

**EVALUASI PRODUK HIDROLISIS KULIT UDANG MENGGUNAKAN
AKTINOMISETES 18D36A2 DAN UJI ANTIBAKTERI**

(Skripsi)

Oleh

GITA JENIKA SARI

2117011011



**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS LAMPUNG
BANDAR LAMPUNG
2025**

ABSTRAK

EVALUASI PRODUK HIDROLISIS KULIT UDANG MENGGUNAKAN AKTINOMISETES 18D36A2 DAN UJI ANTIBAKTERI

Oleh

GITA JENIKA SARI

Enzim kitinase merupakan enzim yang secara spesifik berperan dalam proses degradasi kitin menjadi senyawa turunannya, seperti chitooligosakarida (COS). Penelitian ini mencakup peremajaan serta identifikasi isolat Aktinomisetes 18D36A2, yang berdasarkan analisis mikroskopis diduga termasuk dalam genus *Micrococcus unila*. Untuk memperoleh enzim kitinase, isolat 18D36A2 dikultivasi melalui metode fermentasi padat (*Solid State Fermentation/SSF*) menggunakan media berbahan dasar limbah kulit udang selama tujuh hari. Hasil fermentasi diekstraksi menggunakan akuades, kemudian dilanjutkan dengan proses dialisis. Selanjutnya, dilakukan analisis kadar glukosamin dengan metode DNS dan pengukuran kadar protein menggunakan metode Lowry. Hasil analisis menunjukkan bahwa fermentasi 100 gram limbah kulit udang dalam labu Erlenmeyer berkapasitas 1000 mL menghasilkan glukosamin sebesar 459,6 ppm. Setelah dialisis, aktivitas enzim meningkat dua kali lipat hingga mencapai 0,2 U/mL. Uji aktivitas antibakteri menunjukkan bahwa enzim kitinase dari isolat Aktinomisetes 18D36A2 mampu menghambat pertumbuhan *Staphylococcus aureus* dan *Pseudomonas aeruginosa*. Selain itu, enzim kitinase yang diperoleh dapat menghidrolisis substrat kulit udang menjadi COS dalam waktu inkubasi dua jam. Mengingat kemampuannya dalam menghasilkan COS yang berpotensi sebagai agen antibakteri, temuan ini memberikan landasan penting bagi penelitian lanjutan terkait pemanfaatan enzim kitinase dari isolat tersebut.

Kata kunci : antibakteri, enzim kitinase, isolat aktinomisetes laut 18D36A2, *solid state fermentation*, glukosamin.

ABSTRACT

EVALUATION OF SHRIMP SHELL HYDROLYSIS PRODUCTS USING ACTINOMYCETES 18D36A2 AND ANTIBACTERIAL TEST

By

GITA JENIKA SARI

Chitinase enzyme is an enzyme that specifically plays a role in the degradation process of chitin into its derivative compounds, such as chitooligosaccharides (COS). This study includes the rejuvenation and identification of the Actinomycetes isolate 18D36A2, which based on microscopic analysis is suspected to belong to the genus *Micrococcus* unila. To obtain the chitinase enzyme, the isolate 18D36A2 was cultivated through the Solid State Fermentation (SSF) method using shrimp shell waste as the base medium for seven days. The fermentation results were extracted using distilled water, then continued with the dialysis process. Furthermore, glucosamine levels were analyzed using the DNS method and protein levels were measured using the Lowry method. The results of the analysis showed that fermentation of 100 grams of shrimp shell waste in a 1000 mL Erlenmeyer flask produced glucosamine of 459.6 ppm. After dialysis, enzyme activity doubled to 0.2 U/mL. Antibacterial activity test showed that chitinase enzyme from Actinomycetes isolate 18D36A2 was able to inhibit the growth of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. In addition, the chitinase enzyme obtained could hydrolyze shrimp shell substrate into COS within two hours of incubation. Given its ability to produce COS which has the potential as an antibacterial agent, this finding provides an important basis for further research related to the utilization of chitinase enzyme from the isolate.

Keywords: antibacterial, chitinase enzyme, marine actinomycetes isolate 18D36A2, solid state fermentation, glucosamine.

**EVALUASI PRODUK HIDROLISIS KULIT UDANG MENGGUNAKAN
AKTINOMISETES 18D36A2 DAN UJI ANTIBAKTERI**

Oleh

Gita Jenika Sari

Skripsi

**Sebagai Salah Satu Syarat untuk Mencapai Gelar
SARJANA SAINS**

Pada

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



**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS LAMPUNG
BANDAR LAMPUNG
2025**

**Judul : EVALUASI PRODUK HIDROLISIS
KULIT UDANG MENGGUNAKAN
AKTINOMISETES 18D36A2 DAN
UJI ANTIBAKTERI**

Nama Mahasiswa : Gita Jenika Sari

Nomor Pokok Mahasiswa : 2117011011

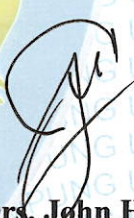
Program Studi : Kimia

Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

MENYETUJUI

1. Komisi Pembimbing


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


Prof. Drs. John Hendri, M.S. Ph.D.
NIP. 19581021198703001

2. Ketua Jurusan Kimia FMIPA Universitas Lampung


Prof. Dr. Mira Rilyanti S.Si., M.Si.
NIP. 197205302000032001

MENGESAHKAN

1. Tim Penguji

Ketua : Dra. Aspita Laila, M.S.

.....

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

.....

Anggota : Mulyono, S.Si., M.Si., Ph.D.

.....

2. Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam



Dr. Eng. Heri Satria, M.Si.
NIP. 197110012005011002

.....

Tanggal Lulus Ujian Skripsi: 21 Juli 2025

SURAT PERNYATAAN KEASLIAN SKRIPSI

Yang bertandatangan di bawah ini:

Nama : Gita Jenika Sari
Nomor Pokok Mahasiswa : 2117011011
Jurusan : Kimia
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Perguruan Tinggi : Universitas Lampung

Menyatakan dengan sesungguhnya bahwa skripsi yang berjudul
**Evaluasi Produk Hidrolisis Kulit Udang Menggunakan Aktinomisetes
18D36A2 dan Uji Antibakteri** adalah benar karya saya sendiri, baik gagasan,
hasil, dan analisisnya. Saya tidak keberatan jika data dalam skripsi ini digunakan
oleh dosen atau program studi untuk kepentingan publikasi sesuai kesepakatan
dengan kesepakatan sebelum dilakukan publikasi.

Bandar Lampung, 13 Agustus 2025
Yang Menyatakan



Gita Jenika Sari
NPM. 2117011011

RIWAYAT HIDUP



Penulis dilahirkan di Sekincau pada tanggal 13 Januari 2004. Penulis bernama lengkap Gita Jenika Sari yang merupakan putri ketiga dari Bapak Khotman dan Ibu Gustina. Penulis memiliki kakak laki-laki bernama Dedi Suhendera dan kakak perempuan bernama Devita Rosalia Sari. Penulis telah menyelesaikan Pendidikan di SMP Negeri 22 Bandar Lampung pada tahun 2015-2018 dan SMA Negeri 15 Bandar Lampung pada tahun 2018-2021. Setelah lulus SMA penulis diterima sebagai mahasiswa Jurusan S1 Kimia, FMIPA, Universitas Lampung melalui jalur SNMPTN pada tahun 2021 dan menyelesaikan studinya pada tahun 2025.

Selama menjadi mahasiswa penulis mengikuti beberapa kegiatan, seperti menjadi anggota di Himpunan Mahasiswa Kimia (Himaki), anggota Koperasi Mahasiswa (Kopma), dan anggota MBKM membangun desa. Penulis dalam pendidikannya telah melakukan Praktik Kerja Lapangan (PKL) di UPA Laboratorium Terpadu Universitas Lampung yang diberi judul “Degradasi Kulit Udang Secara Enzimatis Menggunakan Aktinomisetes”, dan mengikuti Kuliah Kerja Nyata (KKN) selama 40 hari di Desa Sidodadi, Pesawaran. Penulis pernah menjadi asisten praktikum Kimia Dasar pada semester ganjil 2024 untuk mahasiswa fisika angkatan 2024.

Penulis berharap masih dapat meneruskan tulisan-tulisan berikutnya dan dapat memberikan manfaat bagi keluarga, agama, negara, dan ilmu pengetahuan.

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

Dengan menyebut nama Allah yang Maha Pengasih lagi Maha Penyayang

Dengan mengucapkan

Alhamdulillahirabbil'alamin dan dengan segala kerendahan hati,

Ku persembahkan karya ini teruntuk:

Kedua orang tuaku tercinta, Bapak Khotman dan Ibu Gustina yang telah membesarkan, mendidik, mendo'akan, mendukung, dan memberikan cinta dan kasih yang sangat besar sehingga putrimu dapat menyelesaikan studi ini.

Ku ucapkan terima kasih atas segala materi, nasihat, kasih sayang, keringat, dan air mata serta segala sesuatu yang telah kalian diberikan. Kepada seluruh keluarga besar yang selalu memberikan dukungan, bantuan, dan perhatian untukku.

Dengan segala rasa hormat kepada Bapak Dra. Aspita Laila, M.S., Bapak Prof. Drs. John Hendri, M.S., Ph.D., dan Bapak Mulyono, S.Si., M.Si., Ph.D, serta seluruh Dosen Pengajar yang telah membimbing dan mendidikku sampai menyelesaikan pendidikan Sarjana. Seluruh kerabat yang telah memberikan banyak dukungan, bantuan, dan saran.

Almamater Tercinta Universitas Lampung

MOTTO

“Katakanlah: ‘Hai hamba-hambaKu yang melampaui batas terhadap diri mereka sendiri! Janganlah kamu berputus asa dari Rahmat Allah. Sesungguhnya Allah mengampuni dosa-dosa semuanya. Sesungguhnya Dialah Yang Maha Pengampun lagi Maha Penyayang.”
(Q.S. Az-Zumar: 53)

“Janganlah kamu bersedih hati, sesungguhnya Allah beserta kita.”
(Q.S. At-Taubah: 40)

“Karena sesungguhnya sesudah kesulitan itu ada kemudahan, sesungguhnya sesudah kesulitan itu ada kemudahan.”
(Q.S. Al-Insyirah: 5-6)

“Keberhasilan bukanlah milik orang pintar, melainkan milik mereka yang senantiasa berusaha.”
(B.J. Habibie)

“You may encounter many defeats, but you must not be defeated. In fact, it may be necessary to encounter the defeats, so you can know who you are, what you can rise from, how you can still come out of it.”
(Maya Angelou)

“Sometimes good things fall apart so better things can fall together.”
(Marilyn Monroe)

“If you feel pain, you are alive. If you feel other people’s pain, you are a human being.”
(Leo Tolstoy)

SANWACANA

Puji syukur saya haturkan kepada Allah Subhanahu Wa Ta'ala karena atas rahmat serta karunia-Nya skripsi ini dapat saya selesaikan. Salam dan shalawat semoga selalu tercurah pada Nabi Muhammad Sallallahu Alaihi Wassalam. Skripsi dengan judul “Evaluasi Produk Hidrolisis Kulit Udang Menggunakan Aktinomisetes 18D36A2 dan Uji Antibakteri” ini disusun sebagai salah satu syarat untuk mencapai gelar Sarjana Sains pada Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lampung. Dalam proses penelitian dan penyusunan skripsi ini tentu saja saya melibatkan berbagai pihak, baik secara langsung maupun tidak langsung. Untuk itu saya mengucapkan banyak terima kasih kepada:

1. Allah SWT, Tuhan Yang Maha Esa, atas hidayah dan karunia-Nya. Yang telah menjadi tempat penulis berserah diri dan melangitkan seluruh doa-doa penulis.
2. Ayah Khotman yang sangat berjasa di hidup penulis, yang selalu memberikan arah untuk penulis, yang selalu menjadi sesesorang yang bisa penulis ajak berdiskusi mengenai perjalanan selama mengemban pendidikan.
3. Ibu Gustina yang selalu mendoakan penulis tanpa henti, yang selalu mendukung setiap perjalanan penulis, dan selalu memberi perhatiannya sehingga penulis tetap semangat selama proses penyusunan skripsi.
4. Ibu Dra. Aspita Laila, M.S. selaku pembimbing pertama sekaligus pembimbing akademik yang telah membimbing, membantu setiap langkah penulis, memberi saran, mengarahkan penulis dan bersedia meluangkan waktunya untuk membantu penulis dalam penyusunan skripsi.

