

**ANALISIS MORFOLOGI LIMBAH KULIT UDANG  
HASIL BIODEGRADASI SECARA FERMENTASI PADAT  
OLEH *ACTINOMYCETES* YANG BERASAL DARI BIOTA LAUT**

**DISERTASI**

**Oleh**

**WIDYASTUTI**



**PROGRAM STUDI DOKTOR MIPA  
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
UNIVERSITAS LAMPUNG  
BANDAR LAMPUNG  
2023**

## ABSTRAK

### ANALISIS MORFOLOGI LIMBAH KULIT UDANG HASIL BIODEGRADASI SECARA FERMENTASI PADAT OLEH *ACTINOMYCETES* YANG BERASAL DARI BIOTA LAUT

Oleh

WIDYASTUTI

Penelitian dan pengembangan teknik analisis secara mikroskopi khususnya pada bidang biomaterial semakin meningkat. Penelitian ini bertujuan menganalisis permukaan menggunakan *Scanning Electron Microscopy* (SEM) dan instrumen pendukung lainnya pada proses biodegradasi limbah kulit udang melalui proses fermentasi padat dalam menghasilkan produk turunannya yang dapat diaplikasikan sebagai antifungi. *Actinomycetes* diisolasi dari biota laut (*sponge* dan *tunicate*) yang diambil dari perairan Buleleng, Bali dan Oluhuta Gorontalo dan diremajakan menggunakan media koloid kitin agar. Identifikasi *actinomycetes* dilakukan berdasarkan analisis filogenetik. Limbah kulit udang diperoleh dari Gudang Lelang Teluk, Bandar Lampung. Skrining *actinomycetes* penghasil enzim kitinase dilakukan dengan Teknik difusi agar. Fermentasi dilakukan dengan menggunakan solid state fermentasi dengan media kulit udang. Hasil degradasi kulit udang diamati menggunakan teknik SEM. Sedangkan produk hasil degradasi dianalisis menggunakan metode *High Pressure Liquid Chromatography* (HPLC). Berdasarkan hasil skrining zona bening, *actinomycetes* 18D36A1, 18D36A2, dan 19C38A1 berpotensi menghasilkan kitinase. Hasil analisis filogenetik menunjukkan bahwa isolat 18D36A1 merupakan *actinomycetes* genus *Pseudonocardia* dengan nama *Pseudonocardia antitumoralis* 18D36A1 (LC578481), dan isolat 18D36A2 ini yang mengindikasikan sebagai spesies baru *Micrococcus*, sedangkan isolat 19C38A1 ini dikenal sebagai *Kocuria palustris* dengan nama *Kocuria palustris* 19C38A1 (LC659429). Hasil pengamatan morfologi kulit udang teramati proses degradasi meningkat dari hari ke 1 sampai dengan hari ke 4 disertai dengan peningkatan pertumbuhan *actinomycetes*. Analisis lebih lanjut menggunakan HPLC mengindikasikan hasil degradasi kulit udang membentuk oligomer (*chitooligosaccharide*) dan monomer (*glucosamine*). Selanjutnya hasil uji bioaktifitas hasil degradasi isolat 18D36A1 mengindikasikan

bahwa COS memiliki sifat menghambat pertumbuhan antifungi. Berdasarkan data tersebut dapat disimpulkan bahwa aplikasi teknik SEM sangat membantu dalam penentuan potensi suatu *actinomyces* dalam mendegradasi kulit udang menjadi produk turunannya berupa monomer (*glucosamine*) dan oligomer (*chitooligosaccharide*). Hasil informasi yang didapat dari penelitian ini tentunya dapat dimanfaatkan sebagai dasar pengembangan kajian *actinomyces* untuk aplikasi riset *bioengineering* dan teknologi fermentasi dalam skala produksi

**Kata kunci:** *actinomyces*, biodegradasi, COS, glukosamin, SEM.

## ABSTRACT

### MORPHOLOGICAL ANALYSIS OF SHRIMP SHELL WASTE BIODEGRADATION RESULTS BY SOLID FERMENTATION BY ACTINOMYCETES FROM MARINE BIOTA

By

WIDYASTUTI

Research and development of microscopic analysis techniques, especially in the field of biomaterials, is increasing. This study aims to analyze the surface using Scanning Electron Microscopy (SEM) and other supporting instruments in the process of biodegradation of shrimp shell waste through a solid fermentation process in producing derivative products that can be applied as antifungals. *Actinomyces* were isolated from marine biota (sponge and tunicate) taken from the waters of Buleleng, Bali and Oluhuta Gorontalo and rejuvenated using colloidal chitin agar media. Identification of *actinomyces* was carried out based on phylogenetic analysis. Shrimp shell waste was obtained from the Teluk Auction Warehouse, Bandar Lampung. Screening of chitinase-producing *actinomyces* was carried out using the agar diffusion technique. Fermentation was carried out using solid state fermentation with shrimp shell media. The results of shrimp shell degradation were observed using the SEM technique. Meanwhile, the degradation products were analyzed using the High Pressure Liquid Chromatography (HPLC) method. Based on the clear zone screening results, *actinomyces* 18D36A1, 18D36A2, and 19C38A1 have the potential to produce chitinase. The results of the phylogenetic analysis showed that isolate 18D36A1 is an *actinomyces* of the genus *Pseudonocardia* with the name *Pseudonocardia antitumoralis* 18D36A1 (LC578481), and isolate 18D36A2 indicates a new species of *Micrococcus*, while isolate 19C38A1 is known as *Kocuria palustris* with the name *Kocuria palustris* 19C38A1 (LC659429). The results of observations of shrimp shell morphology observed that the degradation process increased from day 1 to day 4 accompanied by an increase in the growth of *actinomyces*. Further analysis using HPLC indicated that the results of shrimp shell degradation formed monomers (glucosamine) and oligomers (chitooligosaccharide). Furthermore, the results of the bioactivity test results from the degradation of isolate 18D36A1 indicated that COS had antifungal growth inhibiting properties. Based on these data it can be concluded

that the application of SEM techniques is very helpful in determining the potential of an *actinomycetes* in degrading shrimp shells into their derivative products as monomers (glucosamine) and oligomers (chitooligosaccharide). The results of the information obtained from this research can certainly be used as a basis for developing *actinomycetes* studies for bioengineering research applications and fermentation technology on a production scale.

**Keywords:** *actinomycetes*, biodegradation, COS, glucosamine, SEM.

**ANALISIS MORFOLOGI LIMBAH KULIT UDANG  
HASIL BIODEGRADASI SECARA FERMENTASI PADAT  
OLEH *ACTINOMYCETES* YANG BERASAL DARI BIOTA LAUT**

**Oleh**

**WIDYASTUTI**

**Disertasi**

**Sebagai Salah Satu Syarat untuk Mencapai Gelar  
DOKTOR MIPA**

**Pada**

**Program Pascasarjana  
Doktor MIPA**



**PROGRAM STUDI DOKTOR MIPA  
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
UNIVERSITAS LAMPUNG  
BANDAR LAMPUNG  
2023**

**ANALISIS MORFOLOGI LIMBAH KULIT UDANG HASIL  
BIODEGRADASI SECARA FERMENTASI PADAT OLEH  
ACTINOMYCETES YANG BERASAL DARI BIOTA LAUT**

Dipersiapkan dan disusun oleh:

**WIDYASTUTI**

NPM. 1937061004

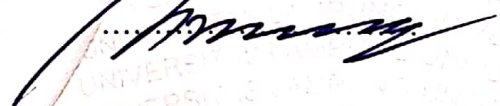
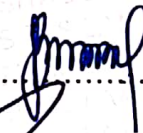
**telah disetujui oleh**

Prof. John Hendri, M.S., Ph.D.  
Promotor

Prof. Andi Setiawan, M.Sc., Ph.D.  
Ko-Promotor

Prof. Dr. Kamisah D. Pandiangan, M.Si  
Ko-Promotor

Dr. G. Nugroho Susanto, M.Sc.  
Ketua Program Studi Doktor MIPA



**Mengesahkan**  
**Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam**

Dr. Eng. Suripto Dwi Yuwono, M.T.

NIP. 19740705 200003 1 001

**Direktur Program Pascasarjana**

Prof. Dr. Ahmad Saudi Samosir, S.T., M.T.

NIP. 19710415 199803 1 005

**ANALISIS MORFOLOGI LIMBAH KULIT UDANG HASIL  
BIODEGRADASI SECARA FERMENTASI PADAT OLEH  
ACTINOMYCETES YANG BERASAL DARI BIOTA LAUT**

Dipersiapkan dan disusun oleh:

**WIDYASTUTI**  
NPM. 1937061004

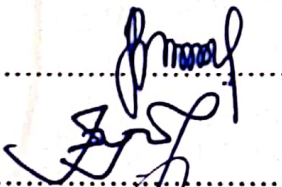
Telah dipertahankan di depan Dewan Penguji  
Pada Tanggal 27 Januari 2023

**Dewan Penguji**

Prof. John Hendri, M.S., Ph.D.  
Promotor



Prof. Andi Setiawan, M.Sc., Ph.D.  
Ko-Promotor



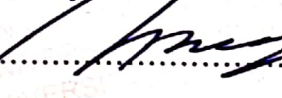
Prof. Dr. Kamisah D. Pandiangan, M.Si.  
Ko-Promotor



Prof. Dr. Sal Prima Yudha, M.Si.  
Penguji



Prof. Wasinton Simanjuntak, M.Sc., Ph.D.  
Penguji




Dr. Eng. Heri Satria, M.Si  
Penguji

Dr. G. Nugroho Susanto, M.Sc.  
Ketua Program Studi Doktor MIPA

Disertasi ini telah diterima sebagai salah satu persyaratan  
Untuk memperoleh gelar Doktor MIPA pada tanggal 27 Januari 2023

Mengesahkan  
Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam



Dr. Eng. Sripto Dwi Yuwono, M.T.  
NIP. 19740705200003 1 001



## PERNYATAAN ORISINILITAS DISERTASI

Saya menyatakan dengan sebenar-benarnya bahwa sepanjang pengetahuan saya di dalam disertasi ini tidak terdapat karya ilmiah yang pernah diajukan untuk memperoleh gelar akademik di suatu perguruan tinggi, dan tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain, kecuali yang secara tertulis dikutip dalam naskah ini dan disebutkan dalam pustaka.

Bandar Lampung, 27 Januari 2022

Yang Mengetahui  
  
METER  
TEMPER  
62D1CAKX12401225  
**WIDYASTUTI**  
NPM. 1937061004

## **RIWAYAT HIDUP**

Penulis dilahirkan di Gisting, Tanggamus, pada tanggal 14 Mei 1987, anak ke-2 dari Bapak Hi. Sukidi Adrianto, S.E. dan Hj. Erniwati.

Penulis menyelesaikan di Sekolah Dasar Negeri 1 Sumberejo tahun 1999. Selanjutnya menyelesaikan pendidikan di Sekolah Menengah Pertama Negeri 1 Talang Padang tahun 2002. Penulis melanjutkan di Sekolah Menengah Atas Negeri 1 Talang Padang dan selesai pada tahun 2005. Pada tahun 2005 penulis diterima mahasiswa S1 Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Jurusan Pendidikan Kimia Universitas Negeri Yogyakarta dan menyelesaikan Pendidikan pada tahun 2009.

Pada tahun 2015 penulis melanjutkan studi S2 di Program Studi Magister Kimia Universitas Lampung. Selanjutnya pada tahun 2019 penulis melanjutkan studi S3 Prodi Doktor MIPA di Universitas Lampung.

## MOTTO DAN PERSEMBAHAN

**"Mayyatakillaha yaj'allahu makhroja."**

Barang siapa yang bertaqwa kepada Allah niscaya Dia akan mengadakannya jalan keluar. (QS. 65 : 2)

"*Sesungguhnya sesudah kesulitan itu ada kemudahan. Maka apabila kamu telah selesai (dari urusan), kerjakanlah dengan sungguh-sungguh (urusan) yang lain, dan hanya kepada Tuhanmulah hendaknya kamu berharap*"(Alam Nasyrah 6-8)

### **Sepenuh hati karya ini ku persembahkan kepada**

Yang Maha Segala-galanya **ALLAH SWT**

Yang slalu jadi tuntunan **Nabi Muhammad SAW** Yang Slalu Kubanggakan

- ② Papi **'Hi. Sukidi Adrianto, SE**" dan Mami **'Hj. Emiwati"** tercinta yang selalu melantunkan do'a dalam setiap langkahku. Terimakasih atas segala perhatian, do'a, nasehat, pengorbanan, bimbingan, kasih sayang & daya upaya yang tak terhingga, bagai sang surya menyinari dunia. Mohon do'anya selalu..agar w selalu mendapatkan kesuksesan yang tak berujung seperti yang pama harapkan. w ingin selalu buat pama bahagia..seperti pama yang selalu beri w kebahagiaan. w sayang pama...
- ② To My Beloved...Suamiku tercinta **"Wawan Udi Utomo, M.Pd.T"** Trimakasih atas Perhatian, Motivasi, Nasehat, Curahan Kasih Sayang dan Tulusmu padaku...(^^,) Semoga **ALLAH** selalu jaga keluarga kita dalam limpahan kasih sayang dan cinta.
- ② Anakku sayang **"Muhammad Asyam Ar-Rasyid"** yang selalu berikan kebanggaan, semoga kelak engkau menjadi anak yang sukses dunia akhirat. Meski masih kecil mama sudah bisa merasakan perhatianmu anak sholih mama...kasih sayangmu begitu besar Nak... Mama sayang Syam.
- ② Anakaku sayang **"Tsalsabila 'Aisyah Putri"** Kakak Chaca...teruslah berusaha nak... semoga kelak kamu menjadi anak yang sholihah dan sukses.
- ② Anakku sayank sikembar **Syifa dan Syafa**, juga **Syahidah**, semoga kelak kalian akan menjadi penolong kami menuju syurga Allah, aamiin Allohumma aamiin
- ② Mb'ku sayang **"Fusi Anita, M.T.P."** yang selalu berikan semangat, menuntun d'w dengan penuh kesabaran dan kasih sayang.
- ② Adikku **"Briptu Agung Prayoga"** yang selalu berikan kebanggaan tersendiri.

- Ⓢ Bapak 'Sukanto' dan ibu 'Sugiyatun' di Jogja terimakasih atas do'a yang tulus, motivasi dan perhatiannya.
- Ⓢ *Keluarga Besar*, yang selalu berikan do'a & semangat.

**Insy Allah**  
**ini hanya awal ketiga dari kebanggaan tak berujung**  
**yang dapat kupersembahkan untuk orang-orang yang mencintaiku**  
**dengan ikhlas**

...Hal jazaa-ul-ihsani illal-ihsan...  
*tiada balasan kebaikan kecuali kebaikan pula (QS. 55:60)*

**Fabiayyi ala irobbikuma tukadziban...**  
Maka nikmat Tuhan kamu yang manakah yang kamu dustakan? (QS. 55:60)

**Thanks to...**

- Ⓢ Promotor Bapak Prof. John Hendri, M.S., Ph.D., Kopromotor 1 Bapak Prof. Andi Setiawan, Ph.D., Kopromotor 2 Ibu Prof. Dr. Kamisah D. Pandiangan, M.Si,
- Ⓢ Pimpinan Sidang/Wakil Rektor Bidang Kemahasiswaan dan Alumni Bapak Prof. Yulianto, M.S, Bapak Ketua Penguji/Dekan FMIPA Unila Bapak Dr. Eng. Suropto Dwi Yuwono, M.T., Sekretaris Penguji/Ketua Program Studi Doktor MIPA Bapak Dr. G. Nugroho Susanto, M.Sc.,
- Ⓢ Penguji Internal 1 Bapak Prof. Wasinton Simanjuntak dan Penguji Internal 2 Bapak Dr. Eng. Heri Satria, M.Si dan Penguji Ekternal Bapak Prof. Dr. Sal Prima Yudha, M.Si. atas segala bimbingan dan arahan selama penulis menyusun dan menyelesaikan disertasi ini.
- Ⓢ To **Anak Bapak Ibu** "Fendi M.Si, Nafila M.Si., Rizki" M.Si. (can) yang selalu menjadi garda terdepan.
- Ⓢ To **The Sisters** "Bu Nuri, Meli, Cece Puji, dan Mb Lina terimakasih atas persahabatan dan persaudaraan yang sudah tulus kita bina.
- Ⓢ To **My Brosty** "Defi, Nyu2n, Asri, Janti, Win" atas persaudaraan kita hingga kini, dukungan, dan do'anya yang tercurah untukku.
- Ⓢ **Grup InsyAllah BLU** "Mb Lina, Purna, Shidik, Anissa, Rosi, Romando" terimakasih banyak atas segala do'a, dukungan, semangat,

dan perhatiannya, semoga Allah membalasnya dengan kebaikan dan semoga kita semua sukses, aamiin.

- © Fendi Setiawan, M.Si., Nafila Khansa Salsabila, M.Si., Ridho Nahrowi, M.Si., Wawan A. Setiawan, M.Si., tambah Chaca, **reaserch group Bapak Ibu.**
- © **Keluarga UPT LTSIT...** Trimakasih dah selalu membantuku...
- © **Temen2 Doktor MIPA 2019** dan seluruh angkatan yang sangat luar biasa...tetap semangat!

Yang dah menyemangati Disertasi & langkahku  
“My Lepi, BE 2825 UF, BE 1953 US, BE 1008 TP”

**Special thanks to....**

**Allohummarhamna Bil Qur'an...**  
**Dhuha dan sepertiga malam saat Disertasi...(^^,)**

**Buat Smua Orang:**

Yang slalu mendoakanku di jalan kebaikan  
Yang slalu mensupportku  
Yang Membenciku, Marah, Kecewa, dan Memusuhiku  
Dan Yang Membaca Halaman Persembahan dan Disertasi Ini  
Thanks Buat Smuanya ya..(^^,)

## SANWACANA

Segala puji dan syukur kepada Allah SWT Tuhan semesta alam yang telah memberikan segala bentuk rahmat, nikmat dan keberkahan-Nya, sehingga Penulis mampu menyelesaikan disertasi ini. Shalawat serta salam selalu tercurah kepada Nabi Alloh Muhammad SAW beserta keluarga dan para sahabat, semoga kita termasuk umat yang beliau cintai dan mendapatkan syafa'at beliau di yaumul akhir nanti, aamiin yarabbal'amin.

Disertasi dengan judul "Analisis Morfologi Limbah Kulit Udang Hasil Biodegradasi Secara Fermentasi Padat Oleh Actinomycetes Yang Berasal Dari Biota Laut" merupakan salah satu syarat untuk memperoleh gelar Doktor Sains (Dr. Si) pada Prodi Doktor Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lampung.

