

**PEMURNIAN ENZIM KITINASE SERTA UJI ANTIMIKROBA DARI
FUNGI LAUT 18A12RF**

(Skripsi)

Oleh

Jordy Setiawan

NPM. 2017011018



**JURUSAN KIMIA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS LAMPUNG
BANDAR LAMPUNG
2024**

ABSTRAK

PEMURNIAN ENZIM KITINASE SERTA UJI ANTIMIKROBA DARI FUNGI LAUT 18A12RF

Oleh

Jordy Setiawan

Enzim kitinase merupakan enzim yang spesifik untuk mendegradasi kitin menjadi turunannya seperti *chitooligosaccharide* (COS) dan *monooligosaccharide* (MOS). Pada penelitian telah dilakukan peremajaan dan identifikasi isolat fungi 18A12RF. Penampakan secara visual, fungi memiliki warna putih dengan bentuk seperti kapas. Sedangkan secara mikroskopi isolat 18A12RF terindikasi sebagai *Aspergillus sp.* Untuk memperoleh enzim kitinase, fungi 18A12RF dikultivasi secara SSF pada media limbah kulit udang selama 4 hari.

Optimasi produksi enzim kitinase dilakukan variasi pH 5, 7, dan 9. Selanjutnya, hasil kultivasi diekstraksi dengan akuades dan dianalisis kadar glukosamin menggunakan DNS dan kadar protein menggunakan Lowry. Hasil analisis menunjukkan bahwa hasil kultivasi pada pH 9 memiliki kadar tertinggi glukosamin (147,38 ppm). Selanjutnya proses *scale up* dilakukan menggunakan 100 g kulit udang dalam 1000 mL Erlenmeyer. Hasil Kultivasi mengalami peningkatan aktivitas sebanyak 6 kali (0,5 U/mL).

Uji antimikroba enzim kitinase fungi 18A12RF menunjukkan aktivitas antijamur terhadap *Malassezia globosa*, sedangkan tidak memiliki aktivitas terhadap bakteri MDR *staphylococcus aureus* dan MDR *Pseudomonas aeruginosa*. Enzim kitinase yang didapatkan mampu mendegradasi substrat menjadi COS dan MOS dalam waktu inkubasi 2 jam, didapatkan nilai Rf yang mendekati standard yaitu 0,4; 0,3; dan 0,4. Hasil degradasi COS juga biasa didapatkan oleh enzim kitinase, sehingga memudahkan dalam produksi COS sebagai antibakteri. Oleh karena itu, informasi awal ini penting untuk kajian lebih lanjut terkait pemanfaatan enzim kitinase dari isolat fungi perairan Indonesia.

Kata kunci : antimikroba, enzim kitinase, isolat fungi laut 18A12RF, *solid state fermentation*, glukosamin.

ABSTRACT

PURIFICATION CHITINASE ENZYME AND ANTIMICROBIAL ASSAY FROM MARINE FUNGAL ISOLATE 18A12RF

By

Jordy Setiawan

Chitinase enzyme is a specific enzyme for degrading chitin into its derivatives such as chitooligosaccharide (COS) and monooligosaccharide (MOS). In this research, maintenance and identification of fungal isolate 18A12RF were carried out. Visually, the fungus has a white color with a cotton-like shape. Meanwhile, microscopically, isolate 18A12RF was indicated as *Aspergillus* sp. To obtain the chitinase enzyme, the 18A12RF fungus was cultivated using SSF in shrimp shell waste media for 4 days.

Optimization of chitinase enzyme production was carried out by varying pH 5, 7, and 9. Then, the cultivation results were extracted with aquadest and analyzed for glucosamine content using DNS and protein content using Lowry. The analysis results showed that the results of cultivation at pH 9 had the highest levels of glucosamine (147.38 ppm). Furthermore, the scale up process was carried out using 100 g of shrimp shells in 1000 mL Erlenmeyer. Cultivation results increased activity by 6 times (0.5 U/mL).

Antimicrobial assay of the fungal chitinase enzyme 18A12RF showed antifungal activity against *Malassezia globosa*, while it had no activity against MDR *Staphylococcus aureus* and MDR *Pseudomonas aeruginosa* bacteria. The chitinase enzyme obtained was able to degrade the substrate into COS and MOS within an incubation time of 2 hours. The Rf value was obtained which was close to the standard, namely 0.4; 0.3; and 0.4. COS degradation results are also usually obtained by the chitinase enzyme, making it easier to produce COS as an antibacterial. Therefore, this initial information is important for further studies regarding the utilization of chitinase enzymes from Indonesian waters

Keyword : antimicrobial, chitinase enzyme, marine fungal 18A12RF, solid state fermentation, glucosamine.

**PEMURNIAN ENZIM KITINASE SERTA UJI ANTIMIKROBA
DARI FUNGI LAUT 18A12RF**

Oleh

JORDY SETIAWAN

Skripsi

**Sebagai Salah Satu Syarat untuk Mencapai Gelar
Sarjana Kimia**

Pada

**Jurusan Kimia
Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lampung**



**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS LAMPUNG
BANDAR LAMPUNG
2024**

Judul Penelitian : **Pemurnian Enzim Kitinase Serta Uji Antimikroba dari Fungi Laut 18A12RF**

Nama Mahasiswa : **Jordy Setiawan**

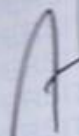
Nomor Pokok Mahasiswa : **2017011018**


Jurusan : **Kimia**

Fakultas : **Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam**


MENYETUJUI

1. Komisi Pembimbing


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


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

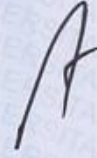
2. Ketua Jurusan Kimia FMIPA


Dr. Mita Rilyanti, S.Si., M.Si.
NIP. 197205302000032001

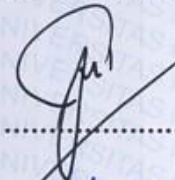
MENGESAHKAN

1. Tim Penguji

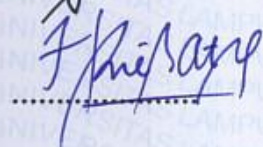
Ketua : **Dra. Aspita Laila, M.S.**



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



Anggota : **Dr. Eng. Heri Satria, S.Si., M.Si.**



2. Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam



Dr. Eng. Heri Satria, S.Si., M.Si.

NIP. 197110012005011002

Tanggal Lulus Ujian Skripsi: **7 Agustus 2024**

SURAT PERNYATAAN KEASLIAN SKRIPSI

Yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama : Jordy Setiawan
NPM : 2017011018
Jurusan : Kimia
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Perguruan Tinggi : Universitas Lampung

Dengan ini menyatakan bahwa skripsi yang berjudul **“Pemurnian Enzim Kitinase Serta Uji Antimikroba dari Fungi Laut 18A12RF”** ini tidak terdapat karya yang ditulis atau diterbitkan oleh orang lain, kecuali yang secara tertulis diacu pada naskah yang disebutkan dalam daftar pustaka. Selanjutnya saya juga tidak keberatan jika sebagian atau seluruh data di dalam skripsi tersebut digunakan oleh dosen atau program studi untuk kepentingan sebelum dilakukan publikasi.

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

Bandar Lampung, 20 Agustus 2024

Yang menyatakan,



Jordy Setiawan

NPM. 20170110701

RIWAYAT HIDUP



Penulis bernama lengkap Jordy Setiawan di lahirkan di Teladas pada tanggal 29 Januari 2002. Anak kedua dari empat bersaudara, putra dari pasangan Bapak Johan Syah dan Ibu Resna Wati. Alamat penulis saat ini *Main Route* Km 39 Kampung Gunung Tapa Udik, Kecamatan Gedung Meneng, Kabupaten Tulang Bawang.

Penulis mengawali jenjang pendidikan dari TK Abadi Perkasa (2007-2008), Sekolah Dasar di SDS Abadi Perkasa (2008-2014), Sekolah Menengah Pertama di SMPS Abadi Perkasa (2014-2017) Perum ILP43 Tulang Bawang, dan pendidikan Sekolah Menengah Atas di *Sugar Group High School* (SMAS Sugar Group) Bandar Mataram, Lampung Tengah diselesaikan pada tahun 2020. Pada tahun 2020, penulis diterima sebagai mahasiswa Jurusan Kimia FMIPA Universitas Lampung melalui jalur Seleksi Nasional Masuk Perguruan Tinggi Negeri (SNMPTN) yang diselesaikan pada tahun 2024.

Selama menjadi mahasiswa, penulis pernah bergabung dalam bidang organisasi kemahasiswaan, sebagai Kader Muda Himpunan Mahasiswa Kimia (KAMI) periode 2020. Penulis Melaksanakan Kuliah Kerja Nyata (KKN) pada Bulan Januari-Februari 2023 di Karang Anyar Kec. Wonosobo Kab. Tanggamus. Penulis menyelesaikan Praktik Kerja Lapangan (PKL) pada tahun 2023 di UPT LTSIT Universitas Lampung dengan judul. Pada tahun 2023 penulis menjadi asisten Praktikum Kimia Dasar untuk mahasiswa S1 Jurusan Fisika FMIPA Universitas Lampung.