5. Bapak Prof. Drs. John Hendri,, M.S., Ph.D. selaku pembimbing kedua yang telah banyak membantu penulis selama penelitian dan bersedia meluangkan waktu untuk membimbing penulis sehingga skripsi ini terselesaikan dengan baik.
6. Bapak Mulyono, S.Si., M.Si., Ph.D. selaku dosen pembahas yang telah memberikan saran dan kritik kepada penulis sehingga bisa menyelesaikan skripsi ini dengan baik.
7. Ibu Prof. Dr. Mita Rilyanti, M.Si. selaku ketua Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lampung.
8. Bapak Dr. Eng. Heri Satria, S.Si., M.Si. selaku Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lampung.
9. Seluruh civitas akademika Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lampung.
10. Kakak- kakak penulis Dedi Suhendera dan Devita Rosalia Sari, yang sudah memberi dukungan, doa, dan menjadi pendengar serta penghibur bagi penulis di saat lelah dalam perjalanan menuju sarjana.
11. Sahabat penulis Reikha Zahra Rijha Putri sejak bangku sekolah yang selalu menjadi tempat berkeluh-kesah dalam menghadapi rintangan selama ini, yang selalu memberi dukungan satu sama lain, dan membantu melepas rasa jenuh penulis selama ini dengan obrolan *random*.
12. Sahabat penulis di masa SMA yaitu, May Putri Rosari S, Reta Sagita, dan Natasya Ate A M B yang sudah memberi dukungan, nasihat, saran, dan memberikan motivasi kepada penulis agar tetap semangat melanjutkan pendidikan sampai akhir. Terima kasih atas banyaknya warna yang kalian berikan dalam kehidupan penulis sejak masa remaja. Semoga kita bisa berkumpul lagi setelah mencapai seluruh mimpi kita.
13. Sahabat dan teman baik di masa SD penulis dalam grup Halal Bihalal yaitu Risya La Gara, Aidha Gian Rosyid, dan Anisatul Mahmudah yang sudah bersedia mendukung dan meluangkan waktunya untuk berbagi cerita dengan penulis. doa-doa terbaik untuk kalian semua.
14. Sahabat dan teman baik penulis dalam grup $\frac{1}{2}$ Saham Gacoan yaitu Desrita Pratiwi, Khairi Hayat Febriana, dan Fildza Amalia yang sudah banyak

membantu penulis, yang sangat menghibur dengan kehebohan dan canda tawa kalian. Semoga kita bisa berkumpul lagi dengan keadaan yang lebih baik. Selamat kembali ke rumah, dan pasti kita akan berjumpa lagi.

15. Rekan seperjuangan penelitian penulis yaitu Nida Roufiqoh, Alysha Mutiara, Sabina Clarissa, dan Kurniawan Sugiarto atas dukungan dan kerja samanya selama penelitian.
16. Rekan ADS'21 yang sudah menjadi teman selama PKL penulis dan sudah banyak sekali membantu penulis selama ini.
17. Kakak yang sudah membimbing dan membantu penulis selama penelitian yaitu Fendi Setiawan. Terima kasih atas dukungan, ilmu, nasihat dan semangat yang telah diberikan kepada penulis.
18. Seluruh Kimia Angkatan 2021, khususnya kelas A yang telah membiarkan penulis menjadi bagian dari kalian.
19. Seluruh pihak yang sudah mendukung dan membantu penulis yang tidak bisa disebutkan satu persatu, terima kasih banyak.
20. Terakhir, kepada Gita Jenika Sari, yaitu diri saya sendiri sebagai penulis. Terima kasih karena sudah bersabar dan terus mempertahankan semangatnya meskipun banyak sekali rintangan tidak terduga yang terjadi. Selalu kuat berdiri di kakinya sendiri untuk memperjuangkan satu janji untuk diri sendiri yang wajib untuk diselesaikan. Semoga selalu kuat batinnya, luas hatinya, dan tetap melangitkan doa-doa yang berjalan selaras dengan ikhtiar. Terima kasih karena selalu yakin bahwa Allah SWT selalu melihat usaha dan mendengar tiap untai kata yang kamu ungkapkan sepuh hati dalam setiap sujud.

Akhir kata, saya menyadari bahwa isi skripsi ini masih jauh dari kesempurnaan, akan tetapi sedikit harapan semoga skripsi ini dapat bermanfaat bagi yang membaca dan juga bagi kemajuan ilmu pengetahuan.

Bandar Lampung, 13 Agustus 2025
Penulis

Gita Jenika Sari

DAFTAR ISI

	Halaman
DAFTAR GAMBAR	vi
DAFTAR TABEL	vii
I. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Tujuan Penelitian.....	5
1.3 Manfaat Penelitian.....	5
II. TINJAUAN PUSTAKA	6
2.1 Kitin dan Kulit Udang	6
2.2 Aktinomisetes	9
2.3 Enzim Kitinase	11
2.4 <i>Solid State Fermentation</i> (SSF).....	13
2.5 Kromatografi Lapis Tipis (KLT)	15
2.6 Isolasi dan Pemurnian Protein.....	16
2.7 Aktivitas Anti Mikroba Enzim Kitinase	19
2.8 Uji antibakteri metode MIC (<i>Minimum Inhibitory Concentration</i>)	19
III. METODELOGI PENELITIAN	21
3.1 Waktu dan Tempat Penelitian	21
3.2 Alat dan Bahan	21
3.3.1 Pembuatan Media	22
3.3.2 Peremajaan Isolat 18D36A2.....	23
3.3.3 Identifikasi Isolat 18D36A2	23

3.3.4 Kultivasi Isolat 18D36A2 Secara <i>Solid State Fermentation</i> (SSF)	24
3.3.5 Kromatografi Lapis Tipis (KLT)	24
3.3.6 Karakterisasi Aktivitas Enzim Kitinase	25
3.3.7 Isolasi dan Pemurnian Enzim Kitinase	26
3.3.8 Pengujian Kerja Enzim Kitinase dalam Degradasi Substrat	27
3.3.9 Uji Antibakteri metode MIC	27
3.4 Diagram Alir	28
IV. HASIL DAN PEMBAHASAN	29
4.1 Morfologi Isolat 18D36A2	29
4.2 Kultivasi Isolat 18D36A2	30
4.3 Karakterisasi Hasil Fermentasi	32
4.3.1 Karakterisasi Glukosamin dengan Kromatografi Lapis Tipis (KLT)	32
4.3.2 Karakterisasi Glukosamin dan Aktivitas Kitinase dengan Spektrofotometri UV-Vis	33
4.3.3 Karakterisasi Kadar Protein dengan Spektrofotometri UV-Vis	34
4.4 Pemurnian Enzim Kitinase	36
4.5 Pengujian Kerja Enzim Kitinase dalam Degradasi Substrat	38
4.6 Uji Antibakteri	38
V. SIMPULAN DAN SARAN	41
5.1 Simpulan	41
5.2 Saran	41
DAFTAR PUSTAKA	42
LAMPIRAN	46

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Kitin (Tran <i>et al.</i> , 2019).....	7
2. Morfologi aktinomisetes (Li <i>et al.</i> , 2016)	11
3. <i>Solid State Fermentation</i> Kulit Udang	14
4. KLT titik bawah bagian awal penotolan dan garis atas titik akhir plat silika..	15
5. Dialisis (Syahmani <i>et al.</i> , 2017)	18
6. Uji antibakteri metode MIC (<i>Minimum Inhibitory Concentration</i>) (Kadeřábková <i>et al.</i> , 2024)	20
7. Isolat peremajaan 18D36A2	29
8. Tampak dekat miselium dari kepala spora isolate	30
9. Inokulum pada hari ke 7	31
10. Fermentasi substrat kulit udang	31
11. KLT	32
12. Perbandingan Aktivitas unit spesifik, Aktivitas unit enzim, dan kadar protein hasil fermentasi pada substrat	35
13. Protein yang mengendap pada proses sentrifius	36
14. Hasil dialisis enzim	36
15. Diagram perbandingan hasil sesudah dan sebelum pemurnian enzim.....	37
16. Uji Antibakteri gram positif <i>Staphylococcus aureus</i>	39
17. Uji Antibakteri gram negatif <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	39

DAFTAR TABEL

	Halaman
1. Nilai Rf hasil KLT ekstrak kasar enzim	32
2. Kadar glukosamin hasil ekstrak kasar enzim	33
3. Kadar protein hasil ekstrak kasar enzim	34
4. Absorbansi standard glukosamin	48
5. Absorbansi standar BSA	49

I. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Indonesia merupakan salah satu negara penghasil udang terbesar di dunia, menempati posisi ketiga setelah negara-negara seperti Tiongkok dan India. Permintaan terhadap udang dan produk makanan laut lainnya terus meningkat secara signifikan, terutama di kawasan Asia, di mana sektor konsumsi makanan laut (*seafood*) mengalami pertumbuhan pesat dalam beberapa tahun terakhir. Hal ini telah mendorong terjadinya ledakan industri pengolahan makanan laut di seluruh dunia, dengan peningkatan produksi yang terus berlanjut. Pada tahun 2014, produksi udang Indonesia, baik dari perikanan tangkap maupun budidaya, mengalami peningkatan sebesar 1,62%, setara dengan 255 ribu ton. Udang yang diproduksi di Indonesia umumnya diekspor dalam bentuk beku untuk menjaga kualitas dan memperpanjang masa simpannya. Namun, di balik keberhasilan produksi dan ekspor udang ini, terdapat masalah yang harus dihadapi, yaitu limbah kulit udang. Diperkirakan sekitar 6 hingga 8 juta ton limbah kulit udang dihasilkan setiap tahunnya, yang terdiri dari kepala, cangkang, dan ekor udang. Limbah ini, yang menyumbang sekitar 45–60% dari berat total udang, biasanya dibuang dan dianggap tidak memiliki nilai (Soeka dan Triana, 2016).

Limbah kulit udang merupakan masalah lingkungan yang serius karena mudah membusuk dan dapat menimbulkan bau tidak sedap serta mencemari lingkungan jika tidak dikelola dengan baik. Selain itu, limbah ini juga berpotensi membahayakan kesehatan manusia jika dibiarkan menumpuk tanpa penanganan yang tepat. Padahal, kulit udang mengandung komponen yang bernilai tinggi, seperti protein, kalsium karbonat, dan kitin, yang sering kali terbuang percuma.

