

**KARAKTERISASI KITOSAN DARI FUNGI 19A15-RF (*Aspergillus ochraceus*)  
YANG BERASOSIASI DENGAN SPONS**

**(Skripsi)**

**Oleh**

**M. Rizky Fadhilah  
NPM 1717011060**



**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
UNIVERSITAS LAMPUNG  
BANDAR LAMPUNG  
2022**

**KARAKTERISASI KITOSAN DARI FUNGI 19A15-RF (*Aspergillus  
ochraceus*) YANG BERASOSIASI DENGAN SPONS**

**Oleh**

**M. Rizky Fadhilah**

**Skripsi**

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

**Pada**

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



**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
UNIVERSITAS LAMPUNG  
BANDAR LAMPUNG  
2022**

## ABSTRAK

### KARAKTERISASI KITOSAN DARI FUNGI 19A15-RF (*Aspergillus ochraceus*) YANG BERASOSIASI DENGAN SPONS

Oleh

M. Rizky Fadhilah

*Fungi* diketahui mengandung kitosan pada dinding selnya. Dalam penelitian ini, *fungi* yang digunakan merupakan koleksi dari UPT LTSIT dengan kode 19A15-RF. Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi dan mengkarakterisasi kitosan dari *fungi* 19A15-RF. *Fungi* diremajakan menggunakan media malt ekstrak agar. Berdasarkan analisis Filogenetik, isolat 19A15-RF memiliki kemiripan 99,32% dengan *Aspergillus ochraceus*. *Fungi* dikultivasi skala besar pada media ekstrak malt dengan waktu variasi 10, 14, dan 18 hari. Pemilihan variasi hari bertujuan untuk melihat pertumbuhan optimum *fungi*, mengetahui kemampuan optimum *fungi* dalam memproduksi kitosan dan mengetahui derajat deasetilasi optimum. Kitosan diekstrak dari *fungi* yang dikultur dalam media malt ekstrak secara *Submerged Fermentation* (SmF). *Fungi* diekstraksi dengan NaOH dan CH<sub>3</sub>COOH. Kitosan yang diperoleh dengan masa kultivasi 10, 14, dan 18 hari diperoleh sebanyak 0,274 g, 0,499 g, dan 0,319 g secara berurutan, dan diperoleh persen rendemen kitosan dengan masa kultivasi 10, 14, dan 18 hari secara berurutan diperoleh sebanyak 0,7%, 1,1%, dan 0,7%. Berdasarkan analisis spektroskopi FTIR, diperoleh gugus fungsi kitosan meliputi serapan pada bilangan gelombang karbonil, C=O-NHR dapat diamati pada 1640 cm<sup>-1</sup> dan pita amina, NH<sub>2</sub> pada 1543-1565 cm<sup>-1</sup>. Derajat deasetilasi kitosan yang dihasilkan pada variasi hari ke 10, 14 dan 18 berturut-turut yaitu 65,85%, 65,15% dan 76,1%. Berdasarkan analisis unsur menggunakan *elemental analyzer*, jumlah nitrogen pada kitosan hari ke 10, 14 dan 18 diperoleh berturut turut sebesar 0,78%, 1,26%, dan 0,37%. Informasi awal ini penting, karena dapat digunakan sebagai dasar untuk pengembangan lebih lanjut dalam pencarian kitosan yang berasal dari *fungi* asosiasi spons laut.

**Kata kunci** : *Aspergillus ochraceus*, Fungi, Karakterisasi, Kitosan, Spons

## ABSTRACT

### CHARACTERIZATION OF CHITOSAN FROM FUNGI 19A15-RF (*Aspergillus ochraceus*) ASSOCIATED WITH SPONGE

By

**M. Rizky Fadhilah**

Fungi are known to contain chitosan in their cell walls. In this study, the fungi used were collections from UPT LTSIT with code 19A15-RF. This study aimed to isolate and characterize chitosan from 19A15-RF fungi. Fungi were rejuvenated using malt agar extract media. Based on phylogenetic analysis, isolate 19A15-RF was 99.32% similar to *Aspergillus ochraceus*. Fungi were cultivated on a large scale on malt extract media with variations of 10, 14, and 18 days. The choice of day variation aims to see the optimum growth of fungi, to determine the optimum ability of fungi to produce chitosan and to determine the optimum degree of deacetylation. Chitosan was extracted from fungi cultured in malt extract media by Submerged Fermentation (SmF). Fungi were extracted with NaOH and CH<sub>3</sub>COOH. Chitosan obtained with a cultivation period of 10, 14, and 18 days was obtained as much as 0.274 g, 0.499 g, and 0.319 g respectively, and the percentage yield of chitosan with a cultivation period of 10, 14, and 18 days respectively was 0.7%, 1.1%, and 0.7%. Based on FTIR spectroscopic analysis, the functional groups of chitosan include absorption at the carbonyl wave number, C=O-NHR which can be observed at 1640 cm<sup>-1</sup> and the amine band, NH<sub>2</sub> at 1543-1565 cm<sup>-1</sup>. The degree of deacetylation of chitosan produced on the 10th, 14th and 18th day variations, respectively, was 65.85%, 65.15% and 76.1%. Based on elemental analysis using an elemental analyzer, the amount of nitrogen in chitosan on days 10, 14 and 18 was obtained at 0.78%, 1.26%, and 0.37%, respectively. This preliminary information is important, because it can be used as a basis for further development in the search for chitosan derived from marine sponge associated fungi.

**Keywords:** *Aspergillus ochraceus*, Fungi, Characterization, Chitosan, Sponges.

Judul : **KARAKTERISASI KITOSAN DARI FUNGI  
19A15-RF (*Aspergillus ochraceus*) YANG  
BERASOSIASI DENGAN SPONS**

Nama Mahasiswa : **M. Rizky Fadhilah**

NPM : **1717011060**

Jurusan : **Kimia**

Fakultas : **Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam**



1. **Komisi Pembimbing**

**Prof. John Hendri, Ph.D.**  
NIP. 19581021198703001

**Andi Setiawan, M.Sc., Ph.D.**  
NIP. 195809221988111001

2. **Ketua Jurusan Kimia FMIPA Unila**

**Mulyono, Ph.D.**  
NIP. 197406112000031002



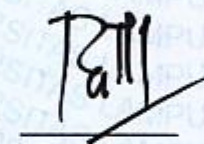
**MENGESAHKAN**

**1. Tim Penguji**

**Ketua : Prof. John Hendri, Ph.D.**



**Sekretaris : Andi Setiawan, M.Sc., Ph.D.**



**Penguji  
Bukan Pembimbing : Dr. Eng. Ni Luh Gede Ratna Juliasih, M.Si.**

**2. Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam**



**Dr. Eng. Supto Dwi Yuwono, M.T.**  
NIP. 197407052000031001

**Tanggal Lulus Ujian Skripsi : 3 Agustus 2022**

## SURAT PERNYATAAN KEASLIAN SKRIPSI

Yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : M. Rizky Fadhilah  
NPM : 1717011060  
Jurusan : Kimia  
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam  
Perguruan Tinggi : Universitas Lampung

Dengan ini menyatakan bahwa skripsi yang berjudul "Karakterisasi Kitosan dari Fungi 19A15-RF (*Aspergillus ochraceus*) yang Berasosiasi dengan Spons" ini tidak terdapat karya yang ditulis atau diterbitkan oleh orang lain, kecuali yang secara tertulis diacu dalam naskah ini sebagaimana disebutkan dalam daftar pustaka. Selanjutnya, saya juga tidak keberatan jika sebagian atau seluruh data di dalam skripsi tersebut digunakan oleh dosen atau program studi untuk kepentingan publikasi, sepanjang nama saya disebutkan dan terdapat kesepakatan sebelum dilakukan publikasi.

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

Bandar Lampung, 03 Agustus 2022

Yang menyatakan,

  
Fadhilah

NPM 171701106



## RIWAYAT HIDUP



M. Rizky Fadhilah lahir di Bekasi pada 25 Januari 2000.

Penulis merupakan anak pertama dari tiga bersaudara dari pasangan Bapak Apri Ramadan Simanullang dan Ibu Ponglina Napitupulu. Penulis memiliki satu adik laki-laki dan satu adik perempuan.

Penulis menyelesaikan pendidikan Taman Kanak-Kanak di TK Syaiful Amir Pondok Gede Tahun 2005. Penulis melanjutkan pendidikan sekolah dasar di SD Negeri Sukasari Cikarang Selatan kemudian pindah ke Madrasah Ibtidaiyah Negeri Sihite Doloksanggul dan Lulus pada tahun 2011. Pendidikan sekolah menengah pertama diselesaikan pada tahun 2014 di MTs Negeri Doloksanggul. Pendidikan sekolah menengah atas diselesaikan pada tahun 2017 di SMA Negeri 1 Doloksanggul, dan pada tahun yang sama penulis diterima sebagai mahasiswa Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lampung melalui jalur SBMPTN (Seleksi Bersama Masuk Perguruan Tinggi Negeri).

Selama menjadi mahasiswa, penulis aktif mengikuti unit kegiatan mahasiswa di lingkungan MIPA. Penulis memulai aktivitas organisasi sebagai kader muda Himaki



tahun 2017. Penulis pernah mengikuti Karya Wisata Ilmiah yang diselenggarakan oleh BEM FMIPA Unila tahun 2018. Penulis pernah menjabat sebagai Ketua Biro Usaha Mandiri HIMAKI FMIPA Unila tahun 2019. Penulis telah menyelesaikan Praktik Kerja Lapangan (PKL) di Laboratorium Biopolimer Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lampung dengan judul Isolasi dan Karakterisasi Kitin Kitosan dari Cangkang Kulit Udang dengan Menggunakan FTIR (*Fourier Transform Infrared*) dan DSC (*Difference Scanning Calorimetry*) dan Kuliah Kerja Nyata (KKN) Mandiri Putra Daerah di Desa Hutabagasan, Kecamatan Doloksanggul, Kabupaten Humbang Hasundutan pada tahun 2020.

## Motto

*"Dibalik Kesusahan Pasti ada Kemudahan"*  
(Q.S. Al-Insyirah : 5-6)

*"Allah tidak membebani seseorang melainkan sesuai kesanggupannya"*  
(Q.S. Al Baqarah : 286)

*"Bukan Kesulitan yang membuat kita Takut, tapi sering Ketakutanlah  
Yang membuat jadi Sulit.  
Jadi, Jangan Mudah menyerah!"*  
(Ir. H. Joko Widodo)

*"Sesuatu akan Terlihat Tidak Mungkin, Sampai Semuanya Selesai"*  
(Nelson Mandela)

*"Berbuat untuk Sebuah Harapan yang tidak lagi Dikeluhkan, tetapi Diperjuangkan"*  
(Najwa Shihab)

*"Plan, Do, Correct and Action"*  
(Prof. John Hendri, Ph.D)

*"その努力決して裏切らない"*  
*Sono Doryoku Kesshite Uragiranai*  
*Usaha Keras Tidak Akan Mengkhianati*  
(Yasushi Akimoto)

*"Whatever You Do, Do What You Love and Love What You Do"*  
(Sandiaga Salahuddin Uno)

*"Tidak Semua Jalanan Dilapisi Aspal Mulus, dan Tidak Semua Perjalanan Dihiasi Trek Lurus. Kadang Kita Harus Sedikit Berputar Sebelum Mencapai Tujuan, Sedikit Nyasar Sebelum Bertemu Kebenaran"*  
(Fiersa Besari)

*"A Little Reminder :One Day the Word 'Soon' Will be Replaced by 'Finally'"*  
(Gabriela Margareth Warouw)

*"Allah is The Best Planner"*  
(M. Rizky Fadhilah)

*"Selesaikan apa yang sudah dimulai"*  
(M. Rizky Fadhilah)

## PERSEMBAHAN

*Alhamdulillah Puji Syukur kepada Allah SWT yang senantiasa memberikan nikmat Kesehatan dan Kesempatan, serta Shalawat beriring salam semoga selalu Tercurahkan kepada baginda Nabi Muhammad SAW.*

*Kupersembahkan karya ini sebagai wujud Cinta, Bakti dan Tanggung jawabku kepada:*

*Kedua Orang tuaku Tercinta yang selalu memberikan Do'a, Dukungan, Cinta serta Kasih sayang, sehingga ku dapat menyelesaikan karya ini dengan baik.*

*Adik-adikku yang selalu memberikan dukungan dan semangat untukku.*

*Bapak Prof. John Hendri, Ph.D., Bapak Andi Setiawan, Ph.D.,  
dan Ibu Dr. Ni luh Gede Ratna Juliasih, M.Si.  
Dosen yang selalu membimbingku dalam mengerjakan penelitian dan tugas akhir.*

*Semua Bapak dan Ibu dosen Jurusan Kimia yang telah memberikan ilmu, membimbing dan membagikan pengalaman kepada penulis selama menempuh pendidikan.*

*Keluarga Besar Chemistry 2017 yang selama ini mengajarkan arti Kekeluargaan, Kebersamaan dan Solidaritas.*

*Serta  
Almamaterku Tercinta*



## SANWACANA

*Alhamdulillah* *rabbi'l'alamin*, Puji syukur kehadirat Allah SWT atas limpahan rahmat dan karunia-nya sehingga penulis dapat menyelesaikan penulisan skripsi yang berjudul “**Karakterisasi Kitosan dari Fungi 19A15-RF (*Aspergillus ochraceus*) yang Berasosiasi dengan Spons**”. Skripsi ini adalah salah satu syarat untuk memperoleh gelar sarjana Sains pada Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Lampung.