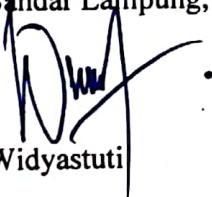
Teriring doa yang tulus, penulis mengucapkan terimakasih yang sebesar-besarnya kepada:

1. Rektor Universitas Lampung Ibu Prof. Dr. Ir. Lusmeilia Afriani, D.E.A., I.P.M. yang telah memberikan kesempatan kepada penulis untuk menempuh Pendidikan pada Program Doktor MIPA Universitas Lampung.
2. Wakil Rektor Bidang Kemahasiswaan dan Alumni yang telah berkenan menjadi pimpinan sidang saat sidang promosi doktor.
3. Dekan FMIPA Universitas Lampung Bapak Dr. Eng. Suropto Dwi Yuwono, M.T. yang telah menyiapkan fasilitas untuk kelancaran Pendidikan dan penelitian penulis.
4. Bapak Prof. John Hendri, Ph.D. selaku Promotor dan Dosen Pembimbing Akademik yang telah memberikan bantuan, bimbingan, arahan, nasihat, dan saran dalam penyusunan dan penyelesaian disertasi.
5. Bapak Prof. Andi Setiawan, Ph.D. selaku Ko-Promotor 1 yang telah memberikan

- bantuan, bimbingan, arahan, nasihat, dan saran dalam penyusunan dan penyelesaian disertasi.
6. Ibu Prof. Dr. Kamisah D. Pandiangan, M.Si. selaku Ko-Promotor 2 yang telah memberikan bantuan, bimbingan, arahan, nasihat, dan saran dalam penyusunan dan penyelesaian disertasi.
  7. Bapak Prof. Wasinton Simanjuntak, Ph.D. selaku Penguji 1 yang telah memberikan bantuan, bimbingan, arahan, nasihat, dan saran dalam penyusunan dan penyelesaian disertasi.
  8. Bapak Dr. Eng. Heri Satria, M.Si. selaku Penguji 2 yang telah memberikan bantuan, bimbingan, arahan, nasihat, dan saran dalam penyusunan dan penyelesaian disertasi.
  9. Bapak Prof. Dr. Sal Prima Yudha, M.Si. selaku Penguji Eksternal yang telah memberikan saran dan masukan disertasi ini lebih baik.
  10. Bapak Dr. G. Nugroho Susanto, M.Sc. selaku kepala program studi Doktor MIPA atas bantuan dan arahnya selama ini.
  11. Ibu Dr. Khoirin Nisa, M.Si. selaku sekretaris Program Studi Doktor MIPA atas bantuan dan arahnya.
  12. Seluruh civitas akademika Unila yang tidak dapat saya sebutkan satu persatu yang telah memberikan bantuan, semoga Allah akan membalas amal kebaikan kita semua.

Semoga disertasi ini dapat memberikan manfaat bagi kita semua dalam rangka pengembangan ilmu pengetahuan dan teknologi untuk masa depan, aamiin Allohmma aamiin.

Bandar Lampung, 27 Januari 2023



Widyastuti

## DAFTAR ISI

	<b>Halaman</b>
<b>DAFTAR ISI</b> .....	<b>i</b>
<b>DAFTAR GAMBAR</b> .....	<b>iv</b>
<b>DAFTAR TABEL</b> .....	<b>vi</b>
<b>DAFTAR LAMPIRAN</b> .....	<b>vii</b>
<b>DAFTAR PUBLIKASI</b> .....	<b>viii</b>
<b>DAFTAR SEMINAR</b> .....	<b>ix</b>
<b>BAB I. PENDAHULUAN</b> .....	<b>1</b>
1.1. Latar Belakang .....	1
1.2. Tujuan Penelitian .....	4
1.3. Manfaat Penelitian .....	4
1.4. Kebaharuan Penelitian .....	5
<b>BAB II. TINJAUAN PUSTAKA</b> .....	<b>6</b>
2.1. Kulit Udang.....	6
2.2. Kitin .....	7
2.3. Kitinase .....	9
2.4. <i>Actinomyces</i> .....	14
2.4.1. Morfologi Miselium.....	16
2.4.2. Morfologi Rantai Spora .....	16
2.5. Mikroskop .....	19
2.5.1. Persiapan Preparat.....	19
2.5.2. <i>Scanning Electron Microscopy (SEM)</i> .....	20



2.6. <i>Chitooligosacharide</i> (COS) .....	26
2.7. Analisis Filogenetik .....	28
<b>BAB III. METODE PENELITIAN .....</b>	<b>32</b>
3.1. Waktu dan Tempat .....	32
3.2. Alat dan Bahan .....	32
3.3. Persiapan Sampel .....	32
3.4. Pembuatan Kitin .....	33
3.5. Pembuatan Media .....	33
3.6. Uji Aktivitas Kitinolitik dengan Metode Zona Bening .....	33
3.7. Pengamatan Strain Unggulan .....	34
3.7.1. Karakteristik Morfologi Strain Unggulan pada Media Padat .....	34
3.7.2. Analisis Filogenetik .....	35
3.8. Identifikasi Pola Pertumbuhan <i>Actinomycetes</i> .....	36
3.9. Identifikasi Pola Degradasi .....	36
3.10. Uji Produk Degradasi Kulit Udang .....	36
3.11. Pengujian Morfologi Antifungi secara Mikroskopi .....	37
<b>BAB IV. HASIL DAN PEMBAHASAN .....</b>	<b>42</b>
4.1. Persiapan Kulit Udang dan Koloid Kitin .....	42
4.2. Isolat <i>Actinomycetes</i> .....	43
4.3. Skrining Kitinase Zona Bening .....	46
4.4. Analisis Morfologi dan Filogenetik .....	49
4.4.1. Identifikasi Morfologi menggunakan Mikroskop .....	49
4.4.1. Analisis Filogenetik .....	52
4.5. Skrining Media Padat .....	54
4.6. Solid State Fermentation pada Kulit Udang .....	58
4.7. Karakterisasi Morfologi Kulit Udang .....	62
4.8. Karakterisasi Hasil Degradasi Kulit Udang .....	66
4.9. Karakteristik Morfologi Hasil Degradasi sebagai Antifungi .....	70

**BAB V. KESIMPULAN ..... 77**

5.1. Simpulan..... 77

5.2. Saran..... 77

**DAFTAR PUSTAKA ..... 78**

**LAMPIRAN**

## DAFTAR GAMBAR

	<b>Halaman</b>
2.1. Sumber Kitin .....	7
2.2. Struktur Kitin .....	10
2.3. Tipe Enzim Kitinase.....	11
2.4. Siklus Hidup <i>Actinomycetes</i> .....	17
2.5. Tipe Spora <i>Actinomycetes</i> .....	18
2.6. Diagram Skematik SEM yang Menampilkan Sistem dan Proses <i>Scanning</i> .....	21
2.7. Representasi Skematis dari Berbagai Jenis Partikel yaitu, Elektron (Elektron Hamburan Balik, Elektron Sekunder, Elektron Auger) dan Foton yang Dihasilkan Setelah Penyinaran Materi oleh Elektron Primer.....	23
2.8. (a) Blanko Kulit Udang (b) Fermentasi Kulit Udang dengan <i>Paenibacillus</i> sp.AD. ...	25
2.9. Struktur COS.....	26
2.10. Keterkaitan Filogenetik dari Keluarga Kelas <i>Actinomycetes</i> .....	29
3.1. Metode Preparasi 96-well plate untuk Mikroskop <i>Apotome</i> .....	38
3.2. Teknik Preparasi SEM .....	41
4.1. Proses Pembuatan Serbuk Kitin; (a) Pencucian; (b) Penimbangan; (c) Deproteinasi dan Demineralisasi; (d) Serbuk Kitin.....	42
4.2. Koloid Kitin .....	43
4.3. Isolat <i>Actinomycetes</i> Bali .....	47
4.4. Isolat <i>Actinomycetes</i> Gorontalo.....	47
4.5. Zona Bening dari Isolat : (a) 18D36A1; (b) 18D36A2; dan (c)19C38A1 .....	48
4.6. Identifikasi Morfologi <i>Actinomycetes</i> dengan menggunakan Mikroskop <i>Apotome</i> dan SEM.....	50
4.7. Perbedaan Tipe Rantai Spora.....	51
4.8. Pohon Filogenetik Isolat 18D36A1.....	52
4.9. Pohon Filogenetik Isolat 1938A1.....	54

4.10. Skrining Media Padat: (a) Sisik Ikan; (b) Tulang Sotong; dan (c). Kulit Udang.....	55
4.11. <i>Spectrum</i> EDX a. kulit udang, b. tulang sotong, c. Sisik ikan .....	53
4.12. Evaluasi Pertumbuhan <i>Actinomyces</i> pada Media Krustasea .....	57
4.13. Mikrograf Degradasi Sampel: (a) Sisik Ikan; (b) Tulang Sotong; dan (c) Kulit Udang .....	58
4.14. Mikrograf Pola Pertumbuhan <i>Actinomyces</i> 18D36A1 pada Kulit Udang.....	59
4.15. Mikrograf Pola Pertumbuhan <i>Actinomyces</i> 18D36A2 pada Kulit Udang.....	60
4.16. Mikrograf yang Menunjukkan Pola Pertumbuhan <i>Actinomyces</i> 18D36A1 pada Kulit Udang dengan Waktu yang Berbeda .....	62
4.17. Mikrograf Pola Degradasi pada Kulit Udang.....	63
4.18. Mikrograf Sampel Kulit Udang yang di Degradasi dengan Waktu yang Berbeda ....	64
4.19. Mikrograf Pola Degradasi pada Kulit Udang.....	65
4.20. Kromatogram HPLC Blanko; (b) Kromatogram HPLC Standar GlcN; (c) Kromatogram Hasil Degradasi Limbah Kulit Udang.....	66
4.21. Identifikasi Produk Oligomer secara KLT.....	67
4.22. Spektrum FT-IR dari chitooligosaccharide D36A1C38.....	68
4.23. Analisis MS dari <i>chitooligosaccharide</i> D36A1C38 .....	69
4.24. Struktur COS DP 6 yang diperoleh.....	69
4.25. Mikrograf Sampel Kulit Udang (a) Tanpa Perlakuan; (b) Sampel yang diberi <i>Actinomyces</i> ; dan (c) Sampel yang Sudah Terdegradasi .....	67
4.26. Aktivitas Antifungi .....	72
4.27. Hasil Pengamatan Aktivitas Fungi dengan Mikroskop Apotome (a) Fungi Tanpa Perlakuan dan (b) Fungi yang Diberi COS.....	74
4.28. Mikrograf Sampel yang Menunjukkan Aktivitas Fungi: (a) Kontrol (Fungi Tanpa COS); dan (b) Sampel Fungi yang diberi COS .....	75
4.29. Hasil Pengamatan Aktivitas Fungi dengan Mikroskop Apotome dan SEM: (a) Apotome Kontrol, (b) Apotome Sampel yang diberi Ekstrak Isolat 19C38A1, (c) Mikrograf Kontrol dan (d) Mikrograf Sampel yang diberi Ekstrak Isolat 19C38A1 .....	76

**DAFTAR TABEL**

	<b>Halaman</b>
4.1. Karakteristik Isolat <i>Actinomyces</i> Bali .....	44
4.2. Karakteristik Isolat <i>Actinomyces</i> Gorontalo.....	45

## **DAFTAR LAMPIRAN**

1. Diagram Alir Penelitian
2. Jurnal Publikasi

**DAFTAR PUBLIKASI**

1. Setiawan, A., Widyastuti, W., Irawan, A., Wijaya, O. S., Laila, A., Setiawan, W. A., and Hendri, J. 2021. Solid state fermentation of shrimp shell waste using *Pseudonocardia carboxydivorans* 18A13O1 to produce bioactive metabolites. *Fermentation*, **7**(4), 247.
2. Widyastuti, W., Setiawan, A., and Hendri, J. 2021. Application SEM-EDX in Biodegradation of Seafood Wastes by Sponge-Derived Actinomycetes 19C38A1 in Solid Fermentation. *IOP Publishing*, **940**(1), 012048.
3. Setiawan, A., Setiawan, F., Juliasih, N. L. G. R., Widyastuti, W., Laila, A., Setiawan, W. A., and Arai, M. 2022. Fungicide Activity of Culture Extract from *Kocuria palustris* 19C38A1 against *Fusarium oxysporum*. *Journal of Fungi*, **8**(3), 280.
4. Widyastuti, W., Setiawan, F., Al Afandy, C., Irawan, A., Laila, A., Juliasih, N. L. G. R., and Setiawan, A. 2022. Antifungal agent chitooligosaccharides derived from solid-state fermentation of shrimp shell waste by *pseudonocardia antitumoralis* 18D36A1. *Fermentation*, **8**(8), 353.

## DAFTAR SEMINAR

1. In The 2<sup>nd</sup> International Conference on Chemistry, Pharmacy and Medical Sciences (ICCPM) 2021. Solid State Fermentation of Shrimp Shell Waste by Actinomycetes to Producing Glucosamine.
2. IOP Conference Series: Earth and Environmental Science 2021. Application SEM-EDX in Biodegradation of Seafood Wastes by Sponge-Derived Actinomycetes 19C38A1 in Solid Fermentation.
3. The 2nd International Conference on Chemistry...(ICCPM), 2021: Determination of Glucosamine from Shrimp Shell Powder Media by Marine Actinomycetes
4. The 4th International Conference on Applied Sciences (ICASMI), 2022: Thermal and Morphology Characteristics of Chitosan Isolated from Banana Shrimp Shell (*Penaeus merguensis de Man*)
5. The 4th International Conference on Applied Sciences...(ICASMI), 2022: Determination of Glucosamine from Shrimp Shell Powder Media by Marine Actinomycetes.



## I. PENDAHULUAN

### 1.1. Latar Belakang

Udang merupakan produk perikanan dengan nilai ekonomi yang sangat tinggi karena merupakan bahan pangan dengan kandungan gizi yang tinggi dan memiliki citarasa yang disukai di seluruh dunia. Karena potensi ekonominya yang tinggi, udang telah menjadi sumber devisa andalan bagi negara produsen, sehingga jumlah produksi udang terus ditingkatkan. Sebagai gambaran, produksi udang global pada tiga tahun (2017-2019) menunjukkan peningkatan yang signifikan, yakni 3,72 juta ton pada tahun 2017, naik 3,8 juta ton pada tahun 2018, dan menjadi 4,45 juta pada tahun 2019 (FAO, 2020), meskipun pada tahun 2020 mengalami penurunan produksi sekitar 7-8 %, kemungkinan besar akibat pandemi Covid-19 (FAO, 2021). Penghasil utama udang adalah negara di kawasan Asia Pasifik dengan kontribusi mencapai 75% dan sisanya disumbang oleh negara Amerika Latin. Berdasarkan data FAO, Indonesia merupakan negara dengan produksi terbanyak ke empat setelah Cina, India, dan Vietnam (FAO, 2020). Di Indonesia, merupakan usaha tambak udang tersebar di berbagai daerah, dan Provinsi Lampung termasuk salah satu dari lima daerah sentra produksi utama, dengan produksi mencapai 69.952 ton pada tahun 2020 (Badan Pusat Statistik Provinsi Lampung, 2020).

Sebagian besar udang yang dihasilkan Indonesia diekspor dalam bentuk udang tanpa kulit, sehingga kulit udang merupakan residu yang utama karena jumlah kulit udang mencapai 20-24% dari massa udang (Rodde, 2017). Dari jumlah tersebut, baru sekitar 5% yang sudah dimanfaatkan sementara sisanya masih merupakan limbah yang dapat menghasilkan bau sangat tajam karena kandungan proteinnya yang berkisar antara 33

- 40% dari massa kulit dan sisanya sulit terurai karena mengandung kitin dengan kadar antara 15 - 40% (Yan and Chen, 2015; Kannan, *et al.*, 2018; Kurita, 2006).

Kitin merupakan polisakarida dengan kelimpahan kedua setelah selulosa. Selain dalam kulit udang, kitin dapat diperoleh dari berbagai sumber terutama krustasea, antropoda, dan invertebrata akuatik lainnya (Abidin, *et al.*, 2020). Berdasarkan kelimpahan sumber kitin cukup besar, maka banyak penelitian yang telah dilakukan untuk menghasilkan senyawa kitin dan turunannya yang kegunaannya sangat luas dalam kehidupan sehari-hari, misalnya sebagai adsorben limbah logam berat dan zat warna, pengawet, anti jamur, kosmetik, farmasi, anti kanker, dan anti bakteri. Salah satu contoh adalah pembuatan sediaan farmasi melalui teknik fermentasi secara enzimatik.

Untuk mengurai kitin secara enzimatik, enzim yang diperlukan adalah kitinase untuk mengurai kitin, menjadi produk turunannya. Enzim kitinase juga banyak digunakan di berbagai bidang, antara lain bidang kesehatan (Morganti, 2011), pertanian (Kumar, *et al.*, 2011) seperti antifungi, antibakteri, antikanker dan penanggulangan nyamuk (Ganjera, 2013). Untuk mendapatkan enzim kitinase biasanya dilakukan dari mikroorganisme salah satunya adalah *actinomycetes*. *Actinomycetes* banyak ditemukan dalam berbagai lingkungan, seperti tanah (Gomes *et al.*, 2000), sponge (Sun *et al.*, 2015) dan sedimen laut (Hosny *et al.*, 2010) (You *et al.*, 2005).

Untuk mendapatkan *actinomycetes* sebagai penghasil enzim kitinase, beberapa penelitian sebelumnya telah melakukan skrining *actinomycetes* yang berasosisasi dengan sampel biota laut antara lain adalah sponge, makroalga dan tunicate yang berasal dari perairan Buleleng, Singaraja, Provinsi Bali dan dari perairan Teluk Tomini, Oluhuta, Provinsi Gorontalo. Hasil skrining dengan media agar koloid kitin di perairan Bali didapat 21 isolat sedangkan dari perairan Gorontalo didapat 26 isolat. Dari 21 isolat Bali didapat isolat unggul sebanyak 2 isolat dengan kode 18D36A1 dan 18D36A2. Untuk 26 isolat dari perairan Gorontalo didapat 1 isolat unggul dengan kode 19C38A1. Ketiga isolat unggulan tersebut digunakan sebagai kajian utama dalam

penelitian ini meliputi morfologi mikroorganisme menggunakan mikroskopi, filogenetik, pola degradasi kulit udang menjadi produk turunan, dan uji antifungi.

Pengujian morfologi dari *actinomycetes* ditujukan untuk melihat pola pertumbuhan *actinomycetes* pada media kulit udang dengan teknik mikroskopi. Pertumbuhan tersebut didefinisikan sebagai fermentasi padat atau yang disebut dengan SSF. Teknik fermentasi padat adalah suatu metode fermentasi substrat padat dengan kadar air rendah dan merupakan suatu teknik yang dimanfaatkan untuk memproduksi enzim ekstraseluler dari suatu mikroorganisme yang saat ini menjadi teknik penting untuk produksi enzim pada mikroba karena salah satu keunggulan ekonomi dibandingkan fermentasi cair (*submerged fermentation*) (Viniegra and Gonzalez, 2013).

Pada proses fermentasi tersebut diperoleh data pengamatan morfologi pola pertumbuhan mikroorganisme pada kulit udang. Data tersebut dapat digunakan sebagai identitas mikroorganisme (*actinomycetes*) dan dapat dikonfirmasi dengan data bank yang sudah dilakukan oleh peneliti dahulu (Setiawan *et al.*, 2021).

Pengamatan morfologi dilakukan dengan menggunakan mikroskop apotome dan SEM. Identifikasi dengan mikroskop apotome bertujuan untuk menentukan pertumbuhan hifa, miselia, dan spora dari mikroorganisme secara makro, sedangkan identifikasi SEM bertujuan untuk melihat pertumbuhan mikroorganisme secara mikro (detail). Identifikasi dengan SEM pada material biologi dapat menyebabkan *charging effect* sehingga menurunkan kualitas hasil morfologi yang diperoleh, maka harus dilakukan suatu teknik preparasi yang tepat seperti fiksasi dengan menggunakan konsentrasi formalin, dehidrasi dengan konsentrasi alkohol dan dengan coating gold. Berdasarkan hasil observasi tersebut diatas akan memberikan informasi karakteristik morfologi dan mendapatkan teknik visualisasi yang tepat. Dari data karakteristik morfologi dilakukan penentuan spesies isolat dengan analisis filogenetik menggunakan *Polymerase Chain Reaction* (PCR) untuk mendapatkan identitas spesies.