Pengolahan limbah kulit udang menjadi produk bernilai ekonomi, seperti kitin, kitosan, dan glukosamin, telah terbukti memberikan manfaat besar. Kitin dan kitosan merupakan bahan alami yang memiliki aplikasi luas di berbagai industri, termasuk pertanian, makanan, kosmetik, kesehatan, dan farmasi. Dalam industri pertanian, kitosan dapat digunakan sebagai bahan pupuk dan pestisida alami. Di sektor makanan, kitosan dimanfaatkan sebagai bahan pengawet alami dan penstabil makanan. Sementara itu, di bidang kosmetik, kitosan sering digunakan dalam produk perawatan kulit. Di dunia kesehatan dan farmasi, glukosamin yang dihasilkan dari kitin memiliki peran penting dalam suplemen kesehatan untuk menjaga kesehatan sendi dan tulang. Dengan memanfaatkan limbah hasil laut seperti kulit udang, Indonesia dapat mengurangi dampak negatif terhadap lingkungan, sekaligus meningkatkan nilai tambah dari produk-produk laut. Pengembangan industri pengolahan limbah udang ini juga berpotensi membuka peluang ekonomi baru dan mendorong pengembangan teknologi hijau dalam pengolahan hasil laut. Pada akhirnya, langkah ini tidak hanya berkontribusi pada keberlanjutan industri perikanan, tetapi juga menciptakan nilai ekonomi yang lebih besar bagi negara (Soeka dan Triana, 2016).

Enzim kitinase merupakan salah satu enzim yang mampu mendegradasi kitin, yaitu senyawa polisakarida utama penyusun eksoskeleton pada artropoda seperti udang, kepiting, dan serangga, serta dinding sel jamur. Kitinase bekerja dengan memecah ikatan glikosidik pada rantai kitin, menghasilkan oligomer-oligomer dan monomer N-asetilglukosamin (GlcNAc), yang dapat dimanfaatkan dalam berbagai industri. Pemanfaatan kulit udang sebagai sumber kitin menjadi sangat menarik karena limbah perikanan yang melimpah ini dapat diubah menjadi produk bernilai tinggi melalui proses degradasi kitin menjadi monomer-monomer yang memiliki potensi aplikasi luas, seperti dalam industri bioteknologi, medis, dan pertanian. Kitinase adalah enzim yang diproduksi secara alami oleh berbagai organisme, termasuk bakteri, cendawan, hewan, dan tumbuhan, sebagai bagian dari mekanisme pertahanan atau nutrisi. Di bidang medis dan farmasi, enzim ini digunakan dalam terapi penyakit yang melibatkan akumulasi kitin, serta dalam pengembangan obat-obatan antijamur dan antimikroba. Di industri makanan, kitinase digunakan untuk meningkatkan kualitas produk olahan dari bahan baku

hewan laut. Sementara itu, dalam pertanian, kitinase berperan sebagai agen pengendalian hayati untuk mengatasi patogen tanaman yang dinding selnya mengandung kitin. Permintaan enzim kitinase yang terus meningkat memacu upaya untuk menghasilkan enzim ini secara massal dengan harga yang terjangkau, stabilitas yang baik terhadap berbagai kondisi lingkungan, serta proses produksi yang efisien. Salah satu sumber enzim kitinase yang menjanjikan adalah mikroorganisme aktinomisetes, kelompok bakteri yang memiliki morfologi mirip cendawan. Aktinomisetes mampu mendegradasi kitin yang terdapat pada kulit udang melalui enzim kitinase, menjadikannya sumber enzim yang potensial dalam aplikasi industri. Enzim kitinase dari aktinomisetes ini dikenal memiliki aktivitas yang tinggi dan stabil, menjadikannya pilihan yang ideal untuk digunakan dalam skala besar. Dengan berkembangnya teknologi enzimatik, diharapkan proses isolasi dan pemurnian enzim kitinase dari mikroorganisme akan menjadi semakin efisien dan ekonomis, sehingga dapat memenuhi kebutuhan pasar yang terus meningkat. Permintaan akan enzim kitinase terutama berasal dari industri yang bergerak di bidang pengolahan limbah, pertanian, bioteknologi, serta industri makanan dan farmasi. Enzim ini memiliki potensi besar dalam berbagai aplikasi, seperti pemecahan kitin yang merupakan komponen utama pada eksoskeleton hewan laut seperti udang dan kepiting (Rawway *et al.*, 2018).

Salah satu kelompok mikroorganisme yang paling berperan dalam produksi enzim kitinase adalah aktinomisetes. Mikroorganisme ini dikenal memiliki kemampuan untuk mendegradasi kitin dengan bantuan enzim kitinase. Kitin yang didegradasi oleh enzim ini dapat diubah menjadi komponen yang lebih sederhana seperti N-asetilglukosamin, yang memiliki berbagai aplikasi dalam industri. Isolat aktinomisetes dengan kode 18D36A2 yang digunakan dalam penelitian ini merupakan jenis *Micrococcus sp.* Isolat ini bersumber dari biota laut hasil sampling di Perairan Banyuwedang, Buleleng, Bali pada tahun 2018 dengan koordinat 8°07'20.9"S 114°34'03.8"E berjenis tunikata yang belum diidentifikasi dan didepositkan sebagai koleksi UPA Laboratorium Terpadu Universitas Lampung. Isolat yang digunakan merupakan isolat unggul dari hasil skrining aktivitas kitinolitik pada penelitian sebelumnya. Isolat ini dipilih karena memiliki zona bening terbesar dari beberapa isolat yang lainnya. Limbah kulit udang sangat

penting sebagai sumber kitin yang dapat diolah menjadi produk bernilai tinggi. Produksi enzim kitinase dari aktinomisetes ini memiliki nilai strategis dalam upaya bioteknologi lingkungan. Dengan menggunakan enzim ini, limbah kulit udang yang biasanya menjadi masalah bagi lingkungan, dapat diurai menjadi produk yang lebih ramah lingkungan dan bahkan bernilai ekonomi. Sebagai contoh, N-asetilglukosamin yang dihasilkan dari degradasi kitin bisa digunakan dalam pembuatan suplemen kesehatan dan kosmetik, serta dalam pengembangan bahan baku bioplastik. Melalui proses yang ramah lingkungan ini, kita tidak hanya mengurangi pencemaran akibat akumulasi limbah kulit udang, tetapi juga meningkatkan nilai ekonomis dari limbah tersebut.

Penelitian ini menggunakan aktinomisetes 18D36A2 yang dikultivasi pada limbah kulit udang dengan metode Fermentasi Keadaan Padat (SSF) seperti yang dilakukan oleh (Setiawan *et al.*, 2021). Inkubasi berlangsung selama 7 hari pada suhu ruangan. Hasil kultivasi kemudian diekstraksi melalui maserasi menggunakan air suling. Analisis produk degradasi substrat kitin dilakukan dengan Kromatografi Lapis Tipis (KLT) menggunakan eluen yang terdiri dari amonia, isopropil alkohol, dan air suling untuk mengukur kadar glukosamin. Pengukuran kadar protein pada ekstrak kultivasi mengacu pada metode Lowry (Muyassaroh *et al.*, 2020). Pemurnian enzim kitinase dilakukan dengan mengacu pada El-Beltagi *et al.* (2022). Enzim diisolasi dengan penambahan ammonium sulfat dan didialisis menggunakan buffer fosfat (pH 7, 50 mM). Uji antibakteri dilakukan dengan metode MIC terhadap bakteri gram positif dan bakteri gram negatif mengacu pada Kadeřábková *et al.* (2024). Menurut El-Beltagi *et al.* (2022), enzim kitinase dari *Talaromyces funiculosus* CBS 129594 memiliki aktivitas antibakteri, dengan efektivitas yang lebih tinggi terhadap bakteri gram positif. Oleh karena itu, penelitian ini akan memproduksi enzim kitinase melalui SSF dan menguji aktivitas antibakteri dari enzim kitinase yang diperoleh dari aktinomisetes 18D36A2.

1.2 Tujuan Penelitian

Adapun tujuan dari penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Mendapatkan enzim kitinase dari isolat aktinomisetes 18D36A2.
2. Melakukan pemurnian enzim kitinase dari aktinomisetes 18D36A2.
3. Melakukan uji kemampuan enzim kitinase dalam mendegradasi substrat.
4. Melakukan uji aktivitas enzim kitinase sebagai antibakteri.

1.3 Manfaat Penelitian

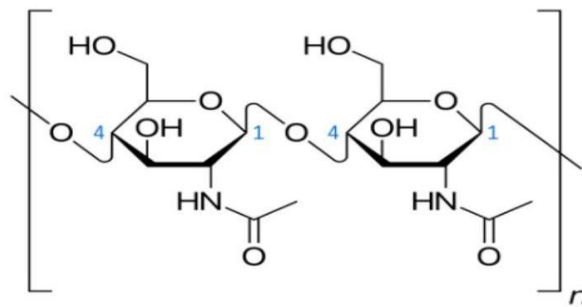
Manfaat penelitian ini adalah untuk memberikan informasi terkait optimalisasi budidaya dari limbah cangkang udang untuk menghasilkan enzim kitinase sebagai agen antibakteri.

II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Kitin dan Kulit Udang

Kitin merupakan polimer linier dari β -1, 4-N-Asetilglukosamin (GlcNAc). Kitin menjadi biopolimer kedua yang paling melimpah di bumi. Kitin banyak ditemukan di skeleton serangga, jamur, ragi, ganggang, kepiting, udang, dan lobster, dan di struktur internal invertebrata lainnya. Kitin adalah polimer alami berupa selulosa beramin dan berasetil (N-asetil glukosamin) yang jumlahnya cukup berlimpah di alam, merupakan senyawa ke dua terbesar setelah selulosa. Dikenal juga sebagai polimer organik konvensional dari laut. Banyak terdapat pada rangka atau skeleton, khususnya pada kulit udang, kepiting, rajungan (krustasea) dan juga terdapat pada dinding sel bakteri dan fungi (Arnold *et al.*, 2020). Kitin tidak larut dalam air, asam, basa dan pelarut organik tetapi larut dalam asam sulfat pekat panas dan asam format anhidrid. Rumus kimia kitin dapat ditulis $(C_8H_{13}O_5N)_n$. 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. Berdasarkan sumbernya, kitin dibagi menjadi tiga jenis, yaitu α , β dan γ . α -kitin adalah jenis yang paling melimpah, yang terdapat pada dinding sel jamur dan ragi, krill, lobster, kepiting, udang, dan kutikula serangga. α -kitin secara sistematis dapat diperoleh melalui rekristalisasi dari larutan kitin, biosintesis *in vitro* atau polimerisasi enzimatik karena stabilitas termodinamika yang tinggi dari isomorf ini. α -kitin memiliki ikatan antarmolekul kuat yang terdiri dari rantai antiparalel dari β -1,4 N-asetil-d-glukosamin

(GlcNAc). Kitin dapat dihasilkan melalui proses demineralisasi menggunakan alkali kuat dan asam. Proses ini menghasilkan limbah berupa air yang mengandung alkali dan protein dalam jumlah tinggi. Alternatif yang lebih ramah lingkungan adalah dengan melakukan biokonversi kulit udang ini menjadi beragam senyawa bioaktif seperti protease, kitinase, inhibitor α -glukosidase, eksopolisakarida, inhibitor tirosinase, atau kitin (Tran *et al.*, 2019).