Penulis menyadari bahwa skripsi ini tidak mungkin terselesaikan tanpa adanya bimbingan, dorongan, nasihat serta bantuan dari berbagai pihak. Oleh karena itu, Penulis menyampaikan terima kasih kepada :

1. Bapak Apri Ramadan Simanullang dan Ibu Ponglina Napitupulu selaku kedua orang tua atas kasih sayang yang telah diberikan selama ini serta segala doa nasihat, motivasi dan dukungan finansial, sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini dengan baik. Semoga Allah SWT membalas atas segala yang telah diberikan dengan Jannah-Nya, Aamiin.

2. Bapak Prof. John Hendri, Ph.D. selaku Pembimbing 1 penelitian atas segala bimbingan, dukungan dan motivasi serta saran yang diberikan kepada penulis sehingga penulis dengan lancar menjalani penelitian dan menyelesaikan skripsi ini.
3. Bapak Andi Setiawan, Ph.D. selaku pembimbing II penelitian atas semua kritik, saran, bimbingan serta motivasi yang selalu diberikan dengan kesabaran dan keikhlasan kepada penulis selama penelitian.
4. Ibu Dr. Ni Luh Gede Ratna Juliasih, M.Si. selaku pembahas penelitian yang telah memberikan kritik serta saran kepada penulis sehingga skripsi ini terselesaikan dengan baik.
5. Ibu Prof. Dr. Kamisah D. Pandiangan, M.Si. selaku pembimbing akademik atas segala bimbingan, masukan dan motivasi yang diberikan kepada penulis sehingga skripsi ini terselesaikan dengan baik.
6. Bapak Dr. Eng. Suropto Dwi Yuwono, M.T. selaku Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam (FMIPA) Universitas Lampung
7. Bapak Mulyono, Ph.D. selaku ketua Jurusan Kimia FMIPA Unila
8. Ibu Dr. Mita Rilyanti, M.Si. selaku sekretaris Jurusan Kimia FMIPA Unila.
9. Bapak Wawan A. Setiawan, S.Si.,M.Si. selaku Kepala Laboratorium Biomolekuler UPT-LTSIT.

10. Bapak dan Ibu Dosen Jurusan Kimia FMIPA Universitas Lampung atas seluruh ilmu, motivasi, dan pengalamannya yang telah diberikan kepada penulis selama menjalankan pendidikan di kampus. Semoga ilmu yang diberikan bermanfaat dan Allah SWT balas semua kebaikan bapak dan ibu dengan pahala yang berlimpah.
11. Seluruh staf administrasi dan pegawai di lingkungan Jurusan Kimia, Dekanat FMIPA, serta Universitas Lampung yang senantiasa membantu dalam sistem akademik, perkuliahan, penelitian, serta penyusunan skripsi dapat terselesaikan dengan baik.
12. Adik-adikku tersayang M. Aquillah Priyandita dan Azizah Divatrya Ningsih untuk semangat dan dukungan kalian.
13. Seluruh Keluarga yang telah memberikan semangat dan bantuan tiada henti kepada penulis.
14. Kak Fendi Setiawan, M.Si. yang selalu memberikan semangat, pengalaman, kritik dan saran terbaik bagi penulis selama menyelesaikan tugas akhir ini, semoga cita-cita jadi *Researcher* di Jepang dikabulkan Allah SWT, Amiin.
15. Anak Bapak Ibu kak Dr. Ridho Nahrowi M.Si , mba Dr. Widyastuti M.Si., dan mba Nafila Khansa Salsabila, M.Si, , Ikromuddin, S.Si, Saras Khairani Rachmawati S.Si, Rana Aprilia Rinjani,S.Si, dan Della Lestari, S.Si. semoga Allah membalas kebaikan kalian, dilancarkan studinya. Semangat Terus Gesss!!!

16. Sahabat- sahabatku, Adita Sukma Ramadhania, S.Si, Anggit Anindya Putri, S.Si, Merriezka Ismaini, S.Si. Terimakasih telah membuatku sedih, senang, dan kuat dalam menyelesaikan tugas akhir ini. You're my support system guys, See You on Top Ya!.
17. Mahasiswa bimbingan Pak John dan Bu Aspita (angkatan 2018) : Icha, Laras, Irma, dan Firda yang telah memberikan semangat dan doa bagi penulis.
18. Mahasiswa bimbingan Pak John (angkatan 2019) : Farich, Silvi, Datun dan Adhel yang telah memberikan semangat dan membantu penulis dalam menyelesaikan tugas akhir
19. Andi Setiawan's Research Group, kak Arik, kak Arif, kak Caca, kak Mifta, kak Oci, kak Vio, kak Zara, bude Linda, mba Gita, kak Dea, Chasya, Ika, Mega, Indra, Lanang, dan Reyzka yang telah menjadi tempat bertanya dikala kesusahan dan kebingungan dalam menyelesaikan tugas akhir ini.
20. "**Squad Kimia Beta**" yang telah kebersamai dalam proses perkuliahan, memberikan kritik dan saran kepada penulis. Semoga tali silaturahmi yang sudah dibangun selama empat tahun tidak putus ya, Semoga Allah SWT. Melancarkan urusan kita semua.
21. Teman-teman seperjuangan , Keluarga Besar "**Chemistry 2017**" , atas kebersamaannya dari awal pertemuan sebagai mahasiswa sampai sekarang dan bahkan sampai masa depan. Kalian hebat, telah menjadi Rumah untukku bernaung. Maaf apabila apabila belum bisa menjadi teman atau sahabat yang



baik bagi kalian. Semoga Allah SWT memberkahi dan meridhoi kita selama menjalankan pendidikan di kampus, dan semoga kita dapat mengaplikasikan ilmu yang telah didapat dalam berbagai bidang kehidupan yang akan ditekuni selanjutnya, Aamiin. Chemistry 17!!!!, Kolaborasi Karya Luar Biasa!!!!

22. Chemmen 17 atas kebersamaanya selama ini, Alfa, Andre, Icen, Ikrom, Rusydi, Arya, Fauzan, Gray, Kadek, Jere, Rois, Muhlis, Ocad, Pandu, Rezal, Sandi, Sang, Danang, Dudung dan Doni, terimakasih telah mengajarkan arti kebersamaan, kekeluargaan dan kesolidan. Tetap Solid dan Semangat boy, harus yakin kalo kita bisa jadi orang hebat!.
23. Abdul Muis Squad, Andreas Sibuea S.Si, Davincent Andreas S.Si, Nelda Rosa Oktarida S.Si. Thankyou boy udah nemenin sampai akhir. See You In Another Milestone of Life!.
24. Kepengurusan HIMAKI FMIPA Unila periode 2018-2019, maaf belum bisa menjadi anggota dan pemimpin yang baik, terimakasih telah berjuang dan bekerja sama. Semoga lelah kita menjadi lillah.
25. Arjuna kost squad, bang Allan S.Ked, kak Adit S.Si, Hilmi, Iqbal, Deo, Thio, Panji dan Timotyus, atas bantuan dan motivasi selama kita tinggal bersama. Semoga Allah SWT. membalas kebaikan kalian semua.
26. Keluarga besar Kimia 2015, 2016, 2018, dan 2019 atas persaudaraannya selama ini.

27. Almamaterku tercinta serta semua pihak yang tidak bisa penulis sebutkan satu persatu, terimakasih atas segala bantuan dan motivasi sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini dan menyelesaikan studi sebagai mahasiswa S1 Kimia.

Akhir kata, Penulis memohon maaf kepada semua pihak apabila skripsi ini masih terdapat kesalahan dan kurang dari kesempurnaan. Penulis berharap semoga skripsi ini dapat berguna dan bermanfaat bagi kita semua.

Bandar Lampung, Agustus 2022

Penulis

M. Rizky Fadhilah

## DAFTAR ISI

<b>DAFTAR TABEL .....</b>	<b>xxi</b>
<b>DAFTAR GAMBAR.....</b>	<b>xxii</b>
<b>I. PENDAHULUAN .....</b>	<b>1</b>
1.1. Latar Belakang.....	1
1.2. Tujuan Penelitian .....	2
1.3. Manfaat Penelitian .....	3
1.4. Kerangka Teoritis .....	3
<b>II. TINJAUAN PUSTAKA.....</b>	<b>4</b>
2.1. Perairan Gorontalo .....	4
2.2. Spons.....	6
2.3. Fungi Endofit .....	8
2.4. Analisis DNA.....	9
2.5. Aspergillus .....	10
2.6. Kitosan .....	12
2.7. Ekstraksi Kitosan .....	14
2.8. Submerged Fermentation (SmF).....	15
2.9. Fourier Transform Infrared (FTIR).....	16
2.10. Elemental Analyzer.....	17
<b>III. METODE PENELITIAN.....</b>	<b>18</b>
3.1. Waktu dan Tempat.....	18
3.2. Alat dan Bahan.....	18

3.3. Prosedur Penelitian .....	19
3.3.1. Persiapan Media Malt Ekstrak.....	19
3.3.2. Biomaterial .....	19
3.3.3. Isolat Fungi .....	19
3.3.4. Analisis Filogenetik Isolat 19A15RF .....	20
3.3.5. Kultivasi Fungi Pada Media Malt Ekstrak.....	20
3.3.6. Ekstraksi Kitosan dari Fungi .....	21
3.3.7. Karakterisasi Kitosan Menggunakan FTIR .....	21
3.3.8. Elemental Analyzer (EA) .....	22
<b>IV. HASIL DAN PEMBAHASAN.....</b>	<b>23</b>
4.1. Biomaterial.....	23
4.2. Isolat Fungi .....	24
4.3. Analisis Filogenetik Isolat 19A15RF .....	25
4.4. Kultivasi Fungi .....	26
4.5. Ekstraksi Kitosan dari Fungi.....	27
4.6. Karakterisasi Kitosan Menggunakan FTIR .....	30
4.7. Elemental Analyzer (EA).....	33
<b>V. SIMPULAN DAN SARAN.....</b>	<b>36</b>
5.1. Simpulan .....	36
5.2. Saran .....	36
<b>DAFTAR PUSTAKA .....</b>	<b>37</b>
<b>LAMPIRAN.....</b>	<b>46</b>
1. Diagram Alir Penelitian .....	47
2. Perhitungan Derajat Deasetilasi Kitosan Fungi Hari 10 .....	48
3. Perhitungan Derajat Deasetilasi Kitosan Fungi Hari 14 .....	49
4. Perhitungan Derajat Deasetilasi Kitosan Fungi Hari 18 .....	50
5. Hasil Analisis Elemental.....	51



