

**BIOTRANSFORMASI KULIT UDANG MENJADI
CHITOLIGOSACCHARIDE (COS) OLEH FUNGI LAUT DAN UJI
BIOAKTIVITAS SEBAGAI ANTIMIKROBA**

(Skripsi)

Oleh

**MUHAMMAD IRFAN HANAFI
NPM 2017011076**



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

ABSTRAK

BIOTRANSFORMASI KULIT UDANG MENJADI *CHITOLIGOSACCHARIDE* (COS) OLEH FUNGI LAUT DAN UJI BIOAKTIVITAS SEBAGAI ANTIMIKROBA

Oleh:

Muhammad Irfan Hanafi

Crustasea merupakan sumber kitin yang sangat melimpah. Melalui proses fermentasi, kitin diubah menjadi produk turunannya, yaitu *Chitooligosaccharide* (COS), yang memanfaatkan bahan baku dari limbah kulit udang dan mikroorganisme dekomposer seperti fungi.

Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi dan mengkarakterisasi produk biodegradasi kitin dari kulit udang melalui proses fermentasi padat menggunakan fungi. Isolasi COS dilakukan menggunakan isolat fungi (18A12RF, 19A15RF, 20BA0502RF, 20CD01RF, 21RSM02 dan 22PLP1F1) yang diperoleh dari deposit Unit Pelaksanaan Teknis Laboratorium Terpadu Sentra Inovasi dan Teknologi (UPT LTSIT) sebagai agen pendegradasi melalui proses kultivasi secara *Solid State fermentation* (SSF) selama 4 hari. Produk biodegradasi oligomer diekstraksi menggunakan air panas, dan diisolasi melalui beberapa tahap kromatografi serta dianalisis menggunakan FTIR dan LC-MS/MS. Produk biodegradasi ini diuji bioaktivitas terhadap bakteri patogen resisten seperti *Staphylococcus aureus*, dan *Pseudomonas aeruginosa*, dan fungi *Malassezia globosa*.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa isolat fungi efektif sebagai agen pendegradasi kulit udang. Isolat fungi 18A12RF terbukti menjadi isolat unggul dalam mendegradasi kulit udang menjadi COS pada hari ke-4, dibuktikan dengan uji KLT. Analisis morfologi menunjukkan isolat 18A12RF merupakan fungi *Aspergillus* sp. COS yang dihasilkan dari degradasi oleh isolat 18A12RF mampu menghambat pertumbuhan mikroba patogen pada dosis 2 mg/mL. Karakterisasi produk hasil degradasi menggunakan FTIR dan LC-MS/MS mengindikasikan bahwa COS memiliki derajat polimerisasi (DP) sebesar 7.

Kata kunci: antimikroba, *chitooligosaccharide*, enzim kitinase, isolat fungi, kulit udang

ABSTRACT

BIOTRANSFORMATION OF SHRIMP SHELL INTO *CHITOLIGOSACCHARIDE* (COS) BY MARINE FUNGI AND BIOACTIVITY ASSAY AS ANTIMICROBIAL

By

Muhammad Irfan Hanafi

Crustaceans are a highly abundant source of chitin. Through the fermentation process, chitin is converted into its derivative product, Chitooligosaccharide (COS), utilizing raw materials from shrimp shell waste and decomposer microorganisms such as fungi.

This study aims to isolate and characterize the biodegradation products of chitin from shrimp shells through Solid State Fermentation using fungi. COS isolation was carried out using fungal isolates (18A12RF, 19A15RF, 20BA0502RF, 20CD01RF, 22RSM02 and 22PLP1F1) obtained from the Integrated Laboratory Technical Implementation Unit Center for Innovation and Technology (UPT LTSIT) as degrading agents through Solid State Fermentation (SSF) cultivation for 4 days. The oligomer biodegradation products were extracted using hot water, isolated through several stages of chromatography, and analyzed using FTIR and LC-MS/MS. The biodegradation products were tested for bioactivity against resistant pathogenic bacteria such as *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, and the fungus *Malassezia globosa*.

