

**KARAKTERISASI GEN AKTINOBAKTERI LAUT SEBAGAI
PENGHASIL ENZIM KITINASE SECARA *SOLID STATE*
FERMENTATION DARI SUBSTRAT KULIT UDANG**

DISERTASI

Oleh

**WAWAN ABDULLAH SETIAWAN
NPM 2137061005**



**PROGRAM STUDI DOKTOR MIPA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS LAMPUNG
BANDAR LAMPUNG
2025**

**KARAKTERISASI GEN AKTINOBAKTERI LAUT SEBAGAI
PENGHASIL ENZIM KITINASE SECARA SOLID STATE
FERMENTATION DARI SUBSTRAT KULIT UDANG**

Oleh

WAWAN ABDULLAH SETIAWAN

Disertasi

Sebagai Salah Satu Syarat untuk Mencapai Gelar DOKTOR MIPA

Pada

**Program Studi Doktor MIPA
Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan
Universitas Lampung**



**PROGRAM STUDI DOKTOR MIPA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS LAMPUNG
BANDAR LAMPUNG
2025**

ABSTRAK

KARAKTERISASI GEN AKTINOBAKTERI LAUT SEBAGAI PENGHASIL ENZIM KITINASE SECARA *SOLID STATE* *FERMENTATION* DARI SUBSTRAT KULIT UDANG

Oleh

WAWAN ABDULLAH SETIAWAN

Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi dan mengidentifikasi spesies aktinobakteri laut penghasil enzim kitinase melalui analisis filogenetik, serta mengkarakterisasi gen aktinobakteri laut sebagai penghasil enzim kitinase melalui fermentasi padat (*Solid State Fermentation/SSF*) dari substrat kulit udang. Isolat aktinobakteri sebanyak 6 isolat dari laut Bali dan Gorontalo diisolasi menggunakan media selektif *International Streptomyces Project 2* (ISP 2) dan koloid kitin. Identifikasi spesies dilakukan melalui pengamatan morfologi menggunakan mikroskop cahaya dan *Scanning Electron Microscope* (SEM) serta analisis filogenetik berbasis sekuen gen 16S rRNA, menghasilkan spesies *Pseudonocardia carboxydivorans* 18A13O1, *Pseudonocardia antitumoralis* 18D36-A1, *Micrococcus unila* 18D36-A2, *Brevibacterium linens* 19A07-A1, *Streptomyces tritolerans* 19B19A1, dan *Kocuria palustris* 19C38A1. Pengujian aktivitas kitinolitik menunjukkan *Streptomyces tritolerans* 19B19A1 memiliki aktivitas tertinggi dengan indeks kitinase 0,324. Karakterisasi gen kitinase pada isolat ini meliputi ekstraksi RNA, sintesis cDNA, amplifikasi PCR dengan primer ChiA, sekuensing, dan analisis *in silico* melalui ORF finder, BLAST, pemodelan struktur protein, serta molecular docking dengan kitin kulit udang. Hasil menunjukkan gen kitinase *S. tritolerans* 19B19A1 berukuran 882 nukleotida yang mengkodekan 293 asam amino. Gen yang didapat menunjukkan homologi 96,61 % dengan enzim kitinase *Streptomyces* di GenBank dengan kode akses WP_011029996.1. Analisis docking molekuler menggunakan AutoDock mengonfirmasi interaksi kuat antara enzim kitinase dan substrat kitin. Nilai *free energy binding* (FEB) sebesar -3,93 dan konstanta inhibisi (KI) sebesar 1320. Nilai FEB dan KI tersebut lebih rendah dari pembandingnya 3EBV yang sudah terdeposit di Protein Data Bank (PDB) yaitu -3,83 dan 1380. Penelitian ini memberikan kontribusi pada pengembangan rekayasa

genetik untuk produksi enzim kitinase dan pemanfaatan limbah kulit udang secara berkelanjutan.

Kata Kunci : aktinobakteri laut, enzim kitinase, fermentasi padat, kulit udang, karakterisasi gen

ABSTRACT

CHARACTERIZATION OF MARINE ACTINOBACTERIAL GENE AS CHITINASE ENZYME PRODUCER THROUGH SOLID STATE FERMENTATION FROM SHRIMP SHELL SUBSTRATE

By

WAWAN ABDULLAH SETIAWAN

This study aims to isolate and identify marine actinobacterial species producing chitinase enzymes through phylogenetic analysis and to characterize the chitinase-producing genes of marine actinobacteria through solid-state fermentation (SSF) using shrimp shell substrate. Six actinobacterial isolates from the seas of Bali and Gorontalo were isolated using selective International Streptomyces Project 2 (ISP 2) medium and colloidal chitin. Species identification was conducted through morphological observation using light microscopy and Scanning Electron Microscopy (SEM), as well as phylogenetic analysis based on 16S rRNA gene sequences, resulting in the identification of *Pseudonocardia carboxydivorans* 18A13O1, *Pseudonocardia antitumoralis* 18D36-A1, *Micrococcus unila* 18D36-A2, *Brevibacterium linens* 19A07-A1, *Streptomyces tritolerans* 19B19A1, and *Kocuria palustris* 19C38A1. Chitinolytic activity testing revealed that *Streptomyces tritolerans* 19B19A1 exhibited the highest activity with a chitinase index of 0.324. Characterization of the chitinase gene in this isolate involved RNA extraction, cDNA synthesis, PCR amplification using ChiA primers, sequencing, and in silico analysis using ORF Finder, BLAST, protein structure modeling, and molecular docking with shrimp shell chitin. The results showed that the chitinase gene of *S. tritolerans* 19B19A1 consists of 882 nucleotides encoding 293 amino acids. The obtained gene exhibited 96.61% homology with the chitinase enzyme of *Streptomyces* in GenBank under accession code WP_011029996.1. Molecular docking analysis using AutoDock confirmed a strong interaction between the chitinase enzyme and the chitin substrate, with a free energy binding (FEB) value of -3.93 and an inhibition constant (KI) of 1320. These FEB and KI values were lower than those of the reference 3EBV deposited in the Protein Data Bank (PDB), which were -3.83 and 1380, respectively. This study contributes to the development of genetic engineering for chitinase enzyme production and the sustainable utilization of shrimp shell waste.

Keywords: marine actinobacteria, chitinase enzyme, solid-state fermentation, shrimp shell, gene characterization

Judul : KARAKTERISASI GEN
AKTINOBAKTERI LAUT SEBAGAI
PENGHASIL ENZIM KITINASE
SECARA *SOLID STATE FERMENTATION*
DARI SUBSTRAT KULIT UDANG

Nama Mahasiswa : Wawan Abdullah Setiawan

Nomor Pokok Mahasiswa : 2137061005

Program Studi : Doktor MIPA

Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

MENYETUJUI


1. Komisi Pembimbing

Prof. Drs. John Hendri, M.Si., Ph.D.
NIP 195810211987031001
Promotor


.....

.....

Prof. Drs. Andi Setiawan, M.Sc., Ph.D.
NIP 195809221988111001
Ko-Promotor


.....

Prof. Dr. Bambang Irawan, M.Sc.
NIP 196503031992031006
Ko-Promotor

2. Ketua Program Studi Doktor MIPA



Dr. Khoirin Nisa, S.Si., M.Si.
NIP 197407262000032001

MENGESAHKAN

KARAKTERISASI GEN AKTINOBAKTERI LAUT SEBAGAI
PENGHASIL ENZIM KITINASE SECARA *SOLID STATE*
FERMENTATION DARI SUBSTRAT KULIT UDANG

OLEH
WAWAN ABDULLAH SETIAWAN
NPM 2137061005

Tim Penguji

Ketua : Dr. Aristoteles, S.Si., M.Si.
NIP 198105212006041002

Sekretaris : Dr. Khoirin Nisa, S.Si., M.Si.
NIP 197407262000032001

Anggota : Prof. Drs. John Hendri, M.Si., Ph.D.
NIP 195810211987031001

Prof. Drs. Andi Setiawan, M.Sc., Ph.D.
NIP 195809221988111001

Prof. Dr. Bambang Irawan, M.Sc.
NIP 196503031992031006

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

Dr. Jani Master, M.Si.
NIP 198301312008121001

Peni Ahmadi, Ph.D.
NIP 198805052020122011

Disertasi ini telah diterima sebagai salah satu persyaratan
untuk memperoleh gelar Doktor MIPA pada tanggal 15 Oktober 2025



Direktur Program Pascasarjana

Prof. Dr. Ir. Murhadi, M.Si.
NIP 196403261989021001

PERNYATAAN ORISINILITAS DISERTASI

Saya yang bertanda tangan ini di bawah ini menyatakan dengan sebenar-benarnya bahwa tulisan saya di dalam disertasi dengan judul “Karakterisasi Gen Aktinobakteri Laut sebagai Penghasil Enzim Kitinase secara *Solid State Fermentation* dari Substrat Kulit Udang” yang merupakan karya ilmiah yang menjadi syarat diperolehnya gelar Doktor MIPA ini tidak terdapat karya ilmiah yang pernah diajukan untuk memperoleh gelar akademik di suatu perguruan tinggi, dan tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain, kecuali yang secara tertulis dikutip dalam naskah ini dan disebutkan dalam pustaka.

Bandar Lampung, 15 Oktober 2025



Wawan Abdullah Setiawan

NPM 2137061005

RIWAYAT HIDUP

Penulis dilahirkan di Tanjung Karang pada tanggal 30 Desember 1979 dari ayah Abim dan ibu Aminah. Penulis merupakan putra pertama dari tujuh bersaudara. Tahun 2003 penulis lulus dari Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lampung. Tahun 2006, penulis bekerja sebagai Spv. *Quality Assurance Food Processing Plant Division* di PT. Central Pertiwi Bahari dan tahun 2009 penulis diterima sebagai CPNS Dosen Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lampung. Pada tahun 2010, penulis diterima di Program Studi Bioteknologi pada sekolah pascasarjana IPB dengan biaya dari program beasiswa pascasarjana Kementerian Pendidikan dan Kebudayaan Nasional dan lulus pada tahun 2014. Tahun 2016-2023, penulis bertanggung jawab menjadi kepala divisi biomolekuler UPT LTSIT Universitas Lampung. Tahun 2021, penulis melanjutkan pendidikan di Program Studi Doktor MIPA Universitas Lampung.

SANWACANA

Alhamdulillah, segala puji dan syukur penulis panjatkan ke hadirat Allah SWT, Tuhan semesta alam, atas segala rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan disertasi yang berjudul “**Karakterisasi Gen Aktinobakteri Laut Penghasil Enzim Kitinase secara *Solid State Fermentation* dari Substrat Kulit Udang**” sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Doktor pada Program Studi Doktor MIPA, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Lampung. Shalawat serta salam semoga senantiasa tercurah kepada Nabi Muhammad SAW, beserta keluarga, sahabat, dan seluruh umatnya hingga akhir zaman. Aamiin.

Dengan penuh rasa hormat dan teriring doa yang tulus, penulis menyampaikan ucapan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada:

1. Rektor Universitas Lampung Ibu Prof. Dr. Ir. Lusmeilia Afriani, D.E.A., I.P.M. yang telah memberikan kesempatan kepada penulis untuk menempuh pendidikan pada Program Studi Doktor MIPA Universitas Lampung.
2. Bapak Prof. Dr. Ir. Murhadi, M.Si. selaku Direktur Pascasarjana Universitas Lampung.
3. Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lampung sekaligus Penguji Internal I, Bapak Dr. Eng. Heri Satria, S.Si., M.Si., atas dukungan, arahan, dan fasilitas yang diberikan selama proses pendidikan dan penyelesaian disertasi ini.

4. Ketua Program Studi Doktor MIPA Universitas Lampung, Ibu Dr. Khoirin Nisa, M.Si., atas bimbingan, saran, serta bantuan akademik yang diberikan kepada penulis.
5. Bapak (Alm) Prof. John Hendri, Ph.D., selaku Promotor penulis atas bimbingan, arahan, kesabaran, dan ketulusan dalam mendampingi penulis sejak awal hingga disertasi ini dapat diselesaikan dengan baik. Semoga Allah SWT senantiasa melimpahkan keberkahan kepada beliau.
6. Bapak Prof. Andi Setiawan, Ph.D., selaku Ko-Promotor I penulis atas bimbingan, masukan ilmiah, dan motivasi yang sangat berarti selama proses penelitian dan penulisan disertasi.
7. Bapak Prof. Dr. Bambang Irawan, M.Sc., selaku Ko-Promotor II atas arahan, saran, dan kontribusi keilmuan yang memperkaya kualitas disertasi ini.
8. Bapak Dr. Jani Master, M.Si., atas kritik, saran, dan masukan yang membangun demi penyempurnaan disertasi ini.
9. Penguji Eksternal, Ibu Peni Ahmadi, Ph.D., atas evaluasi, masukan, dan saran yang sangat berharga dalam meningkatkan mutu dan substansi disertasi ini.
10. Kepada Prof. Dr. Ir. K.E.S. Manik, M.S. atas semua kemurahan hati.
11. Kepada Prof. Dr. Ir. Paul Benyamin Timotiwu, M.S. yang telah memberikan kesempatan untuk penulis selalu *upgrade* diri selama menjadi kepala divisi biomolekuler UPT LTSIT Universitas Lampung.
12. Kepada PT Inti Kemika Sejahtera dan PT. Sciencewerke Indonesia atas segala bantuan dan *hospitality* sejak awal mula menjadi rekanan.
13. Teristimewa, penulis mengucapkan terima kasih yang tak terhingga kepada Ulia Fajriah, S.Pi., M.Si. istri tercinta atas kesabaran, keikhlasan, dan doa yang senantiasa menjadi kekuatan penulis dan kepada anak-anakku Indra, Annisa, dan Atsar tersayang, keempat orang tua dan adik-adik tersayang, terima kasih atas pengertian, senyum, dan semangat yang selalu menguatkan. Semoga Allah SWT membalas seluruh cinta dan pengorbanan dengan keberkahan dan kebahagiaan.
14. Kepada mahasiswa dan asisten penulis, Adinda Nurulita Putri, S.P., atas seluruh kesabaran dan semangat dalam membantu penulis.

15. Kepada Hotma, Esdras, Abdi, Bima, Dodi, Freddy, dan Budi yang telah terus membersamai dan mendukung.
16. Kepada teman-teman SPS BTK 2010 atas kebersamaan dan dukungan yang terus membangun.
17. Kepada seluruh anak-anak INALAB DNA, Diana Salsabila S.Si., Damar Syahputra,, Miko Setiawan, Zahra Fania Qud' Rani, Chanda Rizkia Rahma, Ferdinie Vira Kyrani, Yayun Kumalasari, Ayuhana Aprilintan, Febiyona Karinsa, Dian Nisya Vira, Dyah Ayu Arizki, Dea Octaviani, Rahmadona, Nora V Sibirian, Eva Yuliana, Kafka Anisya Kafka, Desi Latifatulhawa, dan Sony yang telah memberikan dukungan, semangat, dan bantuan kepada penulis.
18. Seluruh dosen, tenaga kependidikan, serta civitas akademika Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lampung, yang telah memberikan bantuan, dukungan, dan kerja sama selama penulis menempuh pendidikan.

Disertasi ini bukan sekadar rangkaian kata dan data, melainkan jejak perjalanan panjang yang ditempuh dengan doa, pengorbanan, dan harapan. Karya ini menjadi akhir dari satu perjalanan dan awal dari tanggung jawab baru, dengan harapan ilmu yang tertulis di dalamnya dapat menjadi cahaya yang bermanfaat bagi sesama dan masa depan.

Akhir kata, penulis menyadari bahwa disertasi ini masih memiliki keterbatasan. Oleh karena itu, penulis dengan rendah hati memohon maaf atas segala kekurangan dan kesalahan. Semoga disertasi ini dapat memberikan manfaat dan kontribusi bagi pengembangan ilmu pengetahuan dan teknologi di masa yang akan datang. Aamiin.

Bandar Lampung, 15 Oktober 2025

Wawan Abdullah Setiawan

DAFTAR ISI

	Halaman
DAFTAR ISI	i
DAFTAR TABEL	iv
DAFTAR GAMBAR	v
I. PENDAHULUAN	1
1.1. Latar Belakang	1
1.2. Perumusan Masalah.....	3
1.3. Tujuan Penelitian.....	3
1.4. Kerangka Teoritis	4
1.5. Keaslian dan Kebaruan Penelitian.....	6
1.6. Kontribusi Penelitian.....	6
II. TINJAUAN PUSTAKA	7
2.1. Aktinobakteri	7
2.2. <i>Solid State Fermentation</i>	8
2.3. Kitin Kulit Udang	9
2.4. Enzim Kitinase	12
2.5. Klasifikasi Kitinase Berdasarkan Urutan Sekuens Genom	15
2.6. Pengujian Aktifitas Enzim Kitinase	17
2.7. Eksplorasi Gen Penghasil Enzim Kitinase dari Mikroorganisme	18
2.8. Perkembangan Analisis DNA.....	21
2.9. <i>Polymerase Chain Reaction</i> (PCR).....	21
2.10. <i>Reverse Transcriptase-quantitative PCR</i> (RT-qPCR).....	24
2.11. Sekuensing dan Analisis Filogenetik.....	27

2.12. Analisis Enzim Secara In-Siliko.....	29
III. METODOLOGI PENELITIAN	33
3.1. Waktu dan Tempat Penelitian.....	33
3.2. Alat dan Bahan	33
3.3. Metode	34
3.3.1. Tahap Pertama : Identifikasi Spesies Spesifik	
Aktinobakteri Berbasis Ribotyping	35
3.3.1.1. Prosedur Kultur dan Peremajaan Isolat Aktinobakteri...	36
3.3.1.2. Prosedur Identifikasi Morfologi Aktinobakteri.....	37
3.3.1.3. Prosedur Ekstraksi DNA	37
3.3.1.4. Prosedur Analisis Konsentrasi dan Kemurnian	
DNA Hasil Ekstraksi.....	38
3.3.1.5. Prosedur Amplifikasi DNA dengan metode	
PCR menggunakan Primer 16s rRNA	38
3.3.1.6. Prosedur Analisis Hasil PCR melalui Elektroforesis	39
3.3.1.7. Prosedur Sekuensing Menggunakan Metode	
<i>Sanger Sequencing</i>	40
3.3.1.8. Prosedur Analisis Filogenetik Hasil Sekuensing	40
3.3.1.9. Prosedur Pendaftaran Urutan Basa DNA Ke Genbank..	40
3.3.2. Tahap Kedua : Pengujian Aktivitas Kitinolitik	41
3.3.3. Tahap Ketiga : Karakterisasi Gen Kitinase	41
3.3.3.1. Prosedur Kultur dan Peremajaan Isolat	
Aktinobakteri dengan Aktivitas Kitinase Tertinggi	43
3.3.3.2. Prosedur Ekstraksi RNA	43
3.3.3.3. Prosedur Analisis Konsentrasi dan Kemurnian RNA	
Hasil Ekstraksi	44
3.3.3.4. Prosedur Pembuatan Pustaka cDNA.....	45
3.3.3.5. Prosedur <i>Polymerase Chain Reaction</i> (PCR)	
dengan Primer gen Kitinase	46
3.3.3.6. Prosedur Elektroforesis Hasil PCR	47
3.3.3.7. Prosedur Sekuensing.....	47

3.3.3.8. Prosedur Analisis Hasil Sekuensing Gen Kitinase 47
3.4. Diagram Alir 48
IV. HASIL DAN PEMBAHASAN 50
4.1. Tahap Pertama Identifikasi Spesies Aktinobakteri	
Berdasarkan <i>Ribotyping</i> 50
4.1.1. Kultur dan Peremajaan Isolat Aktinobakteri 50
4.1.2. Identifikasi Morfologi Aktinobakteri 51
4.1.3. Ekstraksi DNA 59
4.1.4. Analisis Konsentrasi dan Kemurnian DNA Hasil Ekstraksi 59
4.1.5. Amplifikasi Sekuen DNA dengan PCR dan	
Visualisasi menggunakan Elektroforesis 61
4.1.6. Sekuensing dan Analisis Filogenetik Hasil Sekuensing 62
4.2. Tahap Kedua : Pengujian Aktivitas Kitinolitik 73
4.3. Tahap Ketiga : Karakterisasi Gen Kitinase dari Isolat Aktinobakteri	
yang memiliki aktivitas kitinase terbaik75
4.3.1. Kultur dan Peremajaan Isolat <i>Streptomyces tritolerans</i>	
19B19A1 75
4.3.2. Pengamatan Morfologi <i>Streptomyces tritolerans</i> 19B19A1 76
4.3.3. Ekstraksi RNA dan Analisis Konsentrasi serta Kemurnian	
RNA Hasil Ekstraksi77
4.3.4. Polymerase Chain Reaction (PCR) dan Elektroforesis	
hasil cDNA <i>Streptomyces tritolerans</i> 19B19A1 dengan	
Primer Gen Kitinase77
4.3.5. Sekuensing dan Analisis Hasil Sekuensing 78
V. KESIMPULAN86
5.1. Simpulan86
5.2. Saran86
DAFTAR PUSTAKA88
LAMPIRAN103

DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 1. Gen Pengkode Kitinase pada Organisme.....	20
Tabel 2. Primer untuk Amplifikasi PCR Gen Kitinase (Williamson <i>et al</i> , 2000). 24	24
Tabel 3. Pereaksi dalam pembuatan pustaka cDNA dari isolat dengan kemampuan kitinase terbaik	45
Tabel 4. Pengaturan alat PCR untuk cDNA dari isolat dengan kemampuan kitinase terbaik	45
Tabel 5. Desain pasangan primer qPCR untuk analisis transkripsi gen kitinase ..	46
Tabel 6. Identifikasi Morfologi Keenam Isolat Aktinobakteri berdasarkan Pengamatan menggunakan Mikroskop	58
Tabel 7. Hasil analisis konsentrasi dan kemurnian DNA	60
Tabel 8. Indeks Kitinase berdasarkan Zona Bening.....	74

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 1. Diagram alir kerangka.....	5
Gambar 2. Struktur dan Tata Ruang dalam Cangkang Krustasea (Chen <i>et al.</i> , 2016).....	10
Gambar 3. Struktur Kitin (Das <i>et al.</i> , 2016).....	11
Gambar 4. Keragaman distribusi, domain arsitektur dan fungsi kitinase dalam masing-masing organisme (Chen <i>et al.</i> , 2020).....	13
Gambar 5. Tipe Enzim Kitinase (Das <i>et al.</i> , 2016).....	14
Gambar 6. Klasifikasi kitinase (A) Enzim Pendegradasi Kitin (Poria <i>et al.</i> , 2021) dan (B) Klasifikasi dan truktur protein kitinase yang ditemukan dalam genom Arabidopsis (Passarinho & de Vries, 2002).....	16
Gambar 7. Alur eksplorasi produksi enzim secara klasik dan bioinformatik (Zhao <i>et al.</i> , 2016).....	18
Gambar 8. Tahapan Utama PCR (Singh <i>et al.</i> , 2014).....	22
Gambar 9. Perbedaan PCR, qPCR dan dPCR (Zhu <i>et al.</i> , 2020).....	23
Gambar 10. Tahapan Ekspresi gen (Wong & Medrano, 2005).....	25
Gambar 11. Hasil Ekspresi gen ChiA dan 16S rRNA (Cretoiu <i>et al.</i> , 2012).....	26
Gambar 12. Proses Sanger Sekuensing (Shendure <i>et al.</i> , 2017).....	28
Gambar 13. Proses NGS (Shendure <i>et al.</i> , 2017).....	29
Gambar 14. Pendekatan metode analisis enzim (Kamble <i>et al.</i> , 2018).....	30
Gambar 15. Prediksi struktur enzim kitinase (Li <i>et al.</i> , 2018).....	31
Gambar 16. Pemodelan Kitinase dan Substrat (a) model kitinase yang berikatan dengan substrat (b) diagram 2D interaksi reseptor dan ligand (Sreelatha <i>et al.</i> , 2023).....	32