## DAFTAR TABEL

Tabel.....	Halaman
<b>Tabel 1.</b> Persen Rendemen Kitosan.....	28
<b>Tabel 2.</b> Bilangan Gelombang Kitosan .....	31
<b>Tabel 3.</b> Hasil Analisis Elemental Sampel Kitosan.....	34

## DAFTAR GAMBAR

Gambar.....	Halaman
<b>Gambar 1.</b> Teluk Tomini, Gorontalo (Rachma dan Windiastuti, 2020).....	5
<b>Gambar 2.</b> Struktur Morfologi Spons (Brusca and Brusca, 1990) .....	7
<b>Gambar 3.</b> Morfologi Aspergillus (Pitt dan Hocking, 1997).....	11
<b>Gambar 4.</b> Struktur Kitosan.....	13
<b>Gambar 5.</b> Spons 19A15-RF .....	23
<b>Gambar 6.</b> Proses Pertumbuhan Fungi 19A15-RF .....	24
<b>Gambar 7.</b> Identifikasi Fungi 19A15-RF menggunakan Mikroskop Perbesaran 400x .....	25
<b>Gambar 8.</b> Pohon Filogenetik Isolat 19A15-RF.....	26
<b>Gambar 9.</b> Kultivasi Fungi Pada Media Malt Ekstrak 19A15-RF pada : (a) 10 hari, (b) 14 hari dan (c) 18 hari .....	27
<b>Gambar 10.</b> Grafik Berat Kitosan yang Diperoleh.....	28
<b>Gambar 11.</b> Grafik Persen Rendemen Kitosan.....	29
<b>Gambar 12.</b> Spektrum FTIR Kitosan.....	30

## I. PENDAHULUAN

### 1.1. Latar Belakang

Belakangan ini kebutuhan kitosan sangat banyak diminati di berbagai industri. Salah satunya industri farmasi yang digunakan sebagai bahan dasar obat-obatan (Huang *et al.*, 2020). sumber komersial utama kitosan adalah cangkang kepiting dan udang (Pakizeh *et al.*, 2021). Menurut Ahmad *et al.*, (2020) lebih dari 100 gigaton kitosan diekstraksi dari bahan baku krustasea. Dalam memperoleh kitosan tersebut dilakukan isolasi menggunakan bahan-bahan kimia berkonsentrasi tinggi. Proses isolasi kitosan menggunakan bahan kimia konsentrasi tinggi memiliki dampak negatif, dimana limbah hasil pemakaian bahan kimia tersebut dapat merusak lingkungan (Yang *et al.*, 2020).

Untuk mengatasi itu hal itu, Muzarelli (2013) melakukan penelitian tentang kitosan yang berasal dari *fungi*, dan ini merupakan salah satu alternatif sebagai sumber kitosan. Tan *et al.*, (2020) melaporkan kitosan diperoleh dari fungi *Mucor circilloides* dengan derajat deasetilasi 60%. *Fungi* adalah kelompok organisme terbesar kedua di bumi dengan perkiraan jumlah lebih dari 500.000 spesies, dan lebih dari 70.000 spesies telah diketahui. Dinding sel fungi terdiri dari kitin, kitosan,  $\beta$ -glukan, dan mannan (Bělonožníková *et al.*, 2022). dinding sel fungi terdiri dari 22-44% kitin/kitosan (Ghormade *et al.*, 2017) sedangkan krustasea terdiri dari 15-40% kitin/kitosan (Hülsey, 2018). Sehingga *fungi* dapat digunakan sebagai sumber potensial untuk produksi kitosan.

Jenis *fungi* yang umum digunakan dalam produksi kitosan yaitu, *Allomyces*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Choanephora*, *Phycomyces*, *Zygorrhynchus*, dan *Thamnidium* (Hameed *et al.*, 2019). Pada tahun 2020 Tan *et al* mendapatkan kitosan dari *fungi* yang berasal dari *Mucor circinelloides* dengan derajat deasetilasi 60%. Beberapa penelitian telah menunjukkan bahwa berbagai strain *Mucor* (Bartnicki-Garcia dan Nickerson, 1962; White *et al.*, 1979), *Phycomyces* (Kreger, 1954), *Aspergillus* (Velichkov dan Sotirov, 1990) dan *Absidia* (Kobayashi *et al.*, 1988; McGahren *et al.*, 1984; Davoust dan Hansson, 1992) mengandung kitosan dalam jumlah yang signifikan.

Pada penelitian ini, *fungi* yang digunakan berasal dari sumber baru yang bersimbiosis dengan biota laut. diantaranya pada spons (Jeewon *et al.*, 2020). Kurun waktu ini, pemanfaatan *fungi* asosiasi spons dimanfaatkan dalam penemuan senyawa bioaktif, namun masih jarang ditemukan laporan mengenai pemanfaatan *fungi* dalam bidang biopolimer seperti sumber kitosan. Berdasarkan uraian diatas maka pada penelitian ini telah dilakukan ekstraksi kitosan yang berasal dari *fungi Aspergillus ochraceus* yang berasosiasi dengan spons yang diperoleh dari perairan Gorontalo, Indonesia, dengan metode kultivasi menggunakan media malt ekstrak secara *Submerged Fermentation* (SmF).

## **1.2. Tujuan Penelitian**

Adapun tujuan dari penelitian ini adalah sebagai berikut :

1. Memperoleh isolat *fungi* yang dapat menghasilkan kitosan
2. Memperoleh karakteristik kitosan yang diperoleh dari *fungi*

### 1.3. Manfaat Penelitian

Manfaat dari penelitian ini adalah untuk memberikan informasi mengenai fungsi penghasil kitosan untuk dapat dikembangkan dan dikaji sebagai bahan baku industri.

### 1.4. Kerangka Teoritis

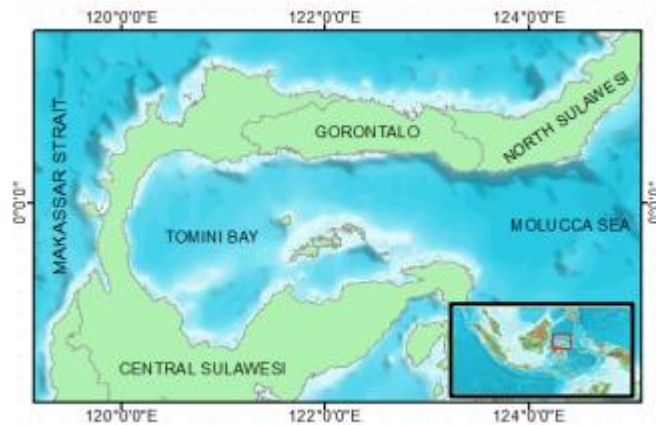
Fungi dilaporkan memiliki kandungan kitosan pada bagian dinding selnya (Ghormade *et al.*, 2017), dalam penelitian ini dilakukan ekstraksi kitosan dari fungi yang dikultur dalam media malt ekstrak secara *Submerged Fermentation* (SmF). Pembuatan media dilakukan dengan menambahkan 3 gr media malt ekstrak dan 0,6 gr TSB (*Tryptic Soy Broth*) dalam 100 ml air laut steril. Media dapat digunakan sebagai media peremajaan dan media kultivasi. Peremajaan fungi dilakukan pada suhu 27°C selama 14 hari, dan identifikasi fungi dilakukan menggunakan mikroskop Zeiss Axioo Imager A1 pada perbesaran 400x . Untuk memastikan jenis spesies *fungi* yang digunakan, dilakukan analisis DNA. Kultivasi pada media malt ekstrak dilakukan selama 10, 14, dan 18 hari.

Proses ekstraksi kitosan yang berasal dari fungi dimulai dengan cara penyaringan media kultivasi dan biomassa fungi. Biomassa fungi yang diperoleh kemudian ditambahkan NaOH untuk proses deasetilasi kitosan yang berada pada dinding sel *fungi* kemudian ditambahkan dengan CH<sub>3</sub>COOH 3% untuk melarutkan kitosan yang berada dalam dinding sel fungi dan diendapkan kembali menggunakan natrium hidroksida. Kitosan *fungi* yang mengendap kemudian dipisahkan dari NaOH, dan ditambahkan metanol untuk memisahkan senyawa organik lain yang terkandung dalam sampel kitosan. Kitosan yang diperoleh dilakukan karakterisasi gugus fungsi dan dihitung derajat deasetilasinya menggunakan *Fourier Transform Infrared* (FTIR) dan diukur kadar nitrogen dalam sampel menggunakan alat *Elemental Analysis* (EA)

## II. TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1. Perairan Gorontalo

Teluk Tomini, Gorontalo merupakan salah satu teluk besar di Indonesia dengan luas sekitar 59.500 km<sup>2</sup> dan memiliki panjang garis laut antara kedua muaranya lebih dari 24 mil. Teluk Tomini terletak di pulau Sulawesi dan secara administratif berada di wilayah tiga provinsi yaitu Gorontalo, Sulawesi Utara, dan Sulawesi Tengah. Sisi timur teluk Tomini terbuka dan berbatasan langsung dengan laut Maluku. Teluk tersebut merupakan bagian dari Wilayah Pengelolaan Perikanan (WPP) Teluk Tomini - Laut Maluku - Laut Seram. Perairan teluk Tomini adalah laut dalam (Oseanik) dengan kedalaman rata-rata >1500 m, berbentuk sebagai corong yang terbuka ke arah timur dan berhubungan langsung dengan Laut Maluku, Teluk Tolo dan Laut Sulawesi. Kondisi geografis demikian memberi konsekuensi terjadinya sirkulasi massa air diantara perairan di dalam teluk dengan perairan di sekitarnya. Perairan Teluk Tomini relatif subur dan kaya akan potensi alam laut. Letak teluk Tomini dan laut Maluku diilustrasikan pada **Gambar 1**.



**Gambar 1.** Teluk Tomini, Gorontalo (Rachma dan Windiastuti, 2020)

Keanekaragaman hayati di Teluk Tomini Gorontalo tidak ditunjukkan oleh pola yang spesifik. Banyak faktor yang memengaruhi keanekaragaman biota laut di Teluk Tomini, seperti habitat spesifik, endemisme, dan biogeografi. Hoeksema dan Putra (2002) menjelaskan bahwa karang jamur (*Fungiidae*) dan asosiasinya ditemukan lebih sedikit di Teluk Tomini dibandingkan perairan di pusat Indo Pasifik. Di daerah Sulawesi Utara dan Sulawesi Tengah ditemukan banyak karang jamur. Hal tersebut terjadi karena adanya variasi habitat seperti daerah yang terekspos turbulensi atau adukan air lebih kuat karena ombak atau arus. Dari penelitian Wallace *et al.*, (2000), di perairan teluk tomini ditemukan 78 jenis Acroporidae yang masuk kategori tinggi dan 28 jenis Fungiidae yang termasuk kategori sedang. Perairan Taman Nasional Kepulauan Togean termasuk ekoregion sebaran jenis karang wilayah Teluk Tomini, yang berjumlah mencapai 518 jenis dengan kisaran 501–550 jenis dan termasuk pusat segitiga keanekaragaman karang dunia (*coral triangle*) (Veron *et al.*, 2009; Veron *et al.*, 2015). Fauna di perairan Teluk Tomini lebih banyak dipengaruhi oleh Samudra Pasifik. Hal ini terbukti dari persentase jenis dari genus Acroporidae dan Fungiidae yang ditemukan, yakni 19,2% dan 10,7%. Famili Acroporidae dan Fungiidae ini berasal dari Samudra Pasifik (Wallace *et al.*, 2000)

## 2.2. Spons

Spons / porifera merupakan organisme berpori yang termasuk dalam jenis filter *feeder* (hewan penyaring), yaitu hewan yang mendapatkan sumber makanan dengan menyaring air laut melalui pori-pori (*ostium*). Sumber makanan dapat berupa mikroorganisme atau sisa organisme mati yang berada di dalam air. Selain sebagai makanan, mikroorganisme dapat menggunakan tubuh spons sebagai inang yang dijadikannya untuk hidup dan perlindungan (Abubakar dkk., 2011).