The results showed that the fungal isolates were effective as shrimp shell degrading agents. The fungal isolate 18A12RF proved to be the superior isolate in degrading shrimp shells into COS on the 4 days, as evidenced by the TLC test. Morphological analysis indicated that the 18A12RF isolate is the fungus *Aspergillus* sp. The COS produced from the degradation by the 18A12RF isolate was able to inhibit the growth of pathogenic microbes at a dose of 2 mg/mL. Characterization of the degradation products using FTIR and LC-MS/MS indicated that COS has a degree of polymerization (DP) of 7.

Keywords: antimicrobial, chitooligosaccharide, chitinase enzyme, fungal isolates, shrimp shells.

**BIOTRANSFORMASI KULIT UDANG MENJADI
CHITOLIGOSACCHARIDE (COS) OLEH FUNGI LAUT DAN UJI
BIOAKTIVITAS SEBAGAI ANTIMIKROBA**

Oleh

Muhammad Irfan Hanafi

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
2024**

Judul : BIOTRANSFORMASI KULIT UDANG
MENJADI *CHITOO*LIGOSACCHARIDE
(COS) OLEH FUNGI LAUT DAN UJI
BIOAKTIVITAS SEBAGAI ANTIMIKROBA

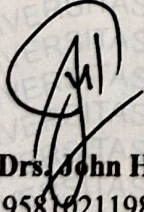
Nama : Muhammad Irfan Hanafi

Nomor Pokok Mahasisswa : 2017011076

Jurusan : Kimia

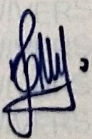
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam




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


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

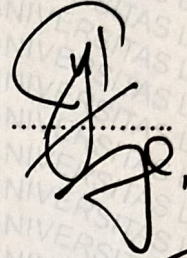
2. Ketua Jurusan Kimia FMIPA Universitas Lampung


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

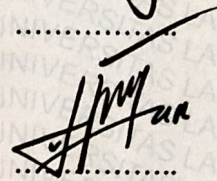
MENGESAHKAN

1. Tim Penguji

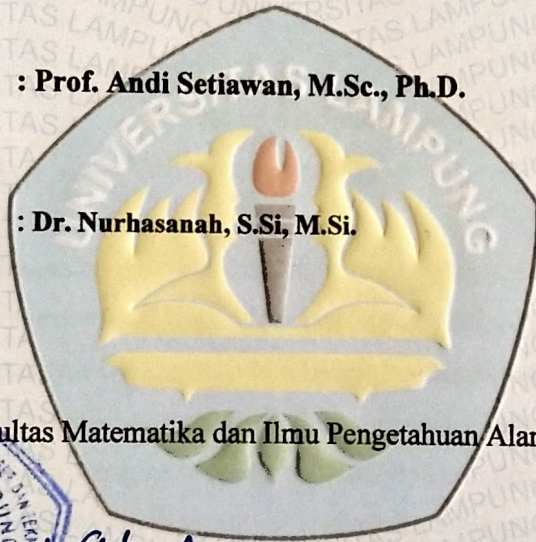
Ketua : Prof. Drs. John Hendri, M.S., Ph.D.



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



Anggota : Dr. Nurhasanah, S.Si, M.Si.



2. Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam



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

Tanggal Lulus Ujian Skripsi : 07 Agustus 2024

**SURAT PERNYATAAN
KEASLIAN SKRIPSI**

Yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Muhammad Irfan Hanafi
NPM : 2017011076
Jurusan : Kimia
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Perguruan Tinggi : Universitas Lampung

Menyatakan dengan sebenar-benarnya dan sesungguhnya, bahwa skripsi saya berjudul **“Biotransformasi Kulit Udang menjadi *Chitooligosaccharide* (COS) oleh Fungi Laut dan Uji Bioaktivitas sebagai Antimikroba”** adalah benar karya saya sendiri, baik gagasan, hasil, dan analisisnya. 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, 07 Agustus 2024
Yang Menyatakan,



Muhammad Irfan Hanafi
NPM. 2017011076

RIWAYAT HIDUP



Muhammad Irfan Hanafi lahir di Rantau Fajar, Raman Utara, Lampung Timur pada 30 Oktober 2001. Penulis adalah anak terakhir dari dua bersaudara yang berasal dari orang tua yang sangat luar biasa, yaitu pasangan Abi Suyono dan Ibu Rusmini.