Gambar 17. Diagram alir tahap 1	36
Gambar 18. Diagram alir tahap 2	41
Gambar 19. Diagram alir tahap 3	42
Gambar 20. Diagram alir penelitian	49
Gambar 21. Hasil inokulasi 6 isolat aktinobakteri pada media 1% koloidal kitin agar	51
Gambar 22. (a). Mikroskopis 18A13O1 dengan mikroskop cahaya; (b). Mikroskopis 18A13O1 dengan mikroskop elektron; (c). Mikroskopis <i>Pseudonocardia</i> dari Parra <i>et al.</i> (2021).....	52
Gambar 23. (a). Mikroskopis 18D36A1 dengan mikroskop cahaya; (b). Mikroskopis 18D36A1 dengan mikroskop elektron;.....	53
Gambar 24. (a). Mikroskopis 18D36A2 dengan mikroskop cahaya; (b). Mikroskopis 18D36A2 dengan mikroskop elektron; (c). Mikroskopis <i>Micrococcus</i> dari de Gouffa <i>et al.</i> , (2021); (d). Mikroskopis <i>Actinoplanes</i> Buttner (2017).....	54
Gambar 25. (a). Mikroskopis 19A07A1 dengan mikroskop cahaya; (b). Mikroskopis 19A07A1 dengan mikroskop elektron; (c). Mikroskopis <i>Brevibacterium</i> dari Koptides <i>et al.</i> (1992); (d). Mikroskopis <i>Micromonospora</i> dari Li <i>et al.</i> , 2016	55
Gambar 26. (a). Mikroskopis 19B19A1 dengan mikroskop cahaya; (b). Mikroskopis 19B19A1 dengan mikroskop elektron; (c). Salah satu bentuk sporangia <i>Streptomyces</i> dari Barkah <i>et al.</i> (2015); (d). Mikroskopis <i>Streptomyces</i> dari Weeraphan <i>et al.</i> (2023).....	56
Gambar 27 (a). Mikroskopis 19C38A1 dengan mikroskop cahaya; (b). Mikroskopis 19C38A1 dengan mikroskop elektron; (c). Salah satu bentuk sporangia <i>Actinomadura</i> dari Li <i>et al.</i> (2016); (d). Mikroskopis <i>Kocuria</i> dari Weeraphan <i>et al.</i> (2023).....	57
Gambar 28. Hasil visualisasi amplifikasi sekuen DNA dengan primer 16S rRNA.....	62
Gambar 29. Pohon filogenetik <i>Pseudonocardia carboxydivorans</i> 18A03O1	64
Gambar 30. Pohon filogenetik <i>Pseudonocardia antitumoralis</i> 18D36A1.....	66

Gambar 31. Pohon filogenetik <i>Micrococcus unila</i> 18D36-A2	68
Gambar 32. Pohon filogenetik <i>Brevibacterium linens</i> 19A07A1	70
Gambar 33. Pohon filogenetik <i>Streptomyces tritolerans</i> 19B19A1.....	71
Gambar 34. Pohon filogenetik <i>Kocuria palustris</i> 19C38A1.....	73
Gambar 35. Aktivitas Kinolitik pada 6 Isolat aktinobakteri	74
Gambar 36. Hasil re-kultur isolat aktinobakteri <i>S. tritolerans</i> 19B19A1 dengan media ISP2	75
Gambar 37. Hasil peremajaan <i>S. tritolerans</i> 19B19A1 pada media koloidal kitin agar.....	76
Gambar 38. (a). Pengamatan morfologi <i>S. tritolerans</i> 19B19A1 menggunakan mikroskop cahaya dengan perbesaran 400x. (b). Pengamatan morfologi <i>S. tritolerans</i> 19B19A1 menggunakan mikroskop elektron dengan perbesaran 3000x	77
Gambar 39. Elektroforesis hasil PCR gen kitinase <i>S. tritolerans</i> 19B19A1.....	78
Gambar 40. Hasil ORF Finder.	80
Gambar 41. Model konformasi enzim kitinase <i>S. tritolerans</i> 19B19A1	81
Gambar 42. Hasil BLAST protein ORF 1	81
Gambar 43. Struktur kristal enzim kitinase A dari aktinobakteri <i>Streptomyces coelicolor</i> dari database protein	82
Gambar 44. Kitin kulit udang dari database PUBCHEM	83
Gambar 45. Interaksi kitinase <i>S. tritolerans</i> 19B19A1 dengan kitin kulit udang	84
Gambar 46. Interaksi kitinase 3EBV dengan kitin kulit udang	85

I. PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Indonesia merupakan salah satu negara dengan megabiodiversitas tertinggi di dunia (Jadid *et al.*, 2020; Huffard *et al.*, 2012). Biodiversitas ini terus dieksplorasi untuk mengoptimalkan potensi nilai ekonomi dengan tetap bertujuan menjaga kelestarian (von Rintelen *et al.*, 2017). Biodiversitas Indonesia meliputi yang ada di laut maupun darat dimanfaatkan dalam bidang bioteknologi. Tapilatu (2016) memaparkan potensi isolat bakteri yang diisolasi dari air laut Arafura memiliki potensi antimikroba. Berbagai mikroorganisme laut termasuk aktinobakteri mampu menghasilkan metabolit baru dengan potensi bioteknologi yang tidak sering terdapat pada mikroba yang berasal dari darat. Aktinobakteri termasuk dalam filum tersendiri dalam kingdom bakteri dengan karakteristik sebagai bakteri Gram positif, berfilamen, dan membentuk miselia (Barka, *et al.*, 2021). Aktinobakteri berperan penting dalam siklus karbon yakni mendegradasi senyawa karbon dari dinding sel tanaman, fungi, kutikula serangga, maupun cangkang krustasea (Chater, 2016). Aktinobakteri laut diketahui memiliki potensi memproduksi metabolit antara lain enzim, senyawa antibiotik, antitumor, dan agen immunosupresif. Aktinobakteri laut berpotensi memiliki karakteristik yang berbeda dari aktinobakteri terestrial yang sehingga berpotensi pula untuk menghasilkan metabolit baru karena lingkungan laut sangat berbeda dengan kondisi terestrial (Alharbi *et al.*, 2016).

Aktinobakteri merupakan sumber potensial penghasil senyawa metabolit sekunder (Selim *et al.*, 2021) dan enzim (Elieh and Hamblin., 2016). Aktinobakteri diketahui dapat memanfaatkan kitin atau kitosan sebagai sumber karbon dan nitrogen menggunakan enzim kitinase (Beier dan Bertilsson, 2013). Enzim kitinase adalah enzim glikosil hidrolase (GH) yang mengkatalisis hidrolisis kitin, polimer linier dari N-asetilglukosamin (GlcNAc) melalui pembelahan ikatan β -(1,4) glikosidik

(Churklam dan Aunpad, 2020). Berdasarkan titik katalisasi pada kitin, kitinase dibagi ke dalam 2 kategori utama yaitu endokitinase, dan eksokitinase. Keduanya merupakan enzim ekstraseluler. Endokitinase mendegradasi kitin secara acak dari dalam, menghasilkan oligomer N-asetil-D-glukosamin (GlcNAc) (Kidibule *et al.*, 2020). Eksokitinase memotong kitin hanya dari ujung non reduksi.

Kitin merupakan polisakarida dengan kelimpahan kedua tertinggi di alam. Sumber kitin utama di alam berasal dari cangkang krustasea. Salah satunya adalah cangkang udang (Yadav, 2019). Produksi udang global menunjukkan peningkatan dari 3,72 juta ton pada tahun 2017 (FAO, 2018) menjadi 9,4 juta ton pada tahun 2022 (FAO, 2023). Di Bandar Lampung sendiri, produksi udang dikelola oleh beberapa perusahaan budidaya udang seperti PT. Indokom Samudera Persada, PT. Central Proteina Prima, dan PT. Wahyuni Mandira. Aktivitas pengolahannya menghasilkan limbah kulit udang sampai 24% massa udang (Rahman *et al.*, 2023). Limbah ini seharusnya bisa dimanfaatkan untuk meningkatkan nilai tambah ekonomi. Santos *et al.*, (2020) menegaskan bahwa saat ini peningkatan nilai tambah limbah kulit udang adalah pemanfaatan kitin dan kitosan.

Kedua material tersebut banyak digunakan di berbagai bidang industri antara lain industri obat-obatan, farmasi, kosmetik, makanan, remediasi lingkungan, pertanian (Thambiliyagodage *et al.*, 2023), dan kertas (Song *et al.*, 2018). Pembuatan kitin dan kitosan bisa dilakukan melalui metode kimia dan enzimatik. Kekurangan dari metode kimia adalah menghasilkan limbah bahan-bahan kimia dari proses tersebut sedangkan metode enzimatik lebih ramah lingkungan (Mohan *et al.*, 2022).

Metode enzimatik biasanya dilakukan melalui proses fermentasi. Proses fermentasi dapat dilakukan melalui teknik *submerged* dan *solid state*. Keuntungan *solid state* yaitu lebih praktis dan ekonomis sehingga lebih mudah diaplikasikan di industri. Berdasarkan Setiawan, *et al* (2021), telah berhasil dilakukan kajian terkait fermentasi secara SSF menghasilkan oligomer/COS dan senyawa metabolit sekunder sebagai antibakteri maupun antifungi. Pada penelitian tersebut hanya sebatas pada pengisolasian aktinobakteri secara konvensional dan produk

fermentasi (COS), namun belum menjelaskan tentang karakteristik gen kitinase pengurai kitin kulit udang secara molekuler.

Maka, pada penelitian ini dilakukan karakterisasi gen aktinobakteri laut penghasil enzim kitinase secara SSF dari substrat kulit udang. Proses karakterisasi ini dilakukan melalui tahapan isolasi aktinobakteri yang berasal dari laut Bali dan Gorontalo. Isolasi dilakukan menggunakan medium selektif koloid kitin untuk mendapatkan isolat aktinobakteri yang mempunyai aktivitas kitinolitik. Masing-masing isolat tersebut dianalisis spesies spesifiknya melalui analisis filogenetik/*ribotyping*. Telah dilakukan konfirmasi kemampuan kitinolitik dari masing-masing isolat melalui modifikasi metode dari Agrawal *et al.* (2012). Dari konfirmasi tersebut, didapat isolat unggul. Untuk mengkonfirmasi gen kitinase, dilakukan isolasi gen kitinase spesifik terhadap isolat aktinobakteri yang memiliki kemampuan kitinolitik terbaik hasil seleksi sebelumnya. Terkarakterisasinya gen kitinase tersebut diharapkan dapat memberikan informasi untuk pengembangan *genetic engineering* terkait aktivitas kitinolitik dari substrat kulit udang.

1.2. Perumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang diatas, dapat dirumuskan masalah dalam penelitian ini adalah sebagai berikut :

1. Bagaimana mengisolasi dan mengidentifikasi spesies aktinobakteri laut penghasil enzim kitinase yang mendegradasi kulit udang?
2. Bagaimana karakteristik molekuler gen penghasil enzim kitinase yang mendegradasi kulit udang terbaik secara SSF?

1.3. Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah :

1. Mengisolasi dan mengidentifikasi spesies aktinobakteri laut penghasil enzim kitinase melalui analisis filogenetik.

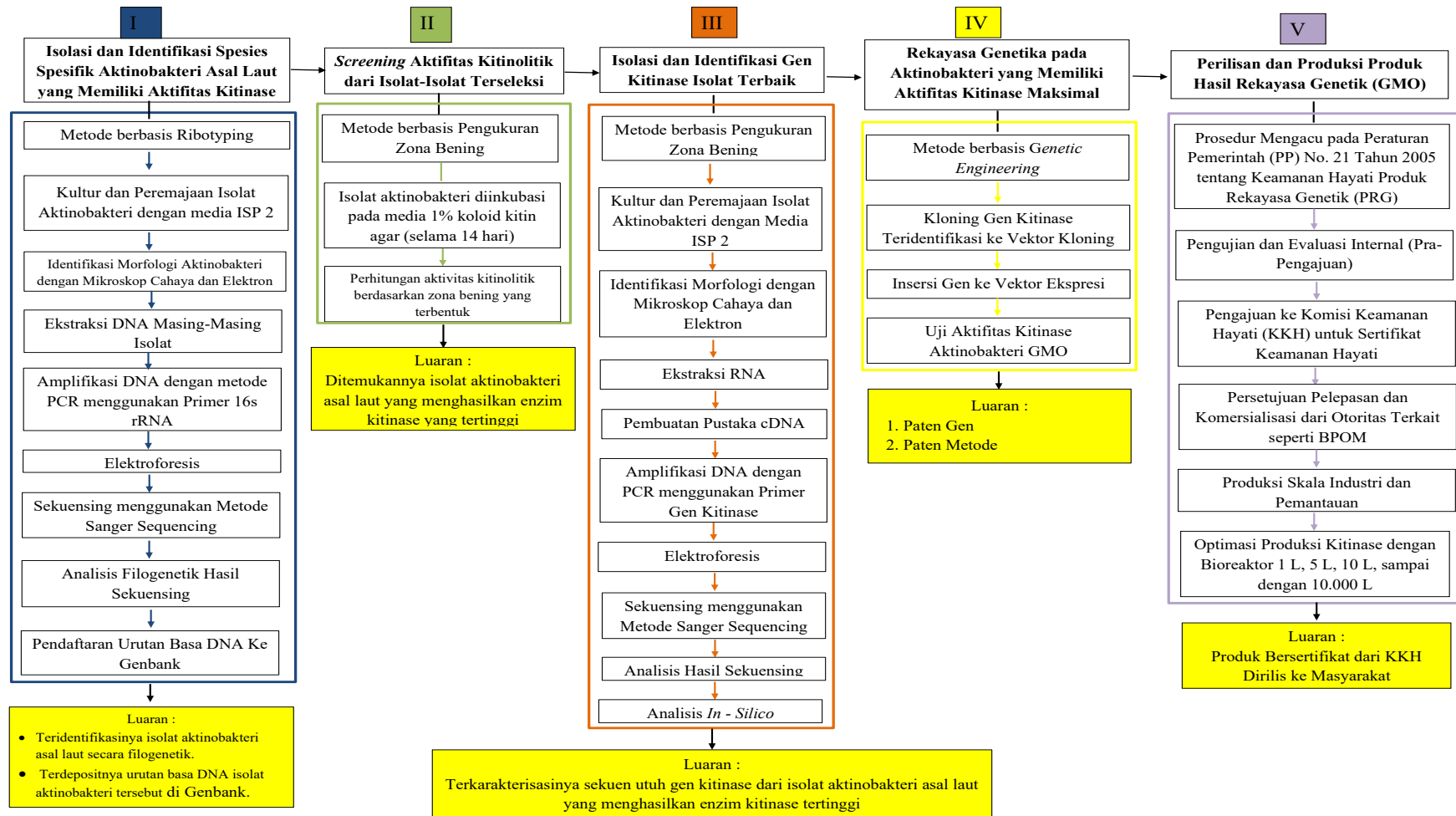
2. Mengkarakterisasi gen kitinase dari aktinobakteri pengurai kitin kulit udang terseleksi secara *in silico* melalui *molecular docking*.

1.4. Kerangka Teoritis

Kerangka teoritis dari penelitian ini adalah telah diketahuinya kemampuan kitinolitik dari aktinobakteri laut. Enzim kitinase aktinobakteri laut (*Streptomyces* sp. DA11) sudah berhasil dikarakterisasi. Pemodelan molekuler enzim kitinase dari aktinobakteri laut *Streptomyces olivaceus* yang mendegradasi limbah cangkang kepiting sudah berhasil dilakukan. Di sisi lain, limbah kulit udang masih bisa diolah untuk meningkatkan nilai ekonomisnya. Pemanfaatan limbah kulit udang sampai saat ini adalah pemanfaatan kitin dan kitosan.

Produksi kitin dan kitosan bisa dilakukan secara kimia maupun enzimatik menggunakan enzim kitinase oleh aktinobakteri. Produksi enzim oleh aktinobakteri dengan menggunakan metode SSF menunjukkan aktivitas enzim sebanyak 2 hingga 20 kali lebih tinggi dibandingkan metode *Submerged Fermentation*.

Identifikasi spesies aktinobakteri bisa dikonfirmasi melalui sekuensing gen 16S rRNA dan dibandingkan dengan database genbank di website NCBI. Kekerabatan aktinobakteri disusun menggunakan pohon filogenetik. Gen *ChiA* menjadi salah satu target untuk mengetahui aktivitas kitinase untuk menghidrolisis kitin oleh mikroorganisme terutama aktinobakteri. Struktur protein enzim kitinase dianalisis menggunakan pendekatan *molecular docking* secara *in silico*. Spesifitas kitinase dapat dianalisis dengan membandingkan sequence group kitinase dalam database Protein Data Bank (PDB). Struktur tersier dan 2D ligand bisa digunakan untuk mendeteksi daerah sisi aktif enzim kitinase dalam menghidrolisis kitin. Jika gen kitinase dari isolat terbaik aktinobakteri laut pengurai kitin kulit udang telah terkarakterisasi, selanjutnya akan memudahkan pengembangan *genetik engineering* terkait produksi enzim kitinase maupun produk hasil penguraian kitin kulit udang. *Big Picture* penelitian ini disajikan oleh Gambar 1, dimana penelitian disertasi ini meliputi tahap I, II, dan III.



Gambar 1. Diagram alir *Big Picture* Penelitian secara Utuh. Penelitian disertasi ini ada di tahap I, II, dan III.

1.5. Keaslian dan Kebaruan Penelitian

Berdasarkan kerangka teoritis, maka penelitian ini memiliki 3 kebaruan. Pertama, ditemukannya metode identifikasi spesies spesifik aktinobakteri asal laut secara filogenetik. Kedua, ditemukannya metode yang lebih mudah dan cepat untuk menganalisis spesies aktinobakteri laut. Ketiga, ditemukannya metode untuk mengkarakterisasi gen kitinase dari aktinobakteri laut yang selama ini belum pernah dilaporkan melalui informasi sekuen gen utuhnya secara *in silico* dengan pendekatan *molecular docking*.

1.6. Kontribusi Penelitian

Kontribusi Penelitian ini adalah:

1. Diketahui spesies spesifik secara filogenetik isolat aktinobakteri yang menghasilkan enzim kitinase tertinggi pada kultur kulit udang secara SSF.
2. Diketahui gen yang menghasilkan enzim kitinase spesifik yang mengurai kulit udang secara SSF dari isolat teridentifikasi.
3. Dengan mengetahui gen spesifik kitinase tersebut, dihasilkan prosedur standar dalam hal analisis kinerja enzim kitinase.

II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Aktinobakteri

Aktinobakteri merupakan bakteri gram positif yang mampu membentuk struktur filamen seperti hifa pada jamur (Berdy, 2005). Aktinobakteri menampilkan diferensiasi morfologis terbesar di antara bakteri gram positif; namun, struktur sel aktinobakteri adalah prokariota yang khas dan sangat berbeda dengan fungi. Seluruh struktur sel hifa sesuai dengan organisasi bakteri: sitoplasma mengandung daerah DNA genom, ribosom, dan berbagai inklusi, cadangan senyawa organik seperti polifosfat, lipid, atau polisakarida.

Berdasarkan perbedaan morfologi dan fungsinya, miselia dapat dibedakan menjadi miselium substrat dan miselium udara. Beberapa aktinobakteri dapat membentuk struktur yang rumit seperti spora, rantai spora, sporangia, dan sporangiospora. Karakteristik morfologi penting dari pengklasifikasian aktinobakteri meliputi mode pertumbuhan dan pola sebaran miselium pada substrat, posisi spora, jumlah spora, struktur permukaan spora, bentuk sporangia, serta ada – tidaknya flagela pada sporangiospora (Li *et al.*, 2016).

Aktinobakteri adalah salah satu unit taksonomi terbesar dengan 18 garis keturunan utama yang saat ini dikenali di dalam bakteri domain, dengan 5 subclass, 6 order, dan 14 suborder (Ludwig *et al.*, 2012). Anggota actinobacteria terdiri lebih dari 200 genera dengan menunjukkan tampilan yang luar biasa variasi dalam hal morfologi sel mulai dari cocci (bulat) pada *Micrococcus*, rod (batang) pada *Mycobacterium*, hifa bercabang dengan bantalan spora seperti *Mikromonospora*, miselia yang terfragmentasi dalam bentuk sel cocci dan sel batang seperti *Nocardia*, hingga

actinobacteria yang memiliki hifa aerial yang bercabang dengan diameter 0.5-2 μ m seperti *Streptomyces* (Li *et al.*, 2016). Actinobacteria laut juga bisa dicirikan berdasarkan morfologi seperti struktur filamen, warna massa udara, warna miselium udara dan substrat, pigmen melanin, pigmen difusi serta berdasarkan morfologi spora (Chauhan and Gohel, 2020).

Aktinobakteri termasuk pengurai kitin terbaik. Mereka dapat memanfaatkan kitin sebagai sumber karbon dan nitrogen (Beier & Bertilsson, 2013) dan memiliki rangkaian enzim yang mengesankan untuk degradasi kitin.

2.2. Solid State Fermentation

Solid state fermentation (SSF) merupakan proses fermentasi yang melibatkan matriks padat dengan jumlah yang sangat rendah atau tanpa air bebas, untuk mendukung metabolisme dan pertumbuhan mikroorganisme, serta jumlah kelembapan dalam substrat harus tercukupi (Singhania *et al.*, 2009; Soccol *et al.*, 2017). Sumber nutrisi atau karbon yang berasal dari matriks padat tersebut dimanfaatkan oleh mikroorganisme untuk mendukung perkembangan, pertumbuhan, dan aktivitas metabolismenya. Mikroorganisme mengeluarkan enzim untuk mendegradasi molekul substrat yang dibutuhkan selama fermentasi. Jenis substrat padat dan sifat mikroorganisme merupakan parameter penting yang memengaruhi hasil produksi dan proses SSF (Suresh *et al.*, 2011). Metode solid SSF memiliki beberapa keunggulan dibandingkan dengan submerged fermentation (SmF), diantaranya yaitu lebih sederhana, biaya yang relatif rendah, potensi sumber daya substrat yang melimpah, produktivitas fermentasi dan stabilitas yang lebih tinggi, permintaan sterilitas yang lebih rendah, dan rendahnya kemungkinan untuk kontaminasi (Singhania *et al.*, 2009). Beberapa contoh limbah padat yang dapat digunakan, yakni limbah agroindustri (kulit nanas, ampas tebu, dedak gandum, dan sebagainya), dan limbah makanan laut (kulit udang, cangkang kepiting, dan sebagainya) (Ooi *et al.*, 2021; Sath *et al.*, 2018).

Bahan baku untuk teknologi fermentasi padat dapat menggunakan limbah kulit udang yang relatif murah dan ketersediaannya yang cukup melimpah karena masih minimnya pengolahan limbah kulit udang. Limbah udang mengandung nutrisi yang bermanfaat, seperti kitin, protein, dan kalsium karbonat (Hamed *et al.*, 2016). Penerapan limbah kulit udang sebagai bahan baku teknologi fermentasi padat dapat mencegah pencemaran lingkungan yang berkelanjutan.

Teknologi SSF digunakan untuk memberikan nilai tambah produk yang dihasilkan melalui mikroorganisme seperti aktinobakteri yang mampu menguraikan kulit udang untuk memproduksi metabolit sekunder (Yazid *et al.*, 2017).

2.3. Kitin Kulit Udang

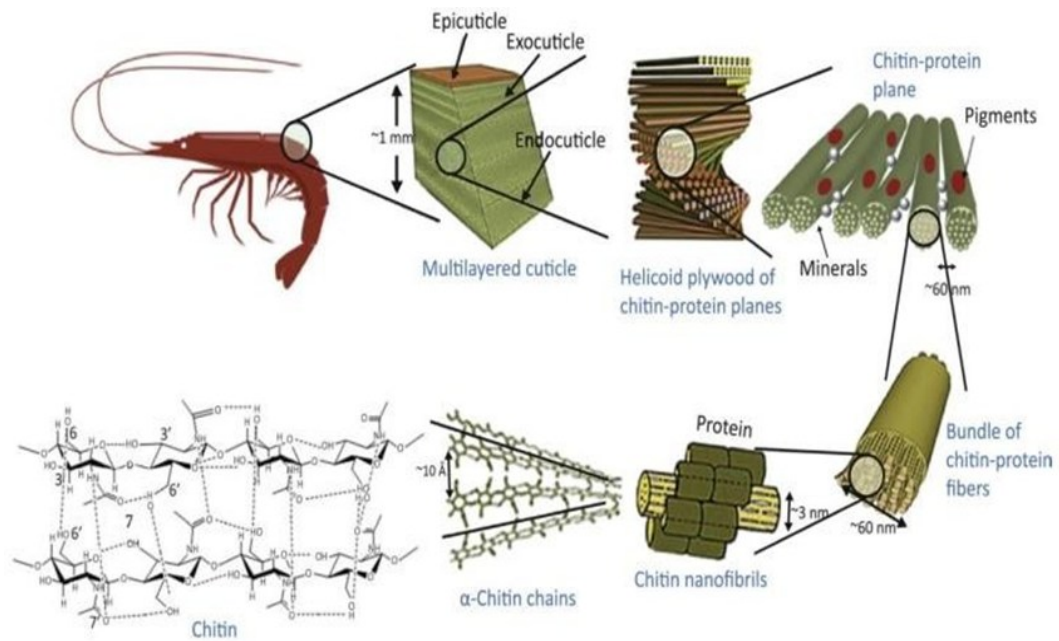
Industri pengolahan udang menghasilkan produk sampingan dalam jumlah besar, seperti kulit udang. Produk sampingan udang ini biasanya digunakan untuk pakan ternak dan pupuk hayati yang bernilai rendah (Nguyen *et al.*, 2016). Oleh karena itu, sangat penting untuk mengubah produk sampingan menjadi produk bernilai tinggi. Kulit udang terdiri dari kitin, protein, dan mineral (Setoguchi *et al.*, 2012).