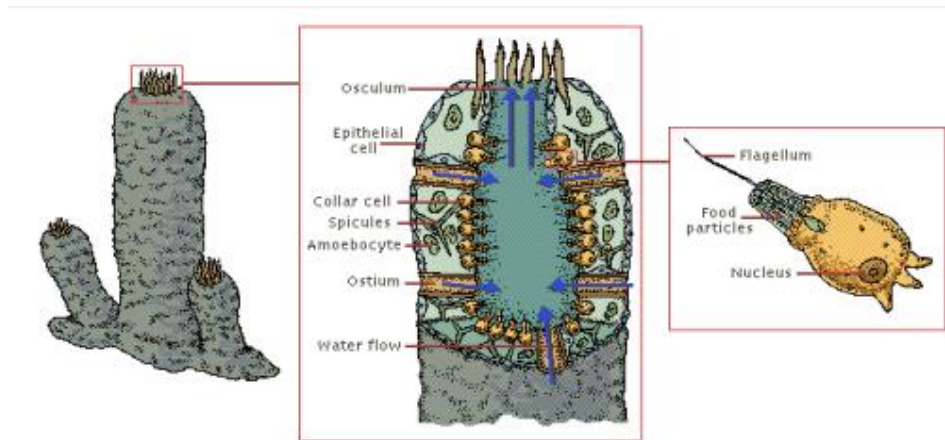
Perlindungan spons terhadap mikroorganisme dari predator dilakukan dengan menginduksi mikroorganisme tersebut untuk menghasilkan senyawa kimia berupa metabolit sekunder spesifik yang memiliki berbagai aktivitas biologis seperti antimikroba (Nofiani dkk., 2009). Spons yang memiliki kelimpahan mikroba tinggi dikenal dengan istilah "*High-Microbial- Abundance*" (HMA) sedangkan spons yang memiliki kelimpahan mikroba rendah disebut "*Low-Microbial-Abundance*" (LMA) (Hentschel *et al.*, 2006).

Spons (porifera) merupakan biota laut multi sel yang fungsi jaringan dan organnya sangat sederhana. Habitat spons umumnya adalah menempel pada pasir, batu-batuan dan karang-karang mati. Biota laut ini dikenal dengan "*filter feeders*", yaitu mencari makanan dengan mengisap dan menyaring air melalui sel cambuk dan memompakan air keluar melalui oskulum. Partikel-partikel makanan seperti bakteri, mikroalga dan detritus terbawa oleh aliran air ini (Amir, 1996). Habitat spons yang melekat pada pasir atau bebatuan menyebabkan hewan ini sulit untuk bergerak. Untuk mempertahankan diri dari serangan predator dan infeksi bakteri patogen, spons mengembangkan system "*biodefense*" yaitu dengan menghasilkan zat racun dari dalam tubuhnya, zat ini umumnya dapat dimanfaatkan sebagai bahan farmasi (Motomasa, 1998).

Spons adalah hewan metazoa multiseluler, yang tergolong ke dalam filum Porifera, yang memiliki perbedaan struktur dengan metazoan lainnya. Hal ini disebabkan



seluruh tubuh spons terbentuk dari sistem pori, saluran dan ruang-ruang, sehingga air dapat dengan mudah mengalir keluar dan masuk secara terus menerus (Kozloff, 1990).



**Gambar 2.** Struktur Morfologi Spons (Brusca and Brusca, 1990)

Hewan ini mencari makan dengan mengisap dan menyaring air yang melalui seluruh permukaan tubuhnya secara aktif (Romimohtarto dan Juwana, 1999).

Selama kurun waktu lebih dari 50 tahun, spons telah dianggap sebagai "tambang emas" berkaitan dengan keanekaragaman senyawa bioaktif yang dikandungnya. Aktivitas biologis dari senyawa-senyawa baru yang berhasil diisolasi dari spons telah dilaporkan dalam publikasi ilmiah. Spons memiliki potensi sebagai sumber bahan baku obat-obatan untuk mengatasi berbagai jenis penyakit, yaitu kanker, penyakit yang disebabkan oleh virus, malaria dan inflamasi (Sipkema *et al.*, 2005). Spons merupakan kontributor terbesar senyawa bioaktif dari laut jika dibandingkan dengan biota laut lainnya yaitu 37% , disusul coelenterata (21%), mikroorganisme (18%), algae (9%), echinodermata dan tunikata masing masing 6%, moluska (2%) dan bryozoan (1%) (Jha dan Zi-Rong, 2004).

Spons laut adalah hewan bentik yang ditemukan di berbagai lingkungan laut. Keanekaragaman spesies bunga karang lebih unggul di lingkungan terumbu karang tropis. Spons juga merupakan sumber daya yang sangat penting untuk pencarian zat aktif biologis, yang berguna untuk mengembangkan obat-obatan, agrokimia dan

reagen biokimia dan senyawa timbalnya. Asal-usul zat aktif biologis ini baru-baru ini dianggap sebagai metabolit yang dihasilkan oleh mikroorganisme yang terkait dengan spons. Dan penelitian juga menunjukkan bahwa beberapa senyawa bioaktif yang diisolasi dari organisme laut telah terbukti menunjukkan aktivitas anti kanker, anti mikroba, anti jamur atau anti inflamasi dan farmakologi lainnya. Invertebrata laut ini telah mengembangkan mekanisme pertahanan kimia terhadap organisme penyerang lainnya, yang melibatkan produksi metabolit sekunder. Spons adalah rumah yang baik tidak hanya untuk organisme makro, seperti cacing, bintang laut, udang, kepiting, dan lain lain. tetapi juga untuk berbagai mikroorganisme seperti bakteri, jamur, dan mikroalga yang hidup di kanal, di antara sel, dan bahkan di dalam sel (Meenupriya dan Thangaraj, 2011).

### **2.3. Fungi Endofit**

Sekitar 300.000 spesies tanaman diketahui merupakan inang endofit. Mikroba endofit dapat berupa bakteri atau jamur, tetapi saat ini yang lebih banyak dieksplorasi adalah jamur-jamur endofit. Jamur endofit merupakan mikroorganisme yang terdapat di dalam suatu sistem jaringan tumbuhan seperti biji, daun, bunga, ranting, batang dan akar. Berbagai senyawa fungsional dapat dihasilkan oleh jamur endofit. Senyawa yang dihasilkan jamur endofit tersebut dapat berupa senyawa anti kanker, antivirus, antibakteri, antifungi, hormon pertumbuhan tanaman, insektisida dan lain-lain (Strobel *et al.*, 2004). Selain itu, pencarian jamur endofit yang banyak terdapat pada tumbuhan dilakukan untuk menambah atau memperkaya koleksi mikroba. Selanjutnya mikroba tersebut perlu diidentifikasi untuk mengetahui sifat pertumbuhan dan jenisnya, sehingga lebih lanjut dapat dimanfaatkan di bidang kesehatan. Mengingat kebutuhan bahan baku obat yang semakin meningkat baik jumlah maupun macamnya maka potensi sumber daya alam Indonesia khususnya jamur endofit perlu digali dan dikembangkan (Noverita *et al.*, 2009).

Indonesia merupakan salah satu negara beriklim tropis yang memiliki kelembapan tinggi sehingga memungkinkan untuk tumbuhnya berbagai tanaman dan mikroorganisme dengan baik. Salah satu mikroorganisme yang dapat tumbuh dengan baik di Indonesia adalah *Fungi* (Arifin, 2006). *Fungi* merupakan organisme eukariotik, berspora, tidak berklorofil, bereproduksi secara seksual dan aseksual, *Fungi* berdasarkan ukuran tubuhnya ada yang makroskopis yaitu *Fungi* yang berukuran besar, sehingga dapat dilihat dengan mata telanjang dan ada juga *Fungi* yang mikroskopis yaitu *Fungi* yang berukuran kecil dan hanya dapat dilihat dengan menggunakan alat bantu mikroskop (Darwis dkk., 2011).

*Fungi* endofit adalah kelompok endosimbiotik *fungi* yang berkoloni pada tanaman dan hidup di dalam jaringan tanaman yang sehat tanpa menyebabkan penyakit pada tanaman tersebut. Dalam ekosistem alami, tanaman dan *fungi* endofit memiliki hubungan simbiosis yang saling menguntungkan. *Fungi* endofit memperoleh keuntungan dari tanaman dengan mendapat nutrisi untuk pertumbuhannya, sebaliknya endofit juga dapat memberi keuntungan pada tanaman inangnya dengan menghasilkan metabolit yang dapat merangsang pertumbuhan tanaman, meningkatkan kemampuan tanaman untuk beradaptasi dengan lingkungan dan mendaur ulang nutrisi (Sudha *et al.*, 2016). Beberapa endofit dapat memberikan perlindungan terhadap tanaman dari mikroba lain, serangga dan herbivora, meningkatkan pertumbuhan dan memungkinkan tanaman untuk menahan tekanan lingkungan seperti panas dan kekeringan (Strobel, 2018).

#### **2.4. Analisis DNA**

Metode ekstraksi DNA fase cair dan padat memiliki karakteristik yang berbeda dalam proses dan produk yang diperoleh. Metode ekstraksi DNA tersebut menentukan keberhasilan teknik deteksi molekuler yang meliputi Loop-Amplification Mediated Polymorphism (LAMP) dan Polymerase Chain Reaction (PCR). Dengan mengkarakterisasi metode ekstraksi DNA dan produknya, kita dapat memilih yang

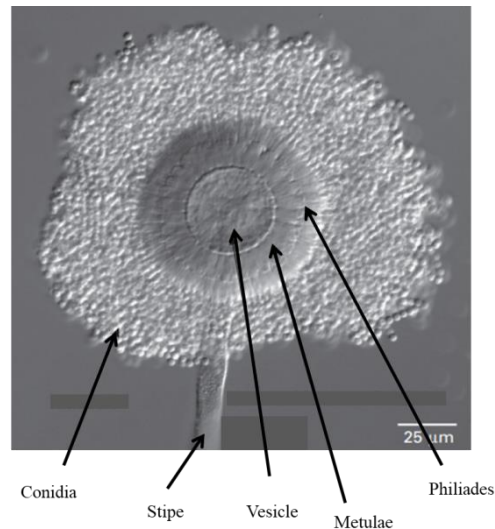
paling cocok untuk tujuan penelitian kita. Faktor-faktor yang harus dipertimbangkan ketika memilih metode ekstraksi asam nukleat untuk deteksi molekuler meliputi latar belakang sampel, lisis, bahan kimia preparasi yang sesuai, batas deteksi yang diperlukan, dan persyaratan untuk aplikasi tertentu. Dalam studi Asprevious, persiapan DNA/RNA untuk deteksi molekuler telah ditinjau yang melaporkan berbagai metode ekstraksi asam nukleat (Thatcher, 2015). Evaluasi metode ekstraksi DNA dan RNA juga dilaporkan. Ini menunjukkan perbandingan beberapa metode ekstraksi (Sambrook *et al.*, 1989). Tahapan metode tersebut antara lain ekstraksi, pemisahan, pemurnian, dan pemekatan DNA. Penelitian ini bertujuan untuk melaporkan karakter metode dan produk ekstraksi DNA fenol kloroform sebagai metode ekstraksi fase cair dan ekstraksi DNA Sure food Kit sebagai metode ekstraksi fase padat (Hutami dkk., 2017).

Analisis DNA adalah suatu analisis secara kualitatif dan kuantitatif berdasarkan ada atau tidaknya suatu pita DNA secara visual dan secara kuantitatif yaitu menghitung panjang pita DNA dalam bp yang menunjukkan DNA telah teramplifikasi. Analisis DNA diperlukan adanya pemurnian (Ekstraksi DNA) dan proses penggandaan atau perbanyakannya (amplifikasi) menggunakan alat PCR (Skutkova *et al.*, 2019). Banyaknya laporan fokus pada penggunaan teknik molekuler atau metode tradisional taksonomi untuk identifikasi keragaman mikroba dari lingkungan laut (Singh *et al.*, 2012) dan (Klindworth *et al.*, 2014).