MOTTO

Gone Angels-Mili

Look one by one
The pages remind me you'll always be villain
For you, angels have fallen
Now they're gone
See? Now they're gone, forever gone
From the hell that served as my one and only home
Though it may hurt today
Tomorrow, I'll be heading my way
I tried, I tried
What did we expect?
My dearest friend
Tell me when we shall make it end
So let me take your hand
Like one of those mad men
Tip tappity tappity tap
Dance our last dance, sing
Spinning vinyl opera (*lascia ch'io pianga*)
Longing for this moment (*mia cruda sorte*)
Brewing all this hatred (*e che sospiri*)
So I have a reason (*la liberte*)
Reason to see you dead
Don't you worry
I saved a spot for you in the recycle bin
Your neighbouring addresses point to the books you burned
Stop now one by one
Your desires convince me you've always been a human
For you, the shelves have fallen
Now they're gone
See? Now they're gone, forever gone
From the stage that allowed us our one and only dreams
What's more to say?
Pain always catches up to those who chooses to stay
Though it may hurt today
Tomorrow, I'll be heading my way

SANWACANA

Alhamdulillahirobbil'alamin, puji syukur kehadiran Allah SWT atas segala rahmat dan hidayah-Nya yang tiada pernah terputus dan selalu sebagai sumber kekuatan bagi penulis, sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi dengan judul “**Pemurnian Enzim Kitinase Serta Uji Antimikroba dari Fungi Laut 18A12RF**” sebagai syarat untuk mendapat gelar Sarjana Sains (S.Si) pada Program Studi Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Lampung.

Penulis menyadari bahwa terselesaikannya skripsi ini tidak terlepas dari bantuan berbagai pihak. Oleh karena itu, dengan teriring doa penulis mengucapkan terima kasih kepada :

1. Bapak Johansyah dan Ibu Resnawati selaku kedua orang tua atas segala doa, kasih sayang, dukungan moral dan finansial, nasihat serta motivasi yang selalu diberikan, sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini dengan baik. Semoga Allah SWT membalas atas segala yang telah diberikan dengan Jannah-Nya, Aamiin.
2. Titah Anggun Mayzela yang telah membantu fungsi finansial, fiskal, serta mental hingga dapat menyelesaikan tugas akhir ini. Dika Tayo Setiawan sudah memberikan semangat, dan Fannisyia Clarista.
3. Dyasmin Dwi Larasati yang telah membantu serta memberikan semangat dalam pengerjaan tugas akhir ini.
4. Kak Fendi Setiawan yang telah membimbing dan mendengarkan keluhan serta Rahmatullah dan M Erpan Hanafi karena kerjasamanya penulis dapat menyelesaikan skripsi.

5. Ibu Dra. Aspita Lailla, M.S selaku pembimbing I atas segala ilmu, kesabaran, motivasi, bimbingan, serta saran terbaiknya sehingga penelitian dan skripsi ini dapat terselesaikan. Semoga Allah SWT catat sebagai amal jariyah dan selalu melimpahkan keberkahan, kenikmatan, serta kemudahan atas segala urusan ibu.
6. Prof. John Hendri., M.S., Ph.D selaku pembimbing II atas semua waktu, ilmu, bimbingan serta motivasi yang selalu diberikan dengan kesabaran dan keikhlasan kepada penulis selama penelitian. Semoga Allah SWT catat sebagai amal jariyah dan melimpahkan segala nikmat dan karunia-Nya dalam kehidupan bapak.
7. Dr. Eng. Heri Satria. S.Si., M.Si selaku pembahas serta Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lampung atas segala bimbingan, motivasi, kritik serta saran terbaik kepada penulis sehingga skripsi ini terselesaikan dengan baik. Semoga Allah SWT selalu melimpahkan keberkahan dan karunia-Nya dalam kehidupan bapak.
8. Dr. Rinawati, Ph.D, S.Si, M.Si selaku pembimbing akademik yang membimbing dala penyelesaian studi
9. Dr. Mita Rilyanti, S.Si., M.Si selaku Ketua Program Studi Kimia, yang telah memberikan informasi dan bimbingan kepada penulis.
10. Seluruh dosen jurusan kimia yang telah memberikan ilmu, bimbingan, serta nasihat yang berguna kepada penulis dalam menyelesaikan studi di FMIPA Jurusan Kimia Unila.
11. Kak Larasati, Alda, dan Ester JHR yang selalu bersama dalam menyelesaikan masalah dan membantu dalam penyelesaian tugas akhir ini.
12. Kak Ibnu Fadilah yang selalu membantu dan membimbing dari SMA *Sugar Group* hingga penyelesaian tugas akhir ini ”Target kita lima ratus ribu ton yes”.
13. SBR 2020 Yasmin, Carlos, Laura, dan lainnya yang saling membantu dalam bekerja di UPT LTSIT.

14. Anggota grup jual beli biawak “Anak Qmax” Arif Ramadhani, Fahrezi, Franky Gomgom, Maulana Bintang, Geo Alfriza Gaghana, M Dwi Fansang, M Dwi Febriyanto, M Irfan Hanafi, M Rifqi Aufa, M Sabil, Rekia Enrik, Sultan Gusti R, Surya Ibrahim Samany, Lord Vito Fadhil, M Rafli Yuwan, Carlos Daniel, M Rafli Akbar, Riyadi, Ahmad Sulaiman, Zidan al, Rahmadtullah, dan Roni Kustiawan yang saling memberikan dukungan hingga dapat menyelesaikan studi pada FMIPA Jurusan Kimia Unila.
15. Unjun M Alexander dan M Ilham Pratama yang selalu membantu penulis dalam menyelesaikan masalah hingga terselesaikan studi pada FMIIPA Jurusan Kimia Unila.
16. Almamater tercinta Unila.

Terima kasih atas segala bantuan dan dukungan seluruh pihak yang tidak dapat disebutkan satu persatu. Semoga Allah SWT membalasnya dengan nikmat dan karunia-Nya dimanapun kalian berada. Penulis menyadari bahwa skripsi ini masih jauh dari kata sempurna, tetapi semoga dapat bermanfaat bagi para pembaca. *Aamiin ya rabbal'alam*

Bandar Lampung, 11 September 2024
Penulis,

Jordy Setiawan

DAFTAR ISI

	Halaman
DAFTAR ISI.....	i
DAFTAR GAMBAR	iv
DAFTAR TABEL.....	v
I. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Tujuan Penelitian	4
1.3 Manfaat Penelitian	4
II.TINJAUAN PUSTAKA.....	5
2.1 Kitin dan Kulit Udang.....	5
2.3 Fungi	6
2.3 Enzim Kitinase	7
2.4 <i>Solid State Fermentation</i> (SSF)	8
2.5 Kromatografi Lapis Tipis (KLT)	9
2.6 Isolasi dan Pemurnian Protein.....	10
2.7 Aktivitas Antimikroba Enzim Kitinase.....	13
2.8 Difusi Agar.....	13
III METODOLOGI PENELITIAN.....	15
3.1 Waktu dan Penelitian	15
3.2 Alat dan Bahan.....	15
3.3 Prosedur Penelitian.....	16

3.3.1 Pembuatan Media.....	16
3.3.1.1 <i>Potato Dextrose Agar</i> (PDA) dan <i>Potato Dextrose Broth</i> (PDB).....	16
3.3.1.2 <i>Muller-Hinton Agar</i> (MHA)	16
3.3.1.3 <i>Tryptic Soy Broth</i> (TSB)	17
3.3.2 Peremajaan Isolat 18A12RF	17
3.3.3 Identifikasi Isolat 18A12RF	17
3.3.4 Kultivasi Isolat 18A12RF Secara <i>Solid State Fermentation</i> (SSF)	18
3.3.5 Karakterisasi Hasil Fermentasi	18
3.3.5.1 Kromatografi Lapis Tipis (KLT)	18
3.3.5.2 Karakterisasi Glukosamin dan Aktivitas Kitinase dengan Spektrofotometri UV-Vis.....	19
3.3.5.3 Karakterisasi Kadar Protein dengan Spektrofotometri UV-Vis.....	20
3.3.6 Isolasi dan Pemurnian Enzim Kitinase	20
3.3.6.1 Presipitasi Protein.....	20
3.3.6.2 Dialisis.....	21
3.3.7 Uji Antimikroba Difusi Agar Menggunakan Enzim Kitinase.....	21
3.3.7.1 Uji Antibakteri	21
3.3.7.2 Uji Antifungi	22
3.3.8 Pengujian Kerja Enzim Kitinase dalam Degradasi Substrat	22
IV. HASIL DAN PEMBAHASAN.....	23
4.1 Morfologi Isolat 18A12RF.....	23
4.2 Kultivasi Isolat 18A12RF	24
4.4. Karakterisasi Hasil Fermentasi	26
4.4.1 Karakterisasi Glukosamin dengan Kromatografi Lapis Tipis (KLT)	27
4.4.2 Karakterisasi Glukosamin dan Aktivitas Kitinase dengan Spektrofotometri UV-Vis	27

4.4.3 Karakterisasi Kadar Protein dengan Spektrofotometri UV-Vis.....	29
4.5 Kultivasi dan Pemurnian Enzim Kitinase	31
4.5.1. Kultivasi	31
4.5.2. Pemurnian enzim.....	32
4.7 Uji Antimikroba Difusi Agar	34
4.7.1 Uji Antibakteri	34
4.7.2 Uji Antifungi	34
4.8 Pengujian Kerja Enzim Kitinase dalam Degradasi Substrat	35
V. SIMPULAN DAN SARAN	38
5.1 Simpulan	38
5.2 Saran.....	38
DAFTAR PUSTAKA	39