Kitin merupakan polisakarida alami terbesar kedua setelah selulosa yang dapat ditemukan pada eksoskeleton arthropoda, jamur dan mukosa usus serangga. Kitin adalah polisakarida linier yang terdiri dari β (1-4) yang terkait dengan N-asetil-D-glukosamin. Kitin tidak larut dalam air dan memiliki 2 bentuk polimorfik kristal, yaitu bentuk α dan β . Bentuk α -kitin terdiri dari lembaran-lembaran rantai paralel dan antiparalel bolak-balik yang tersusun rapat (Minke and Blackwell, 1978), sering ditemukan dalam rangka luar artropoda, serangga, serta pada dinding sel jamur dan ragi. Bentuk β -kitin merupakan rantai yang tersusun paralel (Gardner & Blackwell, 1975). β -kitin jarang ditemukan di alam namun dapat diekstraksi dari tinta cumi.

Kitin adalah biopolimer, polimer alami yang diproduksi oleh organisme hidup. Kitin merupakan biopolimer dengan kelimpahan terbanyak kedua di alam setelah selulosa. Perbedaan utama antara kitin dan selulosa adalah adanya gugus amino yang dapat memberikan fungsi biologis antara lain biokompatibilitas dan aktivitas antibakteri (Duan *et al.*, 2018).

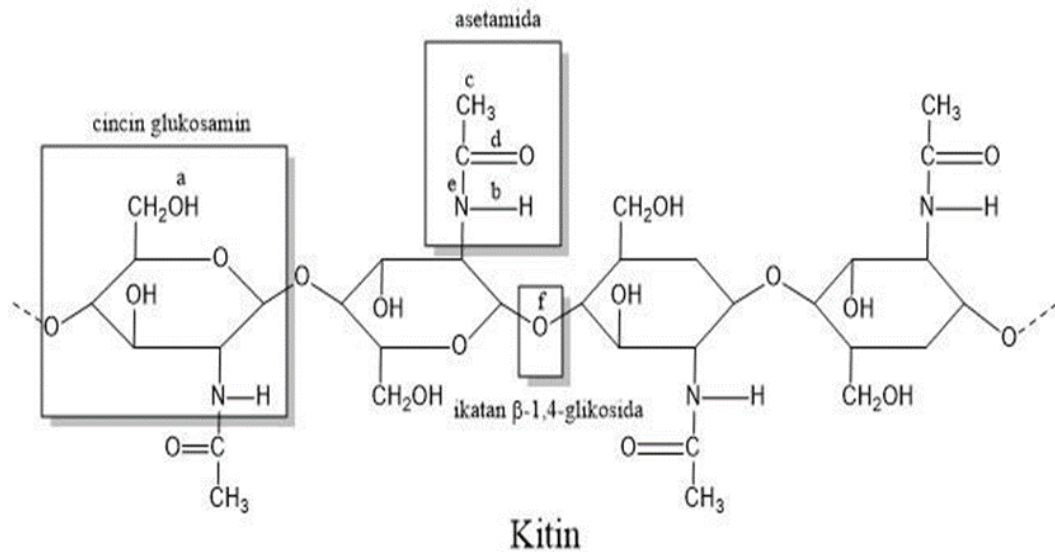
Karakteristik dari kitin antara lain bewarna putih, tidak larut dalam pelarut encer polar dan nonpolar, memiliki sifat biokompatibilitas, biodegradabilitas, antibakteri, nontoksik, dan mempunyai bioaktivasi serta daya absorpsi yang ditentukan oleh sifat fisika dan kimianya (Zvezdova *et al.*, 2011). Sifat-sifat tersebut membuat kitin dapat digunakan dalam berbagai aplikasi, antara lain di bidang pertanian, biomedis, untuk pengolahan air, serta industri makanan (Ahlafi *et al.*, 2013).

Kitin umumnya ditemukan dalam bentuk kristal mikrofibril pada komponen struktural krustasea, serangga, sel-sel jamur dan mikroorganisme lainnya (Ray, 2013). Gambar 2 menunjukkan bahwa struktur cangkang krustasea terdiri dari 3 lapis yaitu epikutikula, eksokutikula, dan endokutikula. Kitin terutama ditemukan pada lapisan dalam (endokutikula) dan dikelilingi oleh lapisan protein. Lapisan tengah (eksokutikula) mengandung kitin dan mineral, sedangkan lapisan atas (epikutikula) mengandung protein dan mineral.



Gambar 2. Struktur dan Tata Ruang dalam Cangkang Krustasea (Chen *et al.*, 2016).

Kitin terutama terdiri dari residu N-asetil-D-glukosamin, yang dilekatkan oleh ikatan β – (1,4) – glikosidik (Gambar 2). Proses dekomposisi kitin pada air dengan temperatur tinggi tidak menyebabkan terputusnya ikatan glikosidik secara drastis seperti selulosa. Hal ini dipengaruhi adanya gugus asetil amida yang meningkatkan reaktivitas pada struktur (Osada *et al.*, 2014). Struktur kitin yang sangat teratur dan kaku dengan adanya ikatan hidrogen intra dan intermolekuler memiliki peran penting dalam kelarutan kitin (Sharma *et al.*, 2013). Meskipun demikian, proses transformasi kitin menjadi monomer yang lebih sederhana tetap dapat dilakukan dengan beberapa metode umum. Ada dua metode, yaitu dengan hidrolisis enzimatis seperti selulase, kitinase, atau kitosanase, dan dengan hidrolisis secara kimia dengan pelarut seperti HCl, H₂SO₄, H₃PO₄ pada pemanasan. Monomer gula amino yang terbentuk seperti GlcNAc dan GlcNH atau kitooligomer memiliki aplikasi yang luas dalam biomedis, farmasi, dan industri makanan (Xia *et al.*, 2008). Struktur kitin dapat dilihat pada Gambar 3 berikut ini :



Gambar 3. Struktur Kitin (Das *et al.*, 2016).

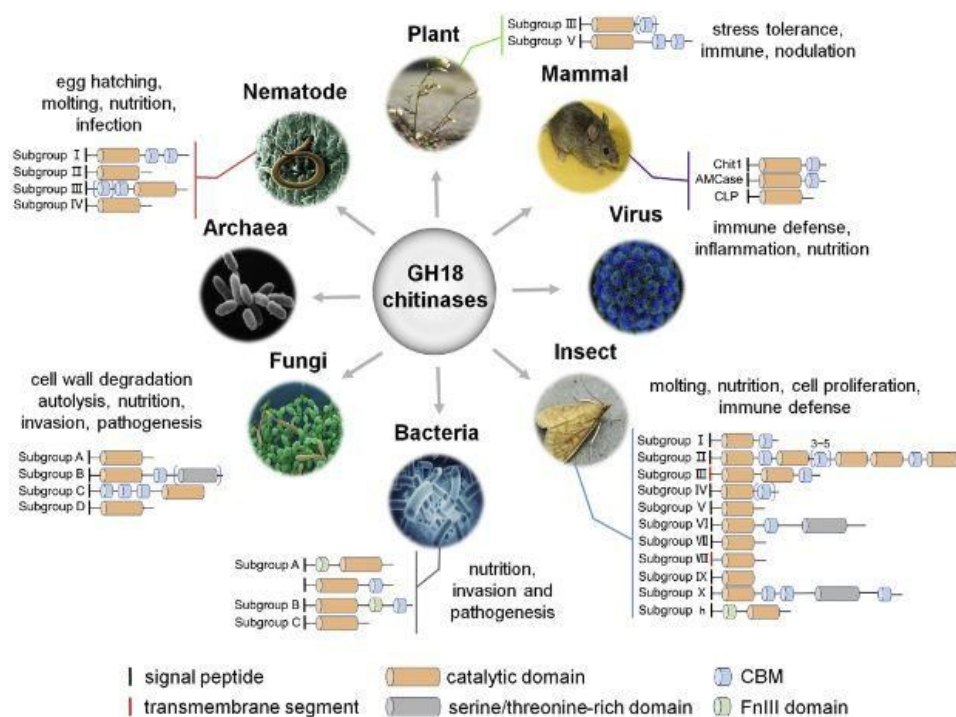
Hidrolisis kitin menjadi glukosamin dengan bantuan katalis asam (asam sulfat) telah dilaporkan oleh Zhang and Yan (2017) yang menghasilkan produk akhir hingga 80% pada suhu 175°C, dan Benavente *et al.* (2015) menggunakan katalis HCl menghasilkan produk akhir glukosamin sebanyak 58% pada suhu tinggi. Hidrolisis kitin dengan bantuan endokitinase dan NAGase dari *C. Tainanensis* berhasil menghasilkan N-asetilglukosamin pada pH 7 (Chen *et al.*, 2011).

2.4. Enzim Kitinase

Kitinase adalah sekelompok enzim hidrolitik yang memutus ikatan β -1,4-glikosidik antara dua N-asetil-D-glukosamin (GlcNAc) berturut-turut dari rantai kitin (Xia *et al.*, 2001). Enzim kitinase dapat dihasilkan oleh bakteri, fungi, tanaman, dan hewan. Kitinase memiliki afinitas khusus dalam mendegradasi kitin menjadi molekul berbobot rendah seperti COS (chitooligosaccharides) dan GlcNAc (N-acetylglucosamine).

Menurut database Carbohydrate-Active enZymes (CAZy) (Lombard *et al.*, 2014), kitinase dikelompokkan menjadi tiga keluarga hidrolase glycosyl (GH) yaitu

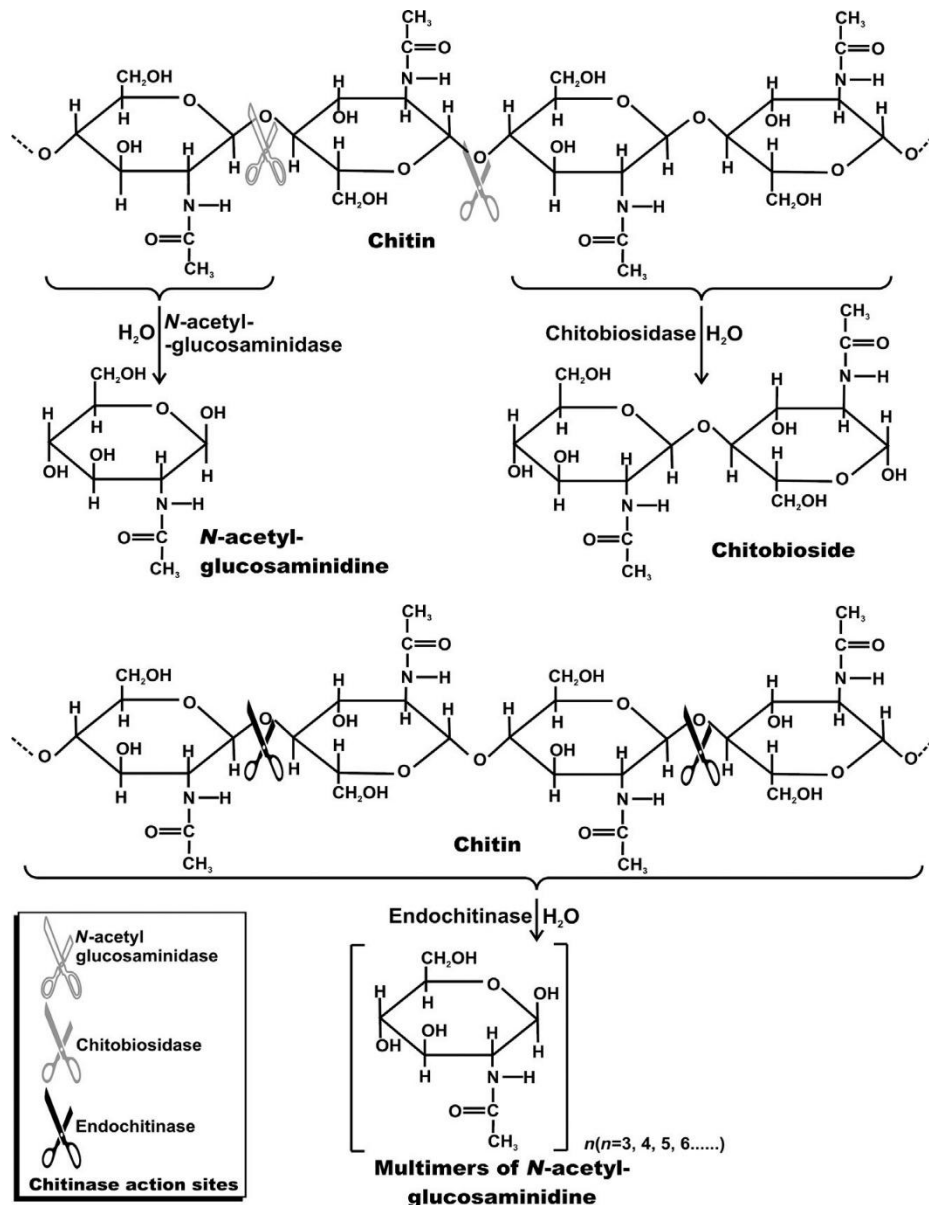
sebagian besar pada keluarga (family) 18, 19 (Henrisat & Bairoch, 1993) dan 20. Sebagian besar kitinase termasuk dalam family 18, meliputi kitinase dari bakteri, jamur, arkea, nematoda, insekta, virus, dan beberapa kitinase dari tanaman dan hewan (kelas III dan V) yang diilustrasikan di Gambar 4 (Chen *et al.*, 2020). Family 19 meliputi keseluruhan kitinase tanaman (kelas I, II, dan IV). Family 20 meliputi β -N-acetylhexosaminidases dari bakteri streptomycetes (Qu *et al.*, 2021) dan manusia (Rathore and Gupta, 2015).



Gambar 4. Keragaman distribusi, domain arsitektur dan fungsi kitinase dalam masing-masing organisme (Chen *et al.*, 2020).

Klasifikasi dan nomenklatur enzim kitinolitik masih belum terdefinisi dengan baik hingga saat ini. Penelitian kontemporer, Graham and Sticklen (1994) telah mengusulkan dua kategori utama dari kitinase, yaitu endokitinase dan eksokitinase. Sekelompok kitinase yang membelah secara acak di situs internal rantai kitin dan menghasilkan oligomer GlcNAc (N-asetilglukosamin) dengan berat molekul rendah seperti kitotetraosa, kitotriosa, dan lain-lain., dikenal sebagai endokitinase (EC3.2.1.14). Sedangkan, kitinase yang memutus rantai kitin dari ujung non-

pereduksi dikategorikan ke dalam kelompok eksokitinase. Berdasarkan pelepasan produk, eksokitinase dikategorikan menjadi dua subkategori, yaitu kitobiosidase (EC 3.2.1.29) dan β -(1,4)-N-asetil- glukosaminidase (EC 3.2.1.30) (Cohen-Kupiec & Chet, 1998). Kitobiosidase berperan hanya melepaskan diasetilkitobiosa dari ujung kitin yang tidak pereduksi. Sebaliknya, β -(1,4)-N-asetil-glukosaminidase hanya melepaskan GlcNAc sebagai satu-satunya produk dari ujung non-pereduksi polisakarida kitin (Gambar 5).



Gambar 5. Tipe Enzim Kitinase (Das *et al.*, 2016).

Kitosan adalah turunan kitin yang sebagian atau seluruhnya terdeasetilasi yang terdiri dari D-glukosamin (GlcN) yang dihubungkan dengan ikatan 1,4-glikosidik dan mengandung sejumlah kecil GlcNAC (Zheng *et al.*, 2021). Kitosan merupakan produk kitin yang terdeasetilasi sebagian, yang telah dipelajari secara luas dan digunakan dalam aplikasi biomedis (Fu *et al.*, 2005). Kitosan memiliki pKa 6,5, dan hanya larut dalam kondisi asam melalui protonasi gugus amino (Liaqat and Eltem, 2018).

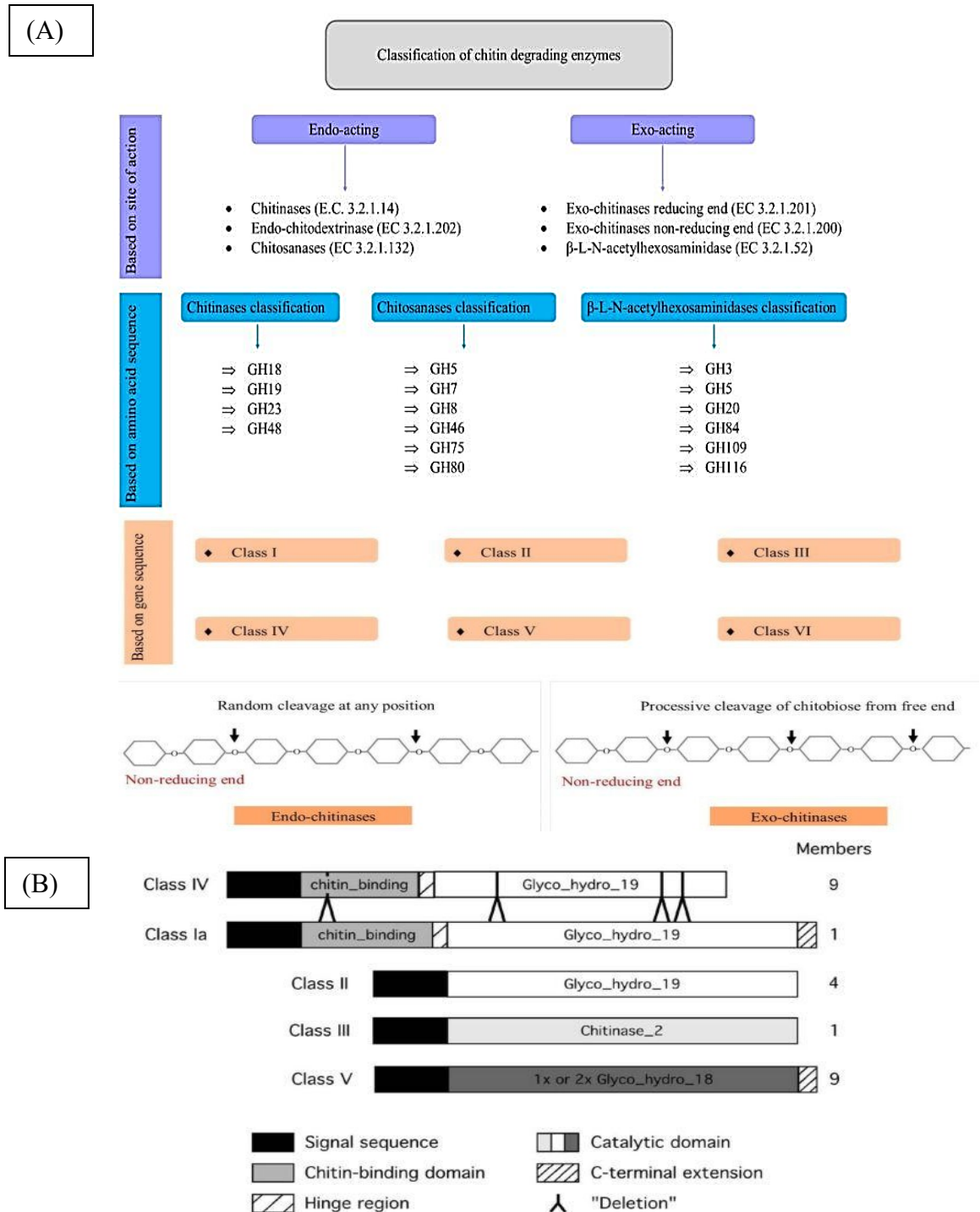
Beberapa penelitian telah melaporkan berbagai jenis mikroba penghasil kitinase antara lain bakteri seperti *Aeromonas hydrophila* dan *Aeromonas punctata* (Saima and Roohi, 2013), *Bacillus pumilus* (Rishad *et al.*, 2016), *Bacillus thuringiensis* dan *Bacillus licheniformis* (Gomaa, 2012), jamur seperti *Humicola grisea* (Kumar *et al.*, 2017), *Rhizomucor miehei* (Yang *et al.*, 2016), dan *Aspergillus flavus* (Rawway *et al.*, 2018), serta Actinomycetes seperti *Thermobifida fusca* (Gaber *et al.*, 2016), *Streptomyces pratensis* (Shivalee *et al.*, 2018), dan *Saccharothrix yanglingensis* (Lu *et al.*, 2018).

2.5. Klasifikasi Kitinase Berdasarkan Urutan Sekuens Genom

Kitinase diklasifikasikan menjadi enam kelas yang berbeda, berdasarkan urutan gen penghasil kitinase (Gambar 6). Kelas kitinase ditentukan oleh berbagai karakteristik, seperti pH isoelektriknya, sinyal, urutan pada N-terminal, inducer, dan lokalisasi enzim (Patil *et al.*, 2000). Berikut kelas kitinase berdasarkan urutan gen pada genom Arabidopsis.

Kitinase di kelas I memiliki terminal-N yang kaya sistein. Hal ini berhubungan dengan lokalisasi vakuolar, dan memiliki valin atau peptida sinyal kaya leusin. Kitin kelas I dibagi lagi menjadi dua sub-kelas yang berbeda, berdasarkan sifat asam atau basa. Tanaman sebagian besar merupakan endo-kitinase, disajikan di kelas I. Kitinase kelas II memiliki urutan yang mirip dengan kitin kelas I, tetapi pada kelas II tidak kaya akan sistein N-terminal. Kelas ini hanya terdiri dari exo-

chitinases, dan mengandung kitinase dari tanaman, jamur, dan bakteri (Passarinho & de Vries, 2002).



Gambar 6. Klasifikasi kitinase (A) Enzim Pendegradasi Kitin (Poria *et al.*, 2021) dan (B) Klasifikasi dan truktur protein kitinase yang ditemukan dalam genom Arabidopsis (Passarinho & de Vries, 2002).

Urutan sekuense kitinase kelas III berbeda dengan kitin kelas I atau kelas II. Kitinase kelas III memiliki domain katalitik GH18 dengan lipatan $(\beta/\alpha)_8$ -barrel. Proses ini memiliki tiga ikatan disulfida yang lestari, dan pelipatannya agak mirip dengan bakteri dan kitin jamur, meskipun kesamaan urutan rendah. Dibandingkan dengan kitinase kelas I, ukuran kitin kelas IV secara signifikan lebih kecil, tetapi mereka memiliki karakteristik yang mirip, termasuk sifat imunologi. Kitinase di kelas V dan kelas VI tidak dikarakterisasi dengan cukup baik. Berdasarkan urutan gen, dilaporkan bahwa N-terminal kaya sistein tampaknya hilang selama evolusi, seperti yang diamati dalam salah satu contoh kitinase kelas V, karena tekanan seleksi yang lebih sedikit. Ada dua domain pengikat kitin secara bersamaan di kitin kelas V (Passarinho & de Vries, 2002).

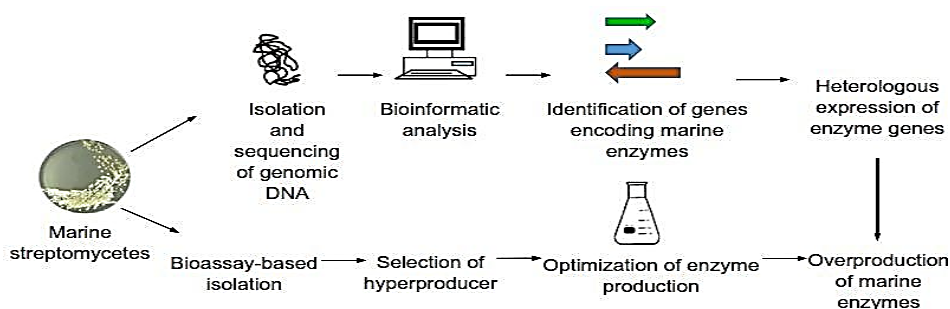
2.6. Pengujian Aktifitas Enzim Kitinase

Enzim kitinase dapat diproduksi oleh beragam mikroorganisme, termasuk aktinobakteri (Wahyudi *et al.*, 2021). Beragam aktinobakteri dapat menjadi kandidat penghasil enzim kitinase (Laila *et al.*, 2021; Wahyudi *et al.*, 2021), yang kemudian dapat dimanfaatkan sesuai dengan kebutuhan masing-masing. Kandidat penghasil enzim kitinase terbaik dapat diuji berdasarkan aktifitas enzim kitinase tertinggi. Aktifitas enzim kitinase dapat diuji dengan beberapa metode seperti pengujian menggunakan pengukuran terhadap kemampuan mereduksi glukosa (N-acetyl-D-Glucosamine) (Wahyudi *et al.*, 2021). Pengujian dengan metode ini membutuhkan penambahan reagen 3,5-dinitrosalicilic acid (DNS) (Laila *et al.*, 2021; Wahyudi *et al.*, 2021). Reagen 3,5-dinitrosalicilic acid ini mengoksidasi grup aldehid di glukosa yang berkaitan dengan asam karboksilat (Saqib & Whitney., 2011). Larutan standar glukosamin dan blanko dengan variasi konsentrasi digunakan sebagai standar. Nilai absorbansi diukur menggunakan spektrofotometer UV-vis dengan panjang gelombang 540 nm. Satu unit (1 U) dari aktivitas kitinase menunjukkan jumlah enzim yang diperlukan untuk memproduksi 1 μ mol glukosamin selama 1 menit (Laila *et al.*, 2021).