Gambar 1. Kitin (Tran *et al.*, 2019)

Kitin merupakan sebuah polimer yang umumnya ditemukan dalam bentuk kristal mikrofibril pada struktur krustasea, serangga, serta berbagai organisme lain seperti jamur dan mikroorganisme merupakan komponen penting dalam struktur cangkang krustasea yang terdiri dari tiga lapisan, yakni epikutikula, eksokutikula, dan endokutikula. Kitin terutama terdapat dalam lapisan terdalam (endokutikula), dikelilingi oleh lapisan protein, sementara lapisan tengah (eksokutikula) mengandung campuran kitin dan mineral, dan lapisan terluar (epikutikula) terdiri dari protein dan mineral. Struktur kitin yang sangat teratur dan kuat, berkat adanya ikatan hidrogen intra dan antarmolekuler, berperan penting dalam ketahanan kitin terhadap kelarutan (Sharma *et al.*, 2013). Namun demikian, transformasi kitin menjadi monomer yang lebih sederhana masih dapat dilakukan melalui beberapa metode umum, termasuk hidrolisis enzimatis dengan enzim seperti selulase, kitinase, atau kitosanase, serta hidrolisis kimia menggunakan pelarut seperti HCl, H₂SO₄, atau H₃PO₄ dengan pemanasan. Monomer gula amino yang dihasilkan seperti GlcNAc dan GlcNH atau kitoooligomer memiliki beragam aplikasi dalam berbagai bidang seperti biomedis, farmasi, dan industri makanan (Xia *et al.*, 2001).

Kulit udang merupakan salah satu sumber yang potensial untuk digunakan dalam pembuatan kitin dan kitosan, yaitu suatu biopolimer yang secara komersil berpotensi di bidang industri. Kulit udang adalah bagian dari udang yang biasanya dianggap sebagai limbah dan tidak memiliki nilai ekonomi yang signifikan. Namun, kulit udang memiliki beberapa manfaat yang dapat diperoleh melalui pengolahan dan pemanfaatannya. Kitin yang terdapat dalam cangkang udang, hadir sebagai mukopolisakarida yang berikatan dengan berbagai garam anorganik, terutama kalsium karbonat (CaCO_3), protein, dan lipida, termasuk pigmen-pigmen. Kulit udang memiliki potensi besar sebagai bahan antimikroba karena mengandung enzim lisozim dan gugus aminopolisakarida yang mampu menghambat pertumbuhan mikroba. Efektivitas daya hambat kitosan terhadap bakteri bergantung pada konsentrasi pelarutan kitosan. Kemampuan untuk menekan pertumbuhan bakteri disebabkan oleh sifat polikation bermuatan positif kitosan yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri dan kapang (Nurhikmawati *et al.*, 2014).

Kulit udang merupakan salah satu jenis limbah yang dihasilkan dari proses pengeksporan udang, karena selama proses ini udang perlu dibersihkan dari kulit dan kepala. Namun, proses pengeksporan ini juga dapat menimbulkan masalah baru, di mana limbah kulit udang dapat memiliki dampak negatif pada lingkungan. Kulit udang tidak larut dalam air dan dapat mengotori lingkungan, serta menghasilkan aroma busuk akibat dekomposisi limbah tersebut. Komposisi kulit udang biasanya terdiri dari protein (25-40%), kalsium karbonat (45-50%), dan kitin (15-20%), meskipun persentase tersebut dapat bervariasi tergantung pada jenis udang yang diolah (Foucher *et al.*, 2009).

Struktur dalam kerangka kulit udang mencakup jenis struktur bouligand, yang terdiri dari lapisan-lapisan yang berputar. Susunan komposit hierarkis pada kutikula ini kompleks, terdiri dari tumpukan lapisan serat planar sejajar yang berputar, dengan rantai panjang polisakarida α -kitin dan protein yang terikat membentuk serat-serat nanometer berupa kitin-protein, serta mineralisasi pada skala *nano* dengan kristal mineral (Suryawanshi dan Eswari, 2022).

2.2 Aktinomisetes

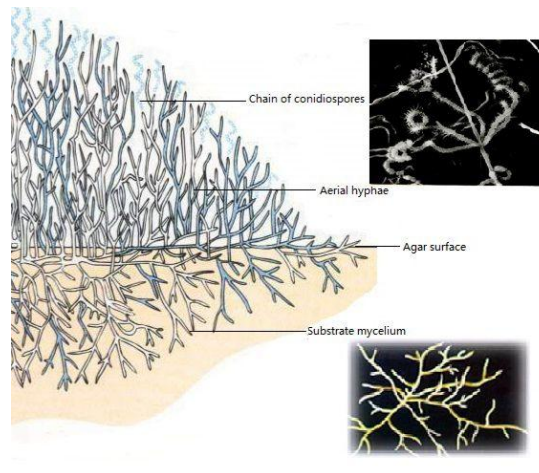
Habitat laut juga merupakan sumber yang kaya dari komunitas mikroba yang beragam dan sebagian besar masih jarang ditemukan termasuk *actinomycetes* (*actinobacteria*). Aktinomisetes adalah bakteri gram positif yang tumbuh sebagai filamen sel yang bercabang dan hidup dari berbagai bahan organik yang membusuk (Cumsille *et al.*, 2017). Aktinomisetes merupakan bentuk peralihan antara bakteri dan fungi. Sejumlah varietas langka, termasuk genus dan famili baru, dari aktinomisetes telah berhasil diisolasi dari berbagai lingkungan laut, termasuk sedimen di pesisir, zona pasang surut dan lautan dalam, serta dari mikroorganisme laut seperti spons, karang, dan ascidian, selain itu juga dari air laut dan hutan *mangrove*. Aktinomisetes secara umum hampir menyerupai jamur karena mempunyai karakter percabangan yang luas, aktinomisetes juga membentuk miselium udara dan konidia, dan pertumbuhan aktinomisetes pada kultur cair jarang menghasilkan kekeruhan seperti umumnya bakteri uniseluler, tetapi membentuk pelet-pelet seperti fungi (Subramani and Aalbersberg, 2013). Beberapa anggota dari filum *actinobacteria* ini memproduksi metabolit sekunder yang berperan penting sebagai sumber senyawa bioaktif yang menjanjikan, terutama dalam kategori antibiotik, antimikroba, dan enzim. Peran signifikan dari *actinobacteria* adalah dalam menghasilkan produk alami yang menunjukkan aktivitas biologis serta dalam proses daur ulang yang memecah limbah di lingkungan (Qin *et al.*, 2011).

Aktinomisetes adalah mikroorganisme yang pertama kali ditemukan oleh Ferdinand Cohn pada tahun 1875 ketika mengamati organisme berfilamen dari saluran lakrimal. Nama aktinomisetes berasal dari bahasa Yunani yang berarti “jamur cahaya (*ray fungus*)”. Mikroorganisme ini memiliki ciri khas berupa filamen yang mirip dengan hifa pada jamur, meskipun sebenarnya mereka adalah bakteri. Aktinomisetes dapat ditemukan dalam berbagai habitat, baik dalam bentuk spora maupun bentuk vegetatif. Mikroorganisme ini tersebar luas di tanah, lingkungan perairan, serasah, kompos, dan sisa makanan. Peran aktinomisetes dalam ekosistem sangat penting, terutama dalam dekomposisi bahan organik dan siklus nutrisi. Aktinomisetes membantu dalam pemecahan kompleks molekul

organik menjadi bentuk yang lebih sederhana yang dapat diserap oleh tanaman dan organisme lain. Selain itu, aktinomisetes mampu mensintesis antibiotik yang digunakan untuk mengobati berbagai infeksi bakteri pada manusia dan hewan. Produksi senyawa-senyawa baru yang dapat bermanfaat dalam pengobatan, industri, dan pertanian. Aktinomisetes juga memainkan peran penting dalam pengembangan teknologi ramah lingkungan, seperti bioremediasi, yang menggunakan mikroorganisme untuk membersihkan polutan dari lingkungan (Sowani *et al.*, 2018).

Aktinomisetes merupakan jenis mikroba yang unik karena memiliki sifat peralihan antara fungi dan bakteri. Hal ini dikarenakan aktinomisetes memiliki dinding sel seperti bakteri dan spora seperti fungi. Koloni aktinomisetes dapat terlihat jelas karena memiliki warna yang khas, selain itu, aktinomisetes dapat diidentifikasi dari sifat morfologinya yang memiliki miselium dan rantai spora yang jelas. Menurut Li dan koleganya dalam artikel jurnalnya, aktinomisetes adalah bakteri dari filum gram positif dengan kandungan G (guanine) - C (sitosin) yang tinggi. Aktinomisetes memiliki bentuk morfologi yang sangat beragam, didasarkan pada derajat filamentous yang mirip dengan fungi. Pada aktinomisetes terdapat miselium radial yang berkembang dengan baik. Miselium radial ini dapat terlihat sebagai miselium substrat yang tumbuh di permukaan medium dan miselium aerial yang tumbuh ke arah udara. Dalam ekosistem, aktinomisetes memainkan peran penting dalam siklus nutrient yang membantu dalam dekomposisi bahan organik kompleks, seperti selulosa dan kitin, menjadi senyawa yang lebih sederhana yang dapat digunakan oleh organisme lain. Proses ini tidak hanya memperbaiki kesuburan tanah tetapi juga memfasilitasi pertumbuhan tanaman dengan meningkatkan ketersediaan nutrien. Aktinomisetes sering ditemukan dalam tanah yang kaya bahan organik, seperti kompos dan humus, di mana mereka berkontribusi terhadap kesehatan tanah dan produktivitas pertanian. Dengan semua karakteristik dan kemampuan unik ini, aktinomisetes merupakan kelompok mikroorganisme yang sangat penting dalam berbagai bidang, termasuk kedokteran, pertanian, dan lingkungan. Penelitian lebih lanjut tentang aktinomisetes dapat membuka potensi baru untuk aplikasi dalam pengembangan

obat baru, teknik bioremediasi yang lebih efektif, dan peningkatan produktivitas pertanian.



Gambar 2. Morfologi aktinomisetes (Li *et al.*, 2016)

Identifikasi morfologi dapat dilakukan dengan mengamati miselium dari isolat. Miselium ini dapat dilihat dari *cover slip* yang akan menempel pada kaca dan terlihat di bawah mikroskop cahaya. Miselium yang terlihat melalui mikroskop cahaya adalah miselium aerial (Li *et al.*, 2016).

Skrining dan isolasi aktinomisetes yang memiliki sifat kitinolitik dapat dilakukan pada media agar dengan media koloid kitin 2%, dengan kultur yang diinkubasi pada suhu 28°C selama 7 hari. Isolat yang digunakan memiliki koloni yang tampak jelas dan memiliki morfologi yang terlihat jelas. Aktivitas kitinolitik dari mikroba dapat diamati dengan baik pada aktinomisetes dan streptomises, yang mampu mendegradasi dinding sel kitin dari fungi patogen serta dalam degradasi sampah kitin (Brzezinska *et al.*, 2013).

2.3 Enzim Kitinase

Kitinase adalah enzim yang menghidrolisis senyawa kitin pada β -1,4-N-asetil-glukosamin menjadi monomer N-asetil-D-glukosamin yang terdistribusi di alam. Enzim kitinase dihasilkan oleh mikroorganisme kitinolitik yang sebagian besar

terdapat di lingkungan tanah dan air. Karakteristik enzim kitinase bervariasi tergantung pada jenis mikroorganisme dan keberadaan substrat kitin. Berat molekul enzim kitinase dari *Streptomyces sp.* strain ANU 6277 sekitar 45 kDa dan dari *Bacillus sp.* D2 sekitar 30 kDa. Sebagian besar kitinase lebih spesifik terhadap substrat koloidal kitin. Aktivitas optimum enzim kitinase berada pada kisaran suhu 30-40°C dan pH 5-7. Kestabilan enzim kitinase berada pada kisaran suhu 30-45°C dan pH 4-8. Enzim kitinase telah banyak digunakan untuk pengolahan limbah dan agen biokontrol hama tanaman. Hasil hidrolisis kitinase dapat digunakan sebagai anti tumor, suplemen, mengontrol kadar gula dalam darah, bahan dasar pembuatan benang operasi, dan anti *inflammatory* (Gomaa, 2012).