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 1 kitin dan D-glukosamin (Stoykov, Pavlov <i>and</i> Krastanov. 2014)	6
Gambar 2 D-glukosamin akan terpotong pada ikatan 1-4 β (Stoykov, Pavlov <i>and</i> Krastanov 2014)	7
Gambar 3 <i>Solid State Fermentation</i> pada kulit udang	8
Gambar 4 KLT titik bawah bagian awal penotolan dan garis atas titik akhir plat silika	9
Gambar 5. Dialisis (Garrett <i>and</i> Grisham 2010).....	11
Gambar 6. Kromatografi kolom (Nelson <i>and</i> Cox 2013)	12
Gambar 7. Metode difusi agar dengan zona inhibisi pada bakteri <i>Staphylococcus</i> ...	14
Gambar 8. Isolat 18A12RF; (a) pengamatan makroskopik; (b) pengamatan mikroskopik 100x perbesaran.	24
Gambar 9. Inokulum pada hari 4.....	25
Gambar 10. Fermentasi substrat pH 5 (a); substrat pH 7 (b); substrat pH 9 (c).	26
Gambar 11. Hasil KLT	27
Gambar 12. Perbandingan Aktivitas unit spesifik, Aktivitas unit enzim, dan kadar protein hasil fermentasi pada substrat pH 9.	30
Gambar 13. Kultivasi <i>scale up</i> hari 4 pada 5 Erlenmeyer 2000 mL	31
Gambar 14. Protein yang mengendap pada proses sentrifius	32
Gambar 15. Hasil dialisis enzim	33
Gambar 16. Diagram perbandingan hasil sesudah dan sebelum pemurnian pada substrat pH 9	33
Gambar 17. Bakteri patogen gram positif (a); bakteri patogen gram negatif (b).....	34
Gambar 18, Hasil difusi agar antifungi	35
Gambar 19. Hasil KLT kulit udang (a); kitin (b); koloid kitin 1% (c).....	36
Gambar 20. Kurva standard glukosamin.....	47
Gambar 21. Kurva standard BSA.....	48

DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 1. Data kadar glukosamin variasi pH 5, 7, dan 9.	26
Tabel 2. Tabel aktivitas unit enzim kitinase.....	28
Tabel 3. Kadar protein.....	29
Tabel 4. Nilai Rf degradasi substrat.....	37
Tabel 5. Absorbansi standard glukosamin	46
Tabel 6. Absorbansi standar BSA.....	47
Tabel 7. Nilai konsentrasi glukosamin pada variasi pH.....	48
Tabel 8. Aktivitas unit enzim kitinase.....	49
Tabel 9. Nilai konsentrasi protein pada variasi pH.....	50

I. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Indonesia merupakan negara kepulauan yang memiliki kekayaan laut melimpah, oleh karena itu Indonesia memiliki industri perikanan yang besar (Wasik *and* Handriana 2023). Udang adalah salah satu komoditas perikanan yang ada di Indonesia (Mustafa *et al.*, 2023), namun banyaknya pengolahan udang dapat menimbulkan masalah pencemaran lingkungan. Penumpukan limbah kulit udang dapat menimbulkan pencemaran pada lingkungan terutama pencemaran bau pada area tersebut. Kulit udang mengandung kitin yang termasuk biopolimer dari N-asetil-D-glukosamin yang terikat dengan ikatan β (1-4), yang merupakan polisakarida terbanyak setelah selulosa (Garbe *and* Bruck, 2020).

Enzim kitinase adalah salah satu jenis enzim yang berfungsi untuk menguraikan polimer pada kitin menjadi bentuk monomer N-asetilglukosamin atau kitin oligosakarida. Sumber kitinase tersebar luas yang dapat ditemukan pada bakteri, serangga, virus, tumbuhan, dan hewan, yang semuanya berperan penting dalam proses fisiologi dan ekologi. (Poria *et al.*, 2021). Pendegradasian kitin menjadi bentuk oligomer dan monomer seperti D-glukosamin diperlukan enzim kitinase, enzim kitinase yang dapat mendegradasi kitin bisa diperoleh dari mikroorganisme bakteri dan fungi. Penggunaan metode enzimatik menawarkan keunggulan dalam hal

adaptabilitas dan skalabilitas, ramah lingkungan dan hemat energi. Namun, pendekatan ini sering kali dihadapkan pada tantangan terkait dengan kitin. Salah satu kendala utama adalah rendahnya kelarutan dan aksesibilitas kitin pada cangkang krustasea, di mana kutikula yang utuh berfungsi sebagai penghalang kedap air yang melindungi kitin dari degradasi enzimatik, strategi untuk pemanfaatan cangkang secara berkelanjutan dan konversi biomassa cangkang menjadi produk bernilai tinggi memiliki potensi ekonomi dan lingkungan yang signifikan (Deng *et al.*, 2019).

Pendekatan enzimatik ini tidak hanya lebih ekonomis tetapi juga tidak menghasilkan limbah air atau nitrogen, serta memungkinkan pemulihan semua komponen cangkang udang dalam keadaan alami, termasuk asam amino yang terkandung dalam peptida, gugus N-asetil dari oligomer kitin, dan astaxanthin (Deng *et al.*, 2020).

Studi oleh Rawy, *et al* (2018) memanfaatkan enzim kitinase dapat diperoleh dari mikroorganisme *Thermobifida fusca* yang mampu mendegradasi kitin pada kulit udang dengan enzim kitinase yang berperan dalam hidrolisis kitin. Jankiewicz, *et al* (2020) menyatakan enzim kitinase dapat dihasilkan dari pertumbuhan mikroba. Isolasi penumbuhan dalam media *Potato dextrose agar* (PDA) yang diinkubasi dalam waktu 4 hari dengan temperatur ruangan ($\pm 28^{\circ}\text{C}$) El-Betagi, *et al* (2022) menyatakan enzim kitinase mempunyai sifat negatif dan dapat menghambat penecambahan konidia patogen. Sifat tersebut yang diakibatkan oleh enzim kitinase terhadap mikroba adalah kelainan bentuk selular, kerusakan protoplasmik, distorsi miselium, kebocoran pada dinding sel, dan beberapa yang lainnya. Oleh karena itu enzim kitinase bisa menjadi bahan antagonis dari fungi maupun bakteri dan berkontribusi sebagai biokontrol mikroba (Rajendran *et al.*, 2023), sehingga enzim kitinase dapat digunakan sebagai kontrol dalam biodegradasi kulit udang (kitin) menjadi D-glukosamin.

Kitinase fungi memiliki jenis GH 18 dan mempunyai peran fisiologis yang berbeda seperti pertumbuhan jamur, remodeling dinding sel, mikoparasitisme, autolisis dan penggunaan kitin untuk kebutuhan nutrisi dan energi (Rajput *et al.*, 2022). Potensi strain jamur yang berbeda untuk menghasilkan kitinase menggunakan *submerge*

fermentation (SMF) dan *solid-state fermentation* (SSF) telah dieksplorasi seperti yang diamati untuk *Trichoderma asperellum* PQ34 dan *Humicola grisea* menggunakan SMF dan *Penicillium ochrochloron* MTCC 517 dan *Fusarium oxysporum* CFR 8 menggunakan SSF (Thadathil *et al.*, 2014). Mempertimbangkan semua aspek positif dari penggunaan teknologi enzim untuk hidrolisis residu kaya kitin serta potensi bioaktivitas kitinase, untuk menyelidiki produksi kitinase ekstraseluler oleh *Apergillus niveus* dengan metode SMF menggunakan cangkang udang sebagai karbon. sumber dan kemudian memurnikan dan mengkarakterisasinya (Ornela and Guimaraes., 2024).

Pada penelitian ini digunakan fungi 18A12RF yang dikultivasi pada limbah kulit udang menggunakan metode *Solid State Fermentation* (SSF) sesuai yang dilakukan Setiawan, *et al* (2021), dengan masa inkubasi 7 hari pada suhu ruangan. Hasil kultivasi diekstraksi dengan cara maserasi menggunakan akuades. Penentuan analisis produk degradasi substrat kitin dilakukan secara Kromatografi Lapis Tipis (KLT) dengan eluen ammonia, isopropil alkohol, dan akuades. KLT ini dilakukan untuk menentukan banyaknya D-glukosamin sesuai yang dilakukan oleh (Martosuyono *et al.*, 2014). Kadar protein pada hasil ekstrak kultivasi mengacu pada metode Lowry (Lowry *et al.*, 1951). Pemurnian serta uji aktivitas antimikroba enzim kitinase mengacu pada (El-Beltagi *et al.*, 2022). Isolasi enzim dilakukan dengan menambahkan ammonium sulfat 60% terlarut dan di dialisis dengan buffer fosfat (pH 7 dan 50 mM),. Uji antimikroba dilakukan dengan difusi agar dan diujikan pada bakteri gram positif, bakteri gram negatif, dan fungi. Berdasarkan El-Beltagi et al 2022, enzim kitinase dari *Talaromyces funiculosus* CBS 129594 memiliki aktivitas antimikroba. Enzim kitinase menunjukkan potensi lebih baik terhadap bakteri gram negatif. Oleh karena itu pada penelitian ini akan dilakukan produksi enzim kitinase secara SSF dan pengujian aktivitas antimikroba dari enzim kitinase yang diperoleh dari fungi 18A12RF.