Pengukuran berbasis glukosamin ini dapat diawali dengan pengujian aktifitas kitinolitik dari isolate kandidat. Aktifitas kitinolitik merupakan aktifitas dimana terjadi hidrolisis atau degradasi kitin untuk menghasilkan monomer N-acetylglucosamine (Setia & Suharjono, 2015). Pengujian aktifitas kitinolitik dilakukan dengan menginokulasikan isolate yang sudah dikultur ke media koloidal kitin dan diinkubasi selama 4-14 hari. Aktifitas kitinolitik ditandai dengan terbentuknya zona bening yang terbentuk setelah masa inkubasi, dimana semakin luas zon bening yang terbentuk maka menandakan aktifitas kitinolitik yang terjadi semakin besar (Laila *et al.*, 2021; Wahyudi *et al.*, 2021). Berdasarkan hal tersebut, aktifitas kitinolitik ini dapat merepresentasikan aktifitas enzim kitinase, dimana semakin tinggi aktifitas kitinolitik, maka semakin tinggi pula aktifitas enzim kitinase dari isolat tersebut (Gonfa *et al.*, 2023)

2.7. Eksplorasi Gen Penghasil Enzim Kitinase dari Mikroorganism

Strategi peningkatan produksi enzim dari aktinobakteri laut menggunakan metode klasik maupun eksplorasi dari genom sudah banyak dilakukan. Metode eksplorasi pada genom, gen penyandi enzim diidentifikasi melalui analisis bioinformatik dari urutan genom, sedangkan metode klasik mengoptimalkan produsen enzim berbasis bioassay, diikuti dengan pemilihan enzim hyperproducer dan optimalisasi media produksi dan kondisi atau lingkungan kultur mikroorganism (Zhao *et al.*, 2016) yang ditunjukkan oleh Gambar 7.



Gambar 7. Alur eksplorasi produksi enzim secara klasik dan bioinformatik (Zhao *et al.*, 2016).

Metode eksplorasi gen penghasil enzim memanfaatkan analisis bioinformatik dari urutan genom, urutan genomik DNA didapat diperoleh dengan sekuensing dalam sampel DNA target atau dapat dengan mudah diambil dari database, seperti yang dicontohkan oleh penemuan biosintesis fluoroasetat di *S. xinghaiensis* (Huang *et al.*, 2014). Setelah identifikasi gen tertarik coding untuk berbagai enzim, produksi enzim dapat dicapai dengan ekspresi heterolog di berbagai strain inang, termasuk *Escherichia coli* dan strain ragi *Saccharomyces cerevisiae* dan *Pichia pastoris*.

Penelitian yang dilakukan oleh Tsujibo *et al.* (2003) mengenai karakterisasi gen penkode kitinase dari aktinomicetes laut *Nocardiopsis prasina* OPC-131 yang mensekresikan enzim kitinase ChiA, ChiB, and ChiBΔ. *Open reading frame* (ORF) chiA mengkodekan protein dari 336 asam amino dengan massa molekul terhitung 35.257 Da. ChiA hanya terdiri dari domain katalitik dan menunjukkan homologi yang signifikan dengan family 18 kitin. ORF chiB mengkodekan protein dari 296 asam amino dengan massa molekul terhitung 31.500 Da. ChiB adalah modul enzim yang terdiri dari domain pengikat kitin tipe 3 (ChtBD tipe 3) dan domain katalitik. Katalitik domain ChiB menunjukkan kemiripan yang signifikan dengan keluarga *Streptomyces* 19 kitin. ChiB menunjukkan hidrolisis kitin dan aktivitas antijamur yang lebih kuat daripada ChiBΔ, menunjukkan bahwa ChtBD tipe 3 dari ChiB memainkan peran penting dalam hidrolisis kitin yang efisien dan aktivitas antijamur.

Gen *ChiA* digunakan untuk mengeksplorasi sepuluh habitat mikroba (6 habitat terestrial, 4 habitat akuatik) untuk melihat potensi mikroba kitinolitik dalam struktur komunitas mikroba dengan pendekatan metode metagenomik (Cretoiu *et al.* 2012). Selain itu Gen *ChiA* digunakan untuk analisis bakteri produksi kitinase di teluk Chesapeake Amerika Serikat. Primer PCR khusus untuk gen *chiA* dirancang dengan *alignnet* (pensejajaran) dan pemilihan daerah yang sangat terkonservasi dari sekuens *chiA* *Serratia marcescens*, *Alteromonas* sp., *Bacillus circulans* dan *Aeromonas caviae*. Primer dan probe *chiA* PCR digunakan untuk mendeteksi keberadaan *chiA* gen dalam kumpulan 53 strain referensi dan memberikan hasil yang konsisten (Ramaiah *et al.*, 2000).

Gen pengkode enzim kitinase pada setiap organisme memiliki nama yang berbeda-beda, namun sebagian besar dinamakan dengan gen *Chi*. Tabel 1 berikut ini menunjukkan informasi gen pengkode kitinase pada masing-masing organisme.

Tabel 1. Gen Pengkode Kitinase pada Organisme

No	Nama Gen	Organisme	Referensi
1	<i>FvChi-14</i>	<i>Fragaria vesca</i>	He <i>et al.</i> , 2023
2	<i>HtCHT1</i> , <i>HtCHT3</i> dan <i>HtCHT4</i>	<i>Helice tientsinensis</i>	Chen <i>et al.</i> , 2023
3	<i>ChiC</i>	<i>Streptomyces griseus</i> HUT6037	Kawase <i>et al.</i> , 2004
4	<i>Chi6769</i>	<i>Saccharothrix yanglingensis</i> Hhs.015	Lu <i>et al.</i> , 2018
5	<i>Chitbac</i>	<i>Bacillus</i> sp. Rh 3.8	Muzuni <i>et al.</i> , 2018
6	<i>ChiH</i>	<i>Streptomyces coelicolor</i>	Nazari <i>et al.</i> , 2011
7	<i>ChiA</i> , <i>ChiB</i> , <i>ChiC</i> , dan <i>ChiD</i>	<i>Alteromonas</i> sp. Strain O-7	Orikoshi <i>et al.</i> , 2005

Proses ekstraksi kitosan dari fungi dapat dilakukan melalui empat tahapan, yaitu pemanenan biomassa fungi, deproteinasi dan deasetilasi, ekstraksi, serta sentrifugasi dan pencucian. Pada tahap pertama, biomassa fungi yang berbentuk miselium dipanen setelah difermentasi selama kurang lebih empat belas hari. Biomassa ini banyak mengandung kitin yang merupakan prekursor kitosan. Selanjutnya, biomassa fungi di deproteinasi menggunakan asam dan di deasetilasi menggunakan basa untuk menghilangkan protein dan gugus asetil yang terdapat pada kitin. Kitosan kemudian diekstraksi menggunakan pelarut asam seperti asam asetat, asam klorida, atau asam sulfat. Tahap terakhir, ekstrak kitosan disentrifugasi untuk menghilangkan pengotor dan dicuci untuk menetralkan kitosan (Kasongo *et al.*, 2020).

2.8. Perkembangan Analisis DNA

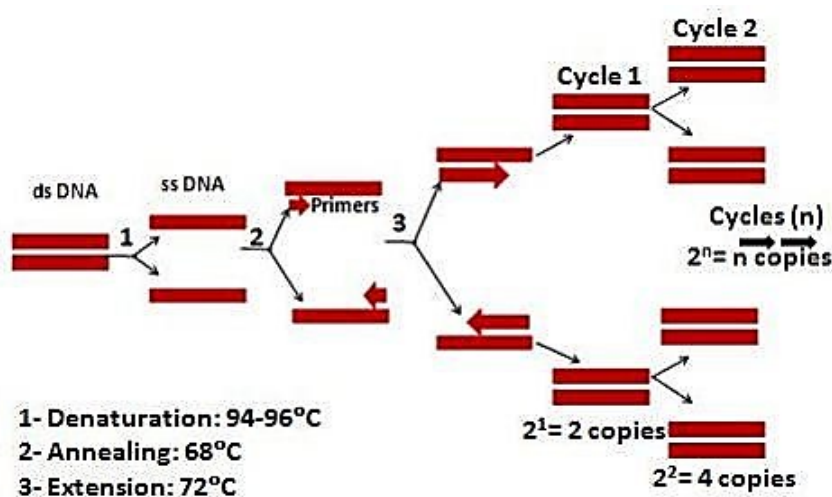
Perkembangan teori pewarisan DNA mencapai puncaknya dengan dipublikasikannya struktur molekul DNA pada tahun 1954. Selanjutnya ditemukan oleh Oswald Avery pada tahun 1944 bahwa DNA adalah materi genetik, dan kemudian Erwin Chargaff menunjukkan bahwa proporsi basa yang termasuk dalam struktur DNA mengikuti hukum tertentu. Penemuan ini, yang dikaitkan dengan studi biofisik Maurice Wilkins dan Rosalind Franklin dengan Raymond Gosling, membawa James Watson dan Francis Crick pada penemuan struktur heliks ganda DNA pada tahun 1953 (Portin, 2014).

Penemuan struktur heliks ganda DNA pada tahun 1953 tetap menjadi titik penting dalam kemajuan bidang biologi dan ilmu biomedis masa kini. Struktur ini menjadi langkah awal untuk mengetahui sekitar dua ribu struktur kristal DNA dalam enam puluh delapan tahun berikutnya. Variasi struktur DNA telah berkembang untuk menunjukkan struktur lokal yang tergantung pada urutan dalam DNA ganda, serta pembengkokan DNA dalam urutan pendek dan panjang serta dalam DNA yang melilit di sekitar nukleosom, dan juga mencakup DNA ganda dengan orientasi kidal. Selain heliks ganda itu sendiri, dalam kondisi di mana urutan DNA bisa terpisah atau dipaksa keluar dari dupleks, berbagai topologi dan bentuk dapat muncul. Struktur kuadrupleks, yang didasarkan pada inti empat untai dari tumpukan kuartet G, cukup umum meskipun tidak tersebar secara acak dalam genom manusia dan genom lainnya, dan bisa berkontribusi dalam proses transkripsi, translasi, dan replikasi. Namun, lipatan yang lebih kompleks dapat menghasilkan DNA dengan struktur tersier yang lebih luas dan kemampuan enzimatik/katalitik (Neidle, 2021).

2.9. *Polymerase Chain Reaction (PCR)*

PCR adalah salah satu teknik dalam biologi molekuler untuk mengamplifikasi atau menggandakan sejumlah kecil DNA secara *in vitro* menggunakan sistem enzimatik dan suhu (Mullis, 1990). Komponen yang dibutuhkan dalam reaksi PCR adalah

DNA target (*template*) yaitu fragmen DNA yang akan dilipatgandakan, oligonukleotida primer yaitu suatu sekuen oligonukleotida pendek (15-25 basa nukleotida) yang digunakan untuk mengawali sintesis rantai DNA, deoksiribonukleotida trifosfat (dNTP), bufer, dan yang terakhir enzim DNA polimerase sebagai katalis reaksi sintesis rantai DNA (Karunanathie *et al.*, 2022). Tahapan utama PCR menurut Singh *et al.*, 2014 ditunjukkan oleh Gambar 8.



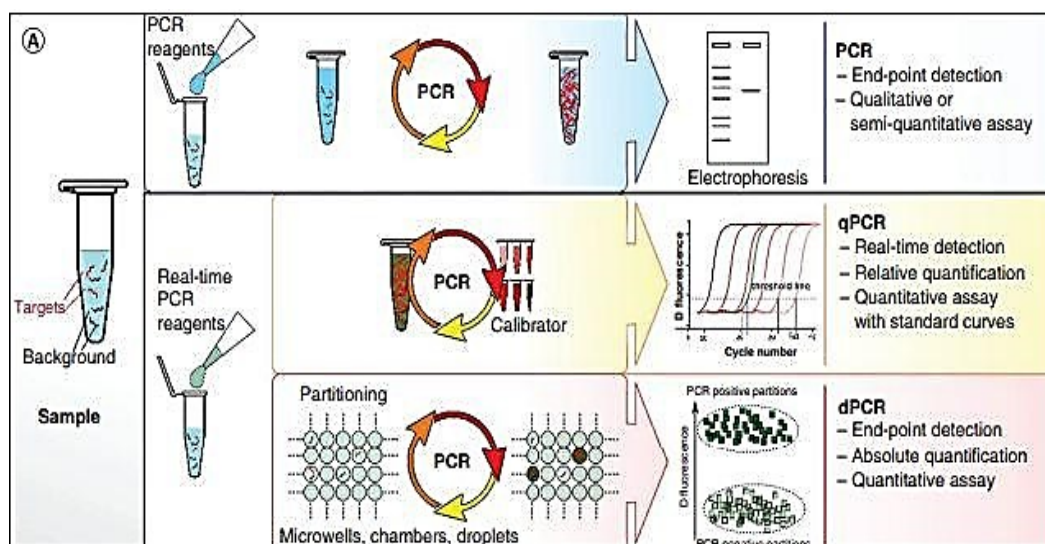
Gambar 8. Tahapan Utama PCR (Singh *et al.*, 2014).

Reaksi PCR terdiri atas beberapa siklus, biasanya 20 sampai 40 siklus. Setiap siklus PCR, DNA polimerase akan menggandakan DNA sebanyak dua kali. Reaksi PCR terdiri atas 3 tahapan utama yang berulang. Tahapan tersebut yaitu denaturasi (denaturation), penempelan (annealing), dan pemanjangan (extension) (Gambar 7) (Singh *et al.*, 2014).

Pemisahan untai DNA (denaturasi) dilakukan pada suhu 94-96°C terjadi pemisahan utas ganda DNA menjadi dua utas tunggal DNA yang menjadi cetakan (*template*) tempat penempelan primer dan tempat kerja DNA polimerase (Deekshit *et al.*, 2013). Selanjutnya proses penempelan yang dilakukan pada suhu penempelan primer pada cetakan DNA untai tunggal dari proses sebelumnya untuk memulai pembentukan pasangan basa nitrogen. Tahapan yang terakhir yaitu pemanjangan.

Suhu pada tahap ini dinaikkan 72°C yang merupakan suhu optimum Taq DNA polimerase untuk polimerisasi selama 30 detik (Putra *et al.*, 2020). Polimerisasi DNA akan mensintesis pita-pita DNA baru dengan cara memanjangkan rantai primer. Waktu pemanjangan bergantung pada panjang daerah yang akan diamplifikasi (You *et al.*, 2011).

Perjalanan metode PCR itu sendiri hingga saat ini sudah mengalami perkembangan yang sangat maju, dimulai dari PCR konvensional, *quantitative* PCR (qPCR) sampai pada digital PCR. Metode PCR konvensional bersifat kualitatif dimana hanya dapat melihat ada atau tidaknya amplifikasi DNA yang ditunjukkan dari hasil elektrogram. qPCR merupakan generasi ke-2 dari metode PCR yang dikembangkan dengan tujuan untuk melakukan kuantifikasi DNA (*copy number*) dengan membandingkan data *real-time* dari proses penggandaan DNA target dengan standar DNA yang telah diketahui jumlahnya. Pengujian kuantitatif pada metode qPCR memerlukan standar DNA sebagai pembanding. Generasi ke-3 dari PCR (digital PCR) dikembangkan dengan kemampuan kuantifikasi DNA secara absolut tanpa memerlukan standar DNA atau kurva standar. Sistem ini mempunyai tingkat sensitivitas yang paling tinggi dibanding dua generasi PCR sebelumnya (Zhu *et al.*, 2020). Perbandingan metode generasi PCR terdapat pada Gambar 9.



Gambar 9. Perbedaan PCR, qPCR dan dPCR (Zhu *et al.*, 2020).

Penelitian dilakukan oleh Williamson & Wellington (2000) menggunakan PCR untuk mendeteksi bakteri dan streptomycetes yang menghasilkan enzim kitinase. Primer di disain menggunakan database family 18 group A kitinase. Setelah dilakukan amplifikasi dengan PCR pada masing-masing sample, hasil amplifikasi disekuensing untuk menentukan asam amino yang terbentuk. Tabel 2 berikut menunjukkan primer yang digunakan untuk amplifikasi PCR dilanjutkan sekuensing.

Tabel 2. Primer untuk Amplifikasi PCR Gen Kitinase (Williamson & Wellington, 2000)

Primer ^d	Target gene (positions) ^b	Sequence (5'→3')
GA1F	Group A bacterial chitinases	cgtegacatcgactggartdbcc
GA1R	Group A bacterial chitinases	acgccgggtccagcncncrta
GASQF	Group A forward sequencing primer	*cgtegacatcgactggga
GASQR	Group A reverse sequencing primer	acgccgggtccagcc
SC1F	Group A streptomycete specific chitinases (1778-1765)	cctacgccgastacgacaaggc
SC2R	Group A streptomycete specific chitinases (2029-2011)	ccgktcgyggtcgcgctgaa
C31F	Group B streptomycete specific chitinases (629-648)	tacacscagcgtgacgg
C41R	Group B streptomycete specific chitinases	ggtckycytggsaggcagt
SCBF	Streptomycete chitin-binding gene (605-624)	gattggtatggacatgtca
SCBR	Streptomycete chitin-binding gene (1286-1311)	gctgctccgactcacctctgac
F19F2	Streptomycete family 19 chitinase	gcctctcgcgcaagtc
F19R	Streptomycete family 19 chitinase	ccgaggatctgggtgt

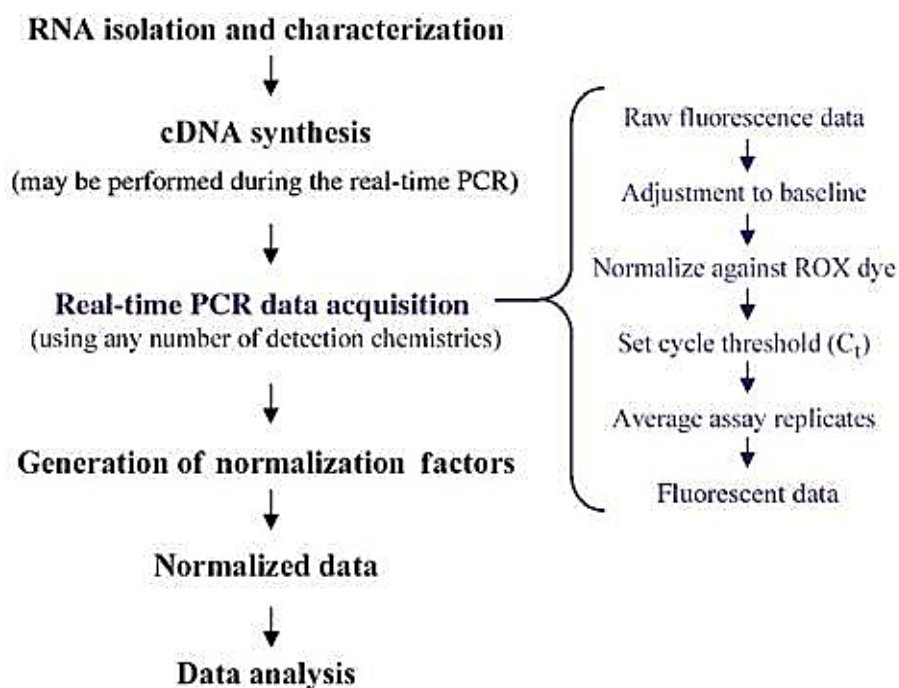
Hingga saat ini, PCR generasi pertama masih terus digunakan untuk amplifikasi gen target kitinase, selanjutnya hasil amplifikasi ini digunakan sebagai template sanger sekuensing untuk mengkonstruksi gen pengkode enzim (Muzuni *et al.*, 2018), filogenetik gen kitinase (Lu *et al.*, 2018; Barboza-corona *et al.*, 2003) dan struktur enzim (Li *et al.*, 2010).

2.10. Reverse Transcriptase-quantitative PCR (RT-qPCR)

RT-qPCR merupakan metode amplifikasi cDNA secara *real-time* sehingga proses perbanyakan cDNA dapat dilihat secara langsung (Singh *et al.*, 2018). PCR *real-time* telah menjadi salah satu metode kuantisasi gen yang paling banyak digunakan

karena memiliki rentang dinamis yang besar, memiliki sensitivitas yang tinggi, tidak ada pemrosesan pasca-amplifikasi (elektroforesis) (Wong & Medrano, 2005). RT-qPCR adalah metode yang paling sensitif untuk deteksi mRNA spesifik, khususnya untuk target dengan konsentrasi yang rendah (Liu & Saint, 2002).

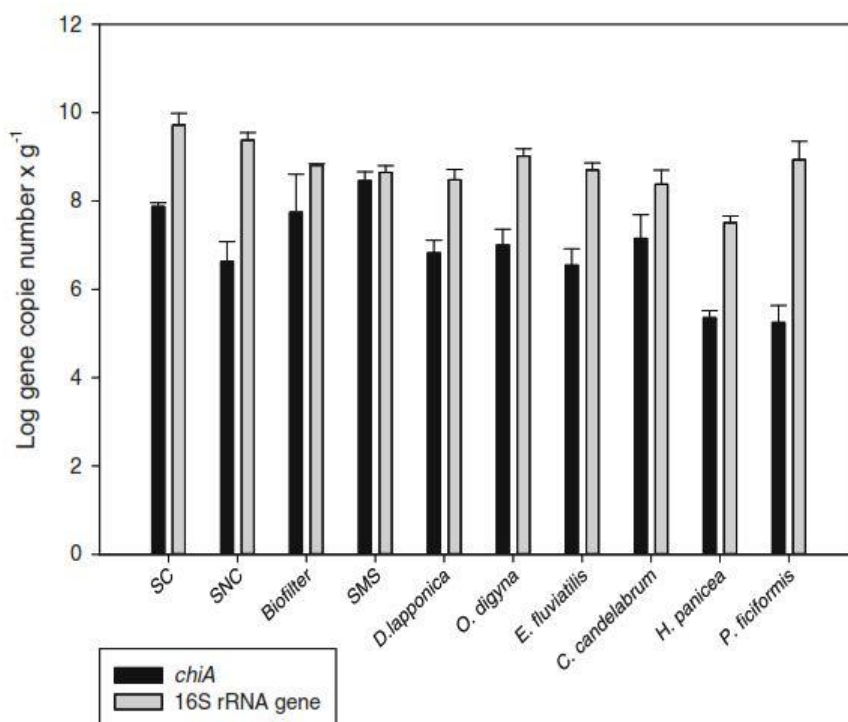
Proses analisis ekspresi gen memiliki tahapan yang dijelaskan pada Gambar 10;. RNA diisolasi dari sampel, kemudian kuantitas RNA diukur menggunakan spektrofotometer. mRNA sering digunakan sebagai template untuk reaksi qPCR. Selama qPCR, template mRNA dikonversi menjadi *complementary* DNA (cDNA) disebut dengan reverse transcriptase (Singh *et al.*, 2018).



Gambar 10. Tahapan Ekspresi gen (Wong & Medrano, 2005).

Reaksi berlangsung secara eksponensial saat DNA berantai ganda bereplikasi. jumlah DNA diukur setelah setiap putaran amplifikasi. Label fluoresen ditambahkan ke dalam reagent PCR sehingga, ketika molekul DNA yang diamplifikasi menumpuk, nilai fluoresen dicatat pada setiap akhir siklus (VanGuilder *et al.*, 2008). Penelitian ekspresi gen penghasil kitinase atau kitinolitik

dilakukan oleh Cretoiu *et al.* (2012) dengan menggunakan target gen *ChiA* yang dibandingkan dengan 16S rRNA. Pada Gambar 11 menunjukkan bahwa dalam sampel gen *ChiA* ada di setiap sampel dan kelimpahan bakteri total dihitung melalui gen 16S rRNA.