Pengamatan pola degradasi kulit udang oleh *actinomycetes* diamati dengan menggunakan SEM. Hasil visualisasi morfologi tersebut dapat dilihat kerusakan pada substrat dan struktur yang akan mengindikasikan terjadinya proses degradasi secara enzimatik oleh enzim kitinase. Adanya enzim kitinase sebagai penghasil produk degradasi menjadi produk turunannya dianalisis menggunakan HPLC. Pada penelitian ini produk hasil degradasi dalam bentuk COS dilakukan uji antifungi sebagai bahan aktif, dalam penghambatan pertumbuhan tersebut menggunakan metode 96-well plate yang dimodifikasi dengan carbon tape dan diidentifikasi morfologi menggunakan mikroskop apotome dan SEM.

Hasil dari rangkaian penelitian di atas memberikan informasi tentang karakteristik morfologi, pola pertumbuhan, pola degradasi kulit udang dan hasil produk degradasi untuk dapat bermanfaat dalam pengembangan ilmu kimia tetapi juga dapat meningkatkan nilai ekonomi kulit udang dan pengembangan teknologi fermentasi padat dalam skala industri.

### **1.2. Tujuan Penelitian**

Mengidentifikasi, karakterisasi dan morfologi *actinomycetes* dari perairan Buleleng, Bali dan Oluhuta, Gorontalo, pola pertumbuhan *actinomycetes* dan kemampuannya mendegradasi kulit udang secara fermentasi padat dalam menghasilkan produk turunannya yang dapat diaplikasikan sebagai antifungi.

### **1.3. Manfaat Penelitian**

Mengetahui pola biodegradasi biomaterial secara fermentasi padat berdasarkan analisis morfologi dengan teknik SEM untuk menghasilkan produk turunannya. Disamping itu dapat meningkatkan nilai tambah limbah kulit udang dan memberikan informasi baru penunjang pengembangan teknologi fermentasi padat dalam skala besar yang dapat dimanfaatkan oleh industri.

#### **1.4. Kebaharuan Penelitian**

Menemukan kebararuan dalam metode yaitu modifikasi metode SSF dan pemantauan pola pertumbuhan actinomycetes dan pola degradasi kulit udang. Kebaharuan dalam produk yaitu temuan isolate baru berdasarkan analisis morfologi dan filogenetik. Kebaharuan dalam aplikasi isolat dan produk turunan sebagai antifungi.

## II. TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1. Kulit Udang

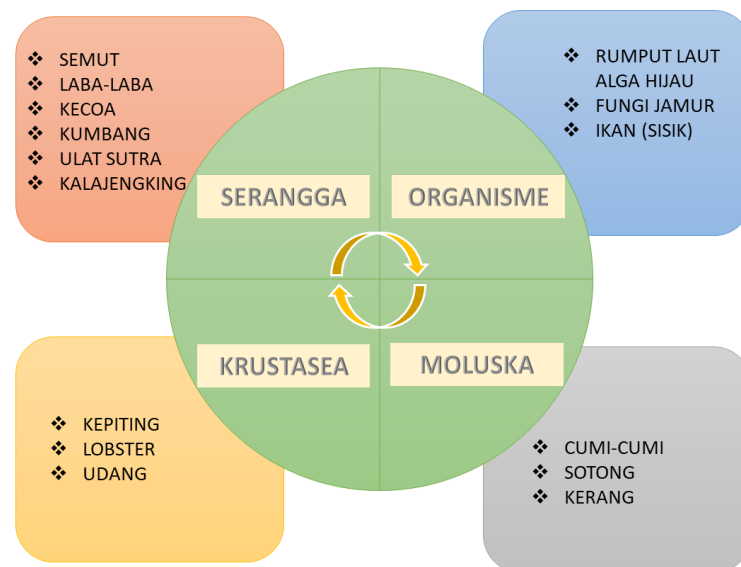
Udang merupakan produk perikanan dengan nilai ekonomi yang sangat tinggi karena merupakan bahan pangan dengan kandungan gizi yang tinggi dan memiliki citarasa yang disukai di seluruh dunia. Karena potensi ekonominya yang tinggi, udang telah menjadi sumber devisa andalan bagi negara produsen, sehingga jumlah produksi udang terus ditingkatkan. Sebagai gambaran, produksi udang global pada tiga tahun (2017-2019) menunjukkan peningkatan yang signifikan, yakni 3,72 juta ton pada tahun 2017, naik 3,8 juta ton pada tahun 2018, dan menjadi 4,45 juta pada tahun 2019 (FAO, 2020), meskipun pada tahun 2020 mengalami penurunan produksi sekitar 7-8 %, kemungkinan besar akibat pandemi Covid-19 (FAO, 2021). Penghasil utama udang adalah negara di kawasan Asia Pasifik dengan kontribusi mencapai 75% dan sisanya disumbang oleh negara Amerika Latin. Indonesia merupakan negara dengan produksi terbanyak ke empat setelah Cina, India, dan Vietnam (FAO, 2020). Di Indonesia, merupakan usaha tambak udang tersebar di berbagai daerah, dan Provinsi Lampung termasuk salah satu dari lima daerah sentra produksi utama, dengan produksi mencapai 69.952 ton pada tahun 2020 (Badan Pusat Statistik Provinsi Lampung, 2020).

Sebagian besar udang yang dihasilkan Indonesia diekspor dalam bentuk udang tanpa kulit, sehingga kulit udang merupakan residu yang utama karena jumlah kulit udang mencapai 20-24% dari massa kering (Rodde, 2017). Dari jumlah tersebut, baru sekitar 5% yang sudah dimanfaatkan sementara sisanya masih merupakan limbah yang dapat menghasilkan bau sangat tajam karena kandungan proteinnya yang berkisar antara 33 - 40% dari massa kulit dan sisanya sulit terurai karena mengandung kitin dengan kadar antara 15 - 40% (Yan and Chen, 2015; Kannan *et al.*, 2018; Kurita, 2006).

### 2.2.Kitin

Kitin adalah polimer linier N-acetylglucosamine (GlcNAc) (Bobbink *et al.*, 2015), dan memiliki keunikan tersendiri karena kitin merupakan polimer yang mengandung nitrogen alami yang paling melimpah di alam. Kitin tersebar luas di alam dan merupakan komponen utama dari eksoskeleton invertebrata laut dan dapat dijumpai pada serangga (Anwar *et al.*, 2019), artropoda, dan moluska (Luo *et al.*, 2019)

Beragam kelas molekul kitin dapat dibedakan menggunakan difraksi sinar- X, untuk diamati tiga struktur kristal yaitu  $\alpha$ ,  $\beta$ , dan  $\gamma$ , yang dibedakan berdasarkan jumlah rantai, derajat hidrasi, dan ukuran satuan molekul. Senyawa  $\alpha$ -kitin merupakan bentuk yang paling melimpah, ditemukan di eksoskeletons arthropoda, dengan adanya banyak ikatan hidrogen antar rantai dan intra rantai yang menghasilkan bahan yang padat. Pada  $\beta$ -kitin, disposisi adalah paralel dan ditemukan pada hewan yang menunjukkan kelenturan dan ketahanan, seperti cumi-cumi.  $\gamma$ -kitin menampilkan campuran dari kedua posisi (Ru *et al.*, 2019).



**Gambar 2.1.** Sumber Kitin (Luo *at al.*, 2019)

Kitin juga merupakan polisakarida dengan kelimpahan kedua setelah selulosa dan banyak ditemukan dalam berbagai sumber (Luo *at al.*, 2019). seperti ditunjukkan dalam Gambar 2.1.

Dari berbagai sumber kitin yang sudah diteliti, udang merupakan sumber utama. Selain itu, sisik ikan dan tulang sotong juga termasuk sumber yang menarik. Kulit udang merupakan salah satu sumber kandungan kitin tertinggi di antara sumber kitin umum lainnya. Isolasi kitin dari kulit udang lebih mudah karena dinding kulit yang lebih tipis (Pakizeh *et al.*, 2021). Kitin merupakan senyawa yang penting karena turunannya banyak bermanfaat untuk beragam tujuan seperti adsorben limbah logam berat dan zat warna, pengawet, anti jamur, kosmetik, farmasi, antikanker, dan antibakteri.

Produk turunan kitin memiliki nilai ekonomi tinggi karena aktivitas dan aplikasi dibidang medis, polimer yang dapat terurai secara alami dan memiliki biokompatibel serta merupakan sumber daya alam yang sangat berlimpah. Memanfaatkan produk sampingan dari pengolahan krustasea adalah kegiatan yang menguntungkan karena senyawa yang melimpah dan bernilai tambah lebih tinggi (Arrouze *et al.*, 2019).

Untuk menghasilkan produk turunan kitin dapat dilakukan dengan beberapa metode. Pada metode kimia perlakuan awal pada penanganan limbah cangkang krustasea hanya perlu menghilangkan kalsium karbonat dengan mendepolimerisasi kitin. Berdasarkan hal tersebut, kita perlu mempertimbangkan beberapa kendala berikut untuk merancang proses pretreatment limbah cangkang krustasea seperti: menghindari penggunaan asam pekat/alkali untuk demineralisasi dan atau deproteinisasi; menghindari penggunaan kondisi pretreatment yang keras (misalnya, suhu tinggi) untuk mencegah degradasi GlcNAc dan tentunya untuk menurunkan biaya pengoperasian; mencapai pemulihan kitin yang tinggi dan cepat dalam kondisi pemrosesan ringan dari limbah cangkang setelah demineralisasi dan depolimerisasi.

Pada saat ini metode yang paling umum digunakan adalah fermentasi. Fermentasi terdiri dari dua teknik yakni fermentasi padat dan fermentasi cair. Teknik fermentasi yang banyak dikembangkan adalah metode fermentasi padat, yang dikenal sebagai *solid state fermentation* (SSF). SSF adalah suatu metode



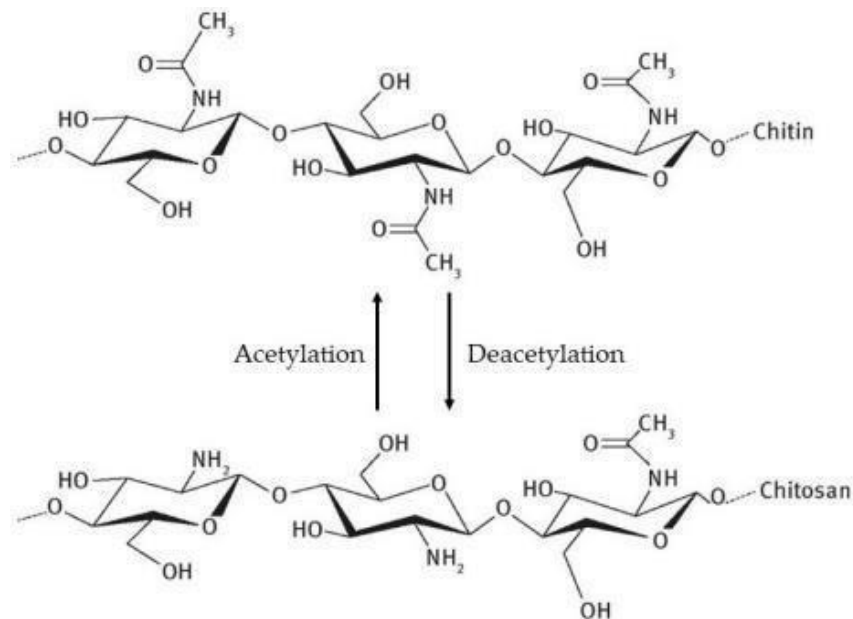
fermentasi substrat padat dengan kadar air rendah dan merupakan suatu teknik yang dimanfaatkan untuk memproduksi enzim ekstraseluler dari suatu mikroorganisme yang saat ini menjadi teknik penting untuk produksi enzim pada mikroba karena salah satu keunggulan ekonomi dibandingkan fermentasi cair (submerged fermentation) (Viniestra and Gonzalez, 2013). Dalam penelitian ini, fermentasi berbagai mikroorganisme merupakan salah satu metode untuk pemanfaatan kitin yang berasal dari limbah kulit udang.

Jenis mikroorganisme dan substrat media padat merupakan parameter penting yang dapat mempengaruhi hasil fermentasi dan tentunya merupakan indikator keberhasilan penerapan teknik fermentasi padat. Salah satu media padat yang murah dan potensial untuk fermentasi padat adalah kulit udang. Sejak tahun 2012, Indonesia mampu memproduksi lebih dari 699.000 ton udang dan diprediksi setiap tahunnya meningkat (Tran *et al.*, 2019), yang mana limbah kulit udang nya belum banyak dimanfaatkan. Pemanfaatan limbah kulit udang yang efektif merupakan hal penting yang terkait dengan permasalahan lingkungan dan nilai ekonomi yang berkelanjutan. Fermentasi media kulit udang dimanfaatkan untuk mengurai kitin secara enzimatik. Enzim yang diperlukan yaitu enzim kitinase. Enzim kitinase dapat mengurai kitin menjadi produk turunannya. Enzim kitinase juga banyak digunakan di berbagai bidang, antara lain bidang kesehatan (Morganti, 2011), pertanian (Kumar, *et al.*, 2011) seperti antifungi, antibakteri, antikanker dan penanggulangan nyamuk (Ganjera, 2013).

### **2.3.Kitinase**

Proses fermentasi dengan adanya kitinase akan membantu mendepolimerisasi oligomer yang lebih besar dalam hidrolisis kitin menjadi GlcNAc atau (GlcNAc) (Sgobba *et al.*, 2018). Kitin adalah polimer alami yang memiliki struktur kristalin yang sangat teratur. Kitin memiliki gugus nitrogen, berwarna putih, dan bersifat keras, memiliki reaktivitas kimiawi yang rendah. Kitin juga merupakan jenis polisakarida yang paling melimpah kedua di alam, setelah selulosa (Xu *et al.*, 2018). Molekul kitin tidak larut dalam air dan pelarut organik, memiliki berat

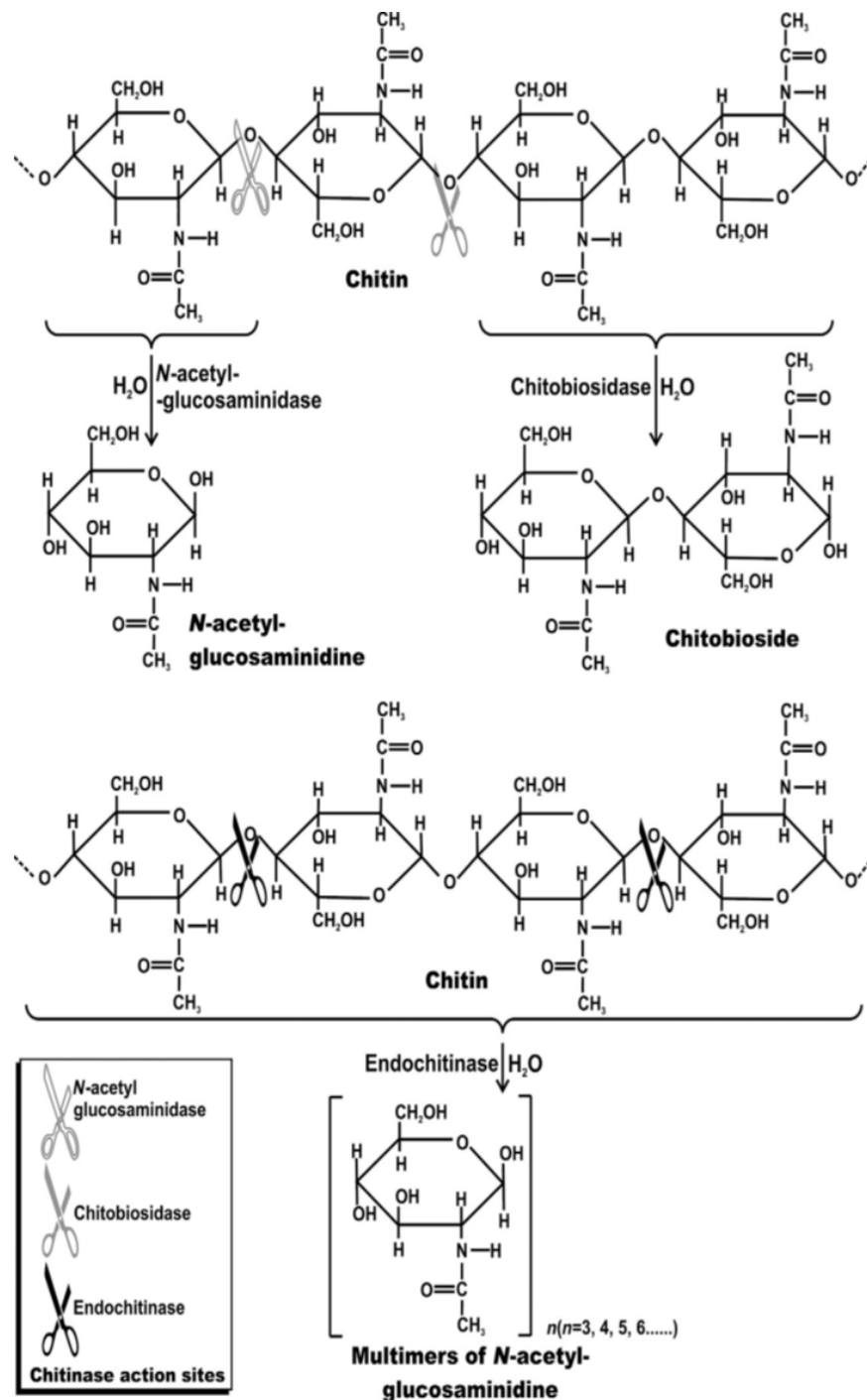
molekul yang tinggi dan secara kimiawi terdiri dari unit N-acetyl-2-amino-2-deoxy-D-glukosa bergabung bersama oleh ikatan glikosidik  $\beta$ -(1  $\rightarrow$  4) Gambar 2.1, membentuk rantai panjang dengan beberapa unit monomer terdeasetilasi (Chen *et al.*, 2019).



**Gambar 2.2.** Struktur Kitin (Bobbink *et al.*, 2015).

Kitinase memiliki kemampuan untuk mendegradasi kitin secara langsung menjadi chitooligomer dengan berat molekul rendah, yang berguna dalam berbagai fungsi yaitu dalam bidang industri, pertanian, dan medis seperti aksi elisitor dan aktivitas anti-tumor (Yuli *et al.*, 2004). N-acetylglucosamine (GlcNAc) dapat diaplikasikan dalam pengobatan osteoarthritis. Kitinase dapat dijumpai pada beberapa mikroorganisme seperti pada bakteri, jamur, tanaman, actinomycetes, hingga arthropoda. Kitinase menjadi sangat penting karena perannya dalam biokontrol fitopatogen jamur (Mathivanan *et al.*, 1998).