## **2.5. Aspergillus**

*Aspergillus* termasuk dalam divisi *Eumycophyta*, kelas *Ascomycetes* dan ordo *Aspergillales*. Memiliki familia *Aspergillaceae*, genus *Aspergillus* dan spesies *Aspergillus sp.* *Aspergillus* adalah jamur yang membentuk filamen-filamen panjang bercabang, dan dalam media biakan membentuk miselia dan konidiospora. Ciri *Aspergillus sp* adalah mempunyai hifa berseptat dan miselium bercabang, sedangkan hifa yang muncul diatas permukaan merupakan hifa fertile, koloninya berkelompok,

konidiospora berseptat atau non septat, pada ujung hifa muncul sebuah gelembung, keluar dari gelembung ini berupa sterigma. Pada sterigma muncul konidium-konidium berwarna yang memberi warna pada jamur seperti hitam, coklat, kuning tua dan hijau (Vennewald dan Wollina, 2005).



**Gambar 3.** Morfologi *Aspergillus* (Pitt dan Hocking, 1997)

*Aspergillus* adalah salah satu genus dari *Hyphomycetes*. Memiliki struktur yang khas: konidiofor memiliki hifa berdinding tebal yang besar dan sel apikal yang berbentuk bulat yang disebut 'vesikel'. Sel-sel yang terbentuk dari, *phialides*, atau *metulae* dan *phialides*, diproduksi dari vesikel. Produksi simultan dari deretan sel yang mengandung spora ini membedakan *Aspergillus* dari *Penicillium*, karena produksi *phialide* di *Penicillium* dan genera terkait selalu berurutan, tidak simultan (Pitt dan Hocking, 1997).

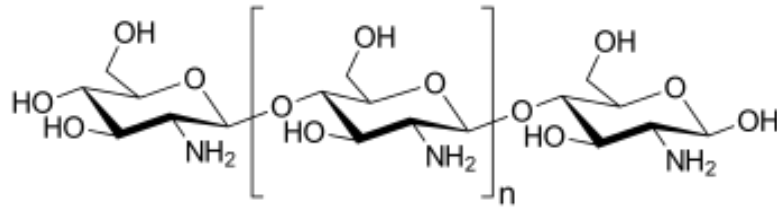
*Aspergillus* adalah spesies yang telah menyebar luas, karena spora jamur yang mudah disebarkan oleh angin. *Aspergillus* merupakan jamur yang mampu hidup pada medium dengan derajat keasaman dan kandungan gula yang tinggi. *Aspergillus* ada yang bersifat parasit, ada pula yang bersifat saprofit. *Aspergillus* yang bersifat parasit menyebabkan penyakit *Aspergillosis*. *Aspergillus sp.* sering ditemukan pada bahan

pakan yang disimpan di dalam gudang dengan kelembaban tinggi. *Aspergillus sp.* dianggap patogen karena dapat menyebabkan suatu penyakit saluran pernafasan, radang granulomatosis pada selaput lendir, mata, telinga, kulit, meningen, bronchus dan paru-paru (Hayani *et al.*, 2017). *Aspergillus* merupakan mikroorganisme eukariot, saat ini diakui sebagai salah satu diantara beberapa makhluk hidup yang memiliki daerah penyebaran paling luas serta berlimpah di alam, selain itu jenis kapang ini juga merupakan kontaminan umum pada berbagai substrat di daerah tropis maupun subtropis (Mizana *et al.*, 2016). *Aspergillus* adalah genus besar jamur anamorphic. *Aspergillus* dibagi menjadi delapan belas kelompok yaitu, *Aspergillus clavatus*, *Aspergillus glaucus*, *Aspergillus ornatus*, *Aspergillus cervinus*, *Aspergillus restrictus*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus ochraceous*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus candidus*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus goii*, *Aspergillus cremeus*, *Aspergillus sparsus*, *Aspergillus versicolor*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus ustus*, *Aspergillus flavipes* dan *Aspergillus terreus* (Afzal *et al.*, 2013).

## 2.6. Kitosan

Kitosan merupakan polimer karbohidrat alami yang diturunkan dari kitin dan ditemukan dalam jumlah besar pada krustasea, *Fungi*, serangga dan beberapa algae (Hussain *et al.*, 2014). Kitosan digunakan dalam aplikasi yang sangat luas, yaitu industri farmasi, biokimia, bioteknologi, kosmetik, biomedis, industri kertas, serta industri tekstil dan makanan (Muzzarelli, 1985). Salah satu cara alternatif yang dapat digunakan untuk meningkatkan kualitas kitosan adalah dengan impregnasi kitosan dengan material lain. Beberapa material yang dapat digunakan untuk memodifikasi kitosan yaitu alumina dan bentonite (Farhana, 2011).

Kitosan adalah senyawa polimer alam turunan kitin yang diisolasi dari limbah perikanan, seperti kulit udang dan cangkang kepiting dengan kandungan kitin antara 65-70 persen.



**Gambar 4.** Struktur Kitosan.

Sumber bahan baku kitosan yang lain di antaranya kalajengking, *fungi*, cumi, gurita, serangga, laba - laba dan ulat sutera dengan kandungan kitin antara 5-45 persen. Kitosan merupakan bahan kimia multiguna berbentuk serat dan merupakan kopolimer berbentuk lembaran tipis, berwarna putih atau kuning, tidak berbau. Kitosan merupakan produk deasetilasi kitin melalui proses kimia menggunakan basa natrium hidroksida atau proses enzimatik menggunakan enzim kitin deasetilase. Serat ini bersifat tidak dicerna dan tidak diserap tubuh. Sifat menonjol kitosan adalah kemampuan mengabsorpsi lemak hingga 4-5 kali beratnya (Rismana, 2006).

Penggunaan kitosan dikembangkan karena sifat kitosan yang merupakan suatu biopolimer organik memiliki sifat non-toksik, *biodegradable* dan hidrofilik. Kitosan terdiri dari gugus fungsi amina dan hidroksil (Abdullah *et al.*, 2017). Sintesis kitosan diperoleh dari cangkang hewan seperti udang, kepiting dan lobster. Kitosan semakin menarik dikembangkan karena ukuran partikelnya dapat dibuat nano dan luas permukaannya kecil sehingga mudah untuk dimodifikasi dengan material kimia lainnya (Zhan *et al.*, 2014).

Kitosan dapat diubah dari kitin melalui proses deasetilasi dengan beberapa cara seperti kimiawi, dengan cairan alkali pekat atau cara biologis. Deasetilasi kimiawi selalu membutuhkan basa berkonsentrasi tinggi, suhu tinggi dan durasi lama. Kekurangan ini menyebabkan efek buruk tidak hanya pada sifat kitosan tetapi juga pada lingkungan. Oleh karena itu, banyak teknologi baru telah diterapkan untuk memenuhi harapan inovasi pada deasetilasi kimia konvensional dalam hal

pengurangan bahan kimia, daya, serta waktu pemrosesan. Misalnya, siklus *freeze – pump out – thaw*, iradiasi gamma, gelombang mikro dan ultrasound telah digunakan sebagai cara baru untuk deasetilasi kitin (Mahdy *et al.*, 2013).

Kitosan diproduksi secara komersial dari udang dan kitin cangkang kepiting. dideasetilasi oleh alkali kuat pada suhu tinggi untuk jangka waktu yang lama (Knorr, 1991). Namun, persediaan bahan baku musiman dan prosesnya melelahkan dan mahal. Lebih lanjut, kitosan yang diperoleh dari proses tersebut bersifat heterogen dalam hal sifat fisiokimianya (Crestini *et al.*, 1996). Kemajuan terbaru dalam teknologi fermentasi menunjukkan bahwa budidaya jamur terpilih dapat memberikan alternatif sumber kitosan. Dinding sel jamur dan septa *Ascomycetes*, *Zygomycetes*, *Basidiomycetes* dan *Deuteromycetes* terutama mengandung kitin, yang bertanggung jawab untuk mempertahankan bentuk, kekuatan dan integritas struktur sel (Ruiz-Herrera *et al.* 1992; Hon 1996). Mikroorganisme ini dapat dengan mudah dibiakkan dalam nutrisi sederhana dan kitosan dinding sel dengan mudah dipulihkan (White *et al.*, 1979; McGahren *et al.*, 1984; Shimahara *et al.*, 1989; Synowiecki dan Al-Khateeb 1997; Yokoi *et al.*, 1998).

## **2.7. Ekstraksi Kitosan**

Ekstraksi kitosan dilakukan dengan beberapa metode seperti deproteinase, demineralisasi, depigmentasi dan deasetilasi. Deproteinase merupakan proses penghilangan protein dari kitin dengan menggunakan larutan NaOH 3,5% dipanaskan selama dua jam pada suhu 65°C disaring dan dinetralkan hingga pH ±7.

Demineralisasi merupakan proses penghilangan mineral dari sampel dengan menggunakan HCl 1,25 N dengan perbandingan 1:10 (w/v). dipanaskan selama satu jam pada suhu 90°C. Depigmentasi bertujuan untuk menghilangkan zat warna yang terdapat pada sampel. Proses depigmentasi dilakukan menggunakan aseton dengan perbandingan 1:15 (w/v) secara sokletasi hingga warna pigmen dari sampel hilang. Kemudian sampel diputihkan dengan NaOCl 0,5% selama 10 menit pada suhu kamar



(Hendri dkk., 2005). Selanjutnya, serbuk udang diisolasi dengan cara deasetilasi agar menghasilkan kitosan. Deasetilasi merupakan prose penghilangan gugus asetil dari kitin dengan melarutkan kitin dalam 60% larutan NaOH kemudian disaring dan dinetralkan hingga pH  $\pm 7$  dan dikeringkan dalam oven selama 24 jam (Hendri dkk., 2007)

## **2.8. Submerged Fermentation (SmF)**

*Submerged Fermentation* telah didefinisikan sebagai budidaya mikroorganisme dalam media cair (Singhania *et al.*, 2010). Pada *submerged fermentation*, mikroorganisme ditumbuhkan pada substrat yang larut (xylan, pektin, mannan) atau tidak larut (dedak gandum, dedak padi, jerami gandum) yang dilarutkan atau direndam dalam media cair. SmF sangat penting selama beberapa tahun terakhir untuk produksi enzim dan metabolit sekunder pada skala industri karena kontrol yang ketat pada parameter fermentasi, produktivitas yang konsisten, dan pengolahan yang mudah (Vaidyanathan *et al.*, 1999). *Batch*, *continuous*, dan *fed-batch* adalah metode utama dalam proses SmF. Modus *batch* mewakili fermentasi larutan nutrisi yang disterilkan dalam wadah tertutup oleh kultur mikroba yang diinginkan. Keuntungan dari proses tersebut adalah biaya yang rendah dan peralatan sederhana untuk kontrol proses. Namun, produktivitas rendah dan penghambatan balik adalah kelemahan utama. Mode kontinu melibatkan sistem bioreaktor yang sangat produktif dan diatur dengan ketat (chemostat atau turbidostat) di mana substrat steril dan komponen media lainnya diumpankan pada tingkat tertentu, dan jumlah produk yang setara dipanen dengan cara yang bergantung pada waktu. Fermentasi *fed-batch* ditandai dengan pemberian pakan intermiten dan pemeliharaan konsentrasi optimum substrat pertumbuhan yang dibutuhkan dengan pemanenan produk secara terus menerus (Lim dan Shin, 2013).