Gambar 11. Hasil Ekspresi gen *ChiA* dan 16S rRNA (Cretoiu *et al.*,2012).

Ekspresi gen kitinase dengan menggunakan RT-qPCR juga dilakukan oleh Nazari *et al.* (2011) menunjukkan bahwa terdapat perbedaan level ekspresi pada setiap sampel. Penelitian yang dilakukan oleh Orikoshi *et al.* (2005) dengan membandingkan ekspresi *ChiA*, *ChiB*, *ChiC*, dan *ChiD* menunjukkan bahwa ekspresi gen kitinase terjadi pada waktu yang hampir sama saat menghidrolisis kitin, hal ini menunjukkan bahwa empat kitinase gen diatur oleh mekanisme induksi umum adanya kitin. *Alignment* urutan nukleotida dari *ChiA*, *ChiB*, *ChiC*, dan *ChiD* di dekat daerah promotor. Drewnowska *et al.* (2020) melakukan penelitian aktivitas kitinolitik dan ekspresi gen *ChiA* dan *ChiB* pada bakteri *Bacillus cereus sensu lato*,

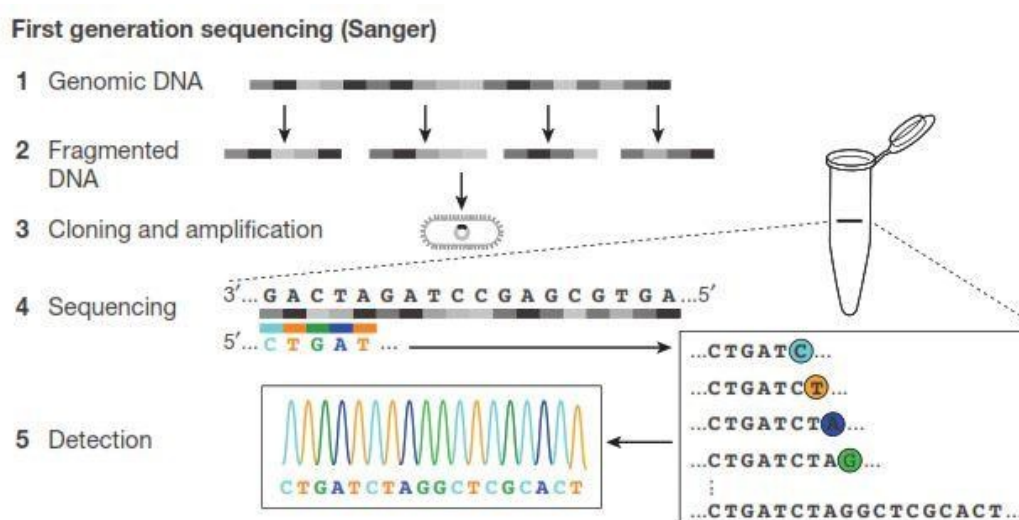
terjadi perbedaan ekspresi gen antara *ChiA* dan *ChiB*, namun tidak ada hubungan antara tingkat ekspresi gen dan aktivitas kitinolitik.

2.11. Sekuensing dan Analisis Filogenetik

Struktur heliks ganda DNA pertama kali dijelaskan oleh Watson dan Crick. Urutan DNA polinukleotida alami pertama diumumkan pada tahun 1953. Karena pengembangan banyak teknik pengurutan, seluruh genom manusia diurutkan pada tahun 2003 sebagai hasil dari *Human Genome Project* (Behjati dan Tarpey., 2013). Tujuan dari *Genome Project* ini yang merupakan sebuah inisiatif ilmiah berskala besar, adalah untuk menyelidiki dan mengevaluasi urutan kimia dari 50.000-100.000 gen yang membentuk genom manusia atau seluruh kumpulan semua materi genetik. Pemisahan dan pemeriksaan kode genetik yang termasuk dalam DNA merupakan dasar untuk proyek besar ini. Ukuran genom manusia sebagai pertimbangan, para ilmuwan pasti telah mengembangkan teknik baru untuk analisis DNA yang dapat menganalisis sejumlah besar data dengan cepat, murah, dan andal. Metode pengurutan DNA yang memerlukan aplikasi berskala besar telah mendorong teknologi untuk meningkatkan kapasitas dan mengurangi ukuran instrumen. Permintaan ini telah mendorong terciptanya peralatan otomatis yang mempercepat dan menurunkan biaya proses biokimia yang terkait dengan pengurutan, meningkatkan analisis reaksi ini, dan membuatnya lebih mudah untuk memasukkan data yang dihasilkan ke dalam *database* (Collin *et al.*, 1998).

Perkembangan teknologi sekuensing DNA menjadi lebih cepat, murah, dan akurat pada tahun 2000-an. Metode sekuensing seperti sekuensing generasi berikutnya (*Next-Generation Sequencing*, NGS) telah memungkinkan peneliti untuk menganalisis sekuens DNA dengan cepat dan dalam jumlah besar. Hal ini memfasilitasi penelitian genetika, genomik, dan analisis DNA di berbagai bidang, termasuk kedokteran, biologi evolusioner, dan ilmu forensik. Sanger Sekuensing paling banyak digunakan karena lebih mudah, praktis dan efisien. Metode sanger banyak digunakan untuk analisis spesies dan karakterisasi gen kitinase (Bartholomew *et al.*, 2019). Metode sanger dikenal dengan metode terminasi rantai, dan metode

Maxam-Gilbert dikenal dengan metode degradasi kimia (Eren *et al.*, 2022). Metode sanger memanfaatkan dua sifat enzim DNA polymerase yaitu kemampuan untuk menyintesis DNA dengan adanya dNTP dan ketidakmampuan membedakan antara dNTP dan ddNTP (Sanger *et al.*, 1977). Tahapan sanger sekuensing dilustrasikan pada Gambar 12, dimulai dari genomik DNA, kemudian ditentukan target sehingga ukuran fragment lebih pendek. Sekuensing dilakukan dengan adanya pendaran fluorescence yang berbeda setiap basa nuklotidanya (Shendure *et al.*, 2017).

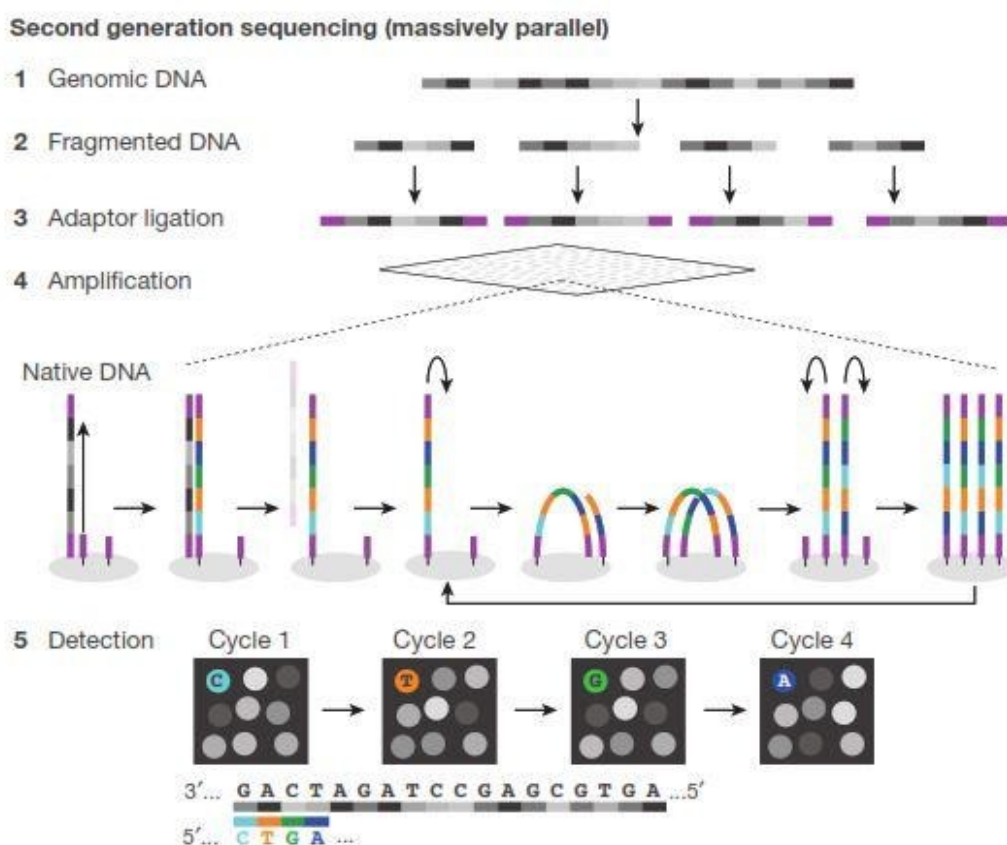


Gambar 12. Proses Sanger Sekuensing (Shendure *et al.*, 2017).

Analisis filogenetik dari keluarga sekuen nukleotida berfungsi untuk menentukan bagaimana keluarga tersebut diturunkan selama proses evolusi. Analisis spesies dan keluarga gen pengkode kitinase dilakukan dari proses sanger sequencing, kemudian Hubungan cabang pada bagian dalam pohon merefleksikan tingkat dimana sekuen yang berbeda saling berhubungan. Dua sekuen yang sangat mirip akan terletak sebagai *neighboring outside* (Barboza-corona *et al.*, 2003; Muzuni *et al.*, 2018).

Teknologi *Next-Generation Sequencing* mampu mendeteksi banyak gen dalam sekali pengurutan basa sehingga bisa disebut *multiplexing* (Shendure *et al.*, 2017). Teknik NGS memiliki kelebihan yaitu hasil sekuensing cepat serta identifikasi diversitas mikroba dan diversitas gen, mutasi genom secara akurat. Keuntungan lain

dari metode ini adalah memiliki kapasitas yang tinggi dalam sekuensing, mengurangi kesalahan pada deteksi basa, serta dapat meminimalisir ketidaktepatan sekuensing pada daerah yang repetitif atau homopolimer (Illumina, 2013). Prinsip Illumina MiSeq sequencing adalah mendeteksi cahaya/flouresens yang dihasilkan dari putusnya ikatan antara nukleotida berlabel adaptor saat berikatan dengan sekuens template DNA (Caporaso *et al.*, 2010). Gambar 13 menunjukkan proses NGS.



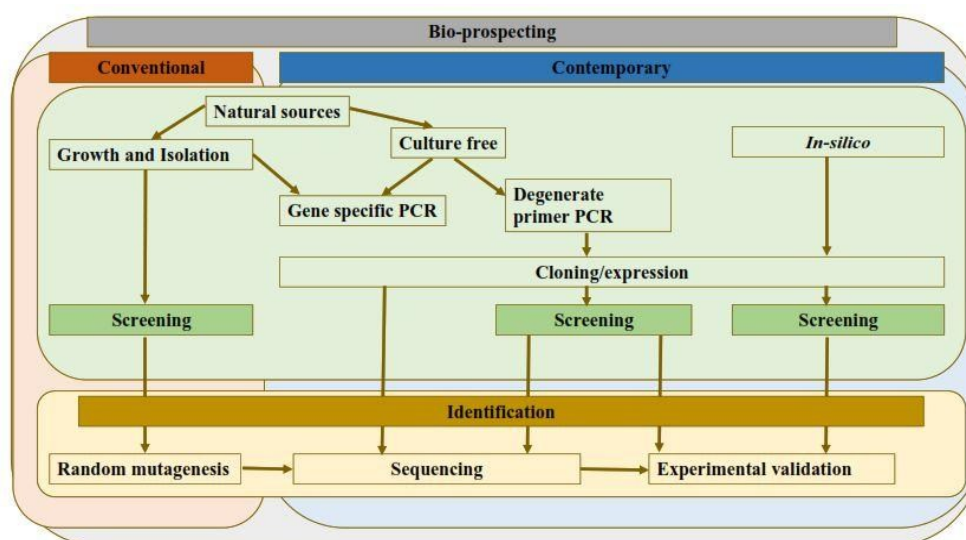
Gambar 13. Proses NGS (Shendure *et al.*, 2017).

2.12. Analisis Enzim Secara In-Silico

Analisis enzim baru dapat dilakukan dengan menggunakan metode konvensional dan kontemporer seperti yang disebutkan dalam Gambar 14. Pendekatan *in-silico*

digunakan untuk mengidentifikasi kandidat enzim baru dengan sifat enzimatis yang lebih baik. Secara umum analisis enzim secara *in-silico* dibagi menjadi dua langkah: (i) Mencari database (ii) Menggunakan Bioinformatika sebagai alat untuk menyaring, menganalisis dan memilih kandidat enzim yang prospektif (Kamble *et al.*, 2018).

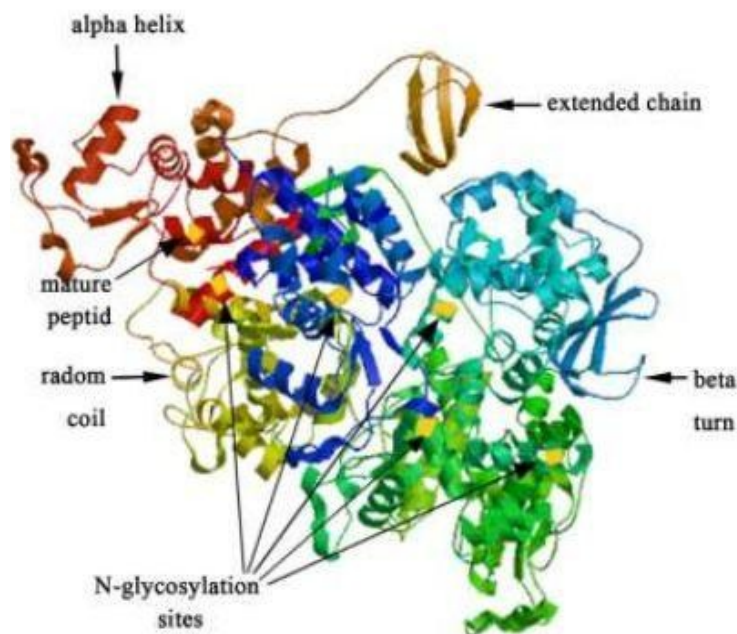
Analisis *in-silico* enzim *alpha-amylase family GH57* yang dilakukan oleh Martinovičová & Janeček (2018) menunjukkan perbandingan urutan secara rinci dari urutan 1602 family GH57 dengan tujuan untuk mengutamakan keunikan masing-masing spesifisitas enzim dan semua kelompok protein. Tahapan yang dilakukan membuat pohon evolusi yang berfokus pada spesifisitas enzim dan asal taksonomi.



Gambar 14. Pendekatan metode analisis enzim (Kamble *et al.*, 2018).

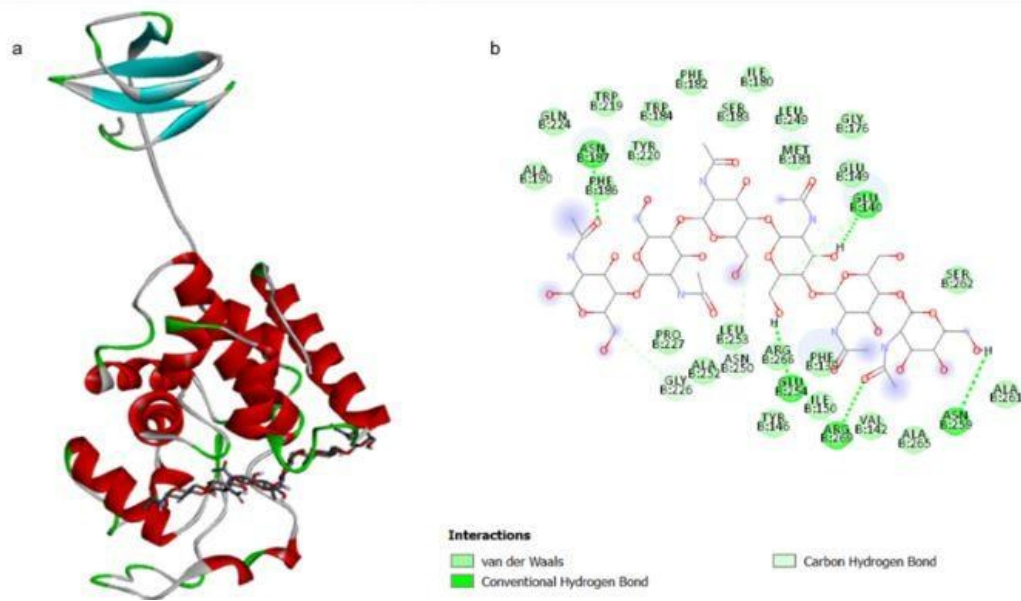
Pendekatan *in-silico* dapat menganalisis parameter fisikokimia (isoelektrik poin, pH, berat molekul dan lain sebagainya), struktur primer (komposisi asam amino), struktur sekunder (konfigurasi yang menjelaskan sifat protein), prediksis struktur tertiariprotein (mengetahui bentuk protein), fungsi dan kekerabatan dengan menggunakan pohon filogenetik (Duta *et al.*, 2021). Penelitian yang dilakukan oleh Li *et al.*, (2018) menggambarkan prediksi struktur tertiar enzim kitinase yang

diekspresikan oleh gen *ChiKJ406136* dari *Streptomyces sampsonii* menunjukkan *alfa-helix* dan *random coil* dominan pada protein (Gambar 15).



Gambar 15. Prediksi struktur enzim kitinase (Li *et al.*, 2018).

Molekuler *docking* digunakan untuk memprediksi dan memodelkan interaksi antara enzim dengan substrat, mengilustrasikan interaksi antara *ligand* dan *receptor* dalam bentuk diagram dua dimensi, serta dapat menentukan daerah yang berpotensi sebagai *binding-site* (Muhammad *et al.*, 2015). Penelitian Sreelatha *et al.*, (2023) tentang pendekatan molekuler *docking* gen kitinase-19 dari *Streptomyces californicus* TBG-201 dengan pendekatan modeling homologi menggunakan SWISS-MODEL, domain yang lestari diambil dari NCBI sehingga dapat dikenali bagian ikatannya. Selain itu Autodck Vina digunakan pada dua kitinase. Secara in-silico, dari genom *S. californicus* TBG-201 menunjukkan memiliki stabilitas tinggi untuk memproduksi ekstraselular enzim kitinase-19. Model kitinase dari *S. californicus* TBG-201 diprediksi memiliki bentuk pada Gambar 16.



Gambar 16. Pemodelan Kitinase dan Substrat (a) model kitinase yang berikatan dengan substrat (b) diagram 2D interaksi reseptor dan ligand (Sreelatha *et al.*, 2023).

Asam amino yang memiliki tugas sebagai pengikat dan berbagai interaksi pengikatan ditunjukkan pada Gambar. 16. Berbagai ikatan yang terlibat adalah van der Waals, ikatan hidrogen konvensional, dan ikatan karbon-ikatan hidrogen. Hasil menggambarkan adanya *alfa helix* pada daerah aktif model kitinase (Sreelatha *et al.*, 2023).

III. METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian telah dilakukan pada bulan Agustus 2021 sampai dengan Desember 2023 di UPT Laboratorium Terpadu dan Sentra Inovasi Teknologi Universitas Lampung. Karakterisasi dan analisis dilakukan di beberapa instansi, antara lain Ekstraksi DNA dan RNA, analisis Nanophotometer DNA dan RNA, PCR, serta elektroforesis dilakukan di UPT Laboratorium Terpadu dan Sentra Inovasi Teknologi Universitas Lampung; sekuensing dengan metode *Sanger* dilakukan di *Ist BASE DNA Sequencing Division*, Apical Scientific, Malaysia.

3.2 Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini disajikan di Tabel 3.

Tabel 3. Alat yang digunakan dalam penelitian

No	Nama Alat	Merek/Model	Negara
1	Nanofotometer	Implen	Jerman
2	PCR Labcycler 48	Sensoquest	Jerman
3	Real Time PCR Rotor-Gene Q	Qiagen	Jerman
4	Elektroforesis Digital QiaxCel Advanced	Qiagen	Jerman
5	Sentrifugasi Suhu Rendah CAX-370	Tomy	Jepang
6	Cooling-Heating Thermostat CH-100	Biosan	Latvia
7	Alat Vakum Micro VacTM	Tomy	Jepang
8	TissueLyser LT	Qiagen	Jerman
9	Peluru Bulat Stainless Steel Diameter 0,5 cm	Qiagen	Jerman

10	Refrigerator SJ-235ND-FW	Sharp	Jepang
11	Freezer FJ-M19SN-SS	Sharp	Jepang
12	Freezer SC-C100 (W)	Sanyo	Jepang
13	UV Sterilization Cabinet UV 4 PCR	Scie-Plas	UK
14	Mikropipet 1000 μ L	Eppendorf	Jerman
15	Mikropipet 200 μ L	Eppendorf	Jerman
16	Mikropipet 10 μ L	Eppendorf	Jerman
17	Mikropipet 2,5 μ L	Eppendorf	Jerman
18	Sanger Sequencer	Applied Biosystem	US
19	Perangkat Lunak BIOEDIT	-	-
20	Perangkat Lunak MEGA XI	-	-
21	Perangkat Lunak AutoDock	-	-

Sedangkan bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini disajikan di Tabel 4 berikut ini :

Tabel 4. Bahan yang digunakan dalam penelitian :

No	Bahan	Keterangan
1	Isolat aktinobakteri dari laut Gorontalo & Bali	Oklis S.W. (18A13O1), Fendi S. (19C38A1), Saras K.R. (19B19A1), Nafila K.S. (18D36-A2), 19A07A1, 18D36A1
2	Medium ISP2	Malt extract, glukosa, yeast extract
3	Media koloidal kitin agar	1%
4	Air laut buatan	Air tawar + NaCl 30 ppt
5	Polyvinylpyrrolidone PA	Merck, Jerman
6	Kloroform PA	Merck, Jerman
7	DNEasy Plant Mini KIT (DNA ekstraksi)	Qiagen, Jerman – buffer AP1, P1, P3, AW1, AE; DNeasy protein/DNA tube; collection tube
8	Ribospin™ Plant Kit (RNA ekstraksi)	Gene All, Korea – buffer RPL, RNW, RBW; E2 Pure™ filter kuning; mini spin column biru
9	iScript™ cDNA Synthesis Kit	Biorad, USA – iScript Reaction Mix, Reverse Transcriptase, RNase-Free water

10	Mastermix PCR KAPA2G Fast ReadyMix	Merck, Jerman
11	Mastermix Real Time PCR Rotorgene Syber Green	Qiagen, Jerman
12	DNA High Resolution Kit cartridge	Qiagen, Jerman
13	Primer 16s rRNA	<ul style="list-style-type: none"> • F27 (5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3'), R1492 (5'-TAC GGY TAC CTT GTT ACG ACT T-3') (Heuer, et. al., 1997) • Fbas (5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3'), dan Rbas (5'-CCG TAC TCC CCA GGC GGG G-3') (Baskaran, et.al., 2016)
14	Primer spesifik gen kitinase	<ul style="list-style-type: none"> • ChiA 1 F (5'- ATC AGG GCA GGT TGA GCA T-3') dan ChiA 1 R (5'-GCC GAG TCG AGG TTG AAG G -3') • ChiA 2 F (5'- AGA ACT TCA ACA ACG GGG C -3') dan ChiA 2 R (5'-TGG GTT ACG GCA GGG C -3')
15	Mikrotube 2 mL	Eppendorf, Jerman
16	Mikrotube 1,5 mL	Eppendorf, Jerman
17	Mikrotip 1000 μ L	Eppendorf, Jerman
18	Mikrotip 200 μ L	Eppendorf, Jerman
19	Mikrotip 10 μ L	Eppendorf, Jerman
20	Nuclease-free water	-
21	ddH ₂ O	-

3.3 Metode

Penelitian dilakukan dalam tiga tahapan utama melalui SSF. Pertama, dilakukan analisis *ribotyping* menggunakan metode PCR. Kedua, analisis aktivitas kitinase masing-masing isolat aktinobakteri laut potensial, dan yang ketiga yaitu dilakukan isolasi gen kitinase dari isolat unggul untuk dikarakterisasi secara in siliko.

3.3.1 Tahap Pertama adalah Identifikasi Spesies Spesifik Aktinobakteri Berbasis *Ribotyping*

Penelitian tahap pertama ini dilakukan identifikasi spesies spesifik aktinobakteri berbasis *ribotyping* dari kultur isolat aktinobakteri terpilih. Mula-mula dilakukan ekstraksi DNA. Hasil ekstraksi DNA dianalisis konsentrasi dan kemurniannya menggunakan alat Nanofotometer sebagai bagian verifikasi kualitas dan kuantitas DNA.