Penulis menyelesaikan pendidikan TK-PKK pada tahun 2007, kemudian melanjutkan pendidikan Sekolah Dasar di SDN 1 Rantau Fajar dan lulus pada tahun 2013. Melanjutkan pendidikan tingkat menengah pada tahun 2013-2016 di MTS Nurul Huda, Lampung Tengah dan SMA di Kotagajah pada tahun 2016-2019.

Penulis diterima sebagai mahasiswa Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam (FMIPA), Universitas Lampung (Unila) melalui jalur Seleksi Bersama Masuk Perguruan Tinggi Negeri (SBMPTN) pada tahun 2020. Selama menjadi mahasiswa, penulis aktif dalam Unit Kegiatan Mahasiswa (UKM) Bulutangkis.

Penulis melaksanakan Kuliah Kerja Nyata (KKN) Periode I tahun 2023 selama 40 hari pada bulan Januari-Februari 2023 di Pekon Tanjung Anom, Tanggamus, Lampung. Pada bulan Juli-Agustus 2023, penulis melaksanakan Praktik Kerja Lapangan (PKL) di Laboratorium Biomasa UPT LTSIT dan Laboratorium Biopolimer, Universitas Lampung dengan judul “Isolasi dan Karakterisasi Kitosan dari Limbah Kulit Udang dengan Penambahan NaBH_4 dalam Proses Deasetilasi”. Pada bulan Januari-Juli 2024, penulis menyelesaikan penelitian yang dilakukan di Laboratorium Biomasa UPT-LTSIT dan Laboratorium Biopolimer,

Universitas Lampung dengan judul “**Biotransformasi Kulit Udang menjadi *Chitooligosaccharide* (COS) oleh Fungi Laut dan Uji Bioaktivitas sebagai Antimikroba**”.

PERSEMBAHAN

Alhamdulillah rabbil 'alamin, puji syukur kehadiran Allah SWT atas segala limpahan rahmat dan karunia-Nya, dengan penuh rasa syukur dan segala kerendahan hati, ku mempersembahkan skripsi ini sebagai wujud bakti dan tanggung jawabku kepada:

Kedua Orang Tuaku Tercinta Abi dan Ibu yang senantiasa memberi dukungan dan kasih sayangnnya kepadaku, serta doa yang dihaturkan untuk mengiringi setiap langkahku. Semoga Allah SWT hadiahkan Jannah-Nya, Aamiin yaa Robbal'alamin.

Kakakku, Irmaya Nurrohmah yang telah mendoakan dan memberikan dukungan dalam segala hal. Semoga Allah SWT senantiasa melimpahkan keberkahan dan kebahagiaan ditengah keluarga ini.

Pembimbing penelitianku, Bapak Prof. John Hendri, Ph.D., dan Bapak Prof. Andi Setiawan, Ph.D., serta seluruh Dosen Jurusan Kimia yang telah membimbing, mendidik, dan memberikan banyak ilmu kepada penulis selama menjalani proses pendidikan sarjana.

Dan untuk;

Almamater yang tercinta, Universitas Lampung

MOTTO

*“Cukuplah Allah menjadi penolong
dan sebaik-baik pelindung”*

~ Q.S Ali Imran : 173 ~

“Sesungguhnya Beserta kesulitan ada kemudahan”

~ Q.S al-Insyirah : 94 ~

*“Kamu Tidak Perlu Terlihat Baik Dimata Manusia,
Tetapi Kamu Wajib Baik Dimata Tuhan”*

~ Habib Ja'far ~

“Hidup adalah perjalanan, Nikmatilah setiap langkahnya”

~ Afi ~

Life is Simple

If You want to be Happy, Try only to please God, not people.