## 2.9. Fourier Transform Infrared (FTIR)

Identifikasi pita absorpsi khas yang disebabkan oleh berbagai gugus fungsi merupakan dasar penafsiran spektrum inframerah. Hadirnya sebuah puncak serapan dalam daerah gugus fungsi dalam sebuah spektrum inframerah hampir selalu merupakan petunjuk pasti bahwa beberapa gugus fungsi tertentu terdapat dalam senyawa cuplikan. Demikian pula, tidak adanya puncak dalam bagian tertentu dari daerah gugus fungsi sebuah spektrum inframerah biasanya berarti bahwa gugus tersebut yang menyerap pada daerah itu tidak ada (Pine, 1980). Asam karboksilat mempunyai dua karakteristik absorpsi IR yang membuat senyawa  $-CO_2H$  dapat diidentifikasi dengan mudah. Ikatan O-H dari golongan karboksilat diabsorpsi pada daerah 2500 sampai 3300  $cm^{-1}$ , dan ikatan C=O yang ditunjukkan diabsorpsi di antara 1710 sampai 1750  $cm^{-1}$  (McMurry, 2007).

Spektrofotometer inframerah merupakan instrumen yang digunakan untuk mengukur resapan radiasi inframerah pada berbagai panjang gelombang (Fessenden, 1982). Radiasi inframerah terletak pada spektrum elektromagnetik antara daerah visibel dan daerah *microwave* (gelombang mikro). Penggunaannya paling banyak untuk kimia organik pada batas panjang gelombang antara 4000 dan 400  $cm^{-1}$ . Spektrum vibrasi tampak berupa pita. Ada dua tipe vibrasi molekuler yaitu *stretching* dan *bending*. Hanya vibrasi yang menghasilkan perubahan secara ritmik pada momen dipol yang diobservasi dalam IR (Silverstein, 2005).

Spektrum sampel kitosan (dalam bentuk cakram KBr dan film) diperoleh dengan menggunakan alat IR. Instrumen dengan rentang frekuensi 4000-400  $cm^{-1}$ . Derajat deasetilasi (DD) sampel kitosan dihitung menggunakan baseline yang diusulkan oleh Domszy dan Roberts. Persamaan perhitungan untuk dua garis dasar diberikan di bawah ini:

$$DD = 100 - [(A_{1655} / A_{3450}) \times 100 / 1.33]$$

di mana A1655 dan A3450 adalah absorbansi pada pita amida-I  $1655\text{ cm}^{-1}$  sebagai ukuran kandungan gugus N-asetil dan pita hidroksil  $3450\text{ cm}^{-1}$  sebagai standar internal untuk mengoreksi ketebalan film atau untuk perbedaan dalam bentuk bubuk konsentrasi kitosan. Faktor '1,33' menunjukkan nilai rasio A1655 /A3450 untuk kitosan N-asetilasi penuh. Diasumsikan bahwa nilai rasio ini adalah nol untuk kitosan terdeasetilasi penuh dan ada hubungan bujursangkar antara kandungan gugus N-asetil dan absorbansi pita amida-I (Domszy and Roberts, 1985)

## 2.10. Elemental Analyzer

*Elemental Analyzer* adalah metode utama untuk memperoleh informasi mengenai ikatan karbon. Teknik ini tidak memberikan rincian tentang gugus fungsi tapi memberikan informasi tentang komponen heteroatom dan dapat memberikan informasi struktur kimia. Ada dua jenis analisis unsur yaitu organik dan anorganik. Analisa unsur organik dilakukan dengan pembakaran analisis dan umumnya unsur yang terdeteksi adalah karbon, hidrogen, nitrogen, sulfur, dan oksigen serta perbedaannya. Analisa unsur anorganik menghasilkan informasi tentang bahan anorganik (kandungan abu dalam karbon, didukung proses katalis) dan dapat dilakukan dengan berbagai teknik seperti X-ray, elektron atau spektroskopi massa (Bandosz, 2009).

Karakterisasi menggunakan CHNS *Elemental Analyzer* bertujuan untuk mengetahui kandungan unsur Karbon (C), Hidrogen (H), Nitrogen (N), dan Sulfur (S) yang terkandung dalam material tersebut. CHNS *Elemental Analyzer* berprinsip pada pembakaran (*Dynamic Combustion*) dengan suhu tinggi diatas  $1000\text{ }^{\circ}\text{C}$  untuk mengkonversi jenis unsur C, H, N, dan S menjadi produk pembakarannya (unsur C menjadi karbon dioksida; unsur H menjadi air; unsur N menjadi gas nitrogen; dan unsur S menjadi sulfur dioksida), produk berupa gas yang dihasilkan akan dideteksi menggunakan sebuah kolom GC hingga hasil analisis ditangkap oleh detektor (Thompson, 2008).

### III. METODE PENELITIAN

#### 3.1. Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Mei 2021 sampai Mei 2022 di Laboratorium Biopolimer Fakultas MIPA, Universitas Lampung. Karakterisasi FTIR (*Fourier Transform Infrared*), Ekstraksi DNA, PCR dan elektroforesis dilakukan di Unit Pelaksana Teknis Laboratorium Terpadu dan Sentra Inovasi (UPT LTSIT) Universitas Lampung. Analisis Elemental dilakukan di Laboratorium Pengelolaan Limbah Agroindustri, Fakultas Pertanian, Universitas Lampung. Sequencing dilakukan di PT. Genetika Science Indonesia.

#### 3.2. Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini adalah alat-alat gelas yang umum digunakan cawan petri *normax*, tabung reaksi *iwaki*, erlenmeyer *iwaki*, kapas, kasa *onemed*, karet gelang, tisu, pinset, jarum ose, lampu spirtus, mikropipet *biohit*, neraca analitik Kern 440-47N, oven *jisico*, *hot plate stirrer* Thermolyne, *laminar air flow*, inkubator Kaltis 499, *autoclave* Tomy SX-700, *centrifuge* Hitachi CF 16RX II, mikroskop Zeiss axio A1, FTIR (*Fourier Transform Infrared*) Cary 630 (Agilent, Santa Clara, CA, United States) dan *Elemental Analyzer* (Vario Micro Cube, Germany).

Bahan-bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah aquades, bubuk agar *swallow*, malt ekstrak *merck*, TSB (*Tryptic Soy Broth*) *merck*, air laut buatan, metanol teknis, Asam asetat teknis dan Natrium hidroksida teknis.

### **3.3. Prosedur Penelitian**

#### **3.3.1. Persiapan Media Malt Ekstrak**

Media kultivasi yang digunakan adalah malt ekstrak. Metode yang dilakukan mengacu dengan metode yang digunakan oleh Nguyen dkk, (2020) dengan sedikit dilakukan modifikasi. Media dibuat dengan melarutkan 3 g ekstrak malt, 0,6 g TSB (*Tryptic Soy Broth*) dalam 100 mL air laut steril menggunakan labu Erlenmeyer. Setelah itu labu disterilkan dalam autoklaf pada 15 psi (121°C) selama 20 menit.

#### **3.3.2. Biomaterial**

Pada penelitian ini sampel spons diperoleh dari perairan Teluk Tomini, Gorontalo. Pengambilan spons dilakukan secara acak dengan teknik *scuba diving* pada kedalaman 5-30 meter pada bulan September 2019, oleh tim Peneliti Universitas Osaka dan Universitas Lampung dan sudah menjadi deposit UPT LTSIT Universitas Lampung.

#### **3.3.3. Isolat Fungi**

Peremajaan *fungi* dilakukan mengacu pada Barwant and Lavhate (2020) dengan sedikit modifikasi. *Fungi* diremajakan pada media malt ekstrak agar pada suhu 27°C selama 14 hari. Identifikasi fungi dilakukan menggunakan mikroskop Zeiss Axioo Imager A1 pada perbesaran 100-400 M, menggunakan metode cover slip 45°.

### 3.3.4. Analisis Filogenetik Isolat 19A15RF

Urutan DNA diekstraksi berdasarkan urutan *DNEasy Plant Mini Kit* (cat. No. 69104), Qiagen, Hilden, Jerman. Urutan ITS rDNA PCR diselesaikan menggunakan *Sensoquest Sensodirect Thermocycler* dari Gottingen, Jerman. PCR dilakukan menggunakan *forward primer*: 5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3' dan *reverse primer*: 5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3' (White *et al.*, 1990). yang diperkuat 561 bp, digunakan. Reaksi PCR diselesaikan menggunakan *2G Fast Ready Mix Kit* (cat. No. KK5102, Merck, Taufkirchen, Jerman). Reaksi PCR diselesaikan pada volume total 25  $\mu$ L, yang mengandung 10  $\mu$ L template DNA (50 ng/L), 12,5  $\mu$ L *2G Fast Ready Mix*, 1,5  $\mu$ L air bebas RNase, 0,5  $\mu$ L forward primer, dan 0,5 L reverse primer.

Amplifikasi diselesaikan dalam 35 siklus sebagai berikut: denaturasi selama 60 detik pada suhu 95<sup>o</sup>C, annealing primer selama 60 detik pada suhu 54<sup>o</sup>C, dan polimerisasi selama 120 detik pada suhu 72<sup>o</sup>C. Lekukan dideteksi dengan instrumen *Qiaxcel Advanced* (Qiagen, Hilden, Jerman) sesuai protokol, kemudian diurutkan menggunakan metode Sanger. Hasil sekuensing dianalisis secara filogenetik menggunakan software Mega versi 11.

### 3.3.5. Kultivasi Fungi Pada Media Malt Ekstrak

Pada proses persiapan inokulum, disiapkan indukan isolat fungi yang telah dikultivasi selama 7-14 hari. Sebanyak 1 mL suspensi spora jamur diinokulasi ke dalam masing-masing erlenmeyer berisi media malt ekstrak dan campurannya dikocok perlahan untuk menahan spora jamur di dalam air. Sebanyak 100 mL inokulum ditambahkan ke media malt ekstrak besar sebanyak 400 mL. kemudian ditempatkan di inkubator untuk difermentasi pada suhu 30<sup>o</sup>C, selama 10, 14, dan 18 hari (Tan *et al.*, 2020).

### 3.3.6. Ekstraksi Kitosan dari Fungi

Miselium jamur ditambahkan dengan NaOH 1N dengan perbandingan 1:40 w/v dari berat kering miselium, kemudian disterilkan pada suhu 121°C selama 20 menit. Komponen yang tidak larut dipisahkan dengan sentrifuge pada 6000 rpm selama 20 menit kemudian dicuci berulang kali dengan akuades sampai netral (pH 7). Endapan yang diperoleh dikeringkan dalam oven pada suhu 40°C, kemudian ditambahkan asam asetat 3% dengan perbandingan 1:40 w/v (Hameed *et al.*, 2019)

Fraksi tidak larut asam diendapkan pada 6000 rpm selama 15-20 menit dan supernatan yang mengandung kitosan diisolasi. Kitosan diendapkan dengan warna bening kekuningan, pH diatur dengan NaOH 2N, kemudian kitosan yang terflokulasi disentrifugasi dengan kecepatan 6000 rpm, selama 15 menit. Kitosan hasil isolasi dicuci empat sampai lima kali dengan air suling untuk menetralkan dan 96% metanol digunakan untuk membilas kitosan dan dikeringkan pada suhu 60° C (Kanimozhi *et al.*, 2014).

### 3.3.7. Karakterisasi Kitosan Menggunakan FTIR

Kitosan yang diperoleh dari hasil fermentasi fungi dikarakterisasi menggunakan FTIR (Fourier Transform Infrared) untuk mengidentifikasi gugus fungsi dan menentukan derajat deasetilasi. Scanning dilakukan pada daerah frekuensi antara 4000 cm<sup>-1</sup> sampai dengan 400cm<sup>-1</sup>. Penentuan derajat deasetilasi dengan spektroskopi IR dilakukan dengan metode base line Domszy & Robert (Khan dkk., 2002) dengan mencatat puncak tertinggi dan mengukur pita dasar yang dipilih. Rumus untuk perhitungan base line adalah :

$$\%DD = 100 - \left[ \left( \frac{A_{1655}}{A_{3450}} \right) \times \frac{100}{1,33} \right]$$

(Khan et al, 2002).