1.2 Tujuan Penelitian

Adapun tujuan dari penelitian ini yaitu sebagai berikut :

1. Memperoleh enzim kitinase dari isolat fungi 18A12RF dan mengoptimasi pH pada substrat kulit udang.
2. Memurnikan enzim kitinase dari fungi 18A12RF.
3. Menguji aktivitas enzim kitinase sebagai antimikroba.
4. Menguji kemampuan enzim kitinase dalam mendegradasi substrat.

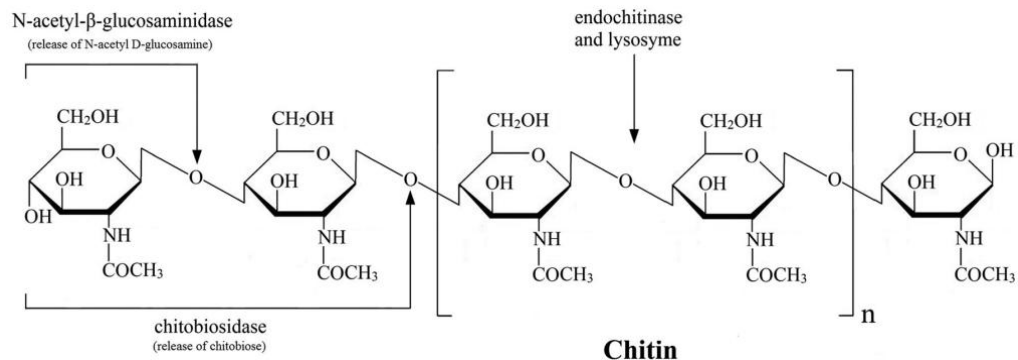
1.3 Manfaat Penelitian

Manfaat dari penelitian ini adalah memberi informasi pengoptimalan kultivasi limbah kulit udang dalam produksi enzim kitinase sebagai antimikroba.

II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Kitin dan Kulit Udang

Kitin merupakan polimer atau dapat disebut sebagai biopolimer dan merupakan biopolimer yang melimpah kedua setelah selulosa. Rumus kimia kitin dapat ditulis $C_{18}H_{26}N_2O_{10}$. Kitin disusun oleh monomer N Asetil D Glukosamin yang terikat dengan ikatan β -(1-4) glikosidik. Kitin biasanya dapat ditemukan pada cangkang kepiting, serangga, udang, dan lobster. Kitin memiliki karakteristik yaitu tidak larut dalam air karena hidrofobitas yang tinggi dan menyerupai struktur kristal yang kaku (Garbe *and* Bruck, 2020). Sumber dari kitin sering diambil banyak dari hasil kelautan seperti cangkang kerang atau udang serta pada cumi-cumi dapat digunakan untuk mendapatkan jumlah kitin dalam jumlah besar, Tran dan tim penelitiannya menyatakan bahwa bahan kitin tersebut mengandung protein dan mineral. Untuk produksi kitin dapat dilakukan dengan demineralisasi menggunakan alkali kuat dan asam, hal tersebut menghasilkan produk samping sisaan air yang mengandung alkali serta mengandung protein yang tinggi. Pengaplikasian yang lebih ramah bisa dilakukan biokonversi kulit udang tersebut menjadi banyak senyawa bioaktif seperti protease, kitinase, inhibitor α -glukosidase, eksopolisakarida, inhibitor tirosinase, atau kitin (Tran *et al.*, 2019).



Gambar 1 kitin dan D-glukosamin (Stoykov, Pavlov *and* Krastanov. 2014)

Kulit udang merupakan salah satu dari limbah pengeksporan dari udang, dikarenakan saat pengeksporan udang perlu dibersihkan dari kulit serta kepalanya. Proses pengeksporan udang dapat memunculkan masalah baru dimana kulit udang dapat memberikan dampak buruk untuk lingkungan seperti dapat mengotori lingkungan karena kulit udang tidak larut dalam air serta akan memberikan aroma busuk disekitar dikarenakan dekomposisi kulit udang. Kulit udang mengandung protein (25-40%), kalsium karbonat (45-50%), dan kitin (15-20%) tetapi kandungan tersebut tergantung pada jenis udang masing-masing (Fourcher *et al.*, 2009).

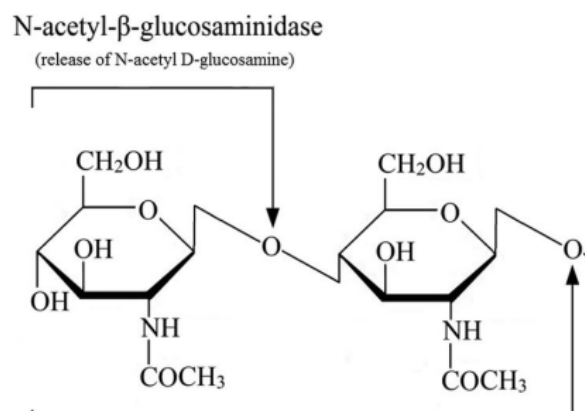
2.3 Fungi

Fungi atau jamur diartikan sebagai jasad eukarior, yang memiliki bentuk benang atau sel tunggal, multiseluler atau uni seluler. Kingdom fungi memiliki keragaman yang signifikan, dengan spesies-spesies yang tumbuh sebagai ragi uniseluler dan/atau hifa bercabang menghasilkan beragam spora dan struktur reproduksi lainnya. Dalam setiap kasus, bentuk dan kekokohan fungi sangat tergantung pada kekuatan mekanik dinding sel yang memainkan peran penting dalam interaksi fungi dengan lingkungan sekitarnya. Dinding sel fungi adalah struktur kompleks yang umumnya terdiri dari

kitin, 1,3- β - dan 1,6- β -glukan, mannan, dan protein. Meskipun demikian, komposisi dinding sel seringkali sangat bervariasi antar spesies fungi yang mencerminkan di bagian atau seluruh dinding sel ragi atau fungi berfilamen. Enzim biosintesis kitin dan glukan menghasilkan rantai linier panjang N-asetilglukosamin terikat β -1,4 dan glukosa terikat β -1,3 secara berurutan. Meskipun demikian, dalam dinding sel fungi terdapat banyak 1,3- β -, 1,6- β -glukan bercabang, dan terdapat adanya ikatan silang yang melibatkan kitin, glukan, dan komponen dinding lainnya (Hidayat dan Putri, 2016).

2.3 Enzim Kitinase

Kitinase merupakan enzim yang mampu menghidrolisis kitin menjadi monomernya atau oligomernya, kitinase yang merupakan kelompok dari glikosil hidrolase yang mampu hidrolisis ikatan glikosida 1 \rightarrow 4 β dari N-asetil D-glukosamin. Kitinase sudah diketahui biasa didapatkan dari aktivitas bakteri serta beberapa fungi, bahkan pada beberapa mamalia tapi secara keseluruhan hanya terdapat sedikit kitinase yang tersedia. kitinase biasanya merupakan enzim ekstraselular yang disekresikan dalam konsentrasi sedang atau rendah (Stoykov, Pavlov *and* Krastanov 2014).



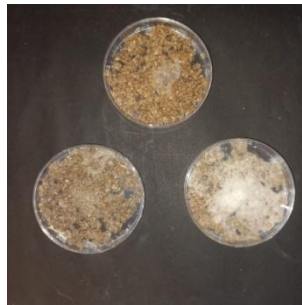
Gambar 2 D-glukosamin akan terpotong pada ikatan 1-4 β (Stoykov, Pavlov *and* Krastanov 2014)

Kitinase dapat sangat baik mendegradasi kitin dari limbah kulit udang, kitinase dapat bekerja baik pada temperatur optimal yaitu pada temperatur 40^o-45^oC serta pH optimal pada 7.0. aktivitas pemurnian enzim dapat terstabilitkan dengan ion Mg⁺ dan enzim dapat terinhibasi dengan ion Hg⁺ dan Pb⁺. Kitinase menginhibasi pertumbuhan dari fungi fitopatogen *Fusarium solani* dan *Alternaria alternate*. Bahan yang umum digunakan dalam produksi kitinase adalah bubuk kulit udang dan bubuk kitin, bahan tersebut menyediakan bahan pertumbuhan tepat karena memiliki sumber karbon dan nitrogen. Produksi kitinase sangat baik menggunakan bahan kulit udang maupun kitin, tapi dalam produksi kitinase kurang efektif menggunakan bahan kitosan. (Jnkiewicz *and* Walczak 2012).

2.4 Solid State Fermentation (SSF)

Solid State Fermentation (SSF) merupakan fermentasi yang menggunakan fase solid (*biodegradable* atau *inert*) sebagai matriks untuk pertumbuhan dari mikroba, metode ini terbukti dapat digunakan sebagai salah satu cara untuk produksi enzim.