~ Leo Tolstoy ~

*“Manusia membuatmu sakit, Allah mengajarkanmu bangkit.
Manusia memberimu luka, namun Allah menghadiahkanmu
bahagia”*

~ Anonim ~

SANWACANA

Alhamdulillah *rabbil' alamin*, Puji syukur kehadiran Allah SWT atas limpahan rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan penulisan skripsi ini. Shalawat serta salam selalu tercurah kepada Baginda Nabi Muhammad SAW, semoga kita mendapat syafa'at-Nya di *yaumul akhir* nanti, *aamiin yarabbal' alamin*. Skripsi ini berjudul “**Biotransformasi Kulit Udang menjadi Chitooligosaccharide (COS) oleh Fungi Laut dan Uji Bioaktivitas sebagai Antimikroba**”, yang merupakan salah satu syarat untuk memperoleh gelar sarjana Sains (S.Si.) pada Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Lampung.

Penyusunan skripsi ini tidak terlepas dari bimbingan, bantuan, saran, kritik, dan doa dari berbagai pihak. Oleh karena itu, sebagai wujud rasa hormat, penulis mengucapkan banyak terima kasih kepada:

1. Kedua orang tua, Abi Suyono dan Ibu Rusmini yang telah memberikan kasih sayang, doanya, dan materi tanpa henti selama masa studi penulis, serta menjadi motivasi sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini dengan baik, semoga Allah SWT selalu memberikan kesehatan kepada mereka.
2. Bapak Prof. John Hendri, Ph.D., selaku Dosen Pembimbing 1, atas segala bimbingan, dukungan, motivasi, waktu, arahan dan kesabarannya yang diberikan kepada penulis sehingga dapat dengan lancar dalam menyelesaikan penelitian dan skripsi ini.
3. Bapak Prof. Andi Setiawan, Ph.D., selaku Dosen Pembimbing 2, yang juga telah memberikan masukan dan saran yang sangat berharga dalam penyempurnaan skripsi ini.

4. Ibu Dr. Nurhasanah, S.Si., M.Si., selaku Dosen Pembahas yang telah memberikan ilmu, arahan, kritik, dan saran kepada penulis sehingga skripsi ini dapat terselesaikan dengan baik dan lancar.
5. Bapak Dr. Eng. Heri Satria, S.Si., M.Si., selaku Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam (FMIPA), Universitas Lampung.
6. Ibu Dr. Mita Rilyanti, M.Si., selaku Ketua Jurusan Kimia FMIPA Unila, yang telah memberikan kesempatan dan fasilitas dalam penyusunan skripsi ini.
7. Ibu Dr. Dian Herasari, M.Si., selaku Sekretaris Jurusan Kimia FMIPA Unila.
8. Ibu Rinawati, Ph.D., selaku Dosen Pembimbing Akademik, atas segala bimbingan dan masukan yang telah diberikan kepada penulis selama perkuliahan di Jurusan Kimia FMIPA Universitas Lampung.
9. Bapak Ibu Dosen Jurusan Kimia FMIPA Unila atas segala ilmu yang telah diberikan kepada penulis.
10. Staff, laboran, dan karyawan Jurusan Kimia FMIPA Universitas Lampung yang telah memberikan bantuan kepada penulis.
11. Kakak penulis, Irmaya Nurrohmah yang senantiasa mendengarkan keluh kesah penulis, memberikan nasihat, doa dan dukungan untuk penulis, sehingga kuat dalam menjalani perkuliahan ini.
12. Kak Fendi, terima kasih atas bimbingan, ilmu, motivasi, kritik, dan saran yang telah diberikan kepada penulis, sehingga penulis dapat menyelesaikan penelitian dan skripsi ini dengan lancar. Penulis mendoakan yang terbaik untuk kakak dan selalu diberi ketabahan menjalani hidup.
13. Saudara terbaik (Semprul Tenan), Yu Dwi, Irmaya Nurrohmah, Lutvia Nurrohmah, Galih Aji Pangestu, dan Navelia Muazahra, yang telah memberikan dukungan, doa dan warna dalam hidup penulis.
14. Intan Aldara atas ketersediaannya memberikan bantuan dan dukungan dalam penyusunan skripsi ini kepada penulis, sehingga dapat terselesaikan dengan baik.
15. Siti Salwa Khotijah, atas ketersediaannya dalam memberikan bantuan dan dukungannya terhadap penyusunan skripsi penulis serta ketersediaannya membagikan akun elseviernya untuk mengakses jurnal yang terkait.