Pada Gambar 2.3., merupakan gambaran sekelompok kitinase yang membelah secara acak di situs internal rantai kitin dan menghasilkan oligomer GlcNAc (N-asetilglukosamin) dengan berat molekul rendah seperti kitotetraosa dan kitotriosa yang dikenal sebagai endokitinase.



**Gambar 2.3.** Tipe Enzim Kitinase (Das *et al.*, 2016)

Kitinase yang memutus rantai kitin dari ujung terminal berada di kelompok eksokitinase. Berdasarkan pelepasan produk, eksokitinase dikategorikan menjadi dua subkategori, yaitu kitobiosidase dan  $\beta$ -(1,4)-N-asetil-glucosaminidase.

Kitobiosidase berperan hanya melepaskan diasetilkitobiosa dari ujung kitin yang tidak pereduksi. Sebaliknya,  $\beta$ -(1,4)-N-asetil-glukosaminidase hanya melepaskan GlcNAc sebagai satu-satunya produk dari ujung non-pereduksi polisakarida kitin. Terdapat dua jenis kitinase yaitu endokitinase dan eksokitinase. Endokitinase bekerja secara acak melalui situs internal pada rantai kitin, sedangkan eksokitinase (chitobiosidases dan 1,4 -glucosaminidases) menunjukkan aksi katalitiknya dimulai dari ujung non-pereduksi kitin. (Dean *et al.*, 2012). Eksositinase telah dibagi lagi menjadi 2 subkategori: Chitobiosidases (EC3.2.1.29) (Harman *et al.*, 1993) yang berfungsi dalam mengkatalisis pelepasan progresif di-asetilkitobiosa mulai dari ujung mikrofibril kitin non reduksi, dan 1-4- $\beta$ -glucosaminidases, membelah produk oligomer dari endochitinase dan chitobiosidases, sehingga menghasilkan monomer GlcNAc (Sahai and Manocha, 1993).

Untuk mendapatkan enzim kitinase biasanya dilakukan dari mikroorganisme. Berdasarkan kelimpahan mikroorganisme di alam, sekitar 90-99% organisme kitinolitik adalah actinomycetes. Hasil kajian literatur menunjukkan bahwa Actinomycetes merupakan sumber potensial kitinase (Tsigos and Bouriotis, 1995; Tokuyasu *et al.* 1996). Pada penelitian ini juga dilakukan evaluasi potensi berbagai Actinomycetes yang berasosiasi dengan sponge dan tunicate untuk mendegradasi kulit udang melalui proses fermentasi padat serta mengevaluasi produk turunannya.

*Actinomycetes* banyak ditemukan dalam berbagai lingkungan, seperti tanah (Gomes *et al.*, 2000), sponge (Sun *et al.*, 2015) dan sedimen laut (Hosny *et al.*, 2010) (You *et al.*, 2005). *Actinomycetes* dan khususnya spesies *Streptomyces* adalah mikroorganisme tanah saprofit yang penting dan sumber antibiotik baru yang baik, enzim, penghambat enzim, imunomodifier, dan vitamin (Kumar and Gupta, 2006). Beberapa enzim kitinolitik telah diidentifikasi dalam berbagai *Streptomyces sp.*, termasuk, *Streptomyces plicatus*, *S. lividans*, *S. viridificans*, *S. halstedii*, *S. aureofaciens*, *S. diasitapiticus*, *S. thermoviolaceus* dan *S. griceus*. Kitinase juga diproduksi oleh beberapa actinomycetes lain seperti *Nocardia*, *Actinoplanes*, dan *Micromonospora spp.* (Iverson *et al.*, 1984).

Produksi kitinase serta pertumbuhan actinomycetes sangat bervariasi, untuk mengoptimalkan kondisi kultur dalam memproduksi kitinase sebagai pendegradasi kitin diperlukan evaluasi dalam pemilihan sumber karbon dan nitrogen yang ideal. Depolimerisasi (hidrolisis) kitin oleh kitinase menghasilkan kitoligosakarida (COS), dan de-N-asetilasi kitin dan COS menghasilkan kitosan dan COS asetat sebagian (paCOS) atau oligomer glukosamin terdeasetilasi penuh. De-N-asetilasi kitin dan kitoligosakarida dikatalisis oleh kitin deasetilase (CDA), yang menunjukkan spesifisitas substrat yang berbeda yang mengarah ke produk yang sepenuhnya atau sebagian terdeasetilasi dengan beragam derajat asetilasi (DA) dan pola asetilasi (PA). Selain peran CDA dalam biologi organisme alami, ada minat yang berkembang dalam karakterisasi biokimia CDA untuk menggunakannya sebagai biokatalis untuk produksi kitoligosakarida yang sebagian terdeasetilasi (paCOS) sebagai molekul bioaktif di berbagai bidang aplikasi atau untuk menghambat mereka karena mereka adalah target potensial terhadap mikroorganisme patogen.

Deasetilase kitin menunjukkan pola deasetilasi yang beragam, yang mencerminkan kekhususan substrat dan pengenalan pola yang berbeda pada substrat liniernya. Mekanisme kerja enzim yang memodifikasi unit dalam rantai pada polisakarida linier umumnya diklasifikasikan sebagai mekanisme serangan ganda, rantai ganda, dan rantai tunggal (Zhou *et al.*, 2010). Mekanisme serangan ganda, pengikatan enzim ke rantai polisakarida diikuti oleh sejumlah deasetilasi berurutan, setelah itu enzim mengikat ke wilayah lain dari rantai polimer (Tsigoz *et al.*, 1999). Pada substrat polimer, mekanisme ini akan menghasilkan struktur blok-kopolimer dengan blok unit GlcNH<sub>2</sub> dalam rantai GlcNAc. Pada COS, biasanya akan menghasilkan deasetilasi penuh dari oligomer.

Dalam mekanisme rantai ganda, enzim membentuk kompleks enzim-polimer aktif dan mengkatalisis hidrolisis hanya satu gugus asetil sebelum berdisosiasi dan membentuk kompleks aktif baru yaitu, *C. lindemuthianum* CDA (Hekmat *et al.*, 2003). Hal ini akan menghasilkan distribusi acak unit GlcNH<sub>2</sub> dan GlcNAc di

sepanjang rantai polimer atau, dalam kasus substrat COS, itu akan membuat sejumlah intermediet oligosakarida terdeasetilasi berakhir dengan pola deasetilasi spesifik atau deasetilasi penuh, tergantung pada enzim dan substrat. Akhirnya, mekanisme rantai tunggal mencakup enzim proses di mana sejumlah peristiwa katalitik terjadi pada molekul substrat tunggal yang mengarah ke deasetilasi berurutan. Beberapa bakteri chitooligosaccharides deacetylases (CODs), yang spesifik untuk satu posisi yang mengarah ke produk mono-deasetilasi. Deasetilase sangat aktif dengan oligosakarida kitin, yang diubah menjadi produk yang tidak memiliki satu gugus asetil, karena ia menghidrolisis gugus N-asetil yang melekat pada unit GlcNAc kedua dari belakang (Zhao *et al.*, 2010).

#### **2.4. *Actinomycetes***

Mikroorganisme seperti *actinomycetes* dapat dijumpai di alam dengan mudah dalam bergai habitat. Untuk saat ini, mikroorganisme pada sponge telah menjadi perhatian para peneliti. Keanekaragaman hayati laut juga mencerminkan keanekaragaman mikroorganisme laut. Namun hasil kajian mengenai potensi dan pemanfaatan mikroorganisme pada sponge masih sangat terbatas. Menjadi hal yang sangat penting dan menarik potensi mikroorganisme laut dapat melakukan biotransformasi. *Actinomycetes* adalah bakteri gram positif dengan kandungan G+C yang tinggi, dengan morfologi sel berfilamen dan koloni berwarna putih, tekstur seperti tepung. *Actinomycetes* menunjukkan diferensiasi morfologi yang signifikan di antara bakteri gram-positif, meskipun struktur sel *actinomycetes* benar-benar berbeda dari jamur dan menunjukkan karakteristik prokariotik yang khas.

*Actinomycetes* menunjukkan berbagai morfologi dan berbeda terutama dengan adanya tidaknya miselium udara atau miselium substrat, warna miselium, struktur dan ornamen spora, dan produksi pigmen melanoid. *Actinomycetes* memiliki variasi morfologi sel, termasuk kokoid (*Micrococcus*), batang (*Mycobacterium*), dan batang-kokoid (*Arthrobacter*), spora bercabang yang mengandung hifa (*Micromonospora*), bentuk hifa yang terfragmentasi (*Nocardia sp.*), dan juga

membentuk miselia bercabang permanen dan berdiferensiasi (*Streptomyces sp.*, *Frankia*). *Rhodococci* tidak menghasilkan miselium sejati tetapi membentuk filamen memanjang pada substrat, *Corynebacteria* tidak menghasilkan miselia sama sekali (Barka *et al.*, 2016).

*Actinomycetes* memiliki miselium aerial yang dapat berkembang dengan baik. Fragmentasi miselium adalah bentuk khusus reproduksi vegetatif yang menghasilkan spora atau konidia. Fragmentasi dan segmentasi atau pembentukan konidia membantu dalam sporulasi *actinomycetes*. Karakteristik morfologi penting untuk klasifikasi *actinomycetes*. Beberapa faktor seperti pertumbuhan miselium substrat, posisi dan jumlah spora, struktur permukaan spora, bentuk sporangia atau konidia, dan apakah sporangiospora memiliki flagela atau tidak menentukan klasifikasinya (Li *et al.*, 2016). Penampilan morfologi *actinomycetes* yang kaku, keras, dan sering kasar dengan permukaan kering pada media kultur dan sering ditandai dengan tertutupnya media dengan miselium udara dan spora (Klieneberger, 1947).

Miselium aerial dapat membentuk spora atau hifa reproduksi untuk sporulasi. Hal ini tergantung pada panjang dan jumlah spora, rantai spora morfologis dapat dibagi menjadi di- atau bispor yang memiliki dua spora, oligospora yang memiliki sedikit spora, dan polispor dengan banyak spora. Klasifikasi panjang rantai spora *actinomycetes*, meliputi posisi, bentuk, struktur, dan warna sangat penting dalam pembeda spesies (Lechavelier and Lechavelier, 1989). Ciri-ciri utama yang bisa digunakan untuk menggambarkan taksonomi actinobacteria pada genus dan spesies yaitu morfologi secara mikroskopis. *Actinobacteria* menunjukkan berbagai macam morfologi, yang berbeda terutama dalam hal ada atau tidak adanya miselium substrat atau miselium aerial, warna miselium, produksi pigmen melanoid yang dapat difusif, dan struktur serta penampilan spora.

#### **2.4.1. Morfologi Miselium**

*Actinobacteria* membentuk miselium substrat pada kultur terendam dan tumbuh padat. Namun, pada permukaan padat, banyak yang membentuk hifa udara, yang tujuan utamanya adalah menghasilkan spora reproduksi. Miselium substrat berkembang dari hasil spora yang berkecambah. *Actinobacteria*, seperti *Thermoactinomyces*, menunjukkan percabangan dikotomis. Di sisi lain, anggota keluarga *Micromonosporaceae* menghasilkan miselium substrat yang luas dengan miselium udara yang tidak ada atau belum sempurna. *Actinobacteria* menunjukkan berbagai morfologi, termasuk coccoid (*Micrococcus*) dan rod-coccoid (*Arthrobacter*), serta bentuk hifa yang terfragmentasi (*Nocardia sp.*) Dan juga bentuk dengan miselia bercabang permanen dan sangat berdiferensiasi (misalnya, *Streptomyces sp.*, *Rhodococci* membentuk filamen memanjang pada substrat dan tidak menghasilkan miselium sejati, sedangkan corynebacteria tidak menghasilkan miselium sama sekali. *Actinobacteria* yang termasuk dalam genus *Oerskovia* ditandai dengan pembentukan substrat bercabang hifa yang pecah menjadi elemen motil flagellated (Barca *et al.*, 2016).

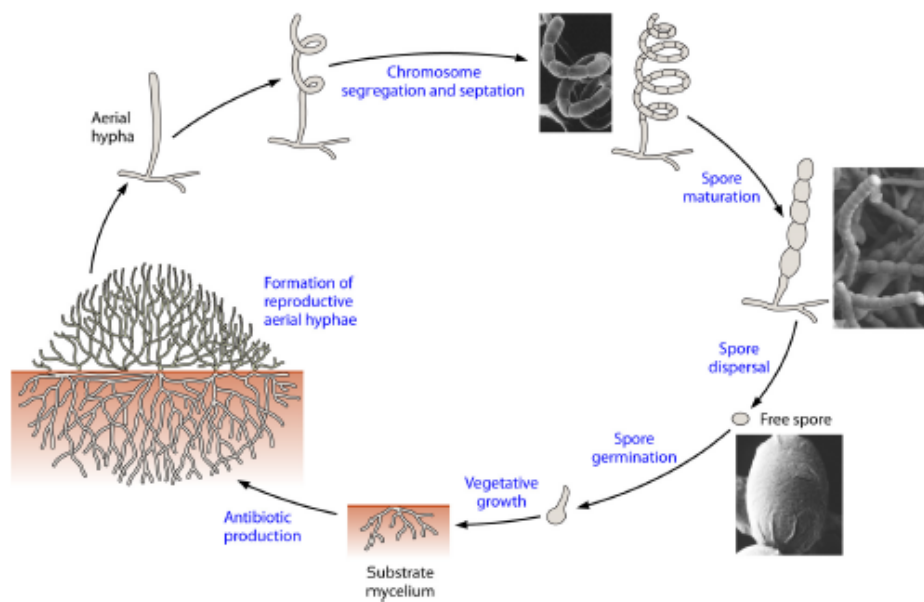
#### 2.4.2 Morfologi Rantai Spora

Spora sangat penting dalam taksonomi *Actinobacteria* (Barca *et al.*, 2016). Langkah awal sporulasi pada beberapa *Actinobacteria* dapat dianggap sebagai proses bertunas, karena memenuhi kriteria utama yang digunakan untuk menentukan tunas pada bakteri lain (Gambar 2.4.). Spora dapat terbentuk pada substrat dan atau miselium aerial sebagai sel tunggal atau rantai dengan panjang yang berbeda. Jadi, pada genera *Micromonospora*, *Micropolyspora*, dan *Thermoactinomyces*, pembentukan spora terjadi langsung pada substrat miselium (Barca *et.al.*, 2016), sedangkan pada *Streptomyces* spora tumbuh dari miselium udara. Kelompok *Actinoplanes* dan *Actinosynnema* dicirikan oleh spora motil, sedangkan *Thermoactinomyces* memiliki endospora tahan panas (Barca *et.al.*, 2016).

Beberapa genera *Actinobacteria* lainnya memiliki sklerotia (*Chainia*), sinema (*Actinosynnema*), vesikel yang mengandung spora (*Frankia*), atau vesikula yang

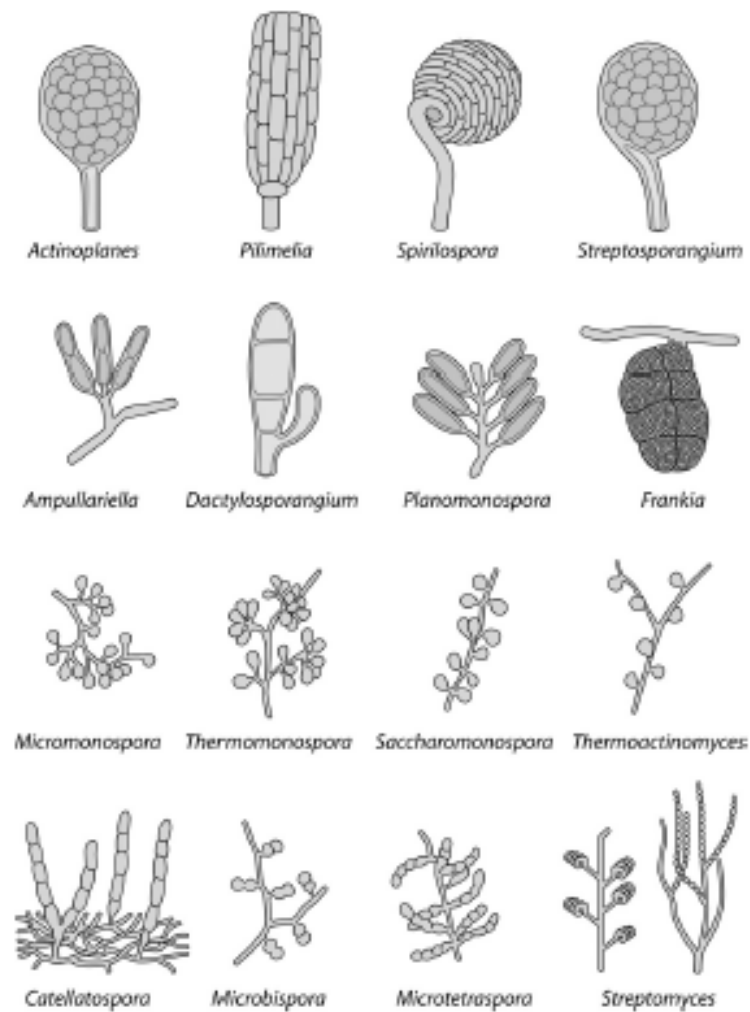


tidak memiliki spora (Intrasporangium). Genera lain, seperti *Actinoplanes*, *Ampulariella*, *Planomonospora*, *Planobispora*, *Dactylosporangium*, dan *Streptosporangium*, diklasifikasikan berdasarkan morfologi sporangialnya. Gambar 2.5. mengilustrasikan berbagai jenis spora yang dapat ditemukan pada genera aktinomisetal. Akhirnya, morfologi spora itu sendiri juga dapat digunakan untuk mengkarakterisasi spesies mereka mungkin memiliki permukaan yang halus, berkulit, berduri, berbulu, atau rugosa (Barca *et al.*, 2016).



**Gambar 2.4.** Siklus Hidup *Actinomycetes* (Barca *et al.*, 2016)

*Actinomycetes* merupakan mikroorganisme yang dapat mendegradasi kulit udang menjadi kitin dan produk turunannya. Salah tujuan dari penelitian ini adalah mencari mikroorganisme unggulan yang khususnya berasosiasi pada biota laut sebagai sumber penghasil enzim kitinolitik.



**Gambar 2.5.** Tipe Spora *Actinomycetes* (Barca *et.al.*, 2016)

Untuk mendapatkan *actinomycetes* sebagai penghasil enzim kitinase, beberapa penelitian sebelumnya telah melakukan skrining *actinomycetes* yang berasosisasi dengan sampel biota laut antara lain adalah sponge, makroalga dan tunicate yang berasal dari perairan Buleleng, Singaraja, Provinsi Bali dan dari perairan Teluk Tomini, Oluhuta, Provinsi Gorontalo. Hasil skrining dengan media agar koloid kitin di perairan Bali didapat 21 isolat sedangkan dari perairan Gorontalo didapat 26 isolat. Dari 21 isolat Bali didapat isolat unggul sebanyak 2 isolat dengan kode 18D36A1 dan 18D36A2. Untuk 26 isolat dari perairan Gorontalo didapat 1 isolat unggul dengan kode 19C38A1. Ketiga isolat unggulan tersebut digunakan sebagai kajian utama dalam penelitian ini meliputi morfologi mikroorganisme

menggunakan mikroskopi, filogenetik, pola degradasi kulit udang menjadi produk turunan, dan uji antifungi.

