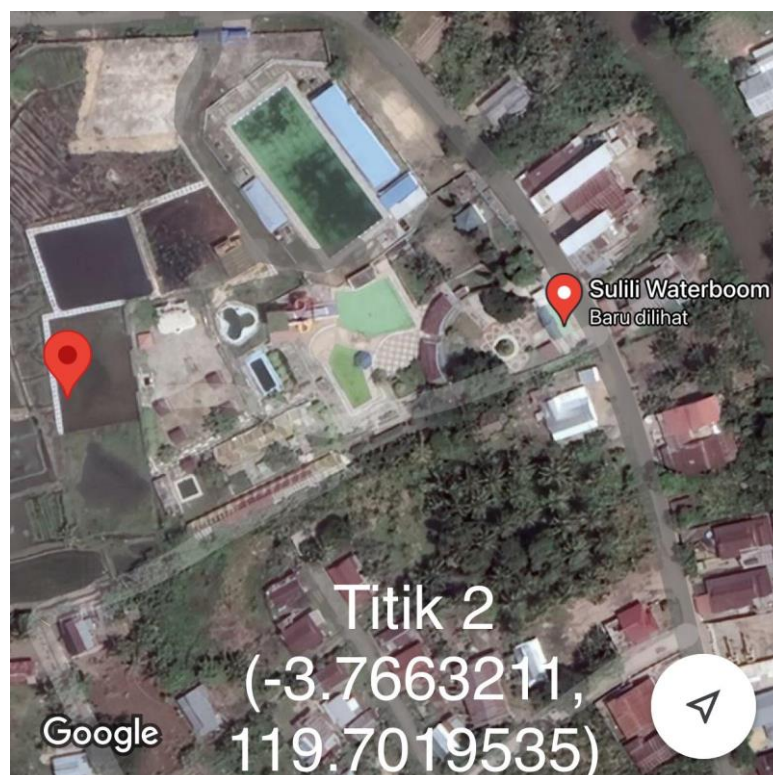
**Lampiran 7.** Peta dan titik pengambilan sampel



Peta lokasi pengambilan sampel (Sumber air panas sulili, Mamminasae, Kecamatan Paleteang, Kabupaten Pinrang, Sulawesi Selatan, Indonesia)  
6PM3+H83



Titik pengambilan sampel 1



Titik pengambilan sampel 2



Titik pengambilan sampel 3