Enzim kitinase memiliki kemampuan untuk menghidrolisa senyawa polimer kitin menjadi kitin oligosakarida atau monomer N-asetil glukosamin dengan cara menghidrolisis kitin secara acak pada ikatan glikosidik. Kitin adalah polimer alami yang ditemukan dalam exoskeleton serangga, krustasea, serta dinding sel jamur, dan merupakan sumber karbon dan nitrogen yang melimpah di alam. Ada tiga jenis enzim kitinase yang dibedakan berdasarkan cara kerjanya dalam mendegradasi kitin, yaitu eksokitinase, endokitinase, dan N-asetil-glukosaminidase. Endokitinase, di sisi lain, memotong polimer kitin secara acak di sepanjang rantai, menghasilkan berbagai ukuran dimer, trimer, tetramer, dan oligomer gula. Enzim ini berfungsi untuk memecah kitin menjadi potongan-potongan lebih kecil yang kemudian bisa diuraikan lebih lanjut oleh enzim-enzim lain. N-asetil-glukosaminidase adalah jenis ketiga yang bekerja dengan memutuskan ikatan diasetilkitobiosa untuk menghasilkan N-asetil-glukosamin. Enzim ini berperan penting dalam tahap akhir degradasi kitin, memastikan bahwa hasil akhirnya adalah monomer N-asetil-glukosamin yang dapat digunakan oleh organisme sebagai sumber energi atau bahan baku untuk biosintesis. Kitinase memiliki banyak aplikasi dalam berbagai industri, seperti pengolahan limbah, pertanian, dan bioteknologi. Dalam pengolahan limbah, kitinase membantu dalam degradasi material organik, sedangkan dalam pertanian, enzim ini digunakan untuk mengendalikan hama yang memiliki exoskeleton kitin. Dalam bioteknologi,

produk dari aktivitas kitinase digunakan dalam produksi kosmetik, farmasi, dan suplemen makanan (Palangatan Maggadani dan Setyahadi, 2017).

Kitinase memiliki kemampuan yang sangat baik untuk mendegradasi kitin yang berasal dari limbah kulit udang. Enzim ini bekerja optimal pada suhu antara 40°-45°C dan pH 7.0. Aktivitas pemurnian enzim kitinase dapat distabilkan oleh ion Mg^{2+} , sementara ion Hg^{2+} dan Pb^{2+} dapat menghambat aktivitasnya. Kitinase juga dapat menghambat pertumbuhan jamur fitopatogen seperti *Fusarium solani* dan *Alternaria alternata*. Bahan yang sering digunakan untuk produksi kitinase termasuk bubuk kulit udang dan bubuk kitin, karena bahan-bahan ini menyediakan sumber karbon dan nitrogen yang tepat untuk pertumbuhan enzim. Meskipun kulit udang dan kitin sangat efektif untuk produksi kitinase, kitosan kurang efektif untuk tujuan ini. Selain itu, terdapat dua kategori utama untuk enzim kitinase: endokitinase dan eksokitinase. Endokitinase adalah enzim yang memecah rantai kitin secara acak pada situs internal, menghasilkan oligomer GlcNAc (N-asetilglukosamin) dengan berat molekul rendah, seperti kitotetraosa dan kitotriososa. Sebaliknya, eksokitinase memotong rantai kitin dari ujung terminal (Brzezinska *et al.*, 2013).

2.4 Solid State Fermentation (SSF)

Fermentasi Padat (*Solid State Fermentation/SSF*) didefinisikan sebagai proses pertumbuhan mikroorganisme pada substrat yang lembab dan tidak larut dengan kadar air yang rendah. SSF dianggap sebagai metode fermentasi yang lebih menguntungkan dibandingkan dengan Fermentasi Terendam (*Submerged Fermentation/SmF*) atau fermentasi cair (Nigam and Pandey, 2009). Keunggulan metode SSF terletak pada beberapa faktor, antara lain: lebih ramah lingkungan, memiliki produktivitas fermentasi yang lebih tinggi, menghasilkan konsentrasi produk dan stabilitas yang lebih tinggi, mengurangi penekanan katabolik, memungkinkan penanaman mikroorganisme khusus pada substrat yang tidak larut, serta membutuhkan tingkat sterilisasi yang lebih rendah karena aktivitas air yang digunakan sangat rendah .



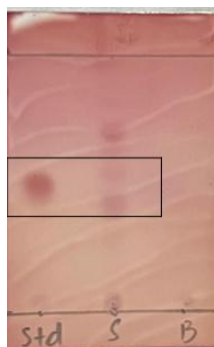
Gambar 3. *Solid State Fermentation* Kulit Udang

Fermentasi Padat (*Solid State Fermentation*) merupakan metode fermentasi di mana mikroorganisme tumbuh dan berkembang pada material padat tanpa adanya cairan bebas. Fermentasi ini membutuhkan kelembapan agar mikroba dapat tumbuh, dengan kondisi kelembapan ini diserap atau terikat dalam kompleks dengan matriks padat. Salah satu aplikasi paling penting dari metode ini adalah produksi enzim (Bhargava *et al.*, 2008). Fermentasi padat dilakukan pada bahan yang tidak larut yang berfungsi sebagai sumber nutrisi dan bahan pendukung fisik tanpa keberadaan cairan bebas. Metode fermentasi padat (*Solid State Fermentation/SSF*) telah diidentifikasi sebagai alternatif yang lebih unggul dibandingkan fermentasi terendam (*Submerged Fermentation/SmF*) dalam produksi mikroba penghasil kitinase, terutama saat menggunakan limbah yang murah dan mudah didapat seperti limbah kulit udang (Couto and Sanromán, 2006).

Solid State Fermentation atau SSF adalah metode fermentasi yang menggunakan media padat (baik yang dapat terurai secara hayati maupun yang bersifat inert) sebagai matriks untuk pertumbuhan mikroorganisme. Metode ini telah terbukti efektif sebagai salah satu cara untuk produksi enzim. SSF sangat cocok digunakan dalam fermentasi kitin karena kitin umumnya tersedia dalam bentuk padat, yang memudahkan proses fermentasi (Stoykov *et al.*, 2015).

2.5 Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

KLT merupakan metode yang digunakan untuk mengidentifikasi keberadaan suatu senyawa dan menentukan kemurniannya. Pada KLT pemisahannya didasarkan oleh perbedaan pengikatan senyawa terlarut dengan fasa diam dan fasa geraknya. Pada pemisahan ini digunakan silika gel sebagai fasa diam. Pada KLT perbedaannya dapat dilihat dari kepolaran analitnya, semakin polar analitnya maka semakin besar interaksinya dengan silika gel sehingga dapat menggeser fasa gerak dari area pengikat. Semakin tidak polar analit maka kedudukannya dapat lebih tinggi dari plat silika gel yang akan mempengaruhi nilai R_f (*retardation factor*). KLT didasarkan dengan distribusi dari fasa diamnya yaitu plat tipis yang diselimuti aluminium oksida ataupun silika gel padat dan fasa geraknya yaitu pelarut eluen. Pelarut yang akan digunakan maupun analit yang dipilih biasanya sesuai dengan karakteristik analit yang akan ditotol pada bagian bawah plat silika. Nilai R_f merupakan perbandingan jarak yang ditempuh eluen dan fase gerak pada plat KLT. Nilai R_f digunakan sebagai nilai perbandingan relatif antar sampel. Senyawa yang memiliki R_f yang lebih besar berarti memiliki kepolaran yang rendah, begitu juga sebaliknya (Forestryana dan Arnida, 2020).



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

Umumnya nilai R_f selalu sama, kecuali analit yang digunakan melalui tahapan berbeda. Nilai R_f juga dapat dipengaruhi oleh daya absorben silika, suhu sekitar, ketebalan plat, kemurnian pelarut eluen, dan massa sampel.

KLT ini digunakan untuk mengidentifikasi D-glukosamin, dengan standar D-Glukosamin 5µl dan fase geraknya yaitu propanol, air dan 25% ammonia dengan perbandingan 7:2:1. Noda pada silika akan muncul dengan divisualisasi ninhydrin yang dilarutkan pada etanol PA.

2.6 Isolasi dan Pemurnian Protein

Pemurnian enzim kitinase merupakan proses penting untuk mendapatkan enzim yang memiliki kemurnian tinggi dan aktivitas spesifik yang optimal. Kitinase adalah enzim yang mengkatalisis degradasi kitin, suatu polimer yang banyak ditemukan dalam eksoskeleton serangga, dinding sel jamur, dan beberapa invertebrata laut. Proses pemurnian kitinase biasanya melibatkan beberapa tahapan, seperti pemilihan bahan awal, metode ekstraksi, dan ekstraksi media. Setiap tahap pemurnian bertujuan untuk menghilangkan kontaminan dan meningkatkan kemurnian enzim, sehingga diperoleh kitinase dengan aktivitas spesifik yang lebih tinggi. Enzim kitinase sendiri merupakan enzim yang mampu menguraikan kitin, suatu polisakarida yang ditemukan di dinding sel jamur, eksoskeleton serangga, dan cangkang krustasea (Atalla *et al.*, 2020).

Proses pemurnian protein dapat dilakukan melalui beberapa tahapan yang melibatkan berbagai teknik, salah satunya adalah teknik presipitasi dengan menggunakan ammonium sulfat. Pada tahap ini, ekstrak kasar enzim akan menjalani fraksinasi menggunakan ammonium sulfat dengan konsentrasi tertentu untuk mengendapkan protein yang diinginkan. Fraksinasi ini dilakukan dengan cara menyentrifugasi ekstrak kasar yang telah dicampur dengan ammonium sulfat, sehingga protein yang telah mengendap dapat dipisahkan dari supernatan.

Setelah fraksinasi, supernatan yang mengandung enzim yang diinginkan kemudian akan menjalani proses dialisis untuk menghilangkan sisa-sisa ammonium sulfat. Langkah berikutnya adalah pemurnian lebih lanjut melalui kromatografi kolom, yang memungkinkan pemisahan enzim berdasarkan sifat-sifat fisik dan kimianya. Penggunaan garam ammonium sulfat dalam pengendapan

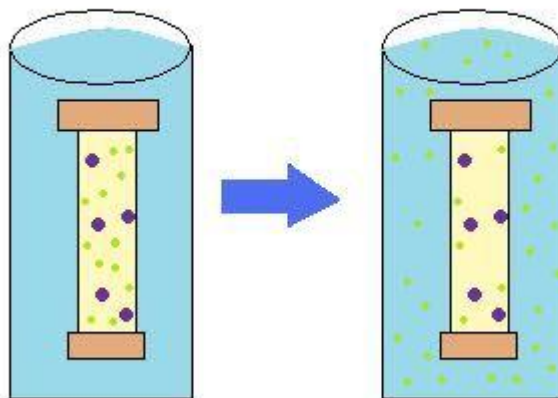
enzim merupakan metode yang sangat umum dalam pemurnian protein. Hal ini disebabkan oleh beberapa keunggulan ammonium sulfat, seperti kelarutannya yang tinggi, kemampuan menjaga pH dalam kondisi moderat, harga yang relatif murah, serta sifatnya yang tidak toksik dan tidak merusak struktur maupun aktivitas enzim (Atalla *et al.*, 2020).