## **2.5. Mikroskop**

Pada penelitian ini dilakukan pengamatan morfologi dengan menggunakan mikroskop apotome dan *SEM*. Identifikasi dengan mikroskop apotome bertujuan untuk menentukan pertumbuhan hifa, miselia, dan spora dari mikroorganisme secara makro, sedangkan identifikasi *SEM* bertujuan untuk melihat pertumbuhan mikroorganisme secara mikro (detail).

### **2.5.1. Persiapan Preparat**

Identifikasi dengan *SEM* pada material biologi dapat menyebabkan *charging effect* sehingga menurunkan kualitas hasil morfologi yang diperoleh, maka harus dilakukan suatu teknik preparasi yang tepat seperti fiksasi dengan menggunakan konsentrasi formalin, dehidrasi dengan konsentrasi alkohol dan dengan coating gold.

Persiapan sampel *SEM* melibatkan beberapa proses preparasi yang meliputi fiksasi dan dehidrasi sampel (Ayub *et al.*, 2017). Umumnya, spesimen untuk analisis *SEM* memerlukan dehidrasi, diikuti dengan pengeringan (pengeringan titik kritis) dalam kasus sampel biologis. Sampel distabilkan dan dibuat konduktif dengan pelapisan sputter.

Fiksasi merupakan teknik yang digunakan untuk mempertahankan struktur seluler dalam tahap "seperti kehidupan" saat memproses. Ini memberikan pencitraan resolusi tinggi dari spesimen tekanan uap tinggi seperti gel, suspensi, emulsi, atau sampel biologis. Penayangan EM atau pemrosesan sampel dilakukan di suhu kriogenik (103 K) (Emas *et.al.*, 2016; Issman and Talmon, 2012). Kondisi kriogenik diperlukan untuk mencegah kehilangan volatil dari sampel dalam ruang vakum EM. Pada dasarnya, preparasi sampel untuk analisis EM dilakukan dengan teknik fiksasi yang berbeda-beda sesuai jenis sampel. Fiksasi kimia adalah metode

yang paling populer dan fleksibel untuk fiksasi di EM. Teknik fiksasi ini menggunakan beberapa bahan kimia seperti (glutaraldehyd, formaldehyd, dan akrolein) untuk pengawetan morfologi sampel biologi. Tetapi tidak dapat mencegah denaturasi protein dan bermasalah dengan teknik pelabelan antibodi, sehingga menciptakan tantangan saat menggunakan EM

Pembesaran pada SEM dibandingkan dengan mikroskop optik, EM memiliki perbesaran daya hingga jutaan kali, dibandingkan dengan mikroskop optik hanya dengan beberapa ribu kali (Chen *et.al.*, 2011). Dalam mikroskop cahaya, resolusi keseluruhan tergantung pada panjang gelombang cahaya, yaitu 0,4-0,7 m saja. Bakteri dan mitochondria, yang lebarnya kira-kira 1-5 m, adalah benda terkecil yang dapat dilihat dengan jelas di bawah mikroskop cahaya (Alberts, 2002; Sula *et.al.*, 2020; Sulai *et.al.*, 2020; Vajargah *et.al.*, 2021). Sebaliknya, penemuan EM, telah mengangkat pengamatan patologi klasik dari tingkat seluler ke subseluler

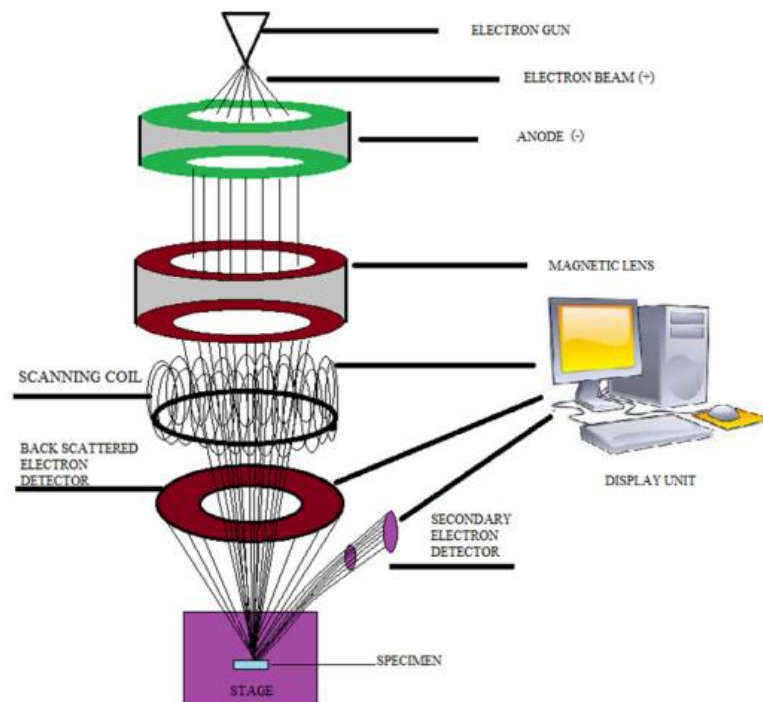
### **2.5.2. Scanning Electron Microscopy (SEM)**

Sejarah mikroskop elektron berawal dari sepertiga pertama abad ke-20 ketika Ruska dan Knoll, dari Universitas Berlin, menciptakan instrumen pertama pada tahun 1931 (Wightman, 2022). SEM merupakan alat interdisipliner untuk mengkarakterisasi bahan keras dan lunak dengan berbagai teknik preparasi sesuai sampel. SEM menghasilkan informasi tentang topologi permukaan, kekasaran, morfologi, perbedaan komposisi dan terkadang fitur sub-permukaan (Wightman, 2022). Pada dasarnya, SEM menggunakan berkas elektron untuk menghasilkan resolusi gambar pada sampel (Brisset, 2012). SEM digunakan untuk melihat permukaan dalam bahan serbaguna, menggunakan berkas elektron untuk analisis. Pembesaran dapat diperpanjang hingga 5.000.000 kali. SEM memberikan informasi tentang berbagai aspek seperti morfologi, komposisi, dan topografi baik biologi maupun bahan non-biologis (Popelka *et al.*, 2020).

Komponen utama dari SEM adalah pistol elektron (Wightman, 2022). Pistol elektron atau gun membutuhkan energi panas untuk memancarkan elektron dari

katoda. Sumber elektron seperti filamen tungsten, cerium hexaboride, atau lanthanum hexaboride dapat menghasilkan berkas elektron dan elektron dipercepat menuju spesimen. Dalam kasus spesimen nonkonduktif, ini dilapisi dengan logam seperti emas (Au), paladium (Pd), platinum (Pt), dan perak (Ag) dalam proses yang dikenal sebagai pelapisan sputter. Elektron tercermin dalam pola zig-zag di mana berkas elektron primer berinteraksi dengan atom di dekat permukaan dan menghasilkan pelepasan partikel sekunder dari setiap posisi (Gambar 2.6).

Berkas elektron ditangkap dan dikonsentrasikan dalam sinar monokromatik tipis yang terfokus menggunakan lubang logam dan lensa magnetik. Elektron berinteraksi dengan spesimen untuk menghasilkan sinyal yang membawa perincian topografi permukaan, komposisi, dan karakteristik kelistrikan lainnya. Efek dan interaksi ini dievaluasi dan diubah menjadi gambar (Kannan, 2018).



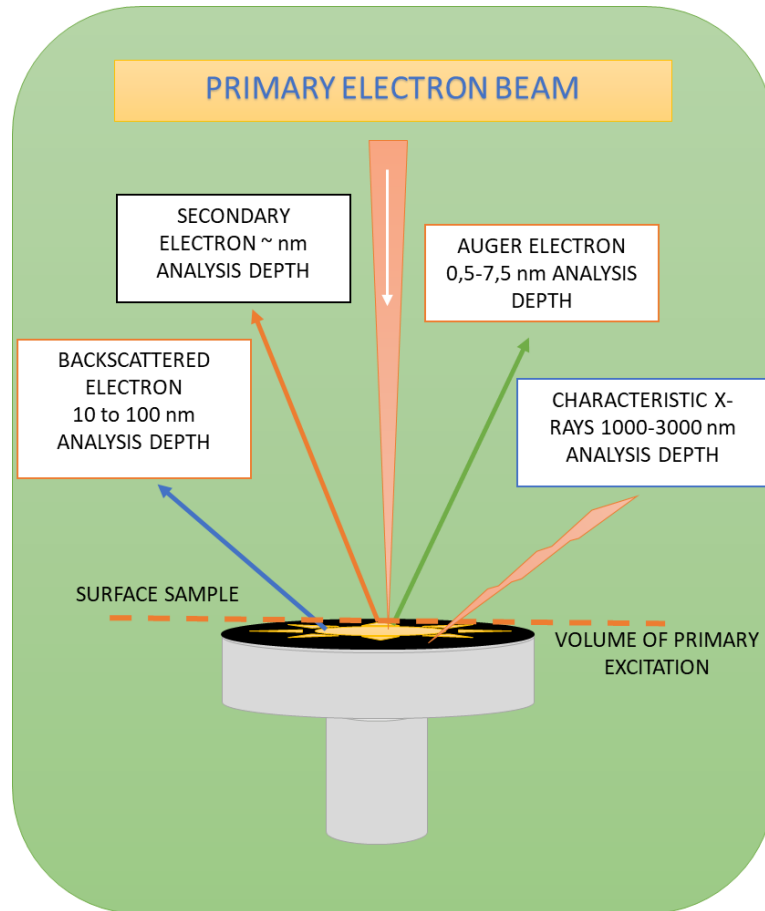
**Gambar 2.6.** Diagram Skematik SEM yang Menampilkan Sistem dan Proses *Scanning* (Brisset *et. al.*, 2009)

Elemen kunci kedua yang mendefinisikan properti dari SEM dibentuk oleh satu set detektor. Ini tergantung pada fakta bahwa berkas elektron terfokus pada

permukaan (Gambar 2.6) menghasilkan berbagai jenis elektron (Brisset *et. al.*, 2009), memungkinkan eksperimen untuk mengumpulkan informasi mengenai topografi permukaan dan komposisi unsur sampel pada skala submikrometer (Egerton, 2005). Di antara komponen-komponen ini, elektron memiliki hamburan balik atau *backscatter detector* (BSD) mendeteksi elektron yang tersebar secara elastis, dan mengambil keuntungan dari fakta bahwa nomor atom yang lebih tinggi kemungkinan menghasilkan tumbukan elastis karena luas penampang yang lebih besar (Jesse *et.al.*, 2011). Dengan demikian, kecerahan gambar yang diperoleh berbanding lurus dengan nomor atom yang lebih rendah, jadi gambar *backscatter electron* (BSE) memberikan tampilan yang elegan cara untuk membedakan fase kimia yang berbeda pada permukaan sampel.

Detektor BSE yang disebut elektron sekunder biasanya terletak di atas sampel dalam chamber energi elektron yang dipancarkan lebih rendah ketika padatan disinari dengan elektron energi tinggi atau partikel lain; dua jenis detektor, yaitu detektor konvensional dalam lensa biasanya ditempatkan di ruang sampel (Wightman, 2022). Yang pertama menghasilkan gambar yang lebih bergantung pada topografi sampel daripada yang diperoleh dengan detektor BSE. Salah satu keuntungan utama dari instrumen SEM adalah resolusinya (Egerton, 2005). Dengan menggunakan elektron alih-alih foton untuk sampel SEM dapat mencapai resolusi nanometer (Haan *et.al.*, 2019).

Kemampuan ini tergantung pada beberapa faktor seperti ukuran tempat elektron, yang ditentukan oleh cara elektron diproduksi dan difokuskan, serta volume interaksi berkas electron. Beberapa SEM biasanya dapat mencapai resolusi nano. Jarak dari potongan kutub terakhir dari lensa ke sampel, yang disebut jarak kerja atau *working distance* adalah sekitar beberapa milimeter. Untuk meningkatkan resolusi, jarak kerja, sumber energi, dan kerapatan arus yang merupakan parameter penting dalam mengoperasikan SEM.



**Gambar 2.7.** Representasi Skematis dari Berbagai Jenis Partikel yaitu, Elektron (Elektron Hamburan Balik, Elektron Sekunder, Elektron Auger) dan Foton yang Dihasilkan Setelah Penyinaran Materi oleh Elektron Primer.

Kelebihan SEM yaitu dapat dengan mudah menggambarkan sel permukaan dan seluruh organisme, terutama dalam kasus studi morfologi arthropoda dan klasifikasi taksonomi (Kownacki *et. al.*, 2015), dalam sampel non-biologis, dapat digunakan untuk penentuan kuantitas, jumlah partikel dan ukuran (Kannan, 2018), dan SEM dapat menampilkan gambar sampel struktur makro, mikro, bahkan nano (Issman and Talmon, 2012).

Prinsip SEM adalah elektron dipancarkan dari sumbernya mengenai sampel. Pantulan elektron ini akan ditangkap oleh detektor, sehingga membentuk bayangan tertentu. Tampilan permukaan sampel bergantung pada intensitas pengukuran elektron kedua. Teknik SEM pada hakikatnya merupakan

pemeriksaan dan analisis permukaan. Hasil foto SEM merupakan gambar topografi dengan segala tonjolan, lekukan, atau lubang permukaan. Gambar tersebut diperoleh dari penangkapan *secondary electron* yang dipancarkan oleh spesimen melalui kolom membentuk cahaya monokromatik. Sinar yang mengenai sampel menyebabkan terjadinya interaksi yang menimbulkan pancaran elektron baru. Sinyal elektron yang dihasilkan ditangkap oleh detektor, kemudian diteruskan ke monitor. Pada monitor akan diperoleh gambar yang khas yang memperlihatkan struktur permukaan spesimen. Selanjutnya, gambar di monitor dapat dipotret dengan menggunakan film hitam putih.

Sebelum dianalisis dengan *SEM*, sampel harus dipreparasi terlebih dahulu. Hal-hal yang harus dipenuhi untuk menyiapkan sampel, yaitu menghilangkan seluruh pelarut, air, atau bahan lain yang dapat menguap ketika di dalam vakum dan menipiskan sampel yang akan dianalisis. Jika spesimen merupakan suatu isolator, seperti tanaman, kuku jari, dan keramik, maka perlu dilapisi dengan bahan konduktor. Bahan konduktor yang biasa digunakan adalah emas, perak, dan carbon. Pelapisan dilakukan dalam ruang penguapan vakum atau sputtering coating.

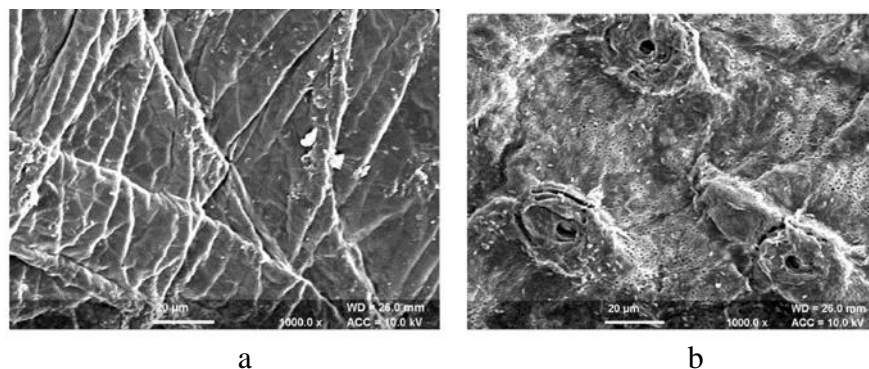
Pengujian morfologi dari dapat digunakan untuk mengevaluasi melihat pola pertumbuhan mikroorganisme dan kerusakan media kultivasi dengan teknik mikroskopi. Pertumbuhan tersebut didefinisikan sebagai fermentasi padat atau yang disebut dengan SSF. Teknik fermentasi padat adalah suatu metode fermentasi substrat padat dengan kadar air rendah dan merupakan suatu teknik yang dimanfaatkan untuk memproduksi enzim ekstraseluler dari suatu mikroorganisme yang saat ini menjadi teknik penting untuk produksi enzim pada mikroba karena salah satu keunggulan ekonomi dibandingkan fermentasi cair (submerged fermentation) (Viniegra and Gonzalez, 2013).

Sejumlah mikroorganisme termasuk bakteri dan jamur telah dilaporkan menghasilkan kitinase tetapi aplikasi komersial dibatasi karena hasil enzim yang rendah, biaya produksi yang tinggi dan stabilitas enzim yang kurang. Sebagian



besar mikroorganisme ini telah dilaporkan menggunakan kitin murni sebagai sumber karbon. Beberapa penelitian menerangkan bahwa mikroorganisme yang menghasilkan kitinase dapat mendegradasi kitin menjadi produk turunannya. Tetapi tidak ada studi sistematis yang dilakukan untuk mengoptimalkan kondisi untuk degradasi limbah makanan laut yang efektif dan mengembangkan strategi bioremediasi menggunakan mikroorganisme kitinolitik. Isolasi bakteri kitinolitik dapat secara efisien mendegradasi limbah makanan laut yang dievaluasi dengan menganalisis degradasi limbah udang menggunakan SEM (Kumar, 2018).

Hasil evaluasi morfologi blanko kulit udang menunjukkan hampir halus permukaan (Gambar 2.8.a.). Namun, setelah proses fermentasi kulit udang menjadi retak dan terbentuk pori yang menunjukkan terjadinya degradasi kitin oleh enzim selama proses fermentasi (Gambar 2.8.b.). Perubahan serupa ditunjukkan pada fermentasi kulit udang dengan kitinase dari *Aeromonas hydrolytica* SBK1 dan *Paenicillium sp.* LYG0704. Hasil penelitian menunjukkan bahwa kitinase dari *Paenibacillus sp.* AD sangat efektif dalam hidrolisis kitin dan juga dapat digunakan untuk degradasi bahan kitin lainnya, karena pada prinsipnya di semua sumber kitin memiliki struktur kitin yang sama.



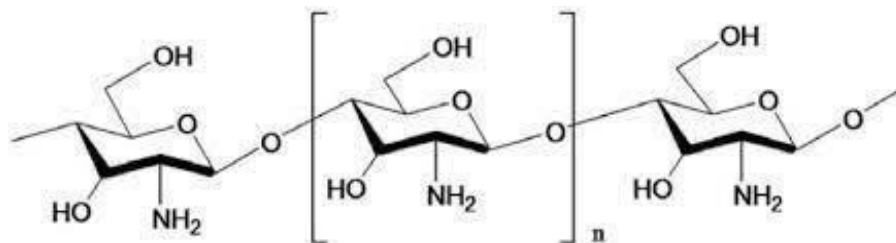
**Gambar 2.8.** (a) Blanko Kulit Udang (b) Fermentasi Kulit Udang dengan *Paenibacillus sp.*AD.

Dalam penelitian ini, digagas menggunakan metode SEM untuk memonitor pertumbuhan *actinomycetes* penghasil kitinase yang mendegradasi kulit udang. Metode monitoring ini didasarkan pada hasil morfologi pola pertumbuhan

actinomycetes dan pola degradasi kulit udang dalam menghasilkan produk turunannya. Untuk mendapatkan *actinomycetes* yang produktif menghasilkan kitinase, dalam penelitian sebelumnya telah dilakukan skrining *actinomycetes* yang berasosisasi dengan sponge dari perairan Buleleng, Singaraja, Provinsi Bali yang telah dilakukan pada tahun 2018 dan perairan Teluk Tomini Provinsi Gorontalo yang telah dilakukan pada tahun 2019.