Dengan :

DD: Derajat Deasetilasi, A1655 : Absorbansi pada bilangan gelombang 1655 cm<sup>-1</sup> yang menunjukkan serapan karbonil dari amida. A3450 : Absorbansi bilangan gelombang 3450 cm<sup>-1</sup> yang menunjukkan serapan hidroksil dan digunakan sebagai standar internal. Faktor 1,33 : Nilai perbandingan  $\frac{A_{1655}}{A_{3450}}$  untuk kitosan yang terdeasetilasi 100%.

### 3.3.8. Elemental Analyzer (EA)

Elemental Analyzer digunakan untuk menentukan rasio karbon atau nitrogen kitosan jamur yang diekstraksi. Sebanyak 5 mg setiap sampel ditambahkan ke *tin foil*, yang dilipat menjadi *pellet* dan dimuat ke dalam korsel sampel. Sampel kemudian dimasukkan ke dalam instrumen, di mana pembakaran tabung katalitik terjadi dalam atmosfer CO<sub>2</sub> bersuhu tinggi yang teroksigenasi. Komponen karbon dan nitrogen dibawa oleh helium melalui kolom adsorpsi khusus untuk memisahkannya, setelah itu konsentrasi masing-masing ditentukan menggunakan detektor konduktivitas termal. (Tan *et al.*, 2020)

(DIAGRAM ALIR PENELITIAN DAPAT DILIHAT DI LAMPIRAN)



## V. SIMPULAN DAN SARAN

### 5.1. Simpulan

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, diperoleh simpulan sebagai berikut :

1. Isolat 19A15-RF dapat menghasilkan kitosan menggunakan media malt ekstrak
2. Isolat 19A15-RF terindikasi genus *Aspergillus* dengan spesies *Aspergillus ochraceus*
3. Derajat deasetilasi Kitosan isolat 19A15-RF pada media Malt Ekstrak pada hari ke 10, 14, dan 18 secara berurutan diperoleh sebesar 65,85%, 65,15%, dan 76,1%
4. Kadar nitrogen Kitosan Isolat 19A15-RF pada media Malt Ekstrak pada hari ke 10,14 dan 18 secara berurutan diperoleh sebesar 0,78%, 1,26%, dan 0,37%

### 5.2. Saran

Berdasarkan penelitian yang diperoleh, penulis memberikan beberapa saran untuk penelitian selanjutnya yaitu, Perlu dilakukan analisis termal kitosan menggunakan DSC, TGA dan DTA, yang bertujuan untuk memperoleh derajat deasetilasi kitosan dan untuk karakterisasi termal material kitosan. Perlu dilakukan Skrining aktivitas Antibakteri kitosan yang diperoleh dan Menentukan aktivitas Antioksidan. Perlu dilakukan optimalisasi parameter fisik isolat *fungi* untuk produksi kitosan (pH dan Temperatur Inkubasi). Perlu dilakukan kultivasi *fungi* pada media padat (*Solid State Fermentation*)

## DAFTAR PUSTAKA

- Abdel-Gawad, K. M., Hifney, A. F., Fawzy, M. A., & Gomaa, M. 2017. Technology optimization of chitosan production from *Aspergillus niger* biomass and its functional activities. *Food Hydrocolloids*. 63, 593-601.
- Abdullah O.G, Hanna R.R, Salman Y.A.K . 2017. Structural, optical, and electrical characterization of chitosan: methylcellulose polymer blends based film. *J. Mater. Sci. Mater. Electron*. 28(14) 10283–10294.
- Abubakar, H., Wahyudi, A. T., dan Yuhana, M. 2011. *Skrining Bakteri yang Berasosiasi dengan Spons Jaspis sp. Sebagai Penghasil Senyawa Antimikroba*. Ilmu Kelautan. Jakarta.
- Afzal, H., S.Shazad, S.Qamar, and U.Nisa. 2013. Morphological Identification Of *Aspergillus* Species From The Soil Of Larkana District (Sindh, Pakistan). *Asian J Agri Biol*. 1(3), pp. 105–117.
- Ahmad, A., Mubharak, N.M., Naseem, K., Tabassum, H., Rizwan, M., Najda, A., Kashif, M., Jumah, M. J., Hussain, A., Shaheen, A., Abdel Daim, M. M., Ali, S., Hussain, S. 2020. Recent advancement and development of chitin and chitosan-based nanocomposite for drug delivery: Critical approach to clinical research. *Arabian Journal of Chemistry*. Vol. 13, 8935-8964.
- Amir, I. 1996. Mengenal Spons Laut (Demospongiae) Secara Umum. *Oseana*. XXI (2) : 15-31
- Arifin, Z. 2006. *Kajian Mikoriza Vesikula Arbuskula (MVA) dalam menekan perkembangan Penyakit Bercak Ungu (Alternaria porri) pada Bawang Putih (Disertasi)*. Universitas Gadjah Mada. Yogyakarta.
- Bandosz, T.J. 2009. Surface Chemistry of Carbon Materials. In Carbon Materials for Catalysis. *Serp, P., & Figueiredo, J.L. (Eds.)*. pp. (58-78), Wiley, ISBN 978-0-470-17885-0.
- Bartnicki-Garcia, S., and W. J. Nickerson. 1962. Nutrition, growth and morphogenesis of *Mucor rouxii*. *J. Bacteriol*. 84:841-858.

- Barwant, M. and Lavhate N. 2020. Isolation and Maintenance of Fungal Pathogens *Aspergillus niger* and *Aspergillus flavus*. *International Journal of Applied and Natural Sciences*. Vol. 9, 47–52.
- Bělonožníková, K., Hýsková, V., Chmelík, J., Kavan, D., Čeřovská, N., & Ryšlavá, H. 2022. *Pythium oligandrum* in plant protection and growth promotion: Secretion of hydrolytic enzymes, elicitors and tryptamine as auxin precursor. *Microbiological Research*. 126976.
- Brusca, R. C. dan Brusca, G. J. 1990. *Invertebrates*. Massachusetts; Sinauer Associates, Inc. Publishers. Sunderland.
- Chatterjee, S.; Guha, A. A. 2014. Study on biochemical changes during cultivation of *Rhizopus oryzae* in deproteinized whey medium in relation to chitosan production. *Lett. Appl. Microbiol.* 59, 155–160.
- Crestini, C., Kovac, B. and Giovannozzi-Sermanni, G. 1996. Production and isolation of chitosan by submerged and solid-state fermentation from *Lentinus edodes*. *Biotechnology Bioengineering*. 50, 207–210
- Darwis, W., Desnalianif., & Supriati, R. 2011. Inventarisasi Jamur yang Dapat Dikonsumsi dan Beracun yang Terdapat di Hutan dan Sekitar Desa Tanjung Kemuning Kaur Bengkulu. *Jurnal Konservasi Hayati*. 07(02), 1-8.
- Davoust, N., and G. Hansson. 1992. Identifying the conditions for development of beneficial mycelium morphology for chitosanproducing *Absidia* spp. in submerged cultures. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 36:618-620.
- Domszy, J.G. and Roberts, G.A.F. 1985. Evaluation of infrared spectroscopic techniques for analyzing chitosan. *Makromol Chem.* 186:1671-1677.
- Farhana, N. 2011. *Chitosan-Bentonite Composite for the Removal of Tartrazine, Malachite Green and Copper (II) from Aqueous Solution*, Thesis. Universiti Sains Malaysia. Pulau Penang.
- Fessenden, R.J. and Fessenden, J.S.,1982. *Kimia Organik, diterjemahkan oleh. Pudjaatmaka, A. H., Edisi Ketiga, Jilid 1*. Erlangga. Jakarta.
- Geiser, D. M.. 1994. Cryptic speciation and recombination in the aflatoxin producing fungus *Aspergillus flavus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95: 388-393.
- Ghormade, V., Pathan, E. K., & Deshpande, M. V. 2017. Can fungi compete with marine sources for chitosan production?. *International Journal of Biological Macromolecules*. 104, 1415–1421.

- Hameed, A.J. Aya, A.A. Zaid, A.T. 2019. Chitosan Production from *Aspergillus oryzae* SU-B2 by Submerged Fermentation and Studying some of its Physiochemical and Actibacterial Characteristics. *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*. Vol. 11 (2), 609-613.
- Hendri J. 2005. *Teknik Pengolahan Limbah Kulit Dan Kepala Udang Suatu Seri Monograf Permasalahan Dan Pengelolaan Lingkungan Hidup Provinsi Lampung*. Pusat Penelitian Lingkungan Lembaga Penelitian Universitas Lampung. Lampung.
- Hendri, J., Indriani, D., Laila, A., dan Suka, I. G. 2007. Pembuatan Asetilglukosamin Secara Enzimatik Dari Kulit Udang dan Kepiting. *Jurnal Ilmiah MIPA (JIM)*. 10 (2).
- Hendri, J., Wardana., Laila, A., Ginting, I. S. 2007. Penentuan Kadar Ca Dan Mg Pada Hasil Demineralisasi Optimum Kulit Udang Windu Gravimetri Dan Spektroskopi Serapan Atom. *Jurnal Sains MIPA*. 13 (2).
- Hentschel, U., Usher, K. M., and Taylor, M. W. 2006. Minireview: marine sponss as microbial fermenters. *FEMS Microbiol Ecol*. 55: 167–177.
- Hoeksema, B. W., & Putra, K. S. 2002. The reef coral fauna of Bali in the centre of marine diversity. Dalam M. K. Moosa dkk. (Ed.). *Proceedings of the 9th International Coral Reef Symposium*. 1, 173– 178.
- Hon, D.N.S. 1996. *Chitin and chitosan: Medical applications*. In *Polysaccharides in Medicinal Application ed. Dumitri, S.* Marcel Dekker Inc. New York.
- Huang. T.W., Ho. Y.C., Tsai. T.N., Tseng. C.L., Lin. C., Mi. F.L. 2020. Enhancement of the permeability and activities of epigallocatechin gallate by quaternary ammonium chitosan/fucoidan nanoparticles. *Carbohydr. Polym.*, 116312.
- Hülsey, M.J. 2018. Shell biorefinery: A comprehensive introduction. *Green Energy Environ*. 3; 318–327
- Hussain, M.R., Murshid I., and Tarun K. M. 2014. Determination of Degree of Deacetylation of Chitosan and their Effect on the Release Behaviour of Essential Oil from Chitosan and Chitosan-Gelatin Complex Microcapsules. *Rev. Tec. Ing. Univ. Zulia.*, Vol. 37 (2), 69-77.

- Hayani, N., Erina., Darniati. 2017. Isolasi *Aspergillus Sp* Pada Paru-Paru Ayam Kampung (*Gallus Domesticus*). *Jurnal Ilmiah Mahasiswa Veteriner*. 1(4), pp. 637–643.
- Hutami, R., Idzni, N., Ranasasmita, R., and Suprayatmi, M. 2017. DNA Extraction Method for Molecular Detection. *Jurnal Pertanian*. 8(2): 106-112.
- Jeewon, R., A.B. Luckhun., V. Bhoyroo., N.B. Sadeer., M.F. Mahomoodally., S. Rampadarath., D. Puchooa., V.V. Sarma., S.S.K. Durairajan., K.D. Hyde. 2020. Pharmaceutical Potential of Marine Fungal Endophytes S. Jha (Ed.), *Endophytes and Secondary Metabolites, Reference Series in Phytochemistry. Springer International Publishing*. 6-1.
- Jha, R.K. and Zi-Rong, X. 2004. Biomedical compounds from marine organisms. *Mar. Drugs*. 2: 123-146.
- Kanimozhi, S., Ramya, D., and Menaga Gandhi. M.R. 2014. Production and Optimization of Chitosan from *Aspergillus niger* by Solid State and Submerged Fermentation and Evaluation of its Antibacterial and Antioxidant activity. *Drug Invention Today*. 6(2),141-148.
- Kannan, M., Nesakumari, M., Rajarathinam, K., & Singh, A. J. A. R. 2010. Production and characterization of mushroom chitosan under solid-state fermentation conditions. *Advances in Biological Research*, 4(1), 10-13.
- Khan, T.A., Peh, K.K., dan Chang, H.S. 2002. Reporting Degree of Deacetylation Values of Chitosan; The Influence of Analytical Methods. *J. Pharm. Sci* Vol 5(3): 205-212.
- Klindworth A., Mann, A.J., Huang, S., Wichels, A., Quast, C., Waldmann, J., Teeling, H., and Glockner, F.O. 2014. Diversity and Activity of Marine Bacterioplankton during a diatom bloom in the North Sea assessed by total RNA and pyrotag sequencing. *Mar Genom*. 18:185-192.
- Knorr, D. 1991. Recovery and utilization of chitin and chitosan in food processing waste management. *Food Technology*. 26, 114–122.
- Kobayashi, T., Y. Takiguchi, K. Shimahara and T. Sannan. 1988. Distribution of chitosan in *Absidia* strains and some properties of the chitosan isolated. *Nippon Nogeikagaku Kaishi*. 62:1463-1469.
- Kozloff, E. N. 1990. *Invertebrates*. Saunders College Publishing. Philadelphia.