Hasil ekstraksi DNA yang terverifikasi, dilakukan analisis dengan alat PCR sehingga didapat amplicon primer 16s rRNA sebagai indikator spesies bakteri spesifik. Hasil PCR tersebut dielektroforesis sebagai indikator keberhasilan PCR untuk mengetahui ada-tidaknya pita amplicon 16s rRNA.

Hasil PCR terbaik, dilakukan sekuensing dengan metode *Sanger Sequencing* dan dianalisis filogenetik menggunakan perangkat lunak MEGA XI. Apabila hasil analisis sekuensing berdasarkan urutan basa nukleotida yang telah terkonfirmasi dan dinyatakan baik, maka didaftarkan ke database Genbank. Sebagai luaran utama pada tahap pertama ini adalah isolat aktinobakteri terpilih diketahui spesies spesifiknya.

Prosedur *ribotyping* ini adalah meliputi: kultur dan peremajaan isolat aktinobakteri, identifikasi morfologi aktinobakteri, ekstraksi DNA, analisis konsentrasi dan kemurnian DNA hasil ekstraksi, amplifikasi DNA dengan metode PCR menggunakan primer 16s rRNA, analisis hasil PCR melalui elektroforesis, sekuensing menggunakan metode *Sanger Sequencing*, dan analisis filogenetik hasil sekuensing, dan pendaftaran urutan basa DNA ke Genbank. Diagram alir tahap 1 ini disajikan pada Gambar 17.



Gambar 17. Diagram alir tahap 1

3.3.1.1 Prosedur Kultur dan Peremajaan Isolat Aktinobakteri

Isolat aktinobakteri yang sudah dikultur di media kulit udang dengan metode SSF selanjutnya diremajakan selama 2 hari pada media standar *International Streptomyces Project 2* (ISP 2) dengan komposisi (1% malt, 0,4% glukosa, 0,4% yeast extract) (Nord *et al.*, 2019) dengan pelarut air laut buatan (Setiawan *et al.*, 2021). Isolat yang sudah dikultur kemudian diremajakan dengan menginokulasikan masing-masing isolat ke media 1% koloidal kitin agar (Setiawan *et al.*, 2021).

3.3.1.2 Prosedur Identifikasi Morfologi Aktinobakteri

Cover slip ukuran 20 x 20 mm ditancapkan pada sudut 45° ke dalam media, lalu strain digoreskan di atas media agar. Secara mikroskopi morfologi diamati menggunakan mikroskop cahaya dan mikroskop electron dari Apotome Microscopy Zeiss Axio Imager Z2 dan SEM EVO MA 10 (Carl Zeiss, Oberkochen, Jerman) berdasarkan struktur spora yang terbentuk. Pengamatan pada mikroskop cahaya dilakukan dengan perbesaran 400x, sedangkan pada mikroskop electron dilakukan dengan perbesaran 10000x. Persiapan sampel *Actinomyces* dilakukan dengan menggunakan coating Gold.ob88. Untuk pengamatan menggunakan mikroskop elektron, sebelum pengamatan, cover slip diletakkan pada stub yang telah direkatkan dengan karbon tip, lalu dilakukan *coating* dengan *gold*. Pengamatan morfologi *Actinomyces* dilakukan pada energi 20 kV.

3.3.1.3 Prosedur Ekstraksi DNA

DNA diekstraksi menggunakan DNEasy Plant Mini KIT (cat. No. 69104, Qiagen, Hilden, Jerman) dengan modifikasi. Inokulum yang telah ditumbuhkan pada media ISP 2 dihomogenkan dengan vorteks selama 1 menit. Cairan sampel dipindahkan sebanyak 1 mL ke mikrotube volume 2 mL. Dilakukan sentrifugasi kecepatan 10.000 rpm 10 menit 4°C. Ditambahkan ±400 µL AP 1 dan dimasukkan 2 butir peluru. Ditambahkan 50 µL kloroform. Sampel diosilasi di tissue lyser selama 2 menit. Diinkubasi 65°C 10 menit, tiap 5 menit dibolak-balik. Ditambah 150 µL Buffer P3, diinversi, lalu inkubasi 5 menit dalam wadah berisi es batu. Sampel dipindahkan ke tube Dneasy warna ungu ± 500 µL, disentrifius 13.500 rpm 2 menit 4°C. Dipindahkan supernatnya ke mikrotube 1,5 mL. Ditambahkan buffer AW1 sebanyak 1,5 volume dari volume supernatan yang digunakan lalu diinversi. Sebanyak 500 µL larutan tersebut dan dimasukkan ke dalam tube DNeasy column putih, disentrifugasikan 8000 rpm 2 menit. Supernatan kemudian dibuang. Ditambahkan buffer AW2 500 µL, disentrifugasikan 13.500 rpm 2 menit, supernatan dibuang. DNeasy column dipindahkan ke dalam *collection tube* yang

baru dan tidak ditambah apapun, disentrifugasikan 13.500 rpm 2 menit untuk meyakinkan tidak ada lagi pelarut. DNeasy column putih dipindahkan ke tube 1,5 mL yang baru, lalu ditambah buffer AE 25 μ L. Diinkubasi di suhu ruang 10 menit, lalu disentrifugasikan 8.000 rpm 3 menit 4°C. Supernatan yang dihasilkan mengandung DNA hasil ekstraksi yang siap dianalisis selanjutnya.

3.3.1.4 Prosedur Analisis Konsentrasi dan Kemurnian DNA Hasil Ekstraksi

Konsentrasi dan kemurnian DNA hasil ekstraksi dianalisis menggunakan Nanophotometer (IMPLEN, Jerman). Nanophotometer menunjukkan konsentrasi DNA dalam satuan ng/ μ L, Absorbansi A260/A280 merupakan rasio absorbansi asam nukleat dengan protein. Sampel diteteskan pada cell sebanyak 1,5 μ L kemudian diletakkan pada *cell holder*. Sebelum dilakukan analisis sampel, dilakukan pemeriksaan blanko sebagai referensi pengukuran menggunakan pelarut DNA(buffer AE) yang diteteskan pada cell sebanyak 1 μ L. Setiap pergantian sampel, *cell* Nanophotometer dibersihkan dengan tissue tanpa serat bersih. DNA dengan kemurnian 1,8 -2,0 dan konsentrasi > 50 ng/ μ L dapat dilanjutkan ke proses amplifikasi dengan *Polymerase Chain Reaction* (PCR).

3.3.1.5 Prosedur Amplifikasi DNA dengan metode PCR menggunakan Primer 16s rRNA

DNA hasil ekstraksi diamplifikasi dengan metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR) menggunakan alat *thermocycle* Sensoquest Sensodirect (Jerman). Primer yang digunakan meliputi primer 16S rRNA yaitu F27 (5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3'), R1492 (5'-TAC GGY TAC CTT GTT ACG ACT T-3') (Heuer, et. al., 1997), Fbas (5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3'), dan Rbas (5'-CCG TAC TCC CCA GGC GGG G-3') (Baskaran, et.al., 2016). Setiap pereaksi PCR terdiri atas 10,5 μ L mastermix 2G Fast ReadyMix Kit (cat. No. KK5102, Merck, Taufkirchen, Jerman), 0,25 μ L primer *forward*, 0,25 μ L primer *reverse*, 8 μ L ddH₂O, dan 2 μ L sampel DNA yang dimasukkan pada mikrotube berukuran 0,2

mL. Program *thermocycling* yang digunakan memiliki 6 tahapan, yaitu tahap denaturasi awal (94°C selama 5 menit), tahap denaturasi (94°C selama 1 menit), tahap penempelan primer (54°C selama 1 menit), pemanjangan (72°C selama 1 menit), pemanjangan akhir (72°C selama 5 menit), dan pendinginan (20°C selama 10 menit). Tahap denaturasi, penempelan primer, dan pemanjangan diulang sebanyak 35 siklus. Setelah selesai, mikrotube berisi sampel hasil PCR disimpan di lemari pendingin suhu 0°C.

3.3.1.6 Prosedur Analisis Hasil PCR melalui Elektroforesis

Visualisasi dilakukan dengan metode *capillary electrophoresis* menggunakan alat elektroforesis digital *Qiaxcel Advanced* (Qiagen, Jerman) menggunakan *DNA HIGH RESOLUTION KIT cartridge*. Prosedur yang digunakan mengikuti panduan manual *Qiaxcel Advanced* dari Qiagen, Jerman. Sebelum dioperasikan *cartridge* diletakkan di suhu ruang terlebih dahulu selama ± 20 menit. Kemudian, *separation buffer* dan *wash buffer* dituang ke dalam *buffer tray*, ditempatkan pada *buffer tray holder*. *Alignment marker* 15 – 3.000 pasang basa (pb) untuk menyerupakan waktu migrasi DNA dihomogenkan dan diletakkan pada *well* di *buffer tray* dalam posisi *tube* terbuka. *Size marker* (100 pb – 2.500 pb) sebagai pembanding ukuran fragmen DNA dan sampel DNA dari proses PCR dihomogenkan dan diletakkan pada *well* di *sample row* dalam posisi *tube* terbuka. *Cartridge* dan *smart key* dimasukkan ke dalam *QIAxcel Advanced instruments*, kemudian nitrogen diaktifkan. Proses migrasi DNA tervisualisasi pada *software QIAxcel ScreenGel*.

3.3.1.7 Prosedur Sekuensing Menggunakan Metode *Sanger Sequencing*

Sekuensing urutan basa DNA 16s rRNA dari isolat aktinobakteri dilakukan dengan metode *Sanger Sequencing* di menggunakan jasa *1st BASE DNA Sequencing Division*, Apical Scientific, Malaysia melalui jasa dari PT. Genetika Science. Hasil analisis berupa urutan basa DNA bisa dilanjutkan ke tahapan selanjutnya.

3.3.1.8 Prosedur Analisis Filogenetik Hasil Sekuensing

Hasil sekuen yang berupa elektroferogram divalidasi dengan menggabungkan sekuen *forward* dan *reverse* menggunakan perangkat lunak BIOEDIT. Setelah divalidasi, urutan basa dianalisis BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) di Genbank melalui website NCBI (*National Center for Biology Information*). Hasil BLAST diunduh untuk selanjutnya dilakukan analisis filogenetik menggunakan perangkat lunak MEGA 11. Spesies yang didapat melalui analisis filogenetik tersebut dijadikan dasar spesies dimana sekuennya kemudian diregistrasikan ke Genbank melalui website.

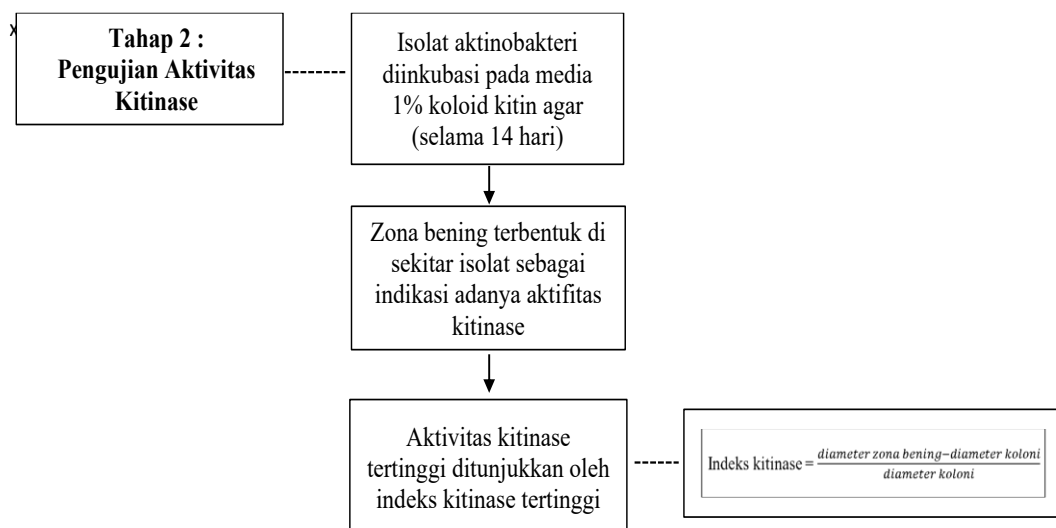
3.3.1.9 Prosedur Pendaftaran Urutan Basa DNA Ke Genbank

Urutan basa yang didapat didaftarkan ke Genbank melalui website DDBJ (*DNA Data Base of Japan*). Pada website tersebut, diisikan data personil pendaftar dan alamat email untuk memperoleh konfirmasi melalui email. Setelah dikonfirmasi, dimasukkan data yang terkait dengan sekuen tersebut meliputi nama-nama personil yang berkontribusi beserta emailnya, urutan basa, titik GPS pengambilan sampel, primer PCR, serta metode sekuensing. Selanjutnya menunggu konfirmasi melalui email. Setelah terkonfirmasi, sekuen tersebut mendapatkan ID (*Accession Number*) dan otomatis telah dapat diakses di seluruh dunia.

3.3.2 Tahap Kedua adalah Pengujian Aktivitas Kitinolitik

Pada tahap kedua ini, dilakukan pengujian aktivitas kitinolitik untuk mengetahui isolat dengan aktivitas kitinase tertinggi setelah spesies dari masing-masing isolat diketahui (Laila *et al.*, 2021; Wahyudi *et al.*, 2021). Penentuan aktivitas kitinolitik dilakukan dengan metode dari Agrawal *et al.* (2012) yang dimodifikasi. Isolat aktinobakteri mula-mula diinkubasi pada media 1% koloid kitin agar selama 14 hari. Hasil aktivitas kitinolitik adalah berbentuk zona bening di sekitar isolat sebagai indikatornya. Isolat dengan aktivitas kitinase tertinggi ini dilanjutkan

dengan mengkarakterisasi gen kitinase. Diagram alir tahap 2 ini disajikan pada Gambar 18.



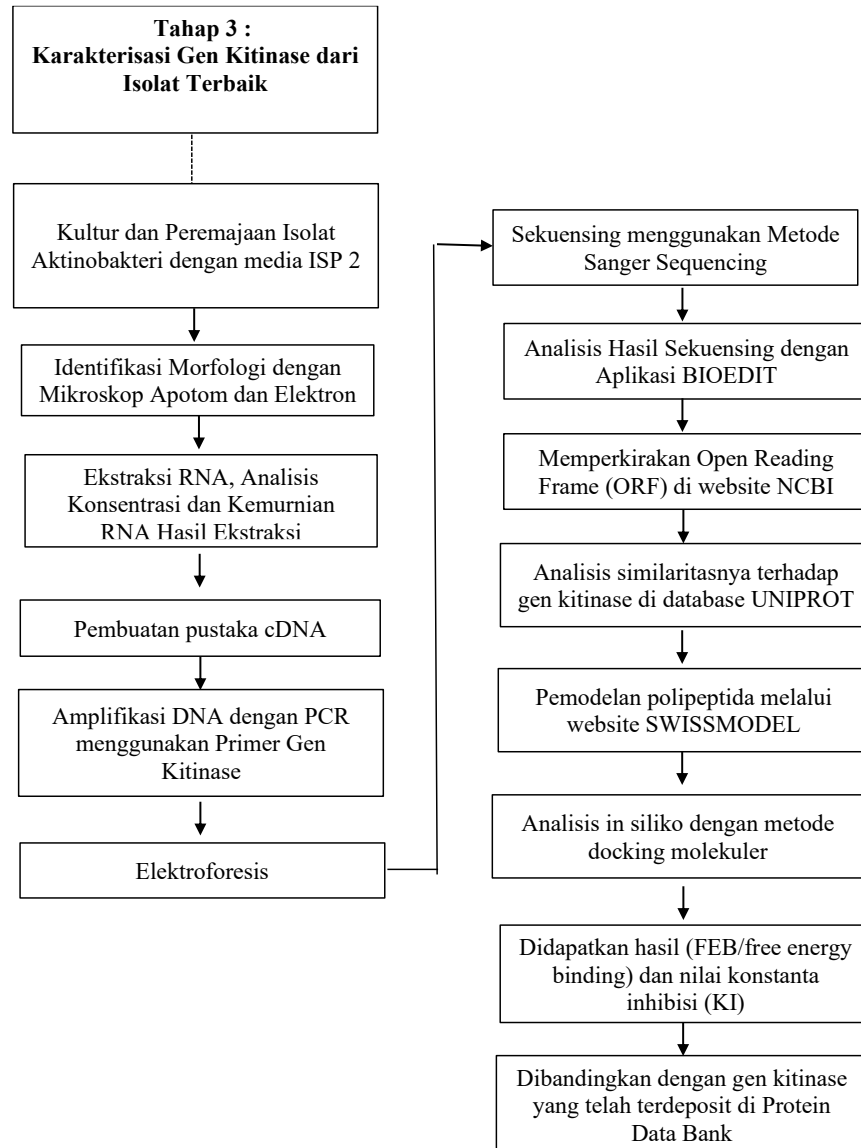
Gambar 18. Diagram alir tahap 2

3.3.3 Tahap Ketiga adalah Karakterisasi Gen Kitinase

Pada tahap ketiga ini adalah mengkarakterisasi gen kitinase dari proses tahap kedua untuk mengkonfirmasi dan mendapatkan gen kitinase dengan prosedur antara lain kultur isolat, ekstraksi RNA, analisis konsentrasi dan kemurnian RNA hasil ekstraksi, pembuatan Pustaka cDNA, PCR gen kitinase, elektroforesis hasil PCR, sekuensing, dan analisis hasil sekuensing. Sebagai luaran utama dari tahap ini adalah terkarakterisasinya urutan basa DNA gen kitinase utuh dari isolat aktinobakteri terpilih yang menghasilkan enzim kitinase tertinggi.

Prosedur penelitian dari karakterisasi gen kitinase ini meliputi kultur dan peremajaan isolat aktinobakteri dengan aktivitas kitinase tertinggi, ekstraksi RNA, analisis konsentrasi dan kemurnian RNA hasil ekstraksi, pembuatan Pustaka

cDNA, PCR gen kitinase, elektroforesis hasil PCR, sekuensing, dan analisis hasil sekuensing. Diagram alir tahap 3 disajikan oleh Gambar 19.



Gambar 19. Diagram alir tahap 3

3.3.3.1 Prosedur Kultur dan Peremajaan Isolat Aktinobakteri dengan Aktivitas Kitinase Tertinggi

Kultur dan peremajaan isolat aktinobakteri dengan aktivitas kitinase tertinggi dilakukan dengan metode yang sama dengan Tahap I sebelumnya. Isolat aktinobakteri yang sudah dikultur di media kulit udang dengan metode SSF selanjutnya diremajakan selama 2 hari pada media standar *International Streptomyces Project 2* (ISP 2) dengan komposisi (1% *malt*, 0,4% glukosa, 0,4% *yeast extract*) (Nord *et al.*, 2019) dengan pelarut air laut buatan (Setiawan *et al.*, 2021). Isolat yang sudah dikultur kemudian diremajakan dengan menginokulasikan masing-masing isolat ke media 1% koloidal kitin agar (Setiawan *et al.*, 2021).

3.3.3.2 Prosedur Ekstraksi RNA

Kultur masing-masing isolat aktinobakteri diambil secara aseptis sebanyak 1 mL untuk dilakukan ekstraksi RNA menggunakan kit Ribospin™ Plant (Gene All, Seoul, Korea). Cairan kultur mula-mula dipindahkan sebanyak 1 mL ke mikrotube volume 2 mL. Dilakukan sentrifugasi kecepatan 10.000 rpm 10 menit 4°C. Ditambahkan buffer RPL 350 µL. Sampel di vortex 30 detik hingga tercampur, kemudian diinkubasi pada suhu ruang selama 30 menit. Lisat dipindahkan ke *E2 Pure™ filter coloumn* kuning dan disentrifugasikan pada 10.000 xg selama 30 detik pada suhu ruang. Supernatan dipindahkan ke dalam mikrotube 1,5 mL baru. Ditambahkan 1 kali volume etanol 70% pada supernatan dan diinversi. Supernatan dipindahkan ke dalam *mini spin coloumn* biru dan disentrifugasikan pada 10.000 xg selama 30 detik pada suhu ruang. Supernatan dibuang dan ditambahkan 500 µL buffer RBW ke *mini spin coloumn* dilanjutkan dengan sentrifugasi pada 10.000 xg selama 30 detik di suhu ruang. Supernatan dibuang, ditambahkan 70 µL DNASE I ke dalam *mini spin coloumn* lalu di inkubasi suhu ruang 10 menit.

Ditambahkan 500 µL buffer RBW ke *mini spin coloumn* dan di inkubasi 2 menit di suhu ruang. Disentrifugasikan 10.000 xg selama 30 detik di suhu ruang. Cairan yang terlewat di *mini spin coloumn* dibuang. Ditambahkan 500 µL buffer RNW ke

mini spin coloumn dan disentrifugasikan 10.000 xg selama 30 detik. Cairan dibuang dan diulang kembali menambahkan 500 μL buffer RNW ke *mini spin coloumn* dan disentrifugasikan 10.000 xg selama 30 detik. Setelah cairan yang terlewat *mini spin coloumn* dibuang, disentrifugasikan 10.000 xg selama 1 menit pada suhu ruang untuk membuang sisa buffer RNW. *Mini spin coloumn* dipindahkan pada mikrotube 1,5 mL baru. Ditambahkan 30 μL *nuclease free water* pada bagian tengah membran dalam *mini spin coloumn* dan diinkubasi 5 menit. Disentrifugasikan 10.000 xg selama 1 menit pada suhu ruang dan sentrifuse kembali 10.000 xg selama 2 menit untuk memastikan tidak ada RNA yang tertinggal pada membran *mini spin coloumn*. RNA hasil ekstraksi disimpan pada suhu -20°C dan siap dilanjutkan ke prosedur berikutnya.

3.3.3.3 Prosedur Analisis Konsentrasi dan Kemurnian RNA Hasil Ekstraksi

Konsentrasi dan kemurnian RNA hasil ekstraksi dianalisis menggunakan Nanophotometer (IMPLEN, Jerman). Nanophotometer menunjukkan konsentrasi RNA dalam satuan $\text{ng}/\mu\text{L}$, Absorbansi A260/A280 merupakan rasio absorbansi asam nukleat dengan protein. Sampel diteteskan pada cell sebanyak 1,5 μL kemudian diletakkan pada *cell holder*. Sebelum dilakukan analisis sampel, dilakukan pemeriksaan blanko sebagai referensi pengukuran menggunakan pelarut RNA yang diteteskan pada *cell* sebanyak 1 μL . Setiap pergantian sampel, cell Nanophotometer dibersihkan dengan tissue tanpa serat bersih. RNA dengan kemurnian 1,8 -2,0 dan konsentrasi $> 50 \text{ ng}/\mu\text{L}$ dapat dilanjutkan ke proses amplifikasi dengan *quantitative Polymerase Chain Reaction* (qPCR).

3.3.3.4 Prosedur Pembuatan Pustaka cDNA

Pembuatan pustaka cDNA dilakukan dengan menggunakan iScriptTM cDNA Synthesis Kit. Dibuat pereaksi sesuai Tabel 5. Pengaturan alat PCR untuk cDNA dari isolat dengan kemampuan kitinase terbaik dijelaskan dalam Tabel 6.

Tabel 5. Pereaksi dalam pembuatan pustaka cDNA dari isolat dengan kemampuan kitinase terbaik

Komposisi	Jumlah
<i>iScript Reaction Mix</i>	4 μ L
<i>iScript reverse transkriptase</i>	1 μ L
RNA template (250 ng)	Disesuaikan dengan hasil ekstraksi RNA total.
<i>RNase-Free water</i>	Disesuaikan
Total	20 μ L

Tabel 6. Pengaturan alat PCR untuk cDNA dari isolat dengan kemampuan kitinase terbaik

Tahapan	Suhu	Waktu
Aktivasi enzim	25°C	5 menit
Elongasi	42°C	60 menit
In aktivasi enzim	85°C	5 menit
Pendinginan	20°C	10 enit

3.3.3.5 Prosedur *Polymerase Chain Reaction* (PCR) dengan Primer gen Kitinase

DNA hasil ekstraksi diamplifikasi dengan metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR) menggunakan alat *thermocycle* Sensoquest Sensodirect (Jerman). Primer gen Kitinase aktinobakteri didesain menggunakan website NCBI Primer BLAST yang selanjutnya divalidasi dengan *software* MEGA 11 dan *website* Primer 3. Didesain 2 pasang primer untuk mengamplifikasi gen kitinase mulai dari start kodon sampai stop kodon. Kedua pasang primer ini dipilih berdasarkan kesesuaian dengan sekuen gen kitinase yang telah terdeposit. Pasangan primer yang digunakan disajikan dalam Tabel 7. berikut:

Tabel 7. Desain pasangan primer qPCR untuk analisis transkripsi gen kitinase

Pasangan Primer	Nama Primer	Urutan Oligonukleotida (5'-3')
1.	ChiA 1 F	ATCAGGGCAGGTTGAGCAT
	ChiA 1 R	GCCGAGTCGAGGTTGAAGG
2.	ChiA 2 F	AGAACTTCAACAACGGGGC
	ChiA 2 R	TGGGTTACGGCAGGGC

Selanjutnya setiap pereaksi PCR terdiri atas 10,5 μ L mastermix 2G Fast ReadyMix Kit (cat. No. KK5102, Merck, Taufkirchen, Jerman), 0,25 μ L primer *forward*, 0,25 μ L primer *reverse*, 8 μ L ddH₂O, dan 2 μ L sampel DNA yang dimasukkan pada mikrotube berukuran 0,2 mL. Program *thermocycling* yang digunakan memiliki 6 tahapan, yaitu tahap denaturasi awal (94°C selama 5 menit), tahap denaturasi (94°C selama 1 menit), tahap penempelan primer (50-57°C selama 1 menit), pemanjangan (72°C selama 1 menit), pemanjangan akhir (72°C selama 5 menit), dan pendinginan (20°C selama 10 menit). Tahap denaturasi, penempelan primer, dan pemanjangan diulang sebanyak 35 siklus. Setelah selesai, mikrotube berisi sampel hasil PCR disimpan di lemari pendingin suhu 0°C.