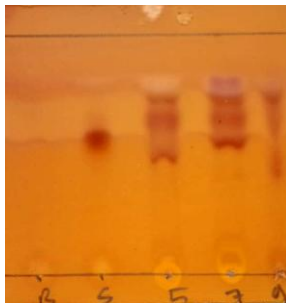
Fermentasi metode SSF cocok dalam fermentasi kitin karena kitin yang bisa didapatkan secara umum memiliki fase solid, hal ini dapat mempermudah proses dari fermentasi (Stoykov, Pavlov *and* Krastanov 2014).



Gambar 3 *Solid State Fermentation* pada kulit udang

2.5 Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

KLT dilakukan untuk memonitor progress dari reaksi, identifikasi terdapat atau tidaknya suatu senyawa, dan menentukan kemurnian dari senyawa. Pemisahan senyawa pada KLT didasarkan pada perbedaan pengikatan senyawa terlarut dengan fasa diamnya dan fase geraknya, biasanya fase diam adalah silika gel. Penggunaan KLT dapat dibedakan sesuai dengan kepolaran analitnya, semakin polar analit maka makin besar interaksinya dengan silika gel sehingga mampu menggeser fase gerak dari area pengikatannya. Karena dipengaruhi oleh kepolaran maka makin tidak polar analit maka akan memiliki kedudukan yang lebih tinggi pada plat silika gel, hal ini akan mempengaruhi nilai dari retardasi retardasi (R_f : *retardation factor*). KLT dilakukan berdasarkan pada distribusi dari fase diam dan gerak dimana plat bertindak sebagai fase diam yang biasanya terbuat dari plat tipis yang diselimuti oleh alumunium oksida maupun silika gel yang berwujud padat, sedangkan fase gerak adalah pelarut eluen biasanya pelarut yang dipakai dengan analit yang dipilih sesuai dengan karakteristik dari analit yang akan ditotol pada bagian bawah dari plat silika. Nilai R_f merupakan sifat dari individual dari setiap senyawa yang terkarakterisasi pada KLT yang bisa dijadikan nilai kuantitas berupa suatu desimal. Nilai R_f dapat dicari dengan cara mengukur panjang jarak tempuh noda dari poin awal penotolan sampai pada spot noda dibagi dengan jarak dari titik awal penotolan ke titik akhir plat silika.



Gambar 4 KLT titik bawah bagian awal penotolan dan garis atas titik akhir plat silika

Nilai Rf biasanya akan selalu sama kecuali analit melalui tahapan yang berbeda selain itu nilai Rf dapat dipengaruhi oleh daya adsorben silika, kemurnian pelarut eluen, suhu sekitar, ketebalan dari plat, dan massa sampel (Archana *and* Khale 2011).

Identifikasi dari D-glukosamin bisa dilakukan dengan cara KLT, pada KLT D-glukosamin digunakan standar D-glukosamin 5µl dan fase geraknya adalah propanol, air, dan 25% ammonia dengan perbandingan total volume 7:2:1. Noda pada silika akan muncul dengan divisualisasi ninhydrin yang dilarutkan pada butanol (Martosuyono *et al.*, 2014).

2.6 Isolasi dan Pemurnian Protein

Pemurnian enzim dilakukan dengan memperhatikan beberapa hal penting dalam kultivasi yaitu pemilihan bahan awal, metode ekstraksi, dan ekstraksi media.

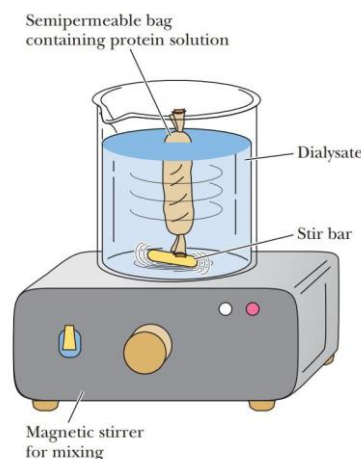
Pemurnian protein dilakukan dengan memperhatikan hal-hal penting yaitu kestabilan pH perlu diperhatikan untuk mencapai aktivitas enzim yang terbaik. Selain itu pada pemurnian protein biasanya dipakai agen reduksi serta khelator atau ion logam (Janson, 2011).

Tahap pemurnian protein bisa dilakukan dengan beberapa tahap yaitu dengan pemakaian teknik presipitasi ammonium sulfat, dengan cara ekstrak kasar enzim akan difraksinasi dengan ammonium sulfat dengan konsentrasi tertentu. Fraksinasi dilakukan dengan sentrifugasi ekstrak kasar dengan amonium sulfat, supernatan akan lalui dialisis dan kromtografi kolom untuk memurnikan enzim. Pengendapan enzim menggunakan garam ammonium sulfat umum dilakukan pada pemurnian enzim, karena penggunaan ammonium sulfat mempunyai kelarutan yang tinggi, pH moderat, harga yang relatif murah, tidak bersifat toksik, dan tidak mempengaruhi enzim (Rochima, 2006).

Pengendapan enzim dilakukan dengan penambahan garam pada ekstrak enzim, pada penambahan garam dalam ekstrak enzim membuat kelarutan enzim menurun karena

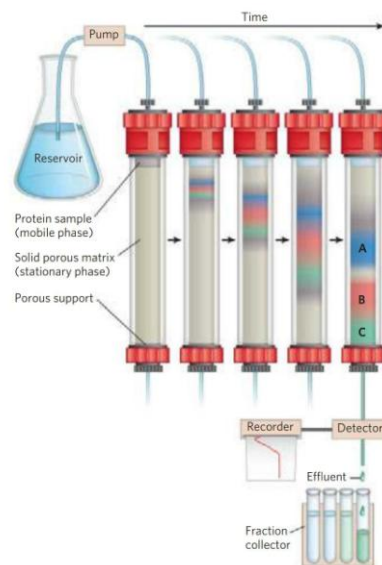
efek yang disebut efek *salting out*. Pemurnian enzim bisa dilakukan dengan pengendapan enzim dengan mencampurkan ammonium sulfat pada ekstrak kasar enzim dan menstrifugasinya. Endapan hasil sentrifugasi lalui proses dialisis dan akan dimurnikan dengan proses kromatografi kolom (El-Beltagi *et al.*, 2022).

Dialisis biasanya merupakan tahapan yang akan dilakukan setelah didapatkan endapan dari enzim melalui proses pengendapan oleh garam, dialisis dilakukan untuk memisahkan enzim dari bahan-bahan pengotor dengan molekul yang lebih kecil. Dialisis akan dilakukan melalui keuntungan dari sifat molekul protein yang besar hingga bisa dipisahkan melalui membran. Proses dialisis dilakukan dengan cara memasukan ekstrak enzim yang sebagian murni kedalam membran semipermeabel dan memasukkannya kedalam larutan buffer dengan kekuatan ionik yang sesuai. Kekuatan ionik yang tepat dari buffer membuat terjadinya pertukaran antara garam dan buffer tapi tidak dengan protein, karena sifat dari membran semipermeabel. Pertukaran ini terjadi karena ketimpangan konsentrasi dari buffer yang terjadi melalui kejadian difusi. Dialisis akan terjadi karena adanya proses dialisis dari buffer dimana konsentrasi yang lebih tinggi akan tertarik ke arah konsentrasi yang rendah, oleh karena itu diperlukan pergantian buffer secara berkala agar menjaga proses difusi yang diinginkan. Pengaplikasian dialisis biasanya dilakukan pada pembersihan ammonium sulfat dari pengendapan protein (Garrett *and* Grisham 2010).



Gambar 5. Dialisis (Garrett *and* Grisham 2010)

Pemurnian protein lebih lanjut bisa melalui kromatografi kolom yang dilakukan karena sifat khusus dari protein seperti perbedaan protein, ukuran, afinitas ikatan, dan sifat lainnya. Bahan padat berpori-pori dengan sifat kimiawi yang tepat sebagai fase diam atau *stationary phase* yang akan tersimpan pada kolom, dan larutan buffer sebagai fase gerak yang akan bermigrasi melewati fase diam. Protein akan dilarutkan dalam larutan buffer yang digunakan sebagai fase gerak yang akan melapisi sisi atas dari kolom yang akan melewati kolom, laju alir dari senyawa yang melewati kolom akan tergantung pada sifatnya bisa cepat ataupun lambat hingga bisa memisahkan senyawa. Kromatografi kolom memiliki beberapa jenis yang disesuaikan dengan cara kerja dari kolom itu sendiri, kromatografi kolom memiliki jenis kolom pertukaran ion (*ion exchange chromatography*) yang memanfaatkan sifat kuat dari ion senyawa, kolom filtrasi gel (*size exclusion chromatography*) yang memanfaatkan ukuran molekul dari senyawa tersebut, kolom afinitas (*affinity chromatography*) yang memanfaatkan keafinitasan senyawa untuk terikat pada ligan. Kromatografi cair kinerja tinggi atau *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC) salah satu instrumen yang mengandalkan kromatografi kolom dengan analit cair dan menggunakan tekanan yang tinggi pada prosesnya.