Pengendapan enzim adalah salah satu teknik pemurnian protein yang umum digunakan untuk memisahkan enzim dari campuran protein lainnya dalam suatu ekstrak kasar. Metode ini didasarkan pada prinsip bahwa protein, termasuk enzim, memiliki kelarutan yang terbatas dalam larutan tertentu dan dapat diendapkan dengan menambahkan agen presipitasi seperti garam atau pelarut organik. Salah satu agen presipitasi yang paling umum digunakan adalah ammonium sulfat, karena kemampuannya untuk secara selektif mengendapkan protein pada konsentrasi tertentu tanpa merusak struktur atau aktivitas enzim.

Pengendapan dengan ammonium sulfat dilakukan dengan menambahkan garam ini secara bertahap ke dalam ekstrak kasar hingga mencapai konsentrasi tertentu, yang menyebabkan protein dan enzim tertentu mengendap. Setelah itu, campuran disentrifugasi untuk memisahkan endapan dari supernatan. Endapan yang diperoleh kemudian dapat dilarutkan kembali dan dimurnikan lebih lanjut dengan teknik lain, seperti dialisis atau kromatografi. Salah satu keuntungan dari metode pengendapan ini adalah kemampuannya untuk meningkatkan kemurnian enzim secara signifikan dengan biaya yang relatif rendah. Selain itu, pengendapan dengan ammonium sulfat tidak hanya efektif dalam mengkonsentrasikan enzim tetapi juga membantu menstabilkan enzim selama proses pemurnian (Engel *et al.*, 2019).

Dialisis adalah salah satu teknik yang digunakan dalam proses pemurnian protein dan enzim untuk menghilangkan garam, ion kecil, atau molekul lain yang larut dalam larutan. Proses ini bekerja berdasarkan prinsip difusi melalui membran semipermeabel, yang memungkinkan molekul kecil seperti ion dan garam keluar dari larutan, sementara molekul yang lebih besar, seperti protein dan enzim, tetap berada di dalam kantong dialisis. Dalam konteks pemurnian enzim, dialisis biasanya dilakukan setelah tahap presipitasi atau fraksinasi menggunakan agen

presipitasi seperti ammonium sulfat. Tujuannya adalah untuk menghilangkan sisa-sisa garam atau agen presipitasi yang mungkin masih ada dalam larutan enzim, yang dapat mempengaruhi aktivitas enzim atau proses pemurnian lebih lanjut. Dialisis dilakukan dengan menempatkan larutan enzim dalam kantong dialisis, yang kemudian direndam dalam buffer dengan volume besar. Molekul kecil seperti garam akan berdifusi keluar melalui membran, sementara enzim tetap terperangkap di dalam kantong. Keuntungan utama dari dialisis adalah kemampuannya untuk membersihkan larutan enzim dari kontaminan kecil tanpa menyebabkan denaturasi atau kehilangan aktivitas enzim. Namun, proses ini bisa memakan waktu lama dan membutuhkan perhatian terhadap kondisi optimal, seperti pH dan suhu, untuk menjaga stabilitas enzim.



Gambar 5. Dialisis (Syahmani *et al.*, 2017)

Pemurnian protein lebih lanjut sering dilakukan melalui teknik kromatografi kolom, yang merupakan salah satu metode paling efektif dan luas digunakan dalam pemisahan dan pemurnian protein. Kromatografi kolom bekerja dengan memisahkan protein berdasarkan berbagai sifat fisikokimia, seperti ukuran, muatan, hidrofobisitas, dan afinitas spesifik terhadap ligan tertentu. Setelah protein diekstraksi dan menjalani langkah-langkah awal seperti presipitasi dan dialisis, protein yang masih mengandung campuran akan dimurnikan lebih lanjut menggunakan kromatografi kolom. Larutan protein dilewatkan melalui kolom yang diisi dengan media kromatografi yang sesuai. Selama larutan melewati

kolom, protein-protein yang ada akan berinteraksi dengan media kolom sesuai dengan sifatnya, menyebabkan mereka terpisah satu sama lain dan keluar dari kolom pada waktu yang berbeda, memungkinkan pengumpulan fraksi murni (Syahmani *et al.*, 2017).

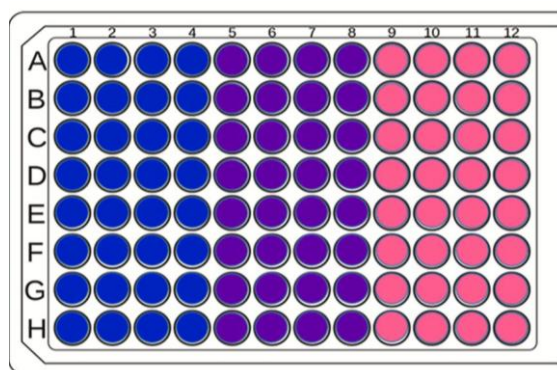
2.7 Aktivitas Anti Mikroba Enzim Kitinase

Enzim kitinase adalah enzim yang berperan dalam menghidrolisis kitin, sebuah polisakarida yang terdapat dalam eksoskeleton serangga, dinding sel jamur, dan beberapa invertebrata laut. Salah satu sifat penting dari kitinase adalah kemampuannya untuk menunjukkan aktivitas antimikroba, terutama terhadap patogen yang mengandung kitin dalam strukturnya, seperti jamur dan beberapa bakteri. Aktivitas antimikroba enzim kitinase terutama disebabkan oleh kemampuannya untuk menguraikan kitin, yang merupakan komponen utama dinding sel jamur dan eksoskeleton serangga. Dengan memecah kitin, kitinase dapat merusak integritas dinding sel patogen, yang pada akhirnya menyebabkan lisis sel dan kematian mikroorganisme. Selain itu, produk degradasi kitin seperti chitooligosaccharides juga dapat memiliki efek antimikroba dengan menghambat pertumbuhan dan proliferasi mikroorganisme. Enzim kitinase telah terbukti efektif dalam melawan berbagai patogen, termasuk jamur yang menyebabkan penyakit tanaman seperti *Fusarium*, *Aspergillus*, dan *Candida*. Selain itu, kitinase juga telah diuji dalam aplikasi biomedis untuk mengendalikan infeksi jamur pada manusia, serta sebagai agen biofungisida dalam pertanian (Palanggatan Maggadani dan Setyahadi, 2017).

2.8 Uji antibakteri metode MIC (*Minimum Inhibitory Concentration*)

Uji antibakteri dengan metode *Minimum Inhibitory Concentration* (MIC) merupakan salah satu metode kuantitatif yang digunakan untuk menentukan konsentrasi terendah suatu agen antimikroba yang masih efektif menghambat

pertumbuhan bakteri. Metode ini umumnya dilakukan menggunakan mikrotiter plate 96 sumur dengan media pertumbuhan cair, seperti *Tryptic Soy Broth* (TSB), dan suspensi bakteri uji yang telah distandarkan. MIC dinilai berdasarkan kejernihan media setelah inkubasi; media yang tetap jernih menandakan tidak adanya pertumbuhan bakteri, sehingga agen antimikroba yang ditambahkan masih efektif pada konsentrasi tersebut. Teknik ini banyak digunakan karena sensitif, relatif sederhana, dan memungkinkan pengujian berbagai konsentrasi secara paralel dalam jumlah kecil. Uji MIC tidak hanya penting dalam mengevaluasi efektivitas antibiotik sintetis, tetapi juga dalam menilai potensi antibakteri dari senyawa alami, seperti enzim, ekstrak tanaman, maupun senyawa hasil rekayasa bioteknologi. Metode ini juga berperan penting dalam penelitian resistensi antibiotik serta pengembangan terapi alternatif terhadap infeksi bakteri (Kadeřábková *et al.*, 2024).



Gambar 6. Uji antibakteri metode MIC (*Minimum Inhibitory Concentration*) (Kadeřábková *et al.*, 2024)

III. METODELOGI PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada November 2024 sampai Mei 2025 di UPA Laboratorium Terpadu 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 Imager A1 Fluorescence*, batang pengaduk, mikropipet, pinset, gunting, *cutter*, *loop ose*, oven, pembakar spiritus, tabung *ependorf*, pipa kapiler, *well plate* 96, spatula logam, karet gelang, spidol, seperangkat alat Kromatografi Lapis Tipis (KLT) dengan pelat aluminium *silica gel* DC kiesel 60 F254 dan Spektrofotometri Uv-Vis *Thermo fisher scientific*.

Bahan-bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah antara lain akuades, *artificial sea water*, alkohol medis, agar-agar, koloid kitin, etanol *proanalyst* (PA), *isopropyl* alkohol (IPA), kulit udang, isolat aktinomisetes 18D36A2, *ninhydrin* (*ninhydrin* dalam pelarut EtOH), ammonium sulfat Merck (*grade* teknis), larutan BaCl₂, buffer fosfat (pH 7 dan 50 mM), dan Ciprofloxacin.

3.3 Prosedur Penelitian

3.3.1 Pembuatan Media

Media yang digunakan pada penelitian yaitu berupa media agar koloid kitin dalam peremajaan isolat aktinomisetes 18D36A2, MHA pada peremajaan bakteri patogen, dan TSB digunakan dalam inokulum bakteri patogen.

3.3.1.1 *Muller-Hinton Agar (MHA)*

Pembuatan media Mueller Hinton Agar (MHA) dilakukan dengan menimbang sebanyak 1,5 gram serbuk MHA dan melarutkannya ke dalam 50 mL akuades menggunakan gelas ukur bersih. Campuran ini kemudian diaduk secara merata hingga membentuk larutan yang homogen tanpa adanya endapan atau gumpalan. Setelah larutan menjadi homogen, proses sterilisasi dilakukan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit guna memastikan kesterilan media dari kemungkinan kontaminasi mikroorganisme (Mustarichie *et al.*, 2020). Media MHA yang telah steril kemudian digunakan dalam proses peremajaan bakteri patogen untuk memperoleh kultur dalam kondisi pertumbuhan aktif yang optimal sebelum dilakukan tahap pengujian lebih lanjut di laboratorium.

3.3.1.2 *Tryptic Soy Broth (TSB)*

Pembuatan media *Tryptic Soy Broth* (TSB) dilakukan berdasarkan prosedur yang telah dimodifikasi dari Laila *et al.* (2023). Sebanyak 1,5 gram serbuk TSB dilarutkan dalam 50 mL akuades untuk memperoleh larutan TSB 3% (b/v). Setelah tercampur secara homogen, larutan tersebut kemudian disterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit. Media TSB yang telah disterilkan ini digunakan sebagai medium pertumbuhan awal (inokulum) bagi

bakteri patogen yang akan digunakan dalam uji daya hambat antibakteri metode MIC.

3.3.2 Peremajaan Isolat 18D36A2

Aktinomisetes yang digunakan berasal dari deposit UPA Laboratorium Terpadu yang telah melewati isolasi dari organisme laut meliputi spong dan makroalga yang berasal dari Bali di perairan Singaraja, Buleleng (8°07'07.6"LS 114°33'38.9"BT) kode isolat 18D36A2 isolat yang diremajakan pada media koloid kitin 1% pada media agar secara selektif untuk menumbuhkan aktinomisetes dengan komposisi 1% koloid kitin dan 2% agar (Brzezinska *et al.*, 2013). Media dilarutkan dengan pelarut air laut buatan 100ml dengan 1 gram koloid kitin dan 2 gram agar dalam Erlenmeyer yang ditutup dengan sumbat kasa dan dimasukkan ke dalam plastik tahan panas. Kemudian, larutan media agar tersebut diautoclave selama 20 menit dengan temperatur 121°C. Media disterilkan di dalam *Laminar Air Flow* (LAF), cawan petri sebagai wadah media sebelumnya disterilkan melalui penyemprotan alkohol dan iradiasi UV dalam LAF selama 15 menit. Media panas dituang ke dalam cawan petri dan diiradiasi dengan UV sampai media menjadi padat. Isolat digores pada media agar dan diinkubasi selama 7 hari pada suhu ruangan.