3.3.3.6 Prosedur Elektroforesis Hasil PCR

Visualisasi dilakukan dengan metode *capillary electrophoresis* menggunakan alat elektroforesis digital *Qiaxcel Advanced* (Qiagen, Jerman) menggunakan *DNA HIGH RESOLUTION KIT*. Prosedur yang digunakan mengikuti panduan manual *Qiaxcel Advanced* dari Qiagen, Jerman. Sebelum dioperasikan *cartridge* diletakkan di suhu ruang terlebih dahulu selama \pm 20 menit. Kemudian, *separation buffer* dan *wash buffer* dituang ke dalam *buffer tray*, ditempatkan pada *buffer tray holder*. *Alignment marker* (15 pb-3.000 pb) untuk menyerupakan waktu migrasi DNA dihomogenkan dan diletakkan pada *well* di *buffer tray* dalam posisi *tube* terbuka. *Size marker* (100 pb – 2.500 pb) sebagai pembanding ukuran fragmen DNA dan sampel DNA dari proses PCR dihomogenkan dan diletakkan pada *well*

di *sample row* dalam posisi *tube* terbuka. *Cartridge* dan *smart key* dimasukkan ke dalam QIAxcel Advanced instruments, kemudian nitrogen diaktifkan. Proses migrasi DNA tervisualisasi pada *software QIAxcel ScreenGel*.

3.3.3.7 Prosedur Sekuensing

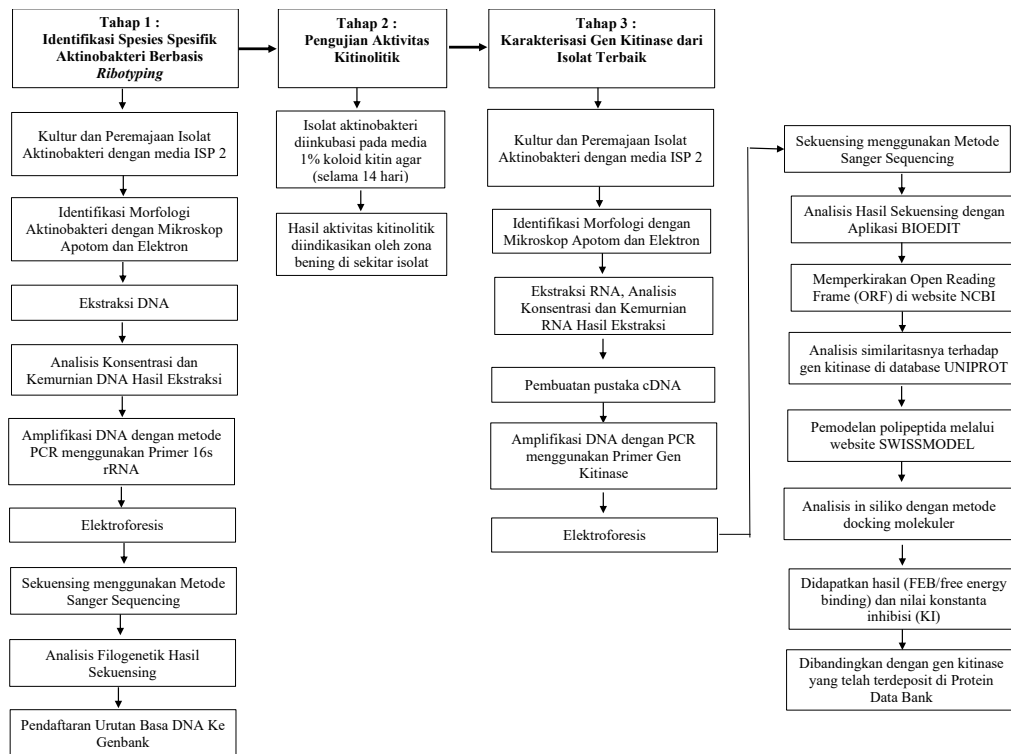
Sekuensing urutan basa DNA 16s rRNA dari isolat aktinobakteri dilakukan dengan metode *Sanger Sequencing* di menggunakan jasa *1st BASE DNA Sequencing Division*, Apical Scientific, Malaysia melalui jasa dari PT. Genetika Science. Hasil analisis berupa urutan basa DNA bisa dilanjutkan ke tahapan selanjutnya.

3.3.3.8 Prosedur Analisis Hasil Sekuensing Gen Kitinase

Hasil sekuen yang berupa elektroferogram divalidasi dengan menggabungkan sekuen *forward* dan *reverse* menggunakan perangkat lunak BIOEDIT. Setelah divalidasi, kedua hasil sekuensing (sekuen dengan primer ChiA 1 dan ChiA 2) diurutkan dan dilakukan penjajaran untuk selanjutnya diperkirakan *open reading frame* (orf) di website NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>). Masing-masing orf yang didapat dianalisis similaritasnya untuk mencari kesesuaian dengan gen kitinase yang sudah terdeposit di *database* UNIPROT. Diperkirakan urutan asam-asam amino penyusunnya dari start kodon sampai stop kodon melalui *database* GenBank di NCBI. Selanjutnya, asam-asam amino tersebut diperkirakan pemodelan polipeptidanya melalui website SWISSMODEL (<https://swissmodel.expasy.org/interactive>). Setelah didapatkan modelnya, secara *in siliko* diperkirakan bagian *ligan binding domain* dengan konformasi monomer kitin udang yang telah terdeposit di *database* PUBCHEM menggunakan pemodelan dari Autodock (Forli *et al.*, 2016). Hal yang sama dilakukan pada gen kitinase yang paling mirip dengan model yang didapatkan untuk membandingkan estimasi ΔG antara keduanya. Jika terdapat kemiripan, maka orf yang telah didapat tersebut bisa diasumsikan sebagai penyandi gen kitinase dari isolat aktinobakteri yang dikerjakan.

3.4 Diagram Alir

Sebagai diagram alir penelitian ini, disajikan pada Gambar 20:



Gambar 20. Diagram alir penelitian.

V. KESIMPULAN

5.1 Simpulan

Berdasarkan hasil penelitian dan pembahasan, dapat disimpulkan sebagai berikut:

1. Diperoleh metode analisis filogenetik aktinobakteri laut menggunakan modifikasi primer F27 (5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3') dan Rbas (5'-CCG TAC TCC CCA GGC GGG G-3'), dimana diketahui bahwa spesies spesifik aktinobakteri laut isolate 18A13O1 adalah *Pseudonocardia carboxydivorans*; 18D36A1 adalah *Pseudonocardia antitumoralis*; 18D36A2 adalah *Micrococcus unila*; 19A07A1 adalah *Brevibacterium linens*; 19B19A1 adalah *Streptomyces tritolerans*; dan 19C38A1 adalah *Kocuria palustris*, dengan *Streptomyces tritolerans* 19B19A1 memiliki aktivitas kitinase tertinggi.
2. Gen kitinase *Streptomyces tritolerans* 19B19A1 memiliki kemiripan 99,66% dengan kitinase *glycoside hydrolase* family 18 dari *Streptomyces tendae* dengan kode ID akses GenBank adalah WP_356817706.1, dengan aktivitas kitinase pada substrat kulit udang secara in siliko melalui molekular docking menunjukkan bahwa kitinase *Streptomyces tritolerans* 19B19A1 memiliki interaksi yang lebih kuat dengan substrat kitin kulit udang dibandingkan dengan kitinase kulit udang yang telah terdeposit di Protein Data Bank (PDB) yaitu kitinase dengan kode 3EBV.

5.2 Saran

Berdasarkan hasil penelitian dan kesimpulan di atas, telah berhasil dikarakterisasi gen penghasil kitinase dari aktinobakteri *Streptomyces tritolerans* 19B19A1 yang menunjukkan aktivitas kitinase terbaik dibandingkan dengan yang telah terdeposit di *Protein Data Bank* (PDB). Gen tersebut sangat potensial untuk

di-overekspresikan. Oleh karena itu, langkah selanjutnya yang perlu dilakukan yaitu menginsersi gen tersebut ke vektor kloning (DH5- α dari bakteri *E. coli*) dan vektor ekspresi sebagai langkah awal dari rekayasa genetika mikroorganisme penghasil aktivitas kitinase tertinggi saat ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Ahlafi, H., Moussout, H., Boukhlifi, F., Echetna, M., Bennani, M. N., & Slimane, S. M. 2013. Kinetics of N-Deacetylation of Chitin Extracted from Shrimp Shells Collected from Coastal Area of Morocco. *Mediterranean Journal of Chemistry*, 2(3), 503–513. <https://doi.org/10.13171/mjc.2.3.2013.22.01.20>
- Alharbi, N. S. 2016. Novel Bioactive Molecules from Marine Actinomycetes. *Biosciences, Biotechnology Research Asia*, 13(4), 1905–1927. <https://doi.org/10.13005/bbra/2346>
- Barboza-Corona, J. E., Nieto-Mazzocco, E., R. Velázquez-Robledo, Rubén Salcedo-Hernández, Bautista, M., Jiménez, B., & Ibarra, J. E. 2003. Cloning, Sequencing, and Expression of the Chitinase Gene chiA74 from *Bacillus thuringiensis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(2), 1023–1029. <https://doi.org/10.1128/aem.69.2.1023-1029.2003>
- Barka, E. A., Vatsa, P., Sanchez, L., Gaveau-Vaillant, N., Jacquard, C., Klenk, H.-P., Clément, C., Ouhdouch, Y., & van Wezel, G. P. 2015. Taxonomy, Physiology, and Natural Products of Actinobacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 80(1), 1–43. <https://doi.org/10.1128/membr.00019-15>
- Bartholomew, E. S., Black, K., Feng, Z., Liu, W., Shan, N., Zhang, X., Wu, L., Bailey, L., Zhu, N., Qi, C., Ren, H., & Liu, X. (2019). Comprehensive Analysis of the Chitinase Gene Family in Cucumber (*Cucumis sativus* L.): From Gene Identification and Evolution to Expression in Response to *Fusarium oxysporum*. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(21), 5309. <https://doi.org/10.3390/ijms20215309>
- Baskaran, R., Mohan, P. M., Sivakumar, K., & Kumar, A. 2016. Antimicrobial Activity and Phylogenetic Analysis of *Streptomyces Parvulus* Dosmb-D105 Isolated from the Mangrove Sediments of Andaman Islands. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica*, 63(1), 27–46. <https://doi.org/10.1556/030.63.2016.1.2>
- Behjati, S., & Tarpey, P. S. 2013. What Is next Generation sequencing? *Archives of Disease in Childhood - Education & Practice Edition*, 98(6), 236–238. <https://doi.org/10.1136/archdischild-2013-304340>

- Beier, S., & Bertilsson, S. 2013. Bacterial chitin degradation—mechanisms and ecophysiological strategies. *Frontiers in Microbiology*, 4. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00149>
- Benavente, M., Arias, S., Moreno, L., & Martínez, J. 2015. Production of Glucosamine Hydrochloride from Crustacean Shell. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 3(1). <https://doi.org/10.17265/2328-2150/2015.01.003>
- Bérdy, J. 2005. Bioactive Microbial Metabolites. *The Journal of Antibiotics*, 58(1), 1–26. <https://doi.org/10.1038/ja.2005.1>
- Brescia, P., Wilson, C., & Banks, P. 2021. Low-Volume, High-Throughput Workflow for Analysis of Nucleic Acid Samples for Biobanking (pp. 1–7). Agilent Technologies, Inc. <https://www.agilent.com/cs/library/applications/low-volume-high-throughput-workflow-nucleic-acid-5994-2754EN-agilent.pdf>
- Buttner, M. J. 2017. *Actinoplanes* Swims into the Molecular Age. *Journal of Bacteriology*, 199(12). <https://doi.org/10.1128/jb.00070-17>
- Castro, D., Marques, A.S.C., Almeida, M.R., de Paiva, G.B., Bento, H.B.S., Pedrolli, D.B., Freire, M.G., Tavares, A.P.M., and Santos-Ebinuma, V.C. 2021. L-asparaginase production review: bioprocess design and biochemical characteristics. *Appl Microbiol Biotechnol* 105, 4515–4534.
- Caporaso, J. G., Lauber, C. L., Walters, W. A., Berg-lyons, D., Lozupone, C. A., Turnbaugh, P. J., dan Knight, R. 2010 : Global patterns of 16S rRNA 54 diversity at a depth of millions of sequences per sample. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States*, 108(1): 4516-4522
- Chauhan, J. V., & Gohel, S. D. 2020. *Molecular Diversity and Pharmaceutical Applications of Free-Living and Rhizospheric Marine Actinobacteria*. Springer EBooks, 111–131. https://doi.org/10.1007/978-981-15-5017-1_6
- Chater, K. F. 2016. Recent advances in understanding Streptomyces. *F1000Research*, 5(2795), 2795. <https://doi.org/10.12688/f1000research.9534.1>
- Chen, X., Jiang, Y., Li, Q., Han, L., & Jiang, C. 2016. *Molecular Phylogenetic Identification of Actinobacteria : Actinobacteria - Basics and Biotechnological Applications*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/62029>
- Chen, Wei. , Xi Jiang, Qing Yang. 2020. Glycoside hydrolase family 18 chitinases: The known and the unknown. *Biotechnology Advances* 43. 107553. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2020.107553>

- Chen, L., Hua, Y., Ji, W., Wang, J., Zhao., H., and Wang., Z. 2023. Cloning, characterization, and expression analysis of the CHITINASE gene family in *Helice tientsinensis*. PeerJ 11:e15045. <http://doi.org/10.7717/peerj.15045>
- Churklam, W., & Aunpad, R. 2020. Enzymatic characterization and structure-function relationship of two chitinases, LmChiA and LmChiB, from *Listeria monocytogenes*. *Heliyon*, 6(7), e04252. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e04252>.
- Cohen-Kupiec, R., & Chet, I. 1998. The molecular biology of chitin digestion. *Current Opinion in Biotechnology*, 9(3), 270–277. [https://doi.org/10.1016/s0958-1669\(98\)80058-x](https://doi.org/10.1016/s0958-1669(98)80058-x)
- Collins, F. S. 1998. New Goals for the U.S. Human Genome Project: 1998-2003. *Science*, 282(5389), 682–689. <https://doi.org/10.1126/science.282.5389.682>
- Crapanzano, C., Laurenzi, P. F., Amendola, C., & Casolaro, I. (2021). Clinical perspective on antipsychotic receptor binding affinities. *Brazilian Journal of Psychiatry*, 43(6), 680–681. <https://doi.org/10.1590/1516-4446-2021-2245>
- Cretoiu, M. S., Korthals, G. W., Visser, J. H. M., & van Elsas, J. D. 2013. Chitin Amendment Increases Soil Suppressiveness toward Plant Pathogens and Modulates the Actinobacterial and Oxalobacteraceal Communities in an Experimental Agricultural Field. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(17), 5291–5301. <https://doi.org/10.1128/AEM.01361-13>
- Cucu, M. A., Gilardi, G., Pugliese, M., Gullino, M. L., & Garibaldi, A. 2020. An assessment of the modulation of the population dynamics of pathogenic *Fusarium oxysporum* f. sp. lycopersici in the tomato rhizosphere by means of the application of *Bacillus subtilis* QST 713, *Trichoderma* sp. TW2 and two composts. *Biological Control*, 142, 104158. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2019.104158>.
- D'Arrigo, G., Autiero, I., Gianquinto, E., Siragusa, L., Baroni, M., Cruciani, G., & Spyraakis, F. 2022. Exploring Ligand Binding Domain Dynamics in the NRs Superfamily. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(15), 8732–8732. <https://doi.org/10.3390/ijms23158732>
- Deekshit, V. K., Kumar, B. K., Rai, P., Rohit, A., & Karunasagar, I. 2013. Simultaneous detection of Salmonella pathogenicity island 2 and its antibiotic resistance genes from seafood. *Journal of Microbiological Methods*, 93(3), 233–238. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2013.03.015>
- de Goffau, M. C., Charnock-Jones, D. S., Smith, G. C. S., & Parkhill, J. (2021). Batch effects account for the main findings of an in utero human intestinal bacterial colonization study. *Microbiome*, 9(1). <https://doi.org/10.1186/s40168-020-00949-z>

- Drewnowska JM., Fiodor, A., J.E Barboza-corona, I, Swiecicka. 2020. Chitinolytic activity of phylogenetically diverse *Bacillus cereus sensu lato* from natural environment. *Systematic and Applied Microbiology* 43. 126075. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2020.126075>
- Duan, Y., Freyburger, A., Kunz, W., & Zollfrank, C. 2018. Cellulose and chitin composite materials from an ionic liquid and a green co-solvent. *Carbohydrate Polymers*, 192, 159–165. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.03.045>.
- Ekundayo, F. O., Folorunsho, A. E., Ibisani, T. A., & Olabanji, O. B. 2022. Antifungal activity of chitinase produced by *Streptomyces* species isolated from grassland soils in Futa Area, Akure. *Bulletin of the National Research Centre*, 46(1). <https://doi.org/10.1186/s42269-022-00782-4>
- Elieh-Ali-Komi, D., & Hamblin, M. R. (2016). Chitin and Chitosan: Production and Application of Versatile Biomedical Nanomaterials. *International journal of advanced research*, 4(3), 411–427.
- Eren, K., Taktakoglu, N., & Pirim, I. 2023. DNA Sequencing Methods: From Past to Present. *The Eurasian Journal of Medicine*, 54(Supp1), S47–S56. <https://doi.org/10.5152/eurasianjmed.2022.22280>
- Evangelista-Martínez, Z., Ríos-Muñiz, D. E., Gómez-Cano, J., Montoya-Hidalgo, A. C., & Ochoa-Solórzano, R. E. 2022. Actividad antimicrobiana de *Streptomyces* sp. Y15 contra bacterias patógenas y evaluación de medios de cultivo para la producción de antibióticos. *TIP Revista Especializada En Ciencias Químico-Biológicas*, 25. <https://doi.org/10.22201/fesz.23958723e.2022.415>
- FAO. 2020. Globefish highlights January 2020 issue, with jan.-sep. 2019 statistics a quarterly update on world seafood markets. *Globefish Highlights*, 1–2020.
- FAO. 2023. *Globefish highlights Q1 January-March 2020 issue, Global farmed shrimp production increased in 2022 despite low demand*. *Globefish Highlights*, 1–2023.
- Forli, S., Huey, R., Pique, M. E., Sanner, M. F., Goodsell, D. S., & Olson, A. J. 2016. Computational protein–ligand docking and virtual drug screening with the AutoDock suite. *Nature Protocols*, 11(5), 905–919. <https://doi.org/10.1038/nprot.2016.051>
- Gaber, Y., Mekasha, S., Vaaje-Kolstad, G., Eijsink, V. G. H., & Fraaije, M. W. 2016. Characterization of a chitinase from the cellulolytic actinomycete *Thermobifida fusca*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) –Proteins and Proteomics*, 1864(9), 1253–1259. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2016.04.010>

- Gardner, K. H., and Blackwell, J. 1975. Refinement of the structure of β -chitin. *Biopolymers: Original Research on Biomolecules*, 14(8), 1581-1595.
- Gibson, L. J. 2012. The hierarchical structure and mechanics of plant materials. *Journal of the Royal Society Interface*, 9(76), 2749-2766.
<https://doi.org/10.1098/rsif.2012.0341>
- Gomaa EZ. 2012. Chitinase production by *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus licheniformis*: Their potential in antifungal biocontrol. *The Journal of Microbiology* 50(1):103-111. <https://doi.org/10.1007/s12275-012-1343-y>
- Gonfa, T., Negessa, A. K., & Bulto, A. O. 2023. Isolation, screening, and identification of chitinase-producing bacterial strains from riverbank soils at Ambo, Western Ethiopia. *Heliyon*, 9(11), e21643–e21643.
<https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e21643>
- Graham LS, Sticklen MB. 1994. Plant chitinases. *Canadian Journal of Botany* 72(8):1057-1083. doi:<https://doi.org/10.1139/b94-132>
- Guesmi, S., Pujic, P., Nouioui, I., Dubost, A., Najjari, A., Ghedira, K., Igual, J. M., Miotello, G., Cherif, A., Armengaud, J., Klenk, H., Normand, P., & Sghaier, H. 2021. Ionizing-radiation-resistant *Kocuria rhizophila* PT10 isolated from the Tunisian Sahara xerophyte *Panicum turgidum*: Polyphasic characterization and proteogenomic arsenal. *Genomics*, 113(1), 317–330.
<https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2020.11.029>
- Hamed I, Özogul F, Regenstein JM. 2016. Industrial applications of crustacean by-products (chitin, chitosan, and chitooligosaccharides): A review. *Trends in Food Science & Technology* 48:40-50.
<https://doi.org/10.1016/j.tifs.2015.11.007>
- Hari, S. 2019. In silico molecular docking and ADME/T analysis of plant compounds against IL17A and IL18 targets in gouty arthritis. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 9(7), 18–26.
<https://doi.org/10.7324/japs.2019.90703>
- Hata, H., Phuoc Tran, D., Marzouk Sobeh, M., & Kitao, A. 2021. Binding free energy of protein/ligand complexes calculated using dissociation Parallel Cascade Selection Molecular Dynamics and Markov state model. *Biophysics and Physicobiology*, 18, 305–316.
<https://doi.org/10.2142/biophysico.bppb-v18.037>
- He, T.; Fan, J.; Jiao, G.; Liu, Y.; Zhang, Q.; Luo, N.; Ahmad, B.; Chen, Q.; Wen, Z. 2023. Bioinformatics and Expression Analysis of the Chitinase Genes in Strawberry (*Fragaria vesca*) and Functional Study of FvChi-14. *Plants*. 12, 1543.<https://doi.org/10.3390/plants12071543>

- Henson, M. W., Pitre, D. M., Weckhorst, J. L., Lanclos, V. C., Webber, A. T., and Thrash, J. C. 2016. Artificial Seawater Media Facilitate Cultivating Members of the Microbial Majority from the Gulf of Mexico. *mSphere*, 1(2), e00028-16.
- Henrissat, B. And Bairocht, A. 1993. New families in the classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochem. J.* 293, 781-788
- Heuer, H., Krsek, M., Baker, P., Smalla, K., and Wellington E.M.H. 1997. Analysis of actinomycete communities by specific amplification of genes encoding 16S rRNA and gel-electrophoretic separation in denaturing gradients. *Appl Environ Microb.* 63, 3233–3241.
- Henrissat B, Bairoch A. 1993. New families in the classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochemical Journal* 293(3):781-788. doi.org/10.1042/bj2930781
- Huang, S., Ma., L., Tong, Him T., O’Hagan, D. and Deng. H. 2014. Fluoroacetate biosynthesis from the marinederived bacterium *Streptomyces xinghaiensis* NRRL B-24674. *Organic & Biomolecular Chemistry.* 12, 4828. DOI: 10.1039/c4ob00970c
- Huffard, C.L., Erdmann, M.V., and Gunawan, T. 2012. Geographic Priorities for Marine Biodiversity Conservation in Indonesia; Ministry of Marine Affairs and Fisheries and Marine Protected Areas Governance Program: Jakarta, Indonesia. ISBN 978-602-98450-6-8. Available online: https://www.coraltriangleinitiative.org/sites/default/files/resources/8_Geographic%20Priorities%20for%20Marine%20Biodiversity%20Conservation%20in%20Indonesia.pdf. Diakses pada 2 Februari 2023.
- Hui, C., Jiang, H., Liu, B., Wei, R., Zhang, Y., Zhang, Q., Liang, Y., and Zhao, Y. 2020. Chitin degradation and the temporary response of bacterial chitinolytic communities to chitin amendment in soil under different fertilization regimes, *Science of the Total Environment.* <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.136003>
- Illumina. 2013. 16S Metagenomic Sequencing Library Preparation. Illumina.Com, (B), 1–28.
- Implen. (2011). NanoPhotometer ® P-Class User Manual P 300 / P 330 / P 360 Version 2.1 P 360 P 300 P 330 (pp. 1–70). Implen Inc. <https://www.implen.de/wp-content/uploads/2015/04/NanoPhotometer-P-Class-User-Manual-2.1.pdf>.
- Jacquioid, S., Franqueville, L., Cécillon, S., M. Vogel, T., & Simonet, P. 2013. Soil Bacterial Community Shifts after Chitin Enrichment: An Integrative

Metagenomic Approach. *PLoS ONE*, 8(11), e79699. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0079699>.