Gambar 6. Kromatografi kolom (Nelson and Cox 2013)

2.7 Aktivitas Antimikroba Enzim Kitinase

Kitinase merupakan enzim hidrolitik yang mampu memecah ikatan glikosidik pada kitin, enzim kitinase memiliki berat molekul berkisar dari 20 sampai 90 kDa. Enzim kitinase mampu memecah kitin menjadi berat molekul yang lebih kecilnya menjadi kitooligomernya yang memiliki banyak jenis digunakan dalam agrikultur, pengaplikasian dalam medis, berpotensi dalam antikanker, serta sebagai agen biokontrol pada sebagian fungi. Enzim kitinase mampu merusak dinding sel fungi serta mampu merusak glukon pada dinding protein bakteri, hingga mampu memberi kecacatan pada mikroba. Aktivitas mikroba dari enzim kitinase bisa didapat pada fungi, bakteri gram positif, dan gram negatif. Enzim kitinase memiliki aktivitas antimikroba paling besar pada bakteri gram negatif. Aktivitas mikroba dari enzim kitinase bisa didapat pada fungi, bakteri gram positif, dan gram negatif. Enzim kitinase memiliki aktivitas antimikroba paling besar pada bakteri gram negatif hal ini disebabkan karena sifat muatan positif dari antimikroba hingga secara efektif dapat terserap pada dinding sel yang bersifat negatif (El-Beltagi *et al.*, 2022).

2.8 Difusi Agar

Difusi agar merupakan metode yang digunakan dalam menguji kemampuan antimikroba dalam dapat diterimanya antimikroba pada mikroba yang diuji, pada keseluruhan pengujian ini mempelajari kemampuan aktivitas antimikroba yang dilihat dari korelasi antara diameter dalam satuan millimeter pada plat difusi. Metode difusi agar dilakukan untuk mengetahui MIC (*Minimum Inhibition Concentration*) dan MEC (*Minimum Effective Concentration*) untuk mengetahui reproduksibilitas pereplika zona pada diameter yang didapatkan pada plat, dengan mengetahui hal tersebut dapat juga mengetahui kemampuan dari antimikroba dengan cara

membandingkannya dan mengidentifikasi resistan yang terdapat pada isolat (Ingroff *et al.*, 2007).



Gambar 7. Metode difusi agar dengan zona inhibisi pada bakteri *Staphylococcus*

III METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Waktu dan Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada Februari 2024 sampai Juni 2024 di Unit Pelaksana Teknis Laboratorium Terpadu Sentra Inovasi dan Teknologi (UPT-LTSIT) Universitas Lampung dan di Laboratorium Biopolimer Universitas Lampung.

3.2 Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini adalah antara lain gelas Erlenmeyer, pipet tetes, gelas ukur, spatula, tabung reaksi, cawan petri, *autoclave* Tomy SX-700, *Laminar Air Flow* (LAF), *refrigerator*, neraca analitik Wigen Houser, sentrifius, *cover slip*, mikroskop cahaya axio Zeiss A1, batang pengaduk, mikropipet, pinset, gunting, *cutter*, *loop ose*, oven, pembakar spiritus, tabung *ependorf*, pipa kapiler, *well plate* 96, ring uji, spatula logam, karet gelang, spidol, seperangkat alat Kromatografi Lapis Tipis (KLT) dengan pelat alumunium *silica gel* DC kielsel 60 F254, *Medium Performance Liquid Chromatography* (MPLC) Buchi C-620 kolom Sephadex LH20.

Bahan-bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah antara lain akuades, *artificial sea water*, alkohol (70%), agar-agar, koloid kitin, etanol *proanalys* (PA), isopropil

alkohol (IPA), kulit udang, fungi laut 18A12RF, ninhydrin 2% (ninhydrin dalam pelarut EtOH), ammonium sulfat 60% (pelarut akuades), BaCl₂, buffer fosfat (pH 7 dan 50 mM), *Ketoconazol*, dan *Ciprofloxacin*.

3.3 Prosedur Penelitian

3.3.1 Pembuatan Media

Media yang digunakan pada penelitian yaitu berupa PDA dan PDB dalam peremajaan isolat fungi 18A12RF, MHA pada peremajaan bakteri patogen, dan TSB digunakan dalam inokulum bakteri patogen.

3.3.1.1 *Potato Dextrose Agar (PDA) dan Potato Dextrose Broth (PDB)*

Pembuatan media PDA dan PDB dilakukan berdasarkan Azzahra, dkk. (2020). Kentang 10 gram dipotong dadu yang sudah dikupas dan dibersihkan, kentang yang terpotong direbus sampai mendidih dengan air laut 30 ppt dengan volume 100 mL. Air rebusan kentang disaring dan ditambahkan dengan 2 gram glukosa. Pembuatan PDA akan ditambahkan 3 gram agar sedangkan pada PDB tidak ditambahkan agar, bahan yang sudah dibuat langsung disterilisasi dengan *autoclave* pada suhu 121°C selama 15 menit.

3.3.1.2 *Muller-Hinton Agar (MHA)*

Pembuatan MHA dilakukan dengan menambahkan MHA 4 gram dengan akuades 100 mL lalu dihomogenkan. Bahan yang sudah homogen disterilisasi dengan *autoclave* pada suhu 121°C selama 15 menit (Mustarichie *et al.*, 2020). Penggunaan MHA

digunakan dalam peremajaan bakteri patogen, tapi dalam penggunaan pada uji difusi agar maka media akan dikontaminasi dengan TSB yang berbanding MHA 1:1000 TSB.

3.3.1.3 Tryptic Soy Broth (TSB)

Pembuatan TSB dilakukan mengacu pada Laila *et al.*,(2023) pembuatan larutan 3% TSB dengan pelarut akuades, 3 gram TSB dilarutkan dalam 100 mL bahan yang sudah homogen disterilisasi dengan *autoclave* pada suhu 121°C selama 15 menit. TSB digunakan dalam pembuatan inokulum bakteri patogen dalam pembuatan media untuk agar difusi.

3.3.2 Peremajaan Isolat 18A12RF

Isolat fungi 18A12RF didapatkan dari deposit UPT-LTSIT yang sebelumnya sudah diisolasi dari organisme laut tunikata yang berasal dari Bali di perairan Singaraja, Buleleng (8°07'07.6"LS 114°33'38.9"BT) kode isolat 18A12RF. Isolat diremajakan pada media *Potato Dextrose agar* (PDA). Pembuatan media pada Prosedur 3.3.1.1 media dibuat dalam erlenmeyer yang ditutup dengan sumbat kasa dan dimasukkan ke dalam plastik tahan panas. Media dituang pada cawan petri disterilkan melalui penyemprotan alkohol dan iradiasi UV dalam LAF selama 15 menit. Isolat diinkubasi dalam 4 hari sampai terlihat hifa yang terlihat pada permukaan agar media.

3.3.3 Identifikasi Isolat 18A12RF

Identifikasi berdasarkan identifikasi morfologi atau bentuk mikroskopis dari isolat, identifikasi menggunakan teknik *cover slip* . Teknik *cover slip* dilakukan dengan

menggoreskan isolat didekat *cover slip* yang ditancapkan pada media dengan kemiringan 45° dari media agar, dan akan diinkubasi selama 4 hari. Metode ini menggunakan mikroskop cahaya axio Zeiss A1, *cover slip* yang telah diinkubasi 4 hari akan digabung dengan kaca preparat. Identifikasi morfologi dengan mencocokkan bentuk spora pada perbesaran mikroskop 100x, identifikasi ini mengacu pada (Goodfellow *et al.*, 2012).

3.3.4 Kultivasi Isolat 18A12RF Secara *Solid State Fermentation* (SSF)

Kultivasi SSF dilakukan sesuai pada Setiawan, *et al* (2021). Kulit udang kering digiling tanpa demineralisasi dan deproteinasi, kulit udang diratakan pada dasar erlenmeyer 250 mL dan dituang inokum sebanyak 10 ml dikultivasi selama 4. Hasil kultivasi diambil dengan merendam kulit udang dengan 160 ml akuades steril selama 1 jam. Hasil rendaman disaring dan disimpan dalam *refrigerator*. Kultivasi dilakukan variasi pH pada substrat untuk menentukan pH optimum produksi enzim kitinase, perlakuan penentuan pH substrat dilakukan mengacu pada Wink, *et al* (2017) substrat kulit udang dimonitoring dengan variasi pH 5,7, dan 9. Hasil fermentasi diekstrak dan dikarakterisasi menggunakan kromatografi lapis tipis (KLT) spektrofotometer UV-Vis.

3.3.5 Karakterisasi Hasil Fermentasi

Karakterisasi hasil fermentasi kulit udang secara SSF dikarakterisasi menggunakan KLT serta spektrofotometri UV-Vis.

3.3.5.1 Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Prosedur Kromatografi Lapis Tipis (KLT) mengacu pada Martosuyono, *et al* (2014), hasil kultivasi dibersihkan dari pengotor dengan sentrifius selama 60 detik diambil

filtrat dan dibuang endapan sebagai pengotor. Kemudian dilakukan sentrifus kembali untuk mendapatkan endapan glukosamin dengan penambahan etanol *proanalys* (PA) dengan rasio 1:1 pada dengan volume total 1000 μ l. Etanol PA dipisahkan dari endapan setelah disentrifus 60 detik. Endapan dilarutkan dalam akuades 500 mikroliter dan dibiarkan homogen, larutan siap ditotol diatas plat silika. Larutan ditotol diatas plat silika sebagai fase diam, dan isopropil alkohol, ammonia, dan akuades dengan perbandingan rasio 7:2:1 sebagai fase gerak, kemudian plat dimasukan ke dalam *chamber* dan dielusi sampai tanda batas pada plat silika. Analisis glukosamin dilakukan dengan reagen ninhidrin (Suyotha, Srisuk *and* Cheirslip. 2023), setelah kering dapat terlihat noda pada plat silika, dapat dihitung nilai waktu retensi dari sampel.