- Kreger, D.R. 1954. Observations on cell walls of yeasts and some other fungi by X-ray diffraction and solubility tests. *Biochem. Biophys. Acta* 13: 1-9.
- Krishnaveni, B. and Ragunathan, R. 2015. Extraction and characterization of Chitin and Chitosan from *Aspergillus terreus* sps, synthesis of their bionanocomposites and study of their productive applications. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*. 7(2):115-132.
- Lim, H.C and Shin, H.S., 2013. *Fed-batch Cultures: Principles and Applications of Semi-batch Bioreactors*. Cambridge University Press. Cambridge.
- Mahdy M.S., M.H. El-Kalyoubi, M.M. Khalaf, M.M. Abd El-Razik. 2013. Physicochemical, functional, antioxidant and antibacterial properties of chitosan extracted from shrimp wastes by microwave technique. *Annals of Agricultural Sciences*. 58(1) 33-41.
- Meenupriya, J. and Thangaraj, M. 2011. Analytical characterization and structure elucidation of metabolites from *Aspergillus ochraceus* MP2 fungi. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. : 376-380.
- McGahren, W.J., G.A. Perkinson, J.A. Growich, R.A. Leese and G.A. Ellestad. 1984. Chitosan by fermentation. *Process Biochem*. 19: 88-90.
- McMurry, J.E. 2007. *Fundamentals of General, Organic, and Biological Chemistry (5th edition)*. Prentice Hall. California.
- Mizana, D. K., Suharti, N. and Amir, A. 2016. dentifikasi Pertumbuhan Jamur *Aspergillus Sp* pada Roti Tawar yang Dijual di Kota Padang Berdasarkan Suhu dan Lama Penyimpanan. *Jurnal Fakultas Kedokteran Unand*. 5(2), pp. 355–360.
- Motomasa, K. 1998. *Search for Biologically Active Substances from Marine Sponss. In: Prosiding Seminar Bioteknologi I (R. R. eds.)*. Puslit Oseanologi LIPI. Jakarta
- Muzzarelli. 1985. *Studies on The Suitable of Chitinocistic Microorganism for Shrimp Waste Fermentation, Dissertation*. University of Washington. New York.
- Muzzarelli. R.A.A., Ravi Kumar. M.N.V., Muzzarelli. C., Sashiwa. H., Domb. A.J. 2013. Chitosan Chemistry and Pharmaceutical Perspectives. *Chemical Reviews*. Vol. 104, No 12.

- Nguyen, T M., and Ranamukhaarachchi, S. L. 2020. Effect of Different Culture Media, Grain Sources and Alternate Substrates on the Mycelial Growth of *Pleurotus eryngii* and *Pleurotus ostreatus*. *Pakistan Journal of Biological Sciences*. 23, (3): 223-230.
- Nofiani, R., Nurbetty, S., dan Sapar, A. 2009. *Aktifitas Antimikroba Ekstrak Metanol Bakteri Berasosiasi Spons Dari Pulau Lemukutan Kalimantan Barat*. Universitas Tanjung Pura. Pontianak.
- Noverita, D. Fitria dan E. Sinaga. 2009. Isolasi dan uji aktivitas antibakteri jamur endofit dari daun rimpang *Zingiber ottensiin Val*. *Jurnal Farmasi Indonesia*. 4(4): 171-176.
- Nwe N, Chandkrachang S, Stevens W F, Maw T, Tan T K, Khor E and Xong S M 2002 Production of fungal chitosan by solid state and submerged fermentation. *Carbohydr. Polym.* 49 235–7.
- Nwe, N., Tamura, H., & Furuike, T. 2010. *Production of fungal chitosan by enzymatic method and applications in plant tissue culture and tissue engineering: 11 years of our progress, present situation and future prospects*. In Elnashar M. (Ed.), *Biopolymers*. InTech Publisher. Shanghai:
- Pakizeh, M., Moradi, A., & Ghassemi, T. 2021. Chemical extraction and modification of chitin and chitosan from shrimp shells. *European Polymer Journal*. 159.
- Patria, A. 2013. Production and characterization of Chitosan from shrimp shells waste. *Aquac. Aquar. Conserv. Legis. Int. J. Bioflux Soc.* 6, 339–344.
- Pine, H, Stanley. 1980. *Organic Chemistry. Fourth edition*. McGraw-Hill. New York.
- Pitt, J. I., & Hocking, A. D. 1997. *Aspergillus and related teleomorphs, In Fungi and food spoilage*. Springer. Boston.
- Rachma, T. R.N. and Windiastuti, R. 2020. Spatial Study of Indonesia's Historic Bay: A Case Study in Tomini Bay . *IOP Conf. Ser.: Earth Environ. Sci.* 618.
- Rismana. 2006. *Serat Kitosan Mengikat Lemak*. Pusat P2 Teknologi farmasi dan medika, BPTT. Jakarta.
- Rinaudo, Marguerite. 2006. "Chitin and chitosan: Properties and applications". *Polymer Science*; 31: 603-632.
- Romimohtarto, K. dan Juwana, S. 1999. *Biologi Laut, Ilmu Pengetahuan tentang Biota Laut*. Pusat Penelitian dan Pengembangan Oseanologi LIPI. Jakarta.

- Ruiz-Herrera, J., Sentandreu, R.R. and Martinez, J.P. 1992. Chitin biosynthesis in fungi. In *Handbook of Applied Mycology*. Vol. 4.
- Sambrook, J., Fritsch, F., Miniatis, T. 1989. *Molecular Cloning Laboratory Manual 3rd Edition*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York.
- Shimahara, K., Takiguchi, Y., Kobayashi, T., Uda, K. and Sannan, T. 1989. Screening of mucoraceae strains suitable for chitosan production. In *Chitin and Chitosan* ed. *Elsevier Applied Science*. pp. 171–178.
- Silverstein, Robert M. 2005. *Spectrometric Identification of Organics Compounds*. John Wiley & Sons, Inc. New Jersey.
- Singh, P., Raghu, K.C., Verma, P. and Shouce, Y. 2012. Assessment of Fungal diversity in deep-sea sediments by multiple primer approach. *World J Microbiol Biotechnol*. 28:659-667.
- Singhania, R.R., Sukumaran, R.K., Patel, A.K., Larroche, C. and Pandey, A. 2010. Advancement and comparative profiles in the production technologies using solid-state and submerged fermentation for microbial cellulases. *Enzyme and Microbial Technology*. 46 (7), 541–549.
- Sipkema, D., Franssen, M.C.R., Osinga, R., Tramper, J., and Wijffels, R.H. 2005. Marine Spons as Pharmacy. *Marine Biotechnology*. 7: 142-162.
- Sivashankari, P. R. and Prabakaran, M. 2017. Deacetylation modification techniques of chitin and chitosan. *Chitosan Based Biomaterials*. Volume 1, 117–133.
- Skutkova, H., Martin, V., Matej, B., Eva, B., and Martina L. 2019. Advanced DNA fingerprint genotyping based on a model developed from real chip electrophoresis data. *Journal of Advanced Research*. 18:9-18.
- Strobel, G., Daisy, B., Castillo, U. and Harper, J. 2004. Natural Products from endophytic microorganisms. *Journal of Natural Products*. 67. 2. 257-268.
- Strobel, G.A. 2018. Fungal Endophytes in Plants. *Journal of Fungi*. 242.
- Sudha, V., Govindaraj, R., Baskar, K., Al-Dhabi, N.A., Duraypandian, V. 2016. Biological Properties of Endophytic Fungi. *Braz. Arch. Biol. Technol*. v.59.
- Synowiecki, J. and Al-Khateeb, N.A. 1997. Mycelia of *Mucor rouxii* as a source of chitin and chitosan. *Food Chemistry*. 60, 605–610.
- Thatcher, S. A. 2015. DNA/RNA preparation for molecular detection. *Clin Chem*. 61: 89-99.



- Tan, Y.N., Lee, P.P., Chen, W.N. 2020. Dual Extraction of Crustacean and Fungal Chitosan from a Single *Mucor circinelloides* Fermentation. *Fermentation*. 6,40.
- Thompson, R. 2008. *Industrial Inorganic Chemicals: Production and Uses*. Royal Society Chemistry. London.
- Tolesa, L.D., Gupta, B.S., Lee, M.J., 2019. Chitin and chitosan production from shrimp shells using ammonium-based ionic liquids. *Int. J. Biol. Macromol.* 130, 818–826.
- Vaidyanathan, S., Macaloney, G., Vaughan, J., McNeil, B., Harvey, L.M., 1999. Monitoring of submerged bioprocesses. *Critical Reviews in Biotechnology*. 19 (4), 277–316.
- Van der Molen, K.M., Raja, H.A., El- Elimat, T., Oberlies, N.H., 2013. Evaluation of culture media for the production of secondary metabolites in a natural products screening program. *AMB Express*. 3, 71.
- Velichkov, A. and N. Sotirov. 1990. Amino acid content in four samples of chitosan-glucan complex. *Dokl. Bolg. Akad. Nauk.* 43:69-71.
- Vennewald I, Wollina U. 2005. Cutaneous Infections due to Opportunistic Molds : Uncommon Presentations – Otomycosis. *Clinics in Dermatology*. 23: 565-71.
- Veron, J. E. N., De Vantier., L. M., Turak, E., Green., A. L., Kininmonth., S., Stafford-Smith, M. & Peterson, N. 2009. Delineating the coral triangle. *Galaxea. Journal of Coral Reef Studies*. 11, 91–100.
- Veron, J. E. N., Stafford-Smith, M., De Vantier, L. M., & Turak, E. 2015. Overview of Distribution Pattern of Zooxanthellate Scleractinia. *Frontier in Marine Science*. 1: 1–19.
- Wallace, C., Paula, G., Bert, W. H., Bellwood, D. R., Hutchings, P. A., Barber, P. H., Erdmann, M., & Wolstenholme, J. 2000. Nature and origins of unique high diversity reef faunas in The Bay of Tomini, Central Sulawesi: The ultimate centre of diversity. Dalam M. K. Moosa dkk. (Ed.). *Proceedings of the 9th International Coral Reef Symposium*. Vol. 1 : 185–192.
- White, S.A., P.F. Farina and I. Pulton. 1979. Production and isolation of chitosan from *Mucor rouxii*. *Appl. Environ. Microbiol.* 38: 323- 328.

- White, T.F., Bruns, T., Lee, S., Taylor, J., 1990. *Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics*. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky FS, White TT (eds) *PCR Protocols: a guide to methods and applications*. Academic Press. San Diego.
- Yokoi, H., Aratake, T., Nishio, S., Hirose, J., Hayashi, S. and Takasaki, Y. 1998. Chitosan production from Shochu distillery wastewater by funguses. *Journal of Fermentation and Bioengineering*. 85, 246–249.
- Zhan, W., Zhang, J., Xia, W. 2014. Effect of ball milling treatment on physicochemical and structural properties of chitosan. *International Journal of Food Properties*. 26-37.