- Jadid, N., Kurniawan, E., Himayani, C. E. S., Andriyani, Prasetyowati, I., Purwani, K. I., Muslihatin, W., Hidayati, D., & Tjahjaningrum, I. T. D. 2020. An ethnobotanical study of medicinal plants used by the Tengger tribe in Ngadisari village, Indonesia. *PLOS ONE*, 15(7), e0235886. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0235886>.
- Kamble, A., Srinivasan, S., Singh, H. 2019. In-Silico Bioprospecting: Finding Better Enzymes. *Molecular Biotechnology*. <https://doi.org/10.1007/s12033-018-0132-1>
- Kannan, M. 2018. Scanning Electron Microscopy: Principle, Components and Applications. In *A Textbook on Fundamentals and Applications of Nanotechnology* (pp. 81–92). Daya Publishing House.
- Karunanathie, H., Kee, P. S., Ng, S. F., Kennedy, M. A., & Chua, E. W. 2022. PCR enhancers: Types, mechanisms, and applications in long-range PCR. *Biochimie*, 197, 130–143. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2022.02.009>
- Kawase, T., Saito, A., Sato, T., Kanai, R., Fujii, T., Nikaidou, N., Miyashita, K., Watanabe, T. 2004. Distribution and Phylogenetic Analysis of Family 19 Chitinases in Actinobacteria. *Applied And Environmental Microbiology*. p. 1135–1144.
- Kidibule, P. E., Santos-Moriano, P., Plou, F. J., & Fernández-Lobato, M. 2020. Endo-chitinase Chit33 specificity on different chitinolytic materials allows the production of unexplored chitoooligosaccharides with antioxidant activity. *Biotechnology reports*, 27, e00500. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2020.e00500>
- Koptides, M., Barák, I., Šišová, M., Baloghová, E., Ugorčaková, J., & Timko, J. 1992. Characterization of bacteriophage BFK20 from *Brevibacterium flavum*. *Journal of General Microbiology*, 138(7), 1387–1391. <https://doi.org/10.1099/00221287-138-7-1387>
- Kumar, M., Brar, A., Vivekanand, V., & Pareek, N. 2017. Production of chitinase from thermophilic *Humicola grisea* and its application in production of bioactive chitoooligosaccharides. *International journal of biological macromolecules*, 104 (Pt B), 1641–1647. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.04.100>
- Kurihara, K., Umezawa, K., Donnelly, A., Sperling, B., Liao, G., Hecht, M. H., & Arai, R. 2023. Crystal structure and activity of a de novo enzyme, ferric enterobactin esterase Syn-F4. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 120(38). <https://doi.org/10.1073/pnas.2218281120>

- Kute, P. M., Soukarieh, O., Tjeldnes, H., Trégouët, D.-A., & Valen, E. 2022. Small Open Reading Frames, How to Find Them and Determine Their Function. *Frontiers in Genetics*, 12. <https://doi.org/10.3389/fgene.2021.796060>
- Laila, A., Setiawan, F., Widyastuti, W., Fadhilah, M. R., Setiawan, A., Juliasih, N. L. G. R., Setiawan, W. A., Apriliana, E., Ahmadi, P., Arai, M., & Hendri, J. 2023. Exploration and Biorefinery Antimicrobial Agent through Solid State Fermentation from Indonesia's Marine Actinomycetes. *Fermentation*, 9(4), 334. <https://doi.org/10.3390/fermentation9040334>
- Li, H. and Greene, L.H., 2010. Sequence and Structural Analysis of the Chitinase Insertion Domain Reveals Two Conserved Motifs Involved in Chitin Binding. *PLoS ONE* 5(1): e8654. doi:10.1371/journal.pone.0008654
- Li, S., Zhang, B., Zhu, H., Zhu, T. 2018. Cloning and Expression of the Chitinase Encoded by ChiKJ406136 from *Streptomyces Sampsonii* (Millard & Burr) Waksman KJ40 and Its Antifungal Effect. *Forest*. 9, pp 699
- Li Q, Chen X, Jiang Y, Jiang C. 2016. Morphological Identification of Actinobacteria. *Actinobacteria - Basics and Biotechnological Applications*. doi: doi.org/10.5772/61461
- Liu, W. and Saint D.A. 2002. Validation of a quantitative method for real time PCR kinetics. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 294. 347–353.
- Liaqat, F., and Eltem, R. 2018. Chitooligosaccharides and Their Biological Activities: a Comprehensive Review. *Carbohydr. Polym*, 184, 243–259.
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* (San Diego, Calif.), 25(4), 402–408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>.
- Lombard, V., Golaconda Ramulu, H., Drula, E., Coutinho, P. M., & Henrissat, B. (2013). The carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013. *Nucleic Acids Research*, 42(D1), D490–D495. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt1178>.
- Lu, Y., Wang, N., He, J., Li, Y., Gao, X., Huang, L, Yan, X. 2018. Expression and characterization of a novel chitinase with antifungal activity from a rare actinomycete, *Saccharothrix yanglingensis* Hhs.015. *Protein Expression and Purification* 143. 45–51.
- Luchini, A., & Vitiello, G. 2020. Mimicking the Mammalian Plasma Membrane: An Overview of Lipid Membrane Models for Biophysical Studies. *Biomimetics*, 6(1), 3. <https://doi.org/10.3390/biomimetics6010003>

- Martinovičová, Mária & Janeček, Štefan. 2018. In silico analysis of the α -amylase family GH57: eventual subfamilies reflecting enzyme specificities. *3 Biotech.* 8:307 <https://doi.org/10.1007/s13205-018-1325-9>
- Minke, R. A. M., and Blackwell, J. 1978. The Structure of α -chitin. *Journal of molecular biology*, 120(2), 167-181.
- Mitsis, T., Papageorgiou, L., Efthimiadou, A., Bacopoulou, F., Vlachakis, D., Chrousos, G., & Eliopoulos, E. 2020. A comprehensive structural and functional analysis of the ligand binding domain of the nuclear receptor superfamily reveals highly conserved signaling motifs and two distinct canonical forms through evolution. *World Academy of Sciences Journal.* <https://doi.org/10.3892/wasj.2020.30>
- Mohan, K., Ganesan, A.R.G, P.N. Ezhilarasi, P., Kondamareddy, K.K., Rajan, D.K, Sathishkumar, P., Rajarajeswaran, J., and Conterno, L. 2022. Green and eco-friendly approaches for the extraction of chitin and chitosan: A review. *Carbohydrate polymers*, 287, 119349.
- Muhammad SA, Fatima N. 2015. In silico analysis and molecular docking studies of potential angiotensin-converting enzyme inhibitor using quercetin glycosides. *Phcog Mag.*11:123-6.
- Mullis, Kary B. 1990. The Unusual Origin of the Polymerase Chain Reaction. *Scientific American*, 262(4):56-65.
- Musfiroh, I., Azura, A., & Rahayu, D. 2020. Prediction of Asiatic Acid Derivatives Affinity Against SARS-CoV-2 Main Protease Using Molecular Docking. *Pharmaceutical Sciences and Research (PSR)*, 7, 57–64.
- Muzuni, NA Yanti and WM Prasetya. 2021. Characterization of the gene encoding chitinase enzyme from bacillus isolates insulated from some locations in Southeast Sulawesi. *Journal of Physics: Conference Series.* 899. 012017 [doi:10.1088/1742-6596/1899/1/012017](https://doi.org/10.1088/1742-6596/1899/1/012017)
- Nazari, B., Saito, A., Kobayashi, M., Miyashita, K., Wang, Y., Fuji T. 2011. High expression levels of chitinase genes in *Streptomyces coelicolor* A3(2) grown in soil. *FEMS Microbiology Ecology. Ecol*, 77:623–635. DOI:10.1111/j.1574-6941.2011.01143.x.
- Neidle, S. 2021. Beyond the double helix: DNA structural diversity and the PDB. *Journal of Biological Chemistry*, 296. <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2021.100553>
- Nguyen TT, Zhang W, Barber AR, Su P, He S.2015. Microwave-Intensified Enzymatic Deproteinization of Australian Rock Lobster Shells (*Jasus edwardsii*) for the Efficient Recovery of Protein Hydrolysate as Food

Functional Nutrients. *Food and Bioprocess Technology*;9(4):628-636.
doi:<https://doi.org/10.1007/s11947-015-1657-y>

- Nord, C., Levenfors, J. J., Bjerketorp, J., Sahlberg, C., Guss, B., Öberg, B., and Broberg, A. 2019. Antibacterial Isoquinoline Alkaloids from the Fungus *Penicillium Spathulatum* Em19. *Molecules*, 24(24), 4616.
- Ooi JK, Woon KS, Hashim H. 2021. A multi-objective model to optimize country-scale municipal solid waste management with economic and environmental objectives: A case study in Malaysia. *Journal of Cleaner Production* 316:128366. Doi : doi.org/10.1016/j.jclepro.2021.128366
- Orikoshi, H., Nakayama, S., Miyamoto, K, Hanato., C., Yasuda., M., Inamori, Y & Tsujibo, H. 2005. Roles of Four Chitinases (ChiA, ChiB, ChiC, and ChiD) in the Chitin Degradation System of Marine Bacterium *Alteromonas* sp. Strain O-7. *Applied And Environmental Microbiology*. p. 1811–1815
doi:[10.1128/AEM.71.4.1811–1815.2005](https://doi.org/10.1128/AEM.71.4.1811-1815.2005).
- Osada, M.; Kikuta, K.; Yoshida, K.; Totani, K.; Ogata, M.; Usui, T. 2013. Non-catalytic synthesis of chromogen I and III from N-acetyl-Dglucosamine in high-temperature water. *Green Chem* 15, 2960– 2966.
- Parra, J., Soldatou, S., Rooney, L. M., & Duncan, K. R. 2021. *Pseudonocardia abyssalis* sp. nov. and *Pseudonocardia oceani* sp. nov., two novel actinomycetes isolated from the deep Southern Ocean. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 71(9).
<https://doi.org/10.1099/ijsem.0.005032>
- Passarinho, P. A., & de Vries, S. C. 2002. *Arabidopsis* Chitinases: a Genomic Survey. The *Arabidopsis* Book, 1, e0023. <https://doi.org/10.1199/tab.0023>.
- Patil, Reetarani S. Vandana Ghormade, Mukund V. Deshpande. 2000. Chitinolytic enzymes: an exploration. *Enzyme and Microbial Technology*, 26. 473– 483.
- Paulsen, S., Andersen, B., Gram, L., & Machado, H. 2016. Biological Potential of Chitinolytic Marine Bacteria. *Marine Drugs*, 14(12), 230.
<https://doi.org/10.3390/md14120230>.
- Pineda-Rodriguez, Y. Y., Pompelli, M. F., Jarma-Orozco, A., Rodríguez, N. V., & Rodríguez-Paez, L. A. 2023. A New and Profitable Protocol to DNA Extraction in *Limnospira maxima*. *Methods and Protocols*, 6(4), 62–62.
<https://doi.org/10.3390/mps6040062>
- Poria, V., Rana, A., Kumari, A., Grewal, J., Pranaw, K., & Singh, S. 2021. Current Perspectives on Chitinolytic Enzymes and Their Agro-Industrial Applications. *Biology*, 10(12), 1319.
<https://doi.org/10.3390/biology10121319>.

- Portin, P. 2014. The birth and development of the DNA theory of inheritance: sixty years since the discovery of the structure of DNA. *Journal of Genetics*, 93(1), 293–302. <https://doi.org/10.1007/s12041-014-0337-4>
- Putra, L. A. G., Yonathan, C. J., Niedhatrata, N. I., Firdaus, M. H. R., & Yoewono, J. R. 2020. A review of the development of Polymerase Chain Reaction technique and its uses in Scientific field. *Stannum : Jurnal Sains Dan Terapan Kimia*, 2(1), 14–30. <https://doi.org/10.33019/jstk.v2i1.1619>
- Qu, T., Zhang, C., Qin, Z., Fan, L., Jiang, L., & Zhao, L. 2021. A Novel GH Family 20 β -N-acetylhexosaminidase With Both Chitosanase and Chitinase Activity From *Aspergillus oryzae*. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 8, 684086. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2021.684086>
- Rahlwes, K. C., Sparks, I. L., & Morita, Y. S. 2019. Cell Walls and Membranes of Actinobacteria. *Sub-Cellular Biochemistry*, 92, 417–469. https://doi.org/10.1007/978-3-030-18768-2_13.
- Rahman, A., Haque, M. A., Ghosh, S., Shinu, P., Attimarad, M., and Kobayashi, G. 2023. Modified Shrimp-Based Chitosan as an Emerging Adsorbent Removing Heavy Metals (Chromium, Nickel, Arsenic, and Cobalt) from Polluted Water. *Sustainability*, 15(3), 2431.
- Ramaiah, N., Hill, R.T, Chun, J., Ravel, J., Matte, M.H., Straube, W.L., and Colwell, R.R. 2000. se of a chiA probe for detection of chitinase genes in bacteria from the Chesapeake Bay. *FEMS Microbiology Ecology* 34. 63^71
- Rathore, A. S., & Gupta, R. D. (2015). Chitinases from Bacteria to Human: Properties, Applications, and Future Perspectives. *Enzyme Research*, 2015, 1–8. <https://doi.org/10.1155/2015/791907>
- Rawway, M., Beltagy, E. A., Abdul-Raouf, U. M., Elshenawy, M. A., & Kelany, M. 2018. Optimization of Process Parameters for Chitinase Production by a Marine *Aspergillus flavus* MK20. *Journal of Ecology of Health & Environment*, 6(1), 1–8. <https://doi.org/10.18576/jehe/060101>
- Rishad KS, Rebello S, Nathan VK, Shabanamol S, Jisha MS. 2016. Optimised production of chitinase from a novel mangrove isolate, *Bacillus pumilus* MCB-7 using response surface methodology. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* 5:143-149. doi:<https://doi.org/10.1016/j.bcab.2016.01.009>
- Sadh PK, Duhan S, Duhan JS. 2018. Agro-industrial wastes and their utilization using solid state fermentation: a review. *Bioresources and Bioprocessing* 5(1). doi.org/10.1186/s40643-017-0187-z
- Saima, M.K. and Roohi, I.Z.A. 2013. Isolation of novel chitinolytic bacteria and production optimization of extracellular chitinase. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*. 11(1): 39-46.

- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R. 1997. DNA Sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc.Natl. Acad.Sci.* Vol. 74, No. 12 pp. 5463-5467.
- Santos, V.P. Marques, N.S.S. Maia, P.C.S.V. de Lima, M.A.B. Franco, L. de O. and de Campos-Takaki, G.M. 2020. Seafood Waste as Attractive Source of Chitin and Chitosan Production and Their Applications. *Int. J. Mol. Sci.* 21: 1–17.
- Selim, M.S.M., Abdelhamid, S.A. & Mohamed, S.S. 2021. Secondary metabolites and biodiversity of actinomycetes. *J Genet Eng Biotechnol* 19(72).
- Setia, I. N., & Suharjono. 2015. Chitinolytic Assay and Identification of Bacteria Isolated from Shrimp Waste Based on 16S rDNA Sequences. *Advances in Microbiology*, 05(07), 541–548. <https://doi.org/10.4236/aim.2015.57056>
- Setiawan, A., Widyastuti, W., Irawan, A., Wijaya, O. S., Laila, A., Setiawan, W. A., Juliasih, N. L., Nonaka, K., Arai, M., & Hendri, J. 2021. Solid State Fermentation of Shrimp Shell Waste Using *Pseudonocardia carboxydvorans* 18A13O1 to Produce Bioactive Metabolites. *Fermentation*, 7(4), 247.
- Setoguchi, T., Kato, T., Yamamoto, K., and Kadokawa, J.I. 2012. Facile Production of Chitin from Crab Shells Using Ionic Liquid and Citric Acid. *Int. J. Biol. Macromol*, 50, 861–864.
- Sharma, M., Mukesh, C., Mondal, D., & Prasad, K. 2013. Dissolution of α -chitin in deep eutectic solvents. *RSC Advances*, 3(39), 18149. <https://doi.org/10.1039/c3ra43404d>
- Shendure, J., Balasubramanian, S., Church, G.M., Gilbert., W., Rogers, J. Schloss, J.A., and Waterston, R.H. 2017. DNA sequencing at 40: past, present and future. *Nature* Vol. 550 pp 345-353. doi:10.1038/nature24286.
- Shivalee, A., Lingappa, K., & Mahesh, D. 2018. Influence of bioprocess variables on the production of extracellular chitinase under submerged fermentation by *Streptomyces pratensis* strain KLSL55. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 16(2), 421–426. <https://doi.org/10.1016/j.jgeb.2017.12.006>.
- Singh, J., Birbia, N., Sinha S., and Goswani, A. 2014. A critical review on PCR, its types and applications. *International Journal of Advanced Research in Biological Sciences*. 1(7): 65–80.
- Singh, Komal., P., Miaskowski, C., Dhruva A.A., Flowers, E., Kober, and Kord. M. 2018. Mechanisms and Measurement of Changes in Gene Expression. *Biological Research for Nursing*. Vol. 20(4) 369-382
- Singhania, R. R., Patel, A. K., Soccol, C. R., & Pandey, A. 2009. Recent advances in solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, 44(1), 13–18. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2008.10.019>

- Soccol CR, Costa ESF da, Letti LAJ, Karp SG, Woiciechowski AL, Vandenberghe LP de S. 2017. Recent developments and innovations in solid state fermentation. *Biotechnology Research and Innovation* 1(1) :52-71. Doi : doi.org/10.1016/j.biori.2017.01.002
- Song, Z., Li, G., Guan, F., & Liu, W. 2018. Application of Chitin/Chitosan and Their Derivatives in the Papermaking Industry. *Polymers*, 10(4), 389.
- Sreela, D. K., Salim, S., Satheesan, A. A., & Sugathan, S. 2023. The whole-genome shotgun sequence of a chitinolytic actinomycete, *Streptomyces californicus* TBG-201, and the in-silico studies of its chitinase-19 genes. *Research Square (Research Square)*. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-2690332/v1>
- Suresh PV, Sachindra NM, Bhaskar N. 2011. Solid state fermentation production of chitin deacetylase by *Colletotrichum lindemuthianum* ATCC 56676 using different substrates. *Journal of Food Science and Technology* 48(3):349-356. doi: doi.org/10.1007/s13197-011-0252-0
- Thambiliyagodage, C., Jayanetti, M., Mendis, A., Ekanayake, G., Liyanaarachchi, H., & Vigneswaran, S. 2023. Recent Advances in Chitosan-Based Applications—A Review. *Materials*, 16(5), 2073.
- Tsujibo, Hiroshi., Takahiro Kubota, Mitsugu Yamamoto, Katsushiro Miyamoto, and Yoshihiko Inamori. 2003. Characterization of Chitinase Genes from an Alkaliphilic Actinomycete, *Nocardopsis prasina* OPC-131. *Applied And Environmental Microbiology*. p. 894–900.
- Qu T, Zhang C, Qin Z, Fan L, Jiang L and Zhao, L. 2021. A Novel GH Family 20 β -N-acetylhexosaminidase With Both Chitosanase and Chitinase Activity From *Aspergillus oryzae*. *Front. Mol. Biosci.* 8:684086. doi: 10.3389/fmolb.2021.684086
- VanGuilder, H.D., Vrana, K. E., and Freeman, W., M. 2008. Twenty-five years of quantitative PCR for gene expression analysis. *BioTechniques*, 44:619-626. doi 10.2144/000112776.
- von Rintelen K, Arida E, Häuser C. 2017. A review of biodiversity-related issues and challenges in megadiverse Indonesia and other Southeast Asian countries. *Research Ideas and Outcomes* 3:e20860. doi.org/10.3897/rio.3.e20860.
- Wahyudi, A. T., Fithriansyah, N. G., Amri, M. F., Priyanto, J. A., & Nawangsih, A. A. (2021). Screening of chitinase-producing rhizosphere actinomycetes and their genetic diversity. *Biodiversitas Journal of Biological Diversity*, 22(10). <https://doi.org/10.13057/biodiv/d221008>.
- Weeraphan, T., Supong, K., Sriprechasak, P., Jutakanoke, R., Kowinthanaphat, S.,

- Tanasupawat, S., Pittayakhajonwut, P., & Phongsopitanun, W. 2023. *Streptomyces rugosispiralis* sp. nov., a Novel Actinobacterium Isolated from Peat Swamp Forest Soil That Produces Ansamycin Derivatives and Nocardamines. *Antibiotics*, 12(9), 1467–1467. <https://doi.org/10.3390/antibiotics12091467>
- Widyastuti, W., Setiawan, F., Al Afandy, C., Irawan, A., Laila, A., Juliasih, N. L. G. R., Setiawan, W. A., Arai, M., Hendri, J., & Setiawan, A. (2022). Antifungal Agent Chitooligosaccharides Derived from Solid-State Fermentation of Shrimp Shell Waste by *Pseudonocardia antitumoralis* 18D36-A1. *Fermentation*, 8(8), 353. <https://doi.org/10.3390/fermentation8080353>.
- Williamson, N., Brian, P., and Wellington, E.M.H. 2000. Molecular detection of bacterial and streptomycete chitinases in the environment. *Antonie van Leeuwenhoek* 78: 315–321.
- Wong, M.L. & Medrano, J. F. 2005. Real-time PCR for mRNA quantitation. *BioTechniques*. Vol. 39, No. 1. pp 75-85.
- Xia, Z. F., Guan, T. W., Ruan, J. S., Huang, Y., and Zhang, L. L. 2013. *Longimycelium tulufanense* gen. nov., sp. nov., a filamentous actinomycete of the family Pseudonocardiaceae. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 63(Pt_8), 2813-2818
- Yadav, M., Goswami, P., Paritosh, K., Kumar, M., Parek, N., and Vivekanand, V. 2019. Seafood waste: a source for preparation of commercially employable chitin/chitosan materials. *Bioresour. Bioprocess.* 6, 8.
- Yang, S., Fu, X., Yan, Q., Jiang, Z., & Wang, J. (2016). Biochemical Characterization of a Novel Acidic Exochitinase from *Rhizomucor miehei* with Antifungal Activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64(2), 461–469. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b05127>
- Yazid N,A., Barrena R, Komilis D, Sánchez A. 2017. Solid-State Fermentation as a Novel Paradigm for Organic Waste Valorization: A Review. *Sustainability* 9(2):224. doi:<https://doi.org/10.3390/su9020224>
- You, C., Zhang, X.-Z., & Zhang, Y.-H. . P. 2012. Simple Cloning via Direct Transformation of PCR Product (DNA Multimer) to *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(5), 1593–1595. <https://doi.org/10.1128/aem.07105-11>
- Zhang, A., Zhang, T., Hall, E. A., Hutchinson, S., Cryle, M. J., Wong, L.-L., Zhou, W., & Bell, S. G. 2015. The crystal structure of the versatile cytochrome P450 enzyme CYP109B1 from *Bacillus subtilis*. *Molecular BioSystems*, 11(3), 869–881. <https://doi.org/10.1039/c4mb00665h>

- Zhang J, Yan N. 2017. Production of Glucosamine from Chitin by Co-solvent Promoted Hydrolysis and Deacetylation. *ChemCatChem* 9(14):2790-2796. doi: doi.org/10.1002/cctc.201601715
- Zhao, X.Q., X.N. Xu, and Chen, L.Y. 2016. Production of Enzymes from Marine Actinobacteria. *Advances in Food and Nutrition Research*, Volume 78. ISSN 1043-4526 <http://dx.doi.org/10.1016/bs.afnr.2016.06.002>
- Zhu, H., Zhang, H., Xu, Y., Lassakova, S., Korabecna, M., Neuzil P. 2020. PCR past, present and future. *BioTechniques* 69: 00–00. 10.2144/btn-2020-0057.
- Zvezdova, D., & Uzov, C. 2012. Determination Of The Degree Of Deacetylation Of Chitin And Chitosan By X-Ray Powder Diffraction. *Material Science*. Corpus ID: 138993471.