3.3.5.2 Karakterisasi Glukosamin dan Aktivitas Kitinase dengan Spektrofotometri UV-Vis

Karakterisasi glukosamin dan aktivitas enzim kitinase menggunakan reagen *dinitrosalicylic acid* (DNS) mengacu pada Atalla *et al.*, (2020). Ekstrak kasar enzim atau hasil fermentasi diambil 1 mL dimasukan ke dalam tabung reaksi ditambahkan 1 mL larutan koloid kitin 1% dihomogenkan dan diinkubasi dala *waterbath* dengan suhu 40°C selama 30 menit. Reagen DNS 1 mL ditambahkan ke dalam tabung ukur setelah enzim kasar diinkubasi, dan didihkan selama 10 menit untuk menghentikan kerja enzim. Sampel dengan suhu ruang diukur absorbansi pada panjang gelombang 540 nm dan dilakukan dengan 3 kali pengulangan. Satu unit aktivitas kitinase didefinisikan sebagai jumlah enzim yang diperlukan untuk melepaskan 1 μ mol glukosamin per menit.

3.3.5.3 Karakterisasi Kadar Protein dengan Spektrofotometri UV-Vis

Karakterisasi kadar protein mengacu pada metode Lowry *et al.*, (1951) akuades sebanyak 0,9 mL dimasukan dalam tabung reaksi ditambahkan 0,1 mL sampel enzim, ditambahkan pereaksi C Lowry (larutan 2% Na₂CO₃ dalam pelarut NaOH ditambah dengan 5 mL CuSO₄.5H₂O 1% yang ditambahkan pada 3 mL Na/K tartrat 1%) dihomogenkan dan diinkubasi selama 10 menit. Pereaksi D Lowry (*folin ciocelleau*) ditambahkan kedalam tabung reaksi sebanyak 0,5ml dihomogenkan dan diinkubasi selama 30 menit. Sampel yang terinkubasi diukur absorbansi pada panjang gelombang 750 nm dan dilakukan pengukuran 3 kali.

Hasil karakterisasi menentukan pH optimum substrat untuk produksi enzim kitinase, pH substrat optimum dilanjutkan untuk *scale up*. Proses *scale up* dilakukan dalam erlenmeyer 2000 mL menggunakan substrat sebanyak 100 gram, inokulum sebanyak 50 mL.

3.3.6 Isolasi dan Pemurnian Enzim Kitinase

Isolasi dan pemurnian enzim kitinase dilakukan dengan presipitasi protein dan dialisis sesuai dengan (El-Beltagi *et al.*, 2022).

3.3.6.1 Presipitasi Protein

Presipitasi protein dilakukan dengan cara mencampur ekstrak kasar dengan 60% ammonium sulfat, dan disentrifius 7000 rpm selama 30 menit. Larutan enzim dan ammonium sulfat disentrifus dalam temperatur 4°C, setelah 30 menit dipisahkan endapan dan filtrat. Endapan protein diambil dengan dilarutkan dalam buffer fosfat pH 7 dan 50 mM, larutan endapan disimpan dalam *refrigerator*.

3.3.6.2 Dialisis

Dialisis dilakukan menggunakan kantung selofan pada temperatur 4°C, larutan endapan protein dimasukan kedalam kantung selofan dan diikat tergantung didalam gelas *beaker* yang berisi buffer fosfat pH7 dengan konsentrasi 10 mM. Dialisis dilakukan selama 18 jam dan pergantian buffer fosfat setiap 4 jam. Setiap pergantian buffer fosfat ditetaskan BaCl 1% pada buffer fosfat, jika terjadi endapan putih proses dialisis perlu dilanjutkan dan perlu dilakukan pergantian buffer fosfat.

3.3.7 Uji Antimikroba Difusi Agar Menggunakan Enzim Kitinase

Uji antimikroba difusi agar menggunakan enzim kitinase dilakukan sesuai dengan metode (El-Beltagi *et al.*, 2022).

3.3.7.1 Uji Antibakteri

Aktivitas antimikroba diuji menggunakan bakteri patogen gram negatif *Pseudomonas aeruginosa*, dan *Staphylococcus aureus* sebagai bakteri gram positif. Bakteri patogen diinkubasi dengan suhu 37°C pada waktu 24 jam dengan media MHA, pembuatan media pada Prosedur 3.3.1.2. Bakteri patogen diambil sebanyak 3 ose dimasukan kedalam TSB dan diinkubasi pada temperatur 37°C selama 15 menit, inokulum ditambahkan pada MHA dengan perbandingan dan dituang pada petri tanpa di iradiasi dengan UV. Ring uji di taruh pada permukaan agar yang terkontamiasi dan ditetesi sebanyak 50 µL kontrol positif (*Ciprofloxacin* 2mg/mL), kontrol negatif (buffer fosfat 10 mM), dan tiga ring untuk enzim kitinase. Media yang ditambahkan ring uji diinkubasi pada temperatur 37°C selama 18 jam, dan dilihat terdapat atau tidaknya zona bening.

3.3.7.2 Uji Antifungi

Uji antifungi difusi agar dilakukan dengan mengkontaminasi media PDA dengan PDB yang diisi dengan 3 ose *Malassezia Globosa* sebagai fungi patogen. PDB disiapkan dengan membuat PDB 5 mL menggunakan pelarut akuades, PDB dicelupkan dengan fungi patogen dan diinkubasi selama 15 menit pada temperatur ruang. PDA dikontaminasi dengan PDB yang mengandung fungi patogen dengan perbandingan PDA 1:1000 PDB. Media didiamkan selama 15 menit sampai media mengeras tanpa diiradiasi UV, ditaruh 5 ring uji untuk ditambahkan 50 µL kontrol positif (*ketconazole* 2mg/mL), kontrol negatif (buffer fosfat 10 mM), dan tiga ring untuk enzim kitinase. Media diinkubasi pada temperatur ruang pada 24 jam, dilihat pada media terdapatnya zona bening.

3.3.8 Pengujian Kerja Enzim Kitinase dalam Degradasi Substrat

Pengujian kerja enzim kitinase dalam degradasi dilakukan mengacu pada Yang *et al.*, (2016) substrat dilakukan pada tiga substrat yaitu kulit udang, kitin, dan larutan 1 % koloid kitin, substrat yang berbeda akan didegradasi oleh enzim kitinase yang diisolasi. Kulit udang dan kitin sebanyak 0,5 gram dimasukkan dalam tabung reaksi ditambahkan 2 mL enzim kitinase, larutan koloid kitin 1% sebanyak 2 mL ditambah 2mL enzim kitinase dan semua substrat diinkubasi pada temperatur ruang selama 2 jam. Tabung reaksi didihkan selama 10 menit dan dipisahkan antara padatan dan cairan, cairan yang diambil akan diuji dengan KLT (Prosedur 3.3.5.1).

V. SIMPULAN DAN SARAN

5.1 Simpulan

Simpulan dari penelitian ini yaitu sebagai berikut :

1. Isolat fungi 18A12RF mampu memproduksi enzim kitinase secara baik pada pH substrat 9 dengan memiliki aktivitas spesifik 0,5736 U/mg.
2. Pemurnian enzim kitinase meningkatkan aktivitas spesifik enzim kitinase pada substrat pH 9 dari 0,0852 U/mg menjadi 0,5736 U/mg.
3. Aktivitas antimikroba pada enzim kitinase yang didapatkan lebih cenderung pada antifungi.
4. Enzim kitinase mampu mendegradasi sumber kitin seperti kulit udang, kitin, dan larutan koloid kitin pada inkubasi 2 jam.

5.2 Saran

Saran pada penelitian adalah sebagai berikut :

1. Memurnikan enzim kitinase lebih lanjut untuk mendapatkan aktivitas spesifik yang lebih tinggi.
2. Memperoleh waktu dan pH inkubasi optimal dalam inkubasi enzim kitinase untuk peroleh hasil degradasi seperti COS yang lebih baik.

DAFTAR PUSTAKA

- Akeed, Y, F Atarsh, dan W Naffa. "Partial purification and characterization of chitinase produced by *Bacillus licheniformis* B307." *Heliyon*, 2020: 6(5).
- Alsohaili, Sohail, Bayan, dan Bani Hasan. "Morphological and Molecular Identification of Fungi Isolated from Different Environmental Sources in the Northern Eastern Desert of Jordan." *Jordan Journal of Biological Sciences*, 2018: 329 - 337.
- Angraini, W. "Pengaruh pH Terhadap Aktivitas Enzim Kitinase." *Jurnal Ilmiah Pendidikan Fisika*, 2015: 49(2): 219-230.
- Archana, Bele, dan Anubha Khale. "An Overview on Thin Layer Chromatography." *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 2011: 256-267.
- Arnold, N.D, D Garbe, dan T.B Bruck. "Enzymatic Modification of Native Chitin and Conversion to Specificity Chemical Product." *Marine Drugs*, 2020: 18(2): 1-27.
- Assink, Junior, P de Jesus, dan E Borges. "Whey Protein Analysis Using the Lowry Assay and 96-Well-Plate Digital Images Acquired Using Smartphones." *Journal of Chemical Education*, 2023: 100(6):2329-2338.
- Atalla, S M, N El Gamal, dan H Awad. "Chitinase of Marine *Penicillium chrysogenum* MH745129: Isolation, Identification, Production and Characterization as Controller for Citrus Fruits Postharvest Pathogens." *Jordan Journal of Biological Sciences*, 2020: 13(1):19-28.