3.3.3 Identifikasi Isolat 18D36A2

Identifikasi dilakukan 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 7 hari. Metode ini menggunakan mikroskop cahaya axio Zeiss Al, *cover slip* yang telah diinkubasi 7 hari akan digabung dengan kaca preparat. Identifikasi morfologi dengan mencocokkan bentuk spora pada perbesaran mikroskop 400x.

3.3.4 Kultivasi Isolat 18D36A2 Secara *Solid State Fermentation* (SSF)

Kultivasi SSF dilakukan sesuai pada kulit udang kering yang sudah digiling tanpa demineralisasi dan deproteinasi, kulit udang diratakan pada permukaan erlenmeyer dan dituang inokulum sebanyak 10ml dan dikultivasi selama 7 hari dan diambil hasil kultivasi pada hari ke-7. Hasil kultivasi diambil dengan merendam kulit udang terkultivasi dengan 250ml akuades steril selama 1 jam. Hasil rendaman disaring dan disimpan dalam *refrigerator* (Setiawan *et al.*, 2021). Kultivasi dilakukan perhitungan kadar dari protein, kitinase, dan glukosamin.

3.3.5 Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Identifikasi D-glukosamin dilakukan dengan metode Kromatografi Lapis Tipis (KLT) yang mana hasil kultivasi dibersihkan dari pengotor dengan sentrifius selama 60 detik diambil filtrat dan dibuang endapan sebagai pengotor. Sentrifius lagi untuk mendapatkan endapan D-glukosamin, disentrifius filtrat dan etanol proanalyr (PA) dengan rasio 1: 1 dengan volume total 1000 mikroliter. Etanol PA dipisahkan dari endapan setelah disentrifius 60 detik. Endapan dilarutkan dalam akuades 200 mikroliter dan dibiarkan homogen, larutan siap ditotol diatas plat silika. Larutan ditotol diatas plat silika dengan pipa kapiler dengan hati-hati. Plat sudah tertotol dimasukan ke dalam larutan isopropil alkohol (IPA), ammonia, dan akuades dengan perbandingan rasio 7:3:1 sebagai fase geraknya didalam chamber sampai tanda batas pada plat silika. Plat silika direndam dalam ninhidrin, setelah kering dapat terlihat noda pada plat silika yang mengindikasikan kemunculan D-glukosamin.

3.3.6 Karakterisasi Aktivitas Enzim Kitinase

3.3.6.1 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 dimasukkan ke dalam tabung reaksi ditambahkan 1 mL larutan koloid kitin 1% dihomogenkan dan diinkubasi dalam *waterbath* dengan suhu 40°C selama 30 menit. Reagen DNS 1 mL ditambahkan ke dalam tabung ukur setelah enzim kasar diinkubasi, dan dididihkan 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 μmol glukosamin per menit.

3.3.6.2 Karakterisasi Kadar Protein dengan Spektrofotometri Uv-Vis

Karakterisasi kadar protein dilakukan dengan menggunakan metode Lowry. Pada prosedur ini, sebanyak 0,9 mL akuades ditambahkan ke dalam tabung reaksi, diikuti dengan penambahan 0,1 mL sampel enzim. Selanjutnya, pereaksi C Lowry ditambahkan, yaitu campuran dari larutan Na_2CO_3 2% dalam NaOH yang telah dikombinasikan dengan 5 mL larutan $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 1% serta 3 mL larutan natrium/kalium tartrat 1%. Campuran tersebut dihomogenkan dan diinkubasi selama 10 menit pada suhu ruang. Setelah inkubasi awal, sebanyak 0,5 mL pereaksi D Lowry (reagen Folin-Ciocalteu) ditambahkan ke dalam tabung reaksi, kemudian campuran dihomogenkan kembali dan diinkubasi selama 30 menit. Absorbansi larutan hasil reaksi kemudian diukur pada panjang gelombang 750 nm menggunakan spektrofotometer. Setiap pengukuran dilakukan dalam tiga ulangan (triplo) guna menjamin ketepatan dan keandalan data yang diperoleh.

3.3.7 Isolasi dan Pemurnian Enzim Kitinase

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

3.3.7.1 Presipitasi Protein

Proses presipitasi protein dilakukan dengan menambahkan ammonium sulfat hingga mencapai konsentrasi akhir sebesar 60% ke dalam ekstrak kasar. Campuran tersebut kemudian disentrifugasi pada kecepatan 7000 rpm selama 30 menit pada suhu 4°C guna mempertahankan stabilitas enzim selama proses pemisahan. Setelah sentrifugasi, fase padat (endapan) dipisahkan dari fase cair (filtrat). Endapan protein yang diperoleh selanjutnya dilarutkan dalam larutan buffer fosfat dengan pH 7 dan konsentrasi 50 mM. Larutan hasil pelarutan endapan ini disimpan dalam lemari pendingin untuk digunakan pada tahap analisis berikutnya.

3.3.7.2 Dialisis

Dialisis dilakukan menggunakan kantung selofan pada suhu 4°C. Larutan endapan protein dimasukkan ke dalam kantung selofan, yang kemudian diikat dan digantung di dalam gelas beaker yang berisi buffer fosfat pH 7 dengan konsentrasi 10 mM. Proses dialisis berlangsung selama 24 jam dengan pergantian buffer fosfat setiap 4 jam. Setiap kali buffer fosfat diganti, ditambahkan BaCl₂ 1% pada buffer fosfat tersebut. Jika terbentuk endapan putih, ini menandakan bahwa proses dialisis harus dilanjutkan dan buffer fosfat perlu diganti lagi hingga tidak ada endapan putih yang terbentuk.

3.3.8 Pengujian Kerja Enzim Kitinase dalam Degradasi Substrat

Pengujian aktivitas enzim kitinase dalam proses degradasi substrat dilakukan dengan menggunakan satu jenis substrat berupa kulit udang yang berfungsi sebagai sumber kitin untuk substrat degradasi (Yang *et al.*, 2016). Sebanyak 2 gram kulit udang ditimbang dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi bersama dengan kitin, kemudian ditambahkan 2 mL larutan enzim kitinase yang telah diisolasi sebelumnya. Campuran tersebut selanjutnya diinkubasi pada suhu ruang selama dua jam. Setelah inkubasi, dilakukan pemisahan antara fase padat dan fase cair melalui proses sentrifugasi. Setelah diperoleh endapan, dilarutkan menggunakan aquades. Larutan yang diperoleh kemudian digunakan untuk uji aktivitas antibakteri menggunakan metode *Minimum Inhibitory Concentration* (MIC) sebagaimana telah dijelaskan pada Subbab 2.8.

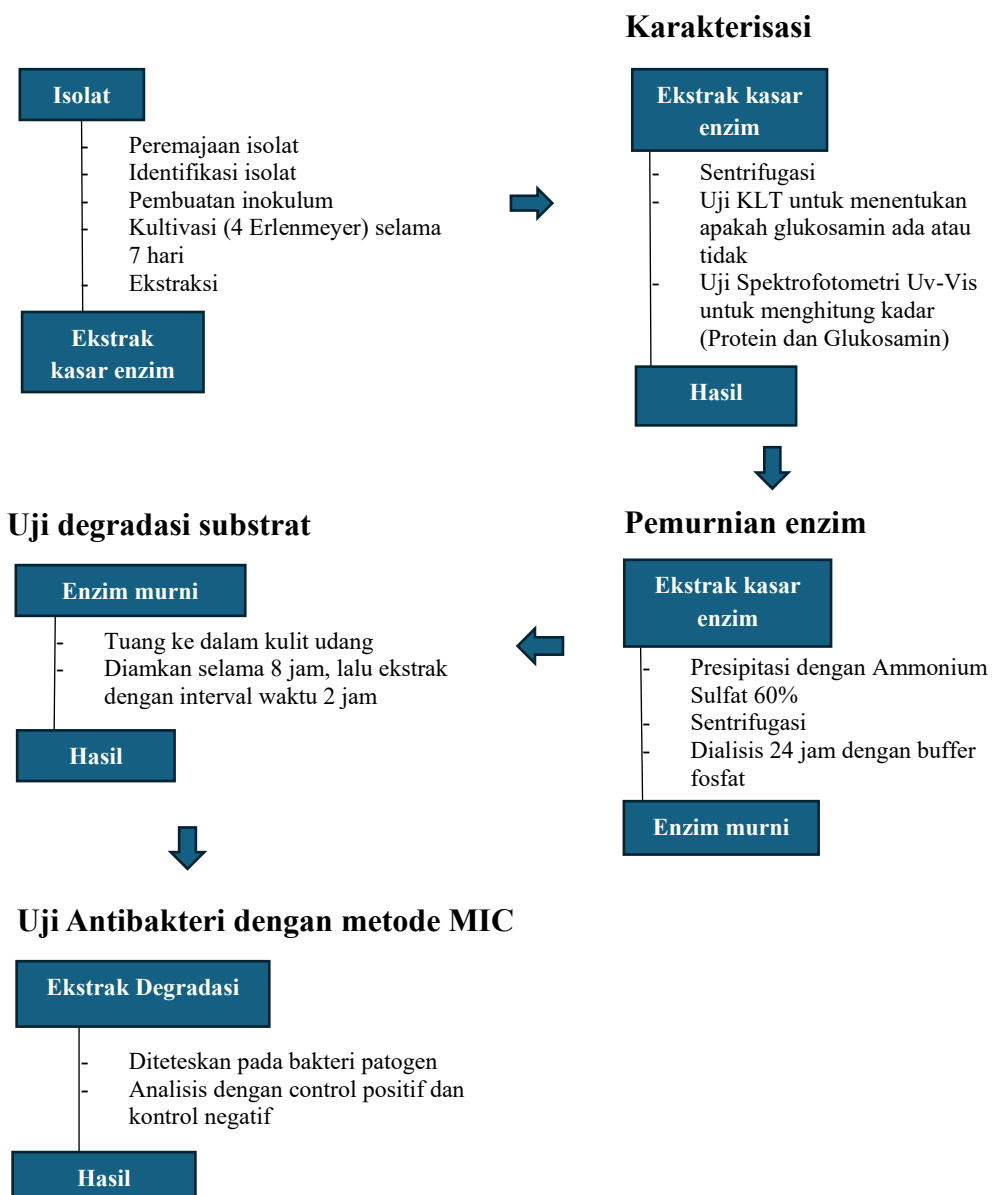
3.3.9 Uji Antibakteri metode MIC

Uji aktivitas antibakteri dilakukan menggunakan dua jenis bakteri patogen, yaitu *Pseudomonas aeruginosa* sebagai bakteri gram negatif dan *Staphylococcus aureus* sebagai bakteri gram positif. Bakteri-bakteri patogen tersebut diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam menggunakan media *Mueller-Hinton Agar* (MHA), sesuai dengan prosedur pembuatan media pada bagian 3.3.1.1. Sebanyak tiga ose bakteri patogen diambil dan dimasukkan ke dalam media *Tryptic Soy Broth* (TSB), lalu diinkubasi kembali pada suhu 37°C selama 2 jam. Setelah inkubasi, inokulum diencerkan dengan perbandingan tertentu. Hasil pengenceran selanjutnya digunakan dalam uji antibakteri.