16. JH Research, Kak Fendi, Mba Laras, Alda, Ester, dan Jordy, sebagai rekan seperbimbingan dan seperjuangan dalam penelitian, yang telah banyak membantu, memberikan dukungan, serta bekerja sama dengan penulis, sehingga penelitian dan skripsi ini dapat diselesaikan dengan baik.
17. Keluarga besar bani Ngadiran, yang senantiasa mendoakan dan memberikan dukungan kepada penulis.
18. Fitriana Artika Sari dan Amelia Mareta yang telah memberikan dukungan kepada penulis.
19. Teman-teman dan Kakak-kakak Laboratorium Biomass UPT LTSIT, Mbak Rosyi, Kak Ridho, Carlos, Yasmin, Laura, Kak Ibnu, Fyra, Risdiana, Olivia, Riyadi, dan Febrina, atas segala bantuan dan kerjasama selama penelitian.
20. Anak kimiawan, atas segala pengalaman dan canda tawa selama perkuliahan.
21. Kelas C, yang telah kebersamai penulis melewati semester demi semester selama perkuliahan.
22. Teman-teman Kimia 2020, atas segala bantuan dan kerjasama selama menjadi mahasiswa jurusan kimia.
23. Semua pihak yang tidak dapat penulis sebutkan satu per satu, yang telah memberikan dukungan dalam berbagai bentuk selama proses penyusunan skripsi ini.
24. Untuk diri penulis, terima kasih atas semua perjuangan yang telah kamu jalani. Terima kasih telah percaya pada kemampuan diri sendiri dan memilih untuk terus maju meskipun mengorbankan waktu, tenaga, dan pikiran serta untuk semua usaha yang telah kamu lakukan untuk mencapai tujuan ini. Maaf jika selama ini terlalu memaksakan untuk menjadi kuat dan berusaha tersenyum dibalik kesedihan. Tetaplah percaya bahwa perjalanan ini adalah bagian dari proses belajar yang berharga. Terima kasih, diriku, karena telah bertahan dan menjadi lebih kuat di setiap langkahnya. Tetap semangat untuk diriku.

Penulis mengucapkan banyak terima kasih kepada semua pihak yang telah membantu penulis. Semoga Allah *subhanahu wa ta'ala* membalas segala bentuk kebaikan yang telah Bapak, Ibu, dan rekan-rekan semua berikan. Penulis

menyadari bahwa skripsi ini masih jauh dari sempurna, sehingga kritik dan saran yang membangun sangat diharapkan demi perbaikan di masa mendatang. Akhir kata, semoga skripsi ini dapat memberikan manfaat bagi pengembangan ilmu pengetahuan, serta bermanfaat bagi para pembaca.

Bandar Lampung, 07 Agustus 2024

Penulis,

Muhammad Irfan Hanafi

DAFTAR ISI

	Halaman
DAFTAR ISI	xvi
DAFTAR TABEL	xviii
DAFTAR GAMBAR.....	xix
I. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Tujuan Penelitian	4
1.3 Manfaat Penelitian	4
II. TINJAUAN PUSTAKA	5
2.1 Kulit Udang	5
2.2 Kitin	6
2.3 Enzim Kitinase	7
2.4 Fungi	9
2.5 <i>Aspergillus</i>	10
2.6 <i>Chitooligosaccharide</i> (COS).....	11
2.7 <i>Solid State Fermentation</i> (SSF)	13
2.8 Aktivitas Antimikroba Senyawa COS	14
2.9 Kromatografi Lapis Tipis (KLT)	14
2.10 <i>Fourier Transform Infrared</i> (FTIR).....	16
2.11 <i>Liquid Chromatography Mass Spectrometry/Mass Spectrometry</i> (LC– MS/MS).....	18
III. METODOLOGI PENELITIAN.....	22
3.1 Waktu dan Tempat Pelaksanaan Penelitian	22
3.2 Alat dan Bahan	22
3.3 Prosedur Kerja.....	23
3.3.1 Preparasi sampel.....	23
3.3.2 Pembuatan Media.....	23
3.3.3 Peremajaan Fungi.....	25
3.3.4 Identifikasi Fungi	26
3.3.5 Kultivasi dan Ekstraksi <i>Chitooligosaccharide</i> (COS)	26
3.3.6 Uji Resistensi Antibiotik	27
3.3.7 Skrining dan Uji Bioaktivitas Antimikroba	27
3.3.8 Kultivasi (<i>Scale up</i>) dan Pemurnian Senyawa COS.....	28