- Azzahra, N, M Jamilatun, dan A Aminah. "Perbandingan Pertumbuhan *Aspergillus fumigatus* pada Media Instan Modifikasi Carrot Sucrose Agar dan Potato Dextrose Aga." *Jurnal Mikrobiologi Indonesia*, 2020: 4(1):168-174.
- Deng, J, D Shi, H Mao, Z LI, S Liang, dan X Luo. "Heterologous expression and characterization of an antifungal chitinase (Chit46) from *Trichoderma harzianum* GIM 3.442 and its application in colloidal c." *J. Biol. Macromol*, 2019: 134(1); 113-121.
- Deng, J, *et al.* "Enzymatic conversion and recovery of protein, chitin, and astaxanthin from shrimp shell waste." *Journal of Cleaner Production*, 2020: 271(1) : 1-10.
- El-Beltagi, Hossam, Omima El-Mahdy, Heba Mohamed, dan Abeer El-Ansary. "Antioxidants, Antimicrobial, and Anticancer Activities of Purified Chitinase of *Talaromyces funiculosus* Strain CBS 129594 Biosynthesized Using Crustacean Bio-Wastes." *Agronomy*, 2022: 2-29.
- El-Sayed, Sana, Amal Ali, Wafaa Shousa, dan Nagwa Omar. "Characterization and Potential antimicrobial Effect of Novel Chitooligosaccharide Against Pathogenic Microorganism." *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 2017: 7(6): 6-12.
- Fourcher, J.P, A Westbrook, S Boetius, S Ceramicola, J Dupre, dan J Mascle. "Structures and Drivers of cold Seep Ecosystems." *Oceanography*, 2009: 22: 92-109.
- Garrett, Reginald, dan Charles Grisham. *Biochemistry*. Boston: Cengage Learning, 2010.
- Goodfellow, M, *et al.* *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. New York: Springer, 2012.
- Herdyastuti, N.,Raharjo,T.J., Mudasir, and Matsjeh, S. "Chitinase and Chitinolytic Microorganism : Isolation, Characterization, and Potential." *J. Chem*, 2009: 9(1): 37-47.
- Ingroff, Espinel, *et al.* "Multicenter Evaluation of a New Disk Agar Diffusion Method for Susceptibility Testing of Filamentous Fungi with Voriconazole, Posaconazole, Itraconazole, Amphotericin B, and Caspofungin." *Journal of Clinical Microbiology*, 2007: 1811-1820.
- Janson, Christer. *Protein Purification*. Canada: John Wiley & Sons Publication, 2011.

- Karahalil, E, H Coban, dan I Turhan. “). A current approach to the control of filamentous fungal growth in media: microparticle enhanced cultivation technique.” *Critical Reviews in biotechnology*, 2019: 39(2):192-201.
- Laila, Aspita, *et al.* "Exploration and Biofinery AntiMicrobial Agent through Solid State Fermentation from Indonesian's Marine Actinomycetes." *Fermentation*, 2023: 1-14.
- Li, Qinyuan, Xiu Chen, Yi Jiang, dan Chenglin Jiang. “Morphological Identification of Actinobacteria.” *Intech*, 2016: 61-81.
- Lowry, Oliver, Nira Rosebrough, Lewis Farr, dan Rose Randall. “Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent.” 1951: 266-275.
- Martosuyono, Pujoyuwono, Asri Pratitis, Alexander Prasetya, dan Elisabeth Kartika Prabawati. “Desalinasi Kitoooligosakarida Menggunakan Teknik Kromatografi Filtrasi Gel dan Dialisis.” *qualen Bulletin of Marine & Fisheries Postharvest & Biotechnology*, 2014: 127-136.
- Mustafa, A, *et al.* "Stragety for Developing Whiteleg Shrimp Culture Using Intensive Technology in Indonesia." *Sustainability*, 2023: 15(3):1753.
- Mustarichie, R, S Sulistyaningsih, dan D Runadi. “Antibacterial Activity Test of Extract and Fraction of Cassava Leaves Against Clinical Isolates of Staphylococcus epidermis Causing Acne.” *International Journal of Microbiology*, 2020: 1-9.
- Nelson, David Lehninger, dan Michael Cox. *Principles of Biochemistry*. New York: W.H. Freeman and Company, 2013.
- Ornela, P, dan L Guimaraes. “Purification, Characterization and Antifungal Activity of the Aspergillus niveus Chitinase Produced Using Shrimp Shells.” *Applied Biosciences*, 2024: 3(2):220-232.
- Ornela, Pedro Henrique, dan Luis Henrique Guimaraes. “Purification, Characterization and Antifungal Activity of the Aspergillus niveus Chitinase Produced Using Shrimp Shells.” *Applied biosciences*, 2024: 220-232.
- Poria, V, A Rana, A Kumari, J Grewal, K Pranaw, dan S Singh. “Current perspectives on chitinolytic enzymes and their agro-industrial applications.” *Biology*, 2021: 10(12):1-20.

- Qinyuan Li, Xiu Chen, Yi Jiang and Chenglin Jiang. "Morphological Identification of Actinobacteria." *Intech*, 2016: 61-64.
- Rajendran, K, M Krishnamoorthy, K Karupiah, K Ethiraj, dan S Sekar. "Chitinase from *Streptomyces mutabilis* as an Effective Eco-friendly Biocontrol Agent." *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2023: 1-14.
- Rajput, M, M Kumar, dan N Pareek. "Myco-chitinases as versatile biocatalysts for translation of coastal residual resources to eco-competent chito-bioactives." *Fungal biol*, 2022: 62-69.
- Rawy, M, E.A Beltagy, U.M Abdul-rouf, M.A Elshenwy, dan M,S Kenlany. "Optimizing of Process Parameters for Chitinase Production by Marine *Aspergillus flafus* MK20." *Journal Ecol*, 2018: 1-8.
- Rochima, E. "Pemurnian dan Karakteristik Kitin Deasetilase Termotabil dari *Bacillus papandayan* Asal Kawah Kamojang Jawa Barat." *Jatinagor*, 2006: 8 : 193-209.
- Setiawan, A, et al. "Solid State Fermentation of Shrimp Shell Waste Using *Pseudonocardia carboxydivorans* 18A13O1 to Produce Bioactive Metabolites." *Fermentation*, 2021: 7(4):247.
- Stoykov, Yuriy Mihayloy, Atanas Ivanov Pavlov, dan Albert Ivanov Krastanov. "Chitinase biotechnology: Production, purification, and application." *Engineering In Life Science*, 2014: 1-9.
- Suyotha, W, K Srisuk, dan B Cheirslip. "Production, Purification, and Characterization of Acid-active Chitosanase from *Lentzea.sp.*" *Biocatalytic and Agricultural BIotechnology*, 2023: 103001.
- Thadathil, N, A Kuttapan, E Vallabaipatei, M Kandasamy, dan S Velappan. *Ann. Microbiol*, 2014: 671-681.
- Toharisman. *Peluang Pemanfaatan Enzim Kitinase di Industri Gula*. Pusat Pengembangan Penelitian Geologi Kelautan, 2007.
- Tran, Thi Ngoc, et al. "AnExochitinase with N-Acetyl--Glucosaminidase Like Activity from Shrimp Head Conversion by *Streptomyces speibonae* and Its Application in Hydrolyzing-Chitin Powder to Produce N-Acetyl-d-Glucosamine." *polymers*, 2019: 2.

- Wasik, dan Handriana. "Strategy for Sustainability of the Fishery Industry During the Covid-19 Pandemic in Indonesia." *Cogent Social Sciences*, 2023: 9(1), 2218723.
- Wink, J, F Mohammadipناه, dan J Hamedi. "Biology and Biotechnology of Actinobacteria." *Practical Aspects of Working with Actinobacteria*, 2017: (11):329-376.
- Yang, Shaoqing, XIng Fu, Qiaojuan Yan, Yu Guo, Zhuqing Liu, dan Zhengqiang Jiang. "Cloning, expression, purification and application of a novel chitinase from a thermophilic marine bacterium *Paenibacillus barengoltzii*." *Food Chemistry*, 2016: 1041-1048.
- Yuriy Mihaylov Stoykov, Atanas Ivanov Pavlov, and Albert Ivanov Krastanov. "Chitinase biotechnology: Production, purification, and application." *Engineering In Life*, 2014: 1-9.
- Zhou, X, et al. "Enzymatic hydrolysis of chitinous wastes pretreated by deep eutectic solvents into N-acetyl glucosamine." *Polymer Degradation and Stability*, 2024: 110907.