## 2.6. Chitooligosacharide (COS)

COS memiliki keunggulan berat molekul rendah, kelarutan tinggi, penyerapan air yang baik, daya serap yang kuat, dan biokompatibilitas yang baik. COS (Gambar 2.9), juga disebut kitosan oligomer atau chitooligomer, didefinisikan sebagai kitosan dengan derajat polimerisasi berkisar 20 dan berat molekul rata-rata kurang dari 3900 Da (umumnya 0,2–3,0 kDa) (Jung and Park, 2014). Molekul yang jauh lebih besar juga disebut sebagai COS, dan ada perbedaan yang sangat besar dalam aktivitas oligomer pendek (0,2–0,8 kDa) dengan oligomer panjang (2,0–3,0 kDa).



**Gambar 2.9.** Struktur COS (Jung and Park, 2014).

Selain itu, COS memiliki potensi kemampuan dalam meningkatkan kualitas makanan dan kesehatan manusia dan juga dapat mencegah pertumbuhan bakteri dan jamur (Joaoc *et al.*, 2008), mengerahkan aktivitas anti-tumor (Park *et al.*, 2011), meringankan respon inflamasi (Santosmoriano *et al.*, 2018), dan bertindak sebagai imunopotensiator (Xing *et al.*, 2016). COS harus disimpan dalam kondisi inert dan di bawah  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  untuk penyimpanan jangka panjang karena sensitivitasnya terhadap autooksidasi.

Dalam produksi COS, metode yang digunakan salah satunya yaitu degradasi oleh enzim. Metode degradasi enzimatik tampaknya lebih mudah dioperasikan dan dipantau dari pada hidrolisis asam, dan produk dapat diperoleh tanpa modifikasi tambahan. Namun, biaya, ketersediaan dan spesifisitas kitosanase telah membatasi penerapannya (Kumar *et al.*, 2006).

Hidrolisis enzimatik dapat diklasifikasikan menjadi hidrolisis enzimatik spesifik kitinase, kitosanase, dan glukonase dan hidrolisis enzimatik non spesifik lisozim, protease, lipase, amilase, selulosa (Cheng *et al.*, 2006). *Bacillus alvei* dapat menghasilkan enzim yang disebut *Extracelullar enzyme preparation* (EEP), dan ketika kitosan diperlakukan dengan EEP, berat molekul kitosan berkurang dari 88.000 menjadi 5000 Da, dan viskositas hampir mendekati nol dalam waktu 2 jam. Kondisi optimum EEP adalah sebagai berikut: pH 5,5, 37°C, 2 jam dan konsentrasi larutan kitosan 1% (Olicon-Hernandez *et al.*, 2017).

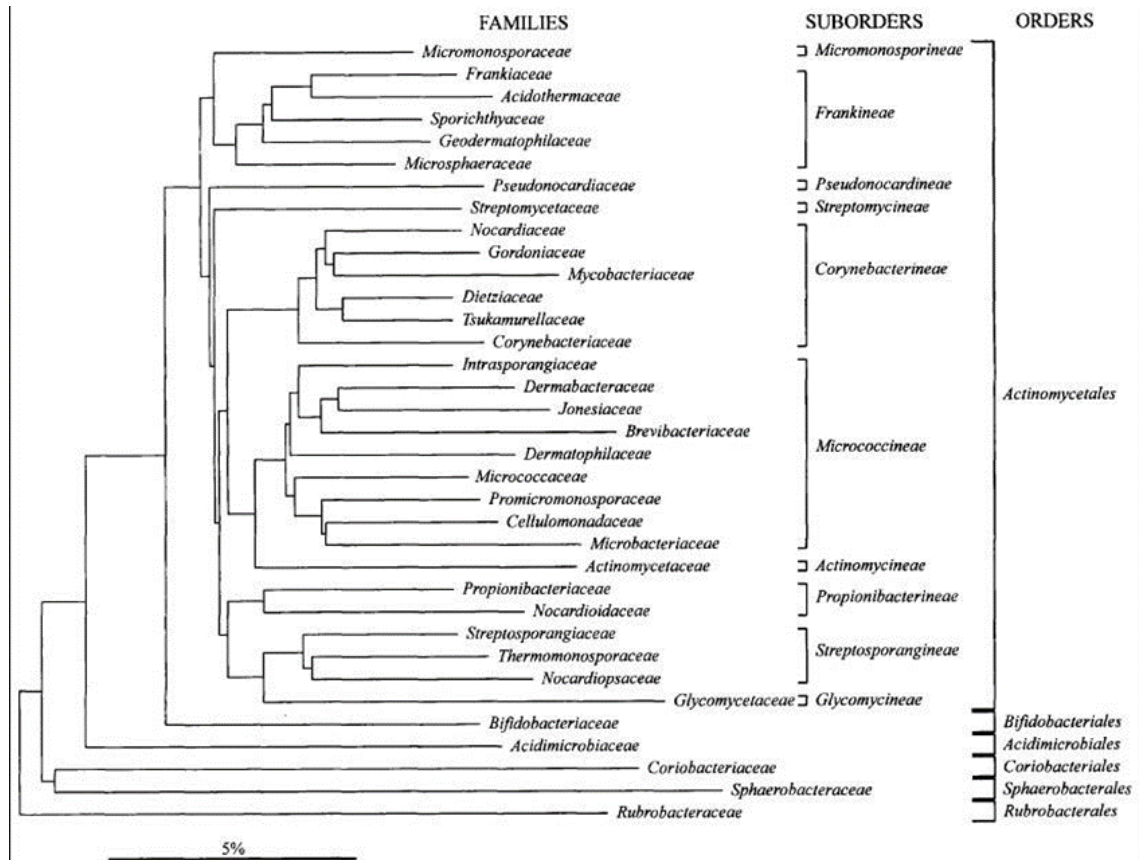
COS telah dilaporkan memiliki aktivitas biologis seperti antibakteri, antifungal, antiviral, anti-tumor, antioksidan, immunoregulatory, dan kontrol tekanan darah. Saat ini COS bisa didapatkan secara kimia menggunakan asam-asam pekat dan enzimatik. Penggunaan bahan kimia dalam proses pembuatan COS secara kimia memiliki kekurangan seperti hidrolisis senyawa yang sulit untuk dikontrol sehingga menghasilkan keberagaman struktur hasil reaksi yang rendah, disamping penggunaan bahan kimia juga tentunya akan berdampak terhadap lingkungan. Oleh karena itu, pembuatan COS secara enzimatik dapat menjadi alternatif yang lebih praktis dan ramah lingkungan demi menghindari penggunaan bahan kimia. *Actinomycetes* diketahui mampu menghasilkan enzim kitinase yang dapat digunakan dalam proses pembuatan COS dari kitin. Informasi mengenai degradasi limbah krustasea menjadi COS secara enzimatik menggunakan *actinomycetes* masih sangat terbatas. Selain itu, senyawa COS hasil degradasi kitin kulit udang oleh *actinomycetes* juga belum banyak dilaporkan. Pada penelitian ini dilakukan potensi COS sebagai antifungi secara mikroskopik.

## 2.7. Analisis Filogenetik

Klasifikasi tingkat taksonomi genus dan kelas disusulkan untuk garis taksonomi *actinomycetes* seperti yang didefinisikan oleh analisis rRNA subunit kecil (16S) dan gen yang mengkode molekul (rDNA). Sementara batasan tradisional genus subfilum *actinomycetes* pada umumnya sesuai dengan pengelompokan filogenetik dari organisme berbasis 16S rRNA/rDNA.

Sistem klasifikasi secara filogenetik pada tingkat genus dikelompokkan ke dalam famili, subordo, ordo, subkelas, dan kelas terlepas dari karakteristik fenotipe yang menjadi dasar penggambaran taksonomi di masa lalu. Selain didasarkan pada daftar beragam sifat kemotaksonomi, morfologi, dan fisiologis, penggambaran hanya didasarkan pada pengelompokan filogenetik berbasis urutan 16S rDNA/rRNA dan keberadaan nukleotida spesifik taksonomi 16S rDNA RNA (Gambar 2.10) (Stackebrandt *et al.*, 1997).

Dalam sistem klasifikasi, organisme yang diusulkan sebagai anggota kelas Aktinomisetes berawal dari tiga sumber: pertama, pembentukan kemotaksonomi yang mendeteksi perbedaan komposisi kimia penyusun sel seperti peptidoglikan, lipid polar dan asam lemak, kuinon isoprenoid, sitokrom, dan komposisi basa DNA; kedua, pengenalan eksperimen reasosiasi DNA-DNA yang mengukur kesamaan besar antara DNA untai tunggal dari galur spesies yang berkerabat dekat (Stackebrandt and Kandier, 1979); dan ketiga, penentuan kesamaan urutan 16S rRNA dan rDNA, yang mengungkapkan tingkat variasi urutan antara strain di semua tingkat keterkaitan (Stackebrandt *et al.*, 1980). Masing-masing pendekatan ini telah berkontribusi pada keberhasilan strategi klasifikasi yang disebut polifasik oleh Colwell (1970).



**Gambar 2.10.** Keterkaitan Filogenetik dari Keluarga Kelas *Actinomycetes* (Stackebrandt *et al.*, 1997).

Setiap melakukan uji PCR beberapa hal penting yang dibutuhkan seperti DNA templat, primer, nukleotida, dan DNA polimerase. DNA polimerase adalah enzim kunci yang menghubungkan nukleotida untuk membentuk produk PCR. Nukleotida mencakup empat basa meliputi adenin, timin, sitosin, dan guanin (A, T, C, G) yang ditemukan dalam DNA. Nukleotida bertindak sebagai building block yang digunakan oleh DNA polimerase untuk membuat produk PCR yang dihasilkan. Primer dalam reaksi menentukan produk DNA yang tepat untuk diamplifikasi.

Primer adalah fragmen DNA pendek dengan urutan tertentu yang melengkapi DNA target yang akan dideteksi dan diamplifikasi. Primer berfungsi sebagai titik ekstensi untuk DNA polimerase. Komponen yang disebutkan di atas dicampur dalam tabung reaksi atau 96 well plate dan kemudian ditempatkan dalam mesin

yang memungkinkan siklus berulang amplifikasi DNA terjadi dalam tiga langkah dasar. Prinsip mesin PCR pada dasarnya adalah thermal cycler.

Mesin ini memiliki blok termal dengan lubang, di mana tube atau plat dengan campuran reaksi PCR dimasukkan. Mesin dapat menaikkan dan menurunkan suhu, tepat dan terprogram (Weier and Gray, 1988). Larutan reaksi pertama-tama dipanaskan di atas titik leleh dua untai DNA komplementer dari DNA target, yang memungkinkan untaian untuk terpisah, proses yang disebut denaturasi.

Suhu kemudian diturunkan untuk memungkinkan primer spesifik mengikat segmen DNA target, proses yang dikenal sebagai hibridisasi atau anil. Annealing antara primer dan DNA target hanya terjadi jika keduanya saling melengkapi secara berurutan (misalnya A mengikat G). Temperatur dinaikkan lagi, pada saat DNA polimerase mampu memperpanjang primer dengan menambahkan nukleotida ke untai DNA yang sedang berkembang. Setiap pengulangan dari ketiga langkah ini, jumlah molekul DNA yang disalin menjadi dua kali lipat.

Ada banyak keuntungan dari metode PCR. Pertama, teknik ini sederhana untuk dipahami dan digunakan, serta menghasilkan hasil yang cepat (Garibyan and Avashia, 2013). PCR adalah teknik yang sangat sensitif dengan potensi untuk menghasilkan jutaan hingga miliaran salinan produk tertentu untuk pengurutan, kloning, dan analisis. Hal ini juga berlaku untuk qRT-PCR, tetapi qRT-PCR memiliki keuntungan dalam kuantifikasi produk yang disintesis. Dengan demikian, dapat digunakan untuk menganalisis perubahan tingkat ekspresi gen pada tumor, mikroba, atau keadaan penyakit lainnya.

Meskipun PCR adalah teknik yang memiliki banyak keuntungan, teknik ini memiliki keterbatasan. Karena PCR adalah teknik yang sangat sensitif, segala bentuk kontaminasi sampel oleh DNA dalam jumlah sedikit pun dapat menghasilkan hasil yang salah (Smith and Osborn, 2009). Selain itu, untuk merancang primer PCR, diperlukan beberapa data sekuens sebelumnya.

Pada penelitian ini, dimulai dengan skrining 21 isolat *actinomyces* dari perairan Bali dan 26 isolat dari perairan Gorontalo pada media agar koloid kitin. Dari skrining ini diperoleh isolat unggul untuk menghasilkan kitinase, dengan kode 18D36A1 dan 18D36A2 dari perairan Bali dan kode 19C38A1 dari perairan Gorontalo. Ketiga isolat tersebut selanjutnya digunakan dalam penelitian ini, dengan menumbuhkannya pada kulit udang untuk menggali lebih lanjut kemampuannya dalam mendegradasi kitin menjadi produk turunannya dan aplikasinya sebagai antifungi.

### III. METODE PENELITIAN

#### 3.1 Waktu dan Tempat

Waktu dan tempat penelitian ini dilaksanakan dari tahun 2020 sampai dengan tahun 2022 di UPT Laboratorium Terpadu dan Sentra Inovasi Teknologi (LTSIT) Universitas Lampung dan Sequencing untuk filogenetik di PT. Genetika Science Indonesia, Tangerang, Banten, Indonesia.

#### 3.2 Alat dan Bahan

Peralatan yang digunakan pada penelitian ini antara lain *Scanning Electron Microscope-Energy Dispersive X-Ray* (SEM-EDX) ZEISS tipe EVO MA 10, Mikroskop Apotome ZEISS A.1., *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC) *Polymerase Chain Reaction* (PCR) Shimadzu.

Bahan habis pakai yang digunakan pada penelitian ini yaitu, agar *swallow*, garam, NaOH, HCl, *ketoconazol*, *ciprofloxacin*, formalin, alkohol, carbon tape, preparat, cover clip. Limbah kulit udang, tulang sotong, dan sisik ikan diperoleh dari Gudang lelang, Teluk, Lampung.

Sampel *actinomycetes* diperoleh dari deposit koleksi di UPT LTSIT Unila hasil isolasi dari *sponge* dan *tunicate* di perairan Buleleng, Bali pada lokasi 8°07'20.9" S 114°34'3.8" E dan Oluhuta, Gorontalo pada lokasi 0°25'11.9" N 123°08'31.8" E.

#### 3.3. Persiapan Sampel

Limbah kulit udang, tulang sotong, dan sisik ikan diperoleh dari Gudang Pelelangan Ikan Teluk Betung Lampung dibersihkan dengan air mengalir, kemudian disimpan di *freezer* dengan suhu 4°C.



### 3.4. Pembuatan Kitin

Kulit udang kering dihancurkan dengan menggunakan blender, selanjutnya direndam dalam NaOH 10% dengan perbandingan kulit udang dan larutan NaOH 1 : 10 (w/v) selama 1 jam dengan suhu 60°C, kemudian disaring dan filtratnya dibilas hingga pH netral. Selanjutnya endapan dilarutkan dalam larutan HCl 2 M selama 1 jam, kemudian disentrifugasi dan dipisahkan antara filtrat dan endapan. Endapan dicuci beberapa kali hingga pH netral dan dimasukkan ke dalam oven hingga kering.

Sebanyak 1% pasta koloid kitin dalam air laut buatan yang sudah steril, diaduk dan dipanaskan bertekanan tinggi menggunakan *autoclave*. Kemudian strain dikulturkan pada media cair dengan menggunakan jarum ose dan diinkubasi selama 14 hari.

### 3.5. Pembuatan Media

Media koloid kitin agar dibuat dengan komposisi 2% agar-agar, 1% koloid kitin, 50 µg/mL *ketoconazole*, dan 50 µg/mL *ciprofloxacin* yang mana semua bahan dilarutkan dalam air laut buatan. Kemudian dituangkan pada petri ± 30 mL.

Media krustasea yang digunakan adalah kulit udang, sisik ikan dan tulang sotong (*cuttlesfish bone*). Mula-mula limbah krustasea dibersihkan dengan air mengalir, kemudian untuk tulang sotong dan kulit udang dipotong menggunakan gunting dengan ukuran ± 0,5 x 0,5 cm. Media tersebut disterilkan dengan autoclave dan disimpan sebagai media penelitian.

### 3.6. Uji Aktivitas kitinolitik dengan Metode Zona Bening

Strain Bali dan Gorontalo dikulturkan pada media agar dengan menggunakan jarum ose. Proses penapisan diawali dengan penggoresan 21 strain *Actinomycetes* dari Perairan Buleleng, Bali dan 26 Strain *actinomycetes* dari perairan Oluhuta,

Gorontalo di atas media agar lalu diinkubasi kemudian dilihat zona bening selama 14 hari untuk semua isolat.

Pengamatan dan analisis kitinolitik dengan metode zona bening adalah untuk melihat pertumbuhan actinomycetes dalam memproduksi enzim kitinase yang ditandai dengan adanya zona disekitar isolate. Untuk isolate yang mempunyai zona disekitarnya akan diambil gambarnya menggunakan kamera. Analisis pertumbuhan diamati dengan menghitung besar kecilnya zona bening yang muncul pada media.

Isolate unggulan yang digunakan pada penelitian selanjutnya adalah isolat yang memiliki zona bening dengan ukuran besar.

### **3.7. Pengamatan Strain Unggulan**

Untuk mengamati strain unggulan terlebih dahulu dilakukan identifikasi morfologi menggunakan SEM, untuk mendapatkan karakteristik morfologi dan analisis pohon phylogenetic menggunakan PCR yang dapat menjelaskan bahwa strain unggulan yang diperoleh adalah strain yang sudah ada di GenBank atau strain baru, dengan langkah sebagai berikut:

#### **3.7.1. Karakteristik Morfologi Strain Unggulan pada Media Padat**

Untuk mengamati karakteristik morfologi strain unggulan pada media padat dilakukan dengan menggunakan beberapa variasi limbah kulit krustasea yaitu media koloid kitin agar yang dimodifikasi secara *Cover Clip* (Kumar *et al.*, 2011), sisik ikan, tulang sotong (*cuttlefish bone*), dan kulit udang. Pada pengamatan ini dilakukan persiapan media agar sesuai Prosedur 3.5. kemudian dikultur dengan cara menggores menggunakan jarum ose. Pada media limbah kulit krustasea dilakukan sesuai Prosedur 3.5., setelah itu dicelupkan ke dalam inokulum yang sudah disiapkan sesuai Prosedur 3.4. kemudian diinkubasi pada suhu ruang selama 4 hari.

Pengamatan morfologi pada masing-masing media dilakukan secara langsung (*fresh*) kecuali pada media koloid kitin agar yang dimodifikasi cover slip dilakukan

fiksasi dengan 10 % formalin. Fiksasi formalin dilakukan dengan cara merendamkan replika pada konsentrasi 10% selama 24 jam, kemudian didehidrasi menggunakan alcohol secara bertahap pada konsentrasi 30 %, 50 %, 70%, 80%, 90 % selama 10 menit dan untuk konsentrasi 96% dilakukan selama 1 jam (Safora *et al.*, 2010). Sebelum pengamatan morfologi menggunakan SEM, masing-masing sampel dipindahkan ke atas aluminium stup yang telah direkati carbon tape, kemudian di-*coating* menggunakan *gold* dengan alat *sputter* Quorum.