3.3.9 Uji Aktifitas Antimikroba	29
3.3.10 Karakterisasi <i>Chitooligosaccharide</i>	30
3.3.10.1 <i>Fourier Transform Infrared (FTIR)</i>	30
3.3.10.2 <i>Liquid Chromatography Mass Spectrometry/Mass Spectrophotometer (LC-MS/MS)</i>	30
IV. HASIL DAN PEMBAHASAN.....	32
4.1 Identifikasi Fungi	32
4.2 Kultivasi dan Ekstraksi <i>Chitooligosaccharide (COS)</i>	35
4.3 Uji Resistensi Antibiotik.....	37
4.4 Uji Bioaktivitas Antimikroba.....	40
4.5 Kultivasi (<i>Scale up</i>) dan Ekstraksi Isolat Fungi 18A12-RF.....	42
4.6 Uji Aktifitas Antimikroba	44
4.7 Karakterisasi.....	46
4.7.1 FTIR	46
4.7.2 LC-MS/MS.....	47
V. SIMPULAN DAN SARAN	49
5.1 Simpulan	49
5.2 Saran.....	49
DAFTAR PUSTAKA.....	50
LAMPIRAN	61

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Morfologi Isolat fungi secara makroskopik	32
2. Morfologi Isolat Fungi	34
3. Uji resistensi antibiotik terhadap bakteri <i>Staphylococcus aureus</i>	38
4. Uji resistensi antibiotik terhadap <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	39
5. Diameter Zona Bening pada Difusi Agar (mm).....	40

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Struktur Molekul Kitin.....	7
2. Pola Pembelahan dengan Enzim Kitinolitik	8
3. Fungi	10
4. Fungi <i>Aspergillus</i>	11
5. Struktur (a) Kitin; (b) Kitosan; (c) COS (n<9)	12
6. Metode produksi COS.....	13
7. Uji KLT Senyawa COS (a. standar Glukosamin, b dan c. Senyawa COS)	16
8. Spektrum FTIR COS.....	17
9. Prinsip LC–MS/MS.....	19
10. Analisis LC–MS/MS <i>Chitooligosaccharide</i>	21
11. Morfologi Mikroskopis Isolat Fungi (a. 18A12RF; b. 19A15RF; c. 20BA0502RF; d. 20CD01; e. 21RSM02; f. 22PLP1F1)	34
12. (a) Inokulum Isolat Fungi; (b) Kultur dengan Media Kulit Udang; dan (c) Ekstraksi menggunakan Air	35
13. KLT dari Ekstrak Isolat (IPA, akuades, dan 25% amoniak 7 :2 :1) (a. glukosamin, b. blanko, c. 18A12RF, d.19A15RF, e. 20CD01, f. 20BA0502, g. 21RSM02, h. 22PLP1F1).....	36
14. Uji Resistensi Antibiotik Terhadap <i>Staphylococcus aureus</i>	38
15. Uji Resistensi Antibiotik terhadap <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	39
16. Diagram Bioaktivitas Antimikroba.....	41
17. Proses Kultivasi Isolat Fungi 18A12-RF	42
18. (a) Kolom kromatografi; dan (b) KLT fraksi terakhir COS (A12) (Ipa: akuades: 25% ammonia (7:2:1))	43
19. KLT Hasil rekolom (Ipa: akuades: 25% ammonia (7:2:1)) (a. Standar glukosamin; b. fraksi A14 dan A15; c. Fraksi A16