Uji antibakteri dilakukan menggunakan metode *Minimum Inhibitory Concentration* (MIC). Sampel uji berupa enzim kitinase dilarutkan aquades dan diencerkan secara bertingkat (*serial dilution*) dalam media *Tryptic Soy Broth* (TSB) dalam mikrotiter plat 96 sumur. Masing-masing sumur diisi dengan 10 µL suspensi bakteri uji, yaitu *Staphylococcus aureus* dan *Pseudomonas aeruginosa*. Sebagai kontrol positif digunakan Ciprofloxacin (2 mg/mL), dan sebagai kontrol

negatif digunakan media ditambah aquades tanpa enzim atau antibiotik. Larutan resazurin ditambahkan ke tiap sumur dan diinkubasi kembali selama 1 jam. Perubahan warna dari biru menjadi pink menunjukkan pertumbuhan bakteri, sedangkan sumur yang tetap biru menunjukkan aktivitas antibakteri.

3.4 Diagram Alir



V. SIMPULAN DAN SARAN

5.1 Simpulan

Simpulan dari penelitian ini adalah sebagai berikut :

1. Isolat aktinomisetes 18D36A2 mampu memproduksi enzim kitinase dengan aktivitas spesifik sebesar 0,7633 U/mg.
2. Pemurnian enzim kitinase dengan ammonium fosfat meningkatkan aktivitas spesifik enzim kitinase pada substrat dari 0,098 U/mg menjadi 0,7633 U/mg.
3. Ekstrak kitinase yang berasal dari isolat kode 18D36A2 mampu memproduksi COS yang berperan sebagai agen antibakteri.
4. Enzim kitinase mampu mendegradasi sumber kitin seperti kulit udang pada inkubasi 0₁ dan 2 jam.

5.2 Saran

Saran pada penelitian adalah sebagai berikut :

1. Degradasi substrat dengan interval waktu lebih lanjut untuk melihat kemampuan enzim kitinase dalam mendegradasi.
2. Karakterisasi senyawa aktif menggunakan metode LCMS untuk mengidentifikasi senyawa hasil hidrolisis kitin.

DAFTAR PUSTAKA

- Akeed, Y., Atrash, F., and Naffaa, W. 2020. Partial purification and characterization of chitinase produced by *Bacillus licheniformis* B307. *Heliyon*. 6(5): 1-7.
- Arnold, N. D., Brück, W. M., Garbe, D., and Brück, T. B. 2020. Enzymatic modification of native chitin and conversion to specialty chemical products. In *Marine Drugs*. 18(2):1-27.
- Atalla, S. M. M., EL Gamal, N. G., and Awad, H. M. 2020. Chitinase of marine penicillium chrysogenum MH745129: Isolation, identification, production and characterization as controller for citrus fruits postharvest pathogens. *Jordan Journal of Biological Sciences*. 13(1): 19–28.
- Bhargava, S., Sanjrani, M. A., and Javed, S. 2008. Solid-State Fermentation : An Overview Solid-state Fermentation : An Overview. *January*. 22(1): 49-70.
- Brzezinska, M. S., Jankiewicz, U., and Walczak, M. 2013. Biodegradation of chitinous substances and chitinase production by the soil actinomycete *Streptomyces rimosus*. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 84(1): 104–110.
- Couto, S. R., and Sanromán, M. Á. 2006. Application of solid-state fermentation to food industry-A review. *Journal of Food Engineering*. 76(3): 291–302.
- Cumsille, A., Undabarrena, A., González, V., Claverías, F., Rojas, C., and Cámara, B. 2017. Biodiversity of actinobacteria from the South Pacific and the assessment of *Streptomyces* chemical diversity with metabolic profiling. *Marine Drugs*. 15(9): 1-21.
- El-Beltagi, H. S., El-Mahdy, O. M., Mohamed, H. I., and El-Ansary, A. E. 2022. Antioxidants, Antimicrobial, and Anticancer Activities of Purified Chitinase of *Talaromyces funiculosus* Strain CBS 129594 Biosynthesized Using Crustacean Bio-Wastes. *Agronomy*. 12(11): 1-29.
- Engel, A., Bracher, A., Dinter, T., Endres, S., Grosse, J., Metfies, K., Peecken, I., Piontek, J., Salter, I., and Nöthig, E. M. 2019. Inter-annual variability of organic carbon concentrations in the eastern Fram Strait during summer (2009-2017). *Frontiers in Marine Science*: 6(1): 1–17.

- Forestryana, D., and Arnida, A. 2020. Skrining Fitokimia Dan Analisis Kromatografi Lapis Tipis Ekstrak Etanol Daun Jeruju (*Hydrolea Spinosa* L.). *Jurnal Ilmiah Farmako Bahari*. 11(2): 113-124.
- Foucher, J. P., Westbrook, G. K., Boetius, A., Ceramicola, S., Dupré, S., Mascle, J., Mienert, J., Pfannkuche, O., Pierre, C., and Praeg, D. 2009. Structure and drivers of cold seep ecosystems. *Oceanography*. 22(1): 92–109.
- Gomaa, E. Z. 2012. Chitinase production by *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus licheniformis*: Their potential in antifungal biocontrol. *Journal of Microbiology*. 50(1): 103–111.
- Kadeřábková, N., Mahmood, A. J. S., and Mavridou, D. A. I. 2024. Antibiotic susceptibility testing using minimum inhibitory concentration (MIC) assays. *Npj Antimicrobials and Resistance*. 2(1): 1-9.
- Li, Q., Chen, X., Jiang, Y., and Jiang, C. 2016. Morphological Identification of Actinobacteria. In *Actinobacteria - Basics and Biotechnological Applications* 7(1): 60-86.
- Mustarichie, R., Sulistyaningsih, S., and Runadi, D. 2020. Antibacterial Activity Test of Extracts and Fractions of Cassava Leaves (*Manihot esculenta* Crantz) against Clinical Isolates of *Staphylococcus epidermidis* and *Propionibacterium acnes* Causing Acne. *International Journal of Microbiology*. 20(2): 1-9.
- Muyassaroh, Dewi, K. R., dan Minah, F. N. 2020. Penentuan Kadar Protein Pada *Spirulina Platensis* Menggunakan Metode Lowry Dan Kjeldahl Estimation of Protein Content in *Spirulina Platensis* Under Lowry ' S and Kjeldahl ' S Method. *Jurnal Teknik Kimia*. 15(1): 40–46.
- Nurhikmawati, F., Manurung, M., dan Laksmiwati, A. A. I. A. M. 2014. Penggunaan kitosan dari limbah kulit udang sebagai inhibitor keasaman tuak. *Jurnal Kimia*. 8(2): 191–197.
- Palanggatan Maggadani, B., and Setyahadi, S. S. 2017. Skrining dan evaluasi aktivitas kitinase dari sembilan isolat bakteri lokal Screening and Chitinolytic Activity Evaluation of Nine indigenous bacteria isolate. *Journal Chemistry*. 4(1): 13-24.
- Pan, D., Xiao, P., Li, F., Liu, J., Zhang, T., Zhou, X., and Zhang, Y. 2024. High Degree of Polymerization of Chitin Oligosaccharides Produced from Shrimp Shell Waste by Enrichment Microbiota Using Two-Stage Temperature-Controlled Technique of Inducing Enzyme Production and Metagenomic Analysis of Microbiota Succession. *Marine Drugs*. 22(8): 1-16.

- Patrisiya, B., Oktavia, N., Zhorif, M. N., and Priyanto, A. D. 2023. Effect of Chitooligosaccharide Characteristics from Several Types of Shells on Prebiotic Activity : A Brief Review. *Journal of Tropical Food and Agroindustrial Technology*. 4(2): 37–45.
- Pratiwi, R. S., Susanto, T. E., Wardani, K. A. Y., dan Sutrisno, A. 2015. Enzim Kitinase dan Aplikasi di Bidang Industri : Kajian Pustaka. *Jurnal Pangan Dan Agroindustri*. 3(3): 878–887.
- Qin, S., Xing, K., Jiang, J. H., Xu, L. H., and Li, W. J. 2011. Biodiversity, bioactive natural products and biotechnological potential of plant-associated endophytic actinobacteria. In *Applied Microbiology and Biotechnology*. 89(3): 457–473.
- Rawway, M., Beltagy, E. A., Abdul-Raouf, U. M., Elshenawy, M. A., and Kelany, M. S. 2018. Optimization of Process Parameters for Chitinase Production by a Marine *Aspergillus Flavus* MK20. *Journal of Ecology of Health and Environment*. 6(1): 1–8.
- Setiawan, A., Widyastuti, W., Irawan, A., Wijaya, O. S., Laila, A., Setiawan, W. A., Juliasih, N. L. G. R., Nonaka, K., Arai, M., and Hendri, J. 2021. Fermentation shrimp shell waste in solid state using *pseudonocardia carboxydvorans* 18a13o1 to produce bioactive metabolites. *Fermentation*. 7(4): 1-10.
- Sharma, M., Mukesh, C., Mondal, D., and Prasad, K. 2013. Dissolution of α -chitin in deep eutectic solvents. *RSC Advances*: 3(39): 18149–18155.
- Singh Nee Nigam, P., and Pandey, A. 2009. Biotechnology for agro-industrial residues utilisation: Utilisation of agro-residues. In *Biotechnology for Agro-Industrial Residues Utilisation: Utilisation of Agro-Residues*. 1(4): 198-216.
- 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(1): 91–101.
- Sowani, H., Kulkarni, M., and Zinjarde, S. 2018. An insight into the ecology, diversity and adaptations of *Gordonia* species. *Critical Reviews in Microbiology*. 44(4): 393–413.
- Stoykov, Y. M., Pavlov, A. I., and Krastanov, A. I. 2015. Chitinase biotechnology: Production, purification, and application. *Engineering in Life Sciences*. 15(1): 30–38.
- Subramani, R., and Aalbersberg, W. 2013. Culturable rare Actinomycetes: Diversity, isolation and marine natural product discovery. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 97(21): 9291–9321.

- Suryawanshi, N., and Eswari, J. S. 2022. Shrimp shell waste as a potential raw material for biorefinery a revisit. *In Biomass Conversion and Biorefinery*. 12(5): 1977-1984.
- Syahmani, S., Leny, L., Iriani, R., dan Elfa, N. 2017. Penggunaan Kitin Sebagai Alternatif Fase Diam Kromatografi Lapis Tipis Dalam Praktikum Kimia Organik. *Vidya Karya*. 32(1): 1–11.
- 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- β -glucosaminidase-like activity from shrimp head conversion by streptomyces speibonae and its application in hydrolyzing β -chitin powder to produce N-acetyl-d-glucosamine. *Journal Polymers*. 11(10): 1-14.
- Xia, G., Jin, C., Zhou, J., Yang, S., Zhang, S., and Jin, C. 2001. A novel chitinase having a unique mode of action from *Aspergillus fumigatus* YJ-407. In *Eur. Journal Biochem*. 268(7): 4079-4085.
- Yang, S., Fu, X., Yan, Q., Guo, Y., Liu, Z., and Jiang, Z. 2016. Cloning, expression, purification and application of a novel chitinase from a thermophilic marine bacterium *Paenibacillus barengoltzii*. *Journal Food Chemistry*. 192(2): 1041–1048.