Hasil pengamatan morfologi dari beberapa media diatas, dipilih gambar yang mempunyai pertumbuhan aktifitas strain bersih dan jelas untuk menunjukkan ciri-ciri strain actinomycetes sesuai dengan referensi yang sudah dipublikasikan oleh beberapa peneliti dan digunakan untuk penelitian selanjutnya.

Untuk memperjelas dan mengkonfirmasi jenis strain unggulan dilakukan analisis filogenetik dengan metode PCR dan untuk penentuan pohon filogenetik menggunakan metode Neighbor-Joining.

### **3.7.2. Analisis Filogenetik**

Pertama DNA isolat unggulan diekstraksi menggunakan protocol KIT DNA Genom Wizard® (cat. no. A1120, Promega, Madison, WI, USA). PCR dari urutan 16S rDNA diselesaikan menggunakan thermocycler Sensodirect dari Jerman. PCR dilakukan menggunakan forward primer: 5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3' (Heuer *et al.*, 1997). Selain itu, primer terbalik: 5'-CCG TAC TCC CCA GGC GGG G-3' (Baskaran *et al.*, 2016), yang diperkuat 810 bp, digunakan reaksi PCR diselesaikan dengan menggunakan Kit 2G Fast ReadyMix (cat. No. KK5102, Merck, Taufkirchen, Jerman). Reaksi PCR dilakukan pada volume total 25 µL, mengandung 5 µL template DNA (50 ng/µL), 12,5 µL 2G Fast ReadyMix, 6,5 µL air bebas RNase, 0,5 µL forward primer, dan 0,5 µL primer terbalik. Amplifikasi dilakukan dalam 35 siklus sebagai berikut: denaturasi selama 60 detik pada suhu 92°C, annealing primer selama 60 detik pada suhu 54°C, dan polimerisasi selama 90 detik pada suhu 72°C. hasil PCR yang menghasilkan amplicon dielektroforesis menggunakan metode sanger melalui jasa PT Genetika Science Indonesia. Hasil

sekuensing dianalisis secara filogenetik menggunakan software Mega versi 11. Data hasil sekuensing didepositkan di genbank dengan kode akses.

### **3.8. Identifikasi Pola Pertumbuhan Actinomycetes**

Pengamatan morfologi pola pertumbuhan actinomycetes pada kulit udang dilakukan dengan menggunakan SEM.

Pertama media kulit udang yang sudah disiapkan sesuai prosedur 3.5. diambil menggunakan pinset dan dimasukkan ke dalam inokulum yang sudah disiapkan sesuai Prosedur 3.4. Kemudian dimasukkan kedalam cawan petri dan diinkubasi dengan variasi waktu selama 1, 2, 3, dan 4 hari. Sebelum proses pengamatan SEM, sampel tersebut diletakkan di atas aluminium stub yang sudah direkati dengan *carbon tape*, selanjutnya dilakukan *coating* menggunakan *gold*. Kemudian dilakukan pengamatan pola morfologi pertumbuhan actinomycetes pada kulit udang menggunakan SEM dengan perbesaran 1000×, 2000× dan 3000×.

### **3.9. Identifikasi Pola Degradasi**

Pengamatan degradasi kulit udang oleh isolate unggulan dengan menggunakan SEM sesuai Prosedur 3.3.3.4. Sebelum pengamatan proses degradasi pada media kulit udang dicuci dengan menggunakan etanol 70%, kemudian sampel tersebut diletakkan pada aluminium stub yang sudah direkati dengan *carbon tape*, selanjutnya dilakukan *coating* menggunakan *gold*. Pengamatan pola morfologi degradasi pada kulit udang dilakukan menggunakan SEM pada variasi waktu inkubasi 1, 2, 3, dan 4 hari dengan perbesaran 1.000×, 2.000× dan 3.000× pada setiap sampel.

### **3.10. Uji Produk Degradasi Kulit Udang**

Pengamatan uji produk degradasi kulit udang dilakukan melalui analisis menggunakan HPLC sebagai indikator hasil degradasi kulit udang berupa senyawa

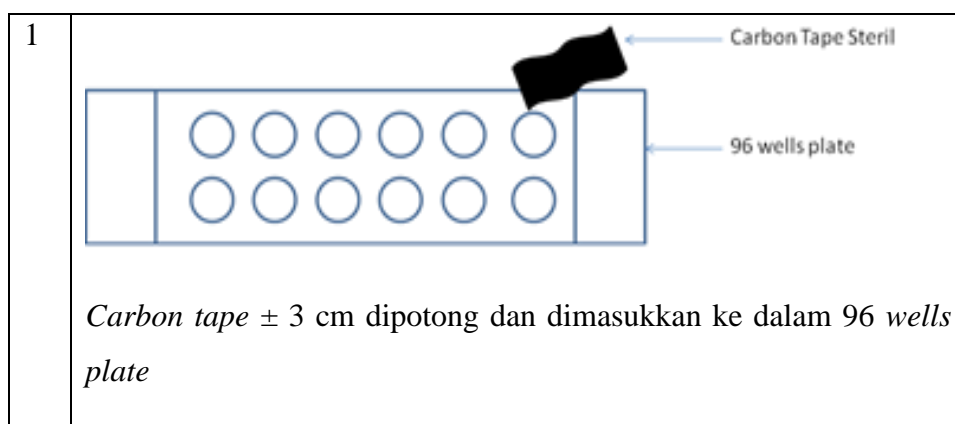
N-Acetyl Glukosamine dan turunannya. Prosedur pengamatan hasil degradasi kulit udang dilakukan dengan cara sebagai berikut:

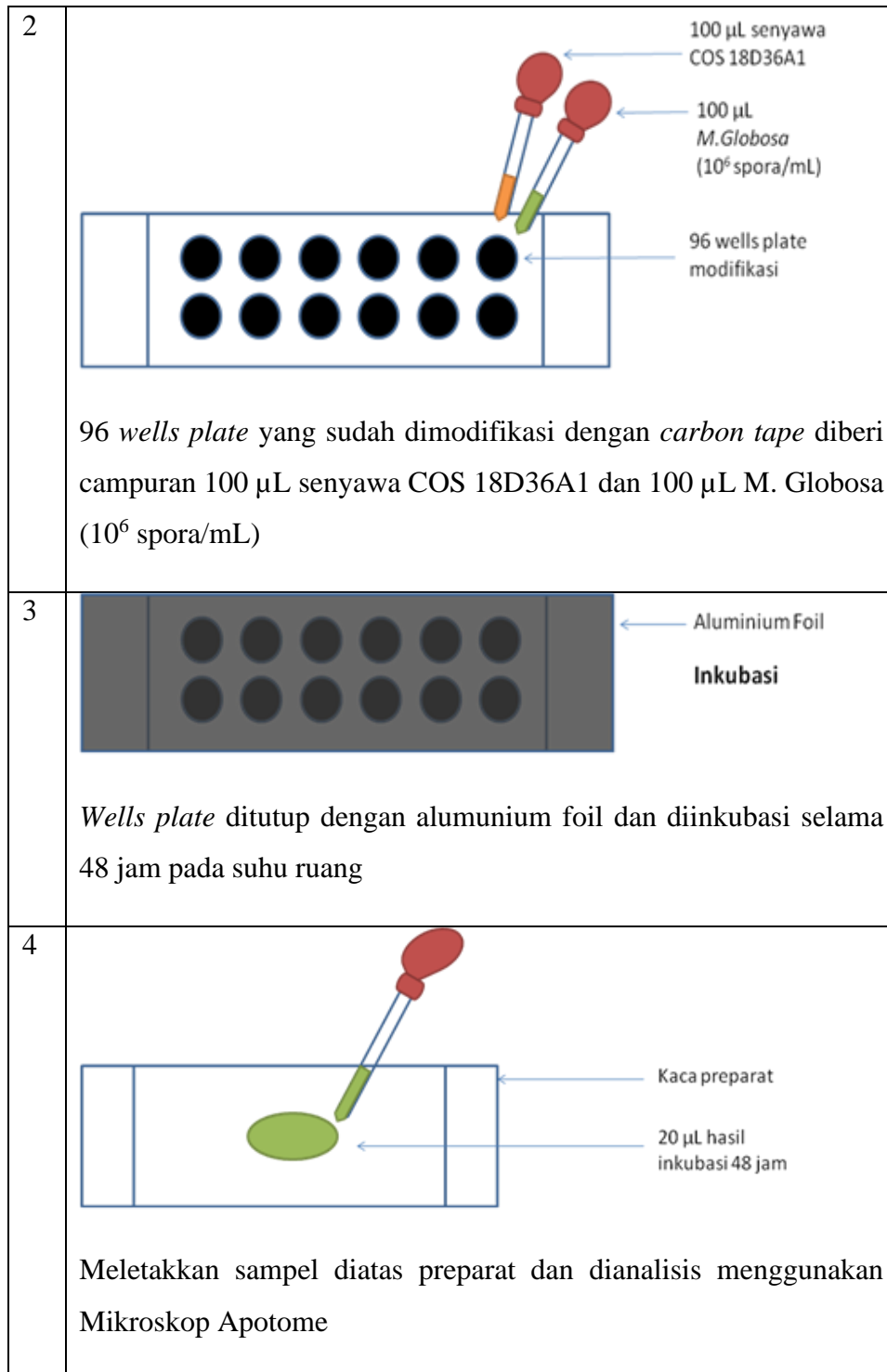
Pertama kulit udang yang sudah bersih diblender dan dimasukkan ke dalam cawan petri sebanyak 20 g dan disterilisasi menggunakan autoclave selama 1,5 jam. Setelah itu sebanyak 10 mL inokulum yang sudah dibuat sesuai dengan prosedur 3.4. dikultur dengan cara menuangkan ke dalam cawan petri yang sudah berisi media serbuk kulit udang dan diinkubasi selama 4 hari. Hasil degradasi produk tersebut disentrifuse untuk mengambil cairan sebagai hasil fermentasi kemudian cairan tersebut dianalisis menggunakan HPLC.

### 3.11. Pengujian Morfologi Antifungi secara Mikroskopi

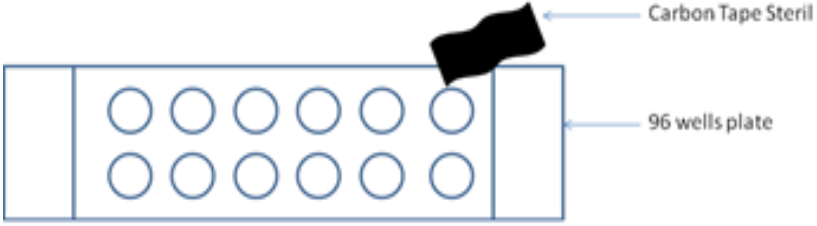
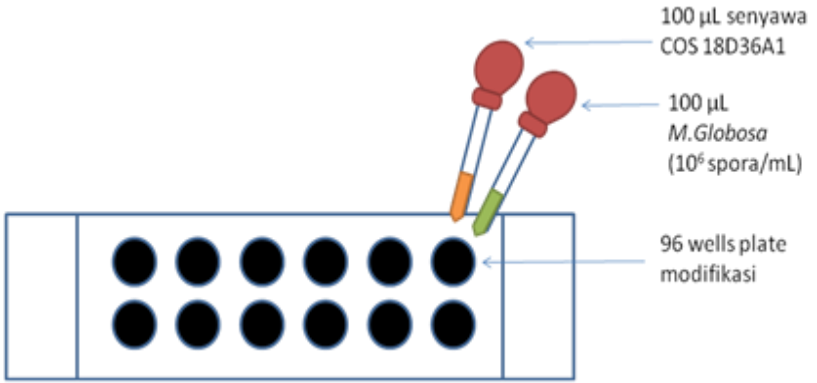

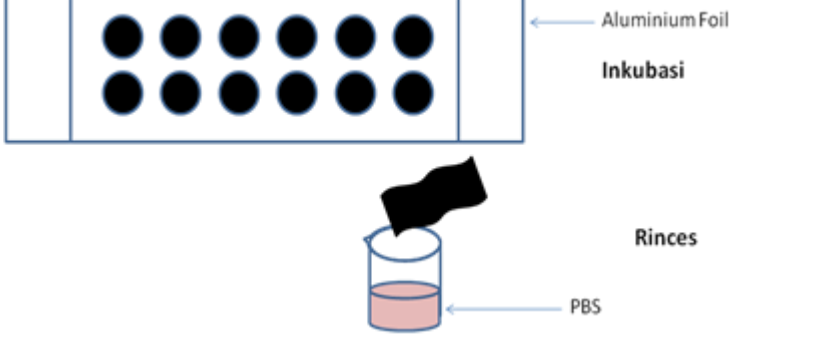
Pengamatan morfologi hasil degradasi kulit udang sebagai antifungi dilakukan dengan menggunakan Mikroskop Apotome dan SEM.

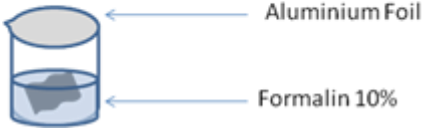

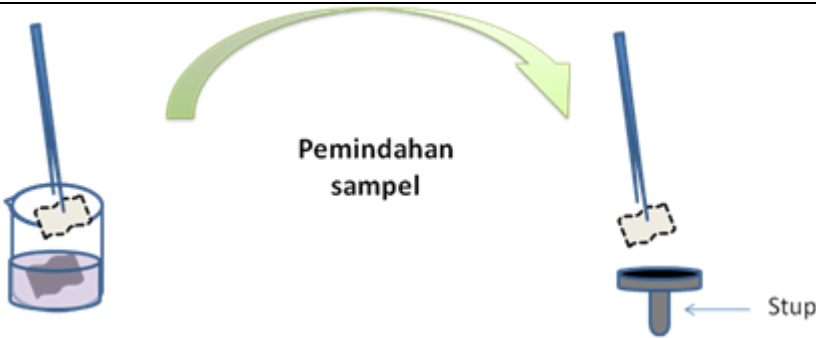

Pengamatan ini bertujuan untuk memverifikasi kemampuan hambatan produk hasil degradasi terhadap fungi dibandingkan analisis antifungi dengan metode *96 well plate* yang dimodifikasi dengan *carbon tape* (Deepthi *et al.*, 2016) yang ditunjukkan pada Gambar 3.1. untuk metode preparasi 96-well plate untuk mikroskop apotome dan Gambar 3.2. untuk teknik preparasi SEM.





**Gambar 3.1.** Metode Preparasi 96-*well plate* untuk Mikroskop Apotome

1	 <p>Carbon Tape Steril</p> <p>96 wells plate</p> <p>Carbon tape ± 3 cm dipotong dan dimasukkan ke dalam 96 wells plate</p>
2	 <p>100 µL senyawa COS 18D36A1</p> <p>100 µL <i>M. Globosa</i> (10<sup>6</sup> spora/mL)</p> <p>96 wells plate modifikasi</p> <p>96 wells plate yang sudah dimodifikasi dengan carbon tape diberi campuran 100 µL senyawa COS 18D36A1 dan 100 µL <i>M. Globosa</i> (10<sup>6</sup> spora/mL)</p>
3	 <p>Aluminium Foil</p> <p><b>Inkubasi</b></p> <p><i>Wells plate</i> ditutup dengan aluminium foil dan diinkubasi selama 48 jam pada suhu ruang</p>
4	 <p>Aluminium Foil</p> <p><b>Inkubasi</b></p> <p><b>Rinces</b></p> <p>PBS</p>

	Sampel yang sudah melekat pada carbon tape dibilas dengan PBS tiga kali untuk menghilangkan bakteri yang tidak melekat
5	<p style="text-align: center;"><b>Fiksasi</b></p>  <p>Sampel yang melekat difiksasi dengan formalin (10%) pada carbon tape selama 24 jam pada suhu ruang dan dicuci 3 kali dengan PBS</p>
6	<p style="text-align: center;"><b>Dehidrasi</b></p>  <p>Sampel yang melekat didehidrasi dalam alkohol pada konsentrasi bertingkat (30%, 50%, 70%, 90% dan 96%)</p>
7	 <p style="text-align: center;">Pemindahan sampel</p> <p style="text-align: right;">Stup</p>
8	<p style="text-align: right;"><b>Pelapisan Emas</b></p>  <p>Sampel dipindahkan pada stup yang telah direkati dengan <i>carbon tape</i> steril.</p>



	Sampel yang sudah dipasang pada aluminium stup dengan <i>carbon tape</i> dimasukkan ke dalam sputter dan dilapisi dengan emas sebelum pengamatan SEM
--	--

**Gambar 3.2.** Teknik Preparasi SEM

Analisis mikroskopi secara Apotome dan SEM, digunakan 96 *well plate* yang mana sumurannya dimasukkan larutan campuran 100  $\mu\text{L}$  produk hasil degradasi dan 100  $\mu\text{L}$  fungi *M. Globosa* ( $10^6$  spora/mL). Sebagai kontrol dibuat pada sumuran lain fungi *M. Globosa* tanpa tambahan hasil produk degradasi dan kemudian diinkubasi selama 48 jam pada suhu ruang. Pengamatan populasi fungi terhadap germinasi spora yang terjadi untuk Mikroskop Apotome adalah dengan memindahkan 20  $\mu\text{L}$  larutan tersebut keatas kaca preparate, kemudian sampel diamati pada perbesaran 100 $\times$ , 200 $\times$ , dan 400 $\times$ .

Analisis dan visualisasi morfologi permukaan hifa fungi dilakukan dengan menggunakan SEM. Tujuan analisis ini adalah untuk mengetahui hambatan antara produk hasil degradasi dengan fungi. Prosedur pengamatan adalah pertama *carbon tape* diletakkan pada sumuran yang sudah dimasukkan larutan campuran 100  $\mu\text{L}$  produk hasil degradasi dan 100  $\mu\text{L}$  fungi *M. Globosa* ( $10^6$  spora/mL) dan diinkubasi selama 48 jam pada suhu ruang. Kemudian *carbon tape* yang sudah diinkubasi diangkat dengan hati-hati. Sampel difiksasi dengan formalin 10% (v/v) selama 24 jam pada suhu ruang, kemudian didehidrasi dalam etanol berturut-turut dengan konsentrasi 30%, 50%, 70%, 90% selama 10 menit dan 96% selama 1 jam. Sampel dikeringkan di udara, dipasang pada aluminium stub menggunakan *carbon tape*, kemudian dimasukkan ke dalam *chamber sputter* Quorum untuk *dicoating* menggunakan *gold* dan divisualisasikan menggunakan SEM pada perbesaran 5.000 $\times$ , 10.000 $\times$ , dan 15.000 $\times$ .

## V. KESIMPULAN DAN SARAN

### 5.1. Kesimpulan

Telah dilakukan analisis morfologi, filogenetik dan karakterisasi terhadap 3 (tiga) isolat unggul actinomycetes 18D36A1, 18D36A2, dan 19C38A1 yang secara berurutan merupakan *Pseudonocardia antitumoralis*, *Micrococcus* sp., dan *Kocuria palustris*.

Berdasarkan analisis zona bening didapatkan 2 (dua) isolat unggul yaitu 18D36A1 dan 18D36A2 dari perairan Buleleng Bali dan 1 (satu) isolat unggul yaitu 19C38A1 dari perairan Oluhuta Gorontalo. Ketiga isolate tersebut memiliki kemampuan kitinolitik

Hasil analisis morfologi kulit udang, tulang sotong dan sisik ikan secara SEM, memperlihatkan kulit udang merupakan hasil terbaik sebagai media dibandingkan tulang sotong dan sisik ikan.

Isolat 18D36A1 mampu mendegradasi kulit udang menghasilkan COS sebagai senyawa antifungi yang menghambat pertumbuhan *M. Globosa*. Sedangkan isolat 19C38A1 mampu menghambat pertumbuhan *F. Oxysporum*. Selanjutnya isolat 18D36A2 merupakan isolat *novel rare actinomycetes*.

### 5.2.Saran

Secara umum berdasarkan kesimpulan di atas, ketiga isolat 18D36A1, 18D36A2, dan 19C38A1 dapat dijadikan sumber senyawa bioaktif, baik hasil metabolit maupun hasil degradasi. Namun untuk memanfaatkan secara maksimal perlu kajian lanjut terkait identifikasi jenis enzim dan produk degradasi secara rinci yang dihasilkan dari kulit udang, terutama dengan pemanfaatan teknologi *solid state fermentation* (SSF). Selain dua sumber yang telah diteliti, perlu juga diteliti sumber dari perairan lain di Indonesia, mengingat Indonesia merupakan negara maritim.

## DAFTAR PUSTAKA

- Adeyeye, E., and Aremu, M. O. 2016. Chemical composition of whole shrimp, flesh and shell of *Pandalus borealis* from Lagos Atlantic Ocean. *FUW Trends in Science & Technology Journal*, **1**(1), 26-32.
- Ali, A. 2016. Keragaman Actinobacteria di Sulawesi Selatan dan Aplikasinya dalam Bioteknologi Tanaman. *Global-RCI*. Makassar. Indonesia.
- Ali, R., El-Boubbou, K., and Boudjelal, M. 2021. An easy, fast and inexpensive method of preparing a biological specimen for scanning electron microscopy (SEM). *MethodsX*, **8**, 101521.
- Ballav, S., Kerkar, S., Thomas, S., and Augustine, N. 2015. Halophilic and halotolerant actinomycetes from a marine saltern of Goa, India producing anti-bacterial metabolites. *Journal of bioscience and bioengineering*, **119**(3), 323-330.
- Binod, P., Sandhya, C., Suma, P., Szakacs, G., and Pandey, A. 2007. Fungal biosynthesis of endochitinase and chitobiase in solid state fermentation and their application for the production of N-acetyl-D-glucosamine from colloidal chitin. *Bioresource technology*, **98**(14), 2742-2748.
- BPS [Badan Pusat Statistik]. 2020. Badan pusat statistik provinsi lampung 2020. *Badan Pusat Statistik*. Lampung
- Brisset, F. 2012. Scanning electronic microscopy and microanalysis. *EDP sciences*.
- Cai, J., Yang, J. H., Du, Y.M., Fan, L. H., Qiu, Y.L., Li, J., Kennedy, J. F. 2006. Purification and characterization of chitin deacetylase from *Scopulariopsis brevicaulis*. *Carbohydr Polym*, 1–7.
- Castillo, U., Myers, S., Bwone, L., Strobel, G., Hess, W. M., Hanks, J., Reay, D. 2006. Scanning electron microscopy of some endophytic streptomycetes in Snakevine-Kennedia niggricans. *Scannings*, **27**:305–311.
- Chang, K. S., Won, J. I., Lee, M. R., Lee, C. E., Kim, K. H., Park, K. Y., and Hwang, S. 2003. The putative transcriptional activator MSN1 promotes chromium accumulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cells*, **16**(3):291-6

- Chang, W. T., Chen, Y. C., and Jao, C. L. 2007. Antifungal activity and enhancement of plant growth by *Bacillus cereus* grown on shellfish chitin wastes. *Bioresource technology*, **98**(6), 1224-1230.
- Chernin, L., Ismailov, Z., Haran, S., Chet, I. 1995. Chitinolytic *Enterobacter agglomerans* antagonistic to fungal plant pathogens. *Appl Environ Microbiol*, **61**:1720–1726
- Deepthi, B. V., Poornachandra, R., K., Chennapa, G., Naik, M. K., Chandrashekara, K. T., and Sreenivasa, M. Y. 2016. Antifungal attributes of *Lactobacillus plantarum* MYS6 against fumonisin producing *Fusarium proliferatum* associated with poultry feeds. *PLoS One*, **11**(6), e0155122.
- DeHaan, K., Ballard, Z. S., Rivenson, Y., Wu, Y., and Ozcan, A. 2019. Resolution enhancement in scanning electron microscopy using deep learning. *Scientific reports*, **9**(1), 1-7.
- De Oliveira, A. M., Mesquita, M. D. S., da Silva, G. C., de Oliveira Lima, E., de Medeiros, P. L., Paiva, P. M. G., ... & Napoleão, T. H. 2015. Evaluation of toxicity and antimicrobial activity of an ethanolic extract from leaves of *Morus alba* L.(Moraceae). *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 513978.
- Egerton, R. F. 2005. Physical principles of electron microscopy springer. *New York*.
- FAO. 2020. Globefish highlights January 2020 issue, with jan.-sep. 2019 statistics a quarterly update on world seafood markets. *Globefish Highlights*, 1–2020.
- FAO. 2021. Globefish highlights a quarterly update on world seafood markets: 2nd issue 2021, with annual 2020 statistics. *Globefish Highlights*, 2-2021.
- Gajera, H., Domadiya, R., Patel, S., Kapopara, M., and Golakiya, B. 2013. Molecular mechanism of trichoderma as bio-control agents against phytopathogen system—a review. *Curr. Res. Microbiol. Biotechnol*, **1**(4), 133-142.
- Girão, A. V., Caputo, G., and Ferro, M. C. 2017. Application of scanning electron microscopy–energy dispersive x-ray spectroscopy. In *Comprehensive analytical chemistry*. Elsevier, **75**, 153-168.
- Gomes, R. C., Semedo, L. T. A. S., Soares, R. M. A., Alviano, C. S., And, L. L., and Coelho, R. R. R. 2000. Chitinolytic activity of actinomycetes from a cerrado soil and their potential in biocontrol. *Letters in Applied Microbiology*, **30**(2), 146-150.

- Grover, A., Sinha, R., Jyoti, D., and Faggio, C. 2022. Imperative role of electron microscopy in toxicity assessment: A review. *Microscopy Research and Technique*, **85**(5), 1976-1989.
- Hosny, M. S., El-Shayeb, N. A., Abood, A., and Abdel-Fattah, A. M. 2010. A potent chitinolytic activity of marine Actinomycete sp. and enzymatic production of chitooligosaccharides. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, **4**(4), 615-623.
- Iqbal, R. K., and Anwar, F. N. 2019. Chitinases potential as bio-control. *Biomedical Journal of Scientific and Technical Research*, **14**(5), 10994-11001.
- Jamialahmadi, K., Soltani, F., Nabavi F. M., Behravan, J., and Mosaffa, F. 2014. Assessment of protective effects of glucosamine and N-acetyl glucosamine against DNA damage induced by hydrogen peroxide in human lymphocytes. *Drug and Chemical Toxicology*, **37**(4), 427-432.
- Jesse, S., and Kalinin, S. V. 2011. Band excitation in scanning probe microscopy: sines of change. *Journal of Physics D: Applied Physics*, **44**(46), 464006.
- Jha, S., Modi, H. A., and Jha, C. K. 2016. Characterization of extracellular chitinase produced from *Streptomyces rubiginosus* isolated from rhizosphere of *Gossypium* sp. *Cogent Food and Agriculture*, **2**(1), 1198225.
- Kamboj, P., Gangwar, M., and Singh, N. 2017. Scanning electron microscopy of endophytic actinomycete isolate against *Fusarium oxysporum* for various growth parameters on musk melon. *Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci*, **6**, 458-464.
- Kammoun, R., Zmantar, T., and Ghouli, S. 2020. Scanning electron microscopy approach to observe bacterial adhesion to dental surfaces. *MethodsX*, **7**, 101107.
- Kotsyumbas, I. Y., Kushnir, I. M., Bilyy, R. O., Yarynovska, I. H., Vasyl' B, G., and Bilyi, A. I. 2007. Light scattering application for bacterial cell monitoring during cultivation process. *In European Conference on Biomedical Optics* (p. 6631\_57). Optical Society of America.
- Krishnamurthi, V. R., Niyonshuti, I. I., Chen, J., and Wang, Y. 2021. A new analysis method for evaluating bacterial growth with microplate readers. *PLoS One*, **16**(1), e0245205.
- Kumar, A., Kumar, D., George, N., Sharma, P., and Gupta, N. 2018. A process for complete biodegradation of shrimp waste by a novel marine isolate *Paenibacillus* sp. AD with simultaneous production of chitinase and chitin oligosaccharides. *International journal of biological macromolecules*, **109**, 263-272.

- Kumar, M., Brar, A., Yadav, M., Chawade, A., Vivekanand, V., and Pareek, N. 2018. Chitinases—potential candidates for enhanced plant resistance towards fungal pathogens. *Agriculture*, **8**(7), 88.
- Kumar, V., Bharti, A., Gusain, O., and Bisht, G. S. 2011. Scanning electron microscopy of *Streptomyces* without use of any chemical fixatives. *Scanning*, **33**(6), 446-449.
- Latorre, E., Aragonés, M. D., Fernández, I., and Catalán, R. E. 1999. Platelet-activating factor modulates brain sphingomyelin metabolism. *European journal of biochemistry*, **262**(2), 308-314.
- Li, X., Wang, J., Chen, X., Tian, J., Li, L., Zhao, M., and Zhou, C. 2011. Effect of chitooligosaccharides on cyclin D1, bcl-xl and bcl-2 mRNA expression in A549 cells using quantitative PCR. *Chinese Science Bulletin*, **56**, 1629-1632.
- Li, K., Xing, R., Liu, S., Qin, Y., and Li, P. 2017. Access to N-acetylated chitohexaose with well-defined degrees of acetylation. *BioMed Research International*, 2017.
- Liaqat, Fakhra, and Rengin Eltem. 2018. Chitooligosaccharides and their biological activities: A comprehensive review. *Carbohydrate polymers*, **184**, 243-259.
- Lu, Y., Wang, N., He, J., Li, Y., Gao, X., Huang, L., and Yan, X. 2018. Expression and characterization of a novel chitinase with antifungal activity from a rare actinomycete, *Saccharothrix yanglingensis* Hhs. 015. *Expression and Purification*, **143**, 45-51.
- Maia, M. R., Marques, S., Cabrita, A. R., Wallace, R. J., Thompson, G., Fonseca, A. J., and Oliveira, H. M. 2016. Simple and versatile turbidimetric monitoring of bacterial growth in liquid cultures using a customized 3D printed culture tube holder and a miniaturized spectrophotometer: application to facultative and strictly anaerobic bacteria. *Frontiers in microbiology*, **7**, 1381.
- Marín, L., Gutiérrez-del-Río, I., Yagüe, P., Manteca, Á., Villar, C. J., & Lombó, F. 2017. De novo biosynthesis of apigenin, luteolin, and eriodictyol in the actinomycete *Streptomyces albus* and production improvement by feeding and spore conditioning. *Frontiers in microbiology*, **8**, 921.
- Morganti, P., Morganti, G., and Morganti, A. 2011. Transforming nanostructured chitin from crustacean waste into beneficial health products: a must for our society. *Nanotechnology, Science and Applications*, **4**, 123.
- Palomo, S., González, I., De la Cruz, M., Martín, J., Tormo, J. R., Anderson, M., and Genilloud, O. 2013. Sponge-derived *Kocuria* and *Micrococcus*

- spp. as sources of the new thiazolyl peptide antibiotic kocurin. *Marine drugs*, **11**(4), 1071-1086.
- Panda, S. K., Kumar, S., Tupperwar, N. C., Vaidya, T., George, A., Rath, S., and Ravindran, B. 2012. Chitohexaose activates macrophages by alternate pathway through TLR4 and blocks endotoxemia. *PLoS pathogens*, **8**(5), e1002717.
- Pesciaroli, L., Petruccioli, M., Fedi, S., Firrincieli, A., Federici, F., and D'Annibale, A. 2013. Characterization of *Pleurotus ostreatus* biofilms by using the Calgary biofilm device. *Applied and environmental microbiology*, **79**(19), 6083-6092.
- Prakash, D., and Nawani, N. N. 2014. A rapid and improved technique for scanning electron microscopy of actinomycetes. *Journal of microbiological methods*, **99**, 54-57.
- Olicón-Hernández, D. R., Hernández-Lauzardo, A. N., Pardo, J. P., Peña, A., Velázquez-del Valle, M. G., and Guerra-Sánchez, G. 2015. Influence of chitosan and its derivatives on cell development and physiology of *Ustilago maydis*. *International journal of biological macromolecules*, **79**, 654-660.
- Ramijan, K., Ultee, E., Willemse, J., Zhang, Z., Wondergem, J. A., van der Meij, A., and Claessen, D. 2018. Stress-induced formation of cell wall-deficient cells in filamentous actinomycetes. *Nature communications*, **9**(1), 1-13.
- Rostinawati, T. 2008. Skrining dan identifikasi bakteri penghasil enzim kitinase dari air laut di perairan Pantai Pondok Bali. *Penelitian Mandiri*, 22-25.
- Sari, F. A. 2019. Isolasi Dan Karakterisasi Actinomycetes Dari Beberapa Sentra Perkebunan Bawang Antagonis *Fusarium Oxysporum* F. Sp. Cepae Dan Uji Kemampuan Perkecambahan Tanaman Bawang Merah (*Allium Ascalonicum* L.) Varietas Tuktuk Super (*Doctoral dissertation, Universitas Negeri Makassar*).
- Silva, N. S. D., Araújo, N. K., Daniele-Silva, A., Oliveira, J. W. D. F., Medeiros, J. M. D., Araújo, R. M., and Fernandes-Pedrosa, M. D. F. 2021. Antimicrobial activity of chitosan oligosaccharides with special attention to antiparasitic potential. *Marine drugs*, **19**(2), 110.
- Setiawan, A., Setiawan, F., Juliasih, N. L. G. R., Widyastuti, W., Laila, A., Setiawan, W. A., and Arai, M. 2022. Fungicide Activity of Culture Extract from *Kocuria palustris* 19C38A1 against *Fusarium oxysporum*. *Journal of fungi*, **8**(3), 280.

- Setiawan, A., Widyastuti, W., Irawan, A., Wijaya, O. S., Laila, A., Setiawan, W. A., and Hendri, J. 2021. Solid state fermentation of shrimp shell waste using *Pseudonocardia carboxydvorans* 18A13O1 to produce bioactive metabolites. *Fermentation*, **7**(4), 247.
- Shamikh, Y. I., El Shamy, A. A., Gaber, Y., Abdelmohsen, U. R., Madkour, H. A., Horn, H., and Hozzein, W. N. 2020. Actinomycetes from the Red Sea sponge *Coscinoderma mathewsi*: isolation, diversity, and potential for bioactive compounds discovery. *Microorganisms*, **8**(5), 783.
- Soeka, Y. S., dan Triana, E. 2016. Pemanfaatan limbah kulit udang untuk menghasilkan enzim kitinase dari *Streptomyces macrosporeus* InaCC A454. *Jurnal Kimia Terapan Indonesia*, **18**(01), 91-101.
- Sturm, H., Schartel, B., Weiß, A., and Braun, U. 2012. SEM/EDX: Advanced investigation of structured fire residues and residue formation. *Polymer testing*, **31**(5), 606-619.
- Subramaniam, R., and Vimala, R. 2012. Solid state and submerged fermentation for the production of bioactive substances: a comparative study. *Int J Sci Nat*, **3**(3), 480-486.
- Sun, W., Zhang, F., He, L., Karthik, L., and Li, Z. 2015. Actinomycetes from the South China Sea sponges: isolation, diversity, and potential for aromatic polyketides discovery. *Frontiers in microbiology*, **6**, 1048.
- Suresh, P. V., Sachindra, N. M., and Bhaskar, N. 2011. Solid state fermentation production of chitin deacetylase by *colletotrichum lindemuthianum* ATCC 56676 using different substrates. *Journal of Food Science and Technology*, **48**(3), 349–356.
- Tran, T. N., Doan, C. T., Nguyen, M. T., Nguyen, V. B., Vo, T. P. K., Nguyen, A. D., and Wang, S. L. 2019. An exochitinase with N-acetyl- $\beta$ -glucosaminidase-like activity from shrimp head conversion by *Streptomyces speibonae* and its application in hydrolyzing  $\beta$ -chitin powder to produce N-acetyl-D-glucosamine. *Polymers*, **11**(10), 1600.
- Tsigos I & Bouriotis V (1995) Purification and characterization of chitin deacetylase from *Colletotrichum lindemuthianum*. *J Biol Chem* 270: 26286–26291
- Tokuyasu, K., Ohnishi-Kameyama, M., and Hayashi, K. 1996. Purification and characterization of extracellular chitin deacetylase from *colletotrichum lindemuthianum*. *Biosci Biotechnol Bioch*, **60**, 1598–1603.
- Viniegra-González, G., Favela-Torres, E., Aguilar, C. N., de Jesus Romero-Gomez, S., Diaz-Godinez, G., and Augur, C. 2003. Advantages of fungal enzyme production in solid state over liquid fermentation systems. *Biochemical Engineering Journal*, **13**(2-3), 157-167.



- Vo, T. S., Ngo, D. H., Kang, K. H., Jung, W. K., and Kim, S. K. 2015. The beneficial properties of marine polysaccharides in alleviation of allergic responses. *Molecular nutrition and food research*, **59**(1), 129-138.
- Wang, S. L., Shih, I. L., Liang, T. W., and Wang, C. H. 2002. Purification and characterization of two antifungal chitinases extracellularly produced by *Bacillus amyloliquefaciens* V656 in a shrimp and crab shell powder medium. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **50**(8), 2241-2248.
- Widyastuti, W., Setiawan, A., and Hendri, J. 2021. Application SEM-EDX in Biodegradation of Seafood Wastes by Sponge-Derived Actinomycetes 19C38A1 in Solid Fermentation. IOP Publishing, 940(1), 012048.
- Widyastuti, W., Setiawan, F., Al-Afandy, C., Irawan, A., Laila, A., Juliasih, N. L. G. R., and Setiawan, A. 2022. Antifungal Agent Chitooligosaccharides Derived from Solid-State Fermentation of Shrimp Shell Waste by *Pseudonocardia antitumoralis* 18D36-A1. *Fermentation*, **8**(8), 353.
- Wightman, R. 2022. An overview of cryo-scanning electron microscopy techniques for plant imaging. *Plants*, **11**(9), 1113.
- Willoughby, L. G. 1968. Aquatic actinomycetales with particular reference to the Actinoplanaceae. *Veröffentlichungen des Instituts für Meeresforschung in Bremerhoben*, **3**, W-26.
- You, J. L., Cao, L. X., Liu, G. F., Zhou, S. N., Tan, H. M., and Lin, Y. C. 2005. Isolation and characterization of actinomycetes antagonistic to pathogenic *Vibrio* spp. from nearshore marine sediments. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, **21**(5), 679-682.
- Zainolabidin, N. A., Kormin, F., Anuar, N. A. F., and Bakar, A. M. F. 2020. The potential of insects as alternative sources of chitin: An overview on the chemical method of extraction from various sources. *International journal of molecular sciences*, **21**(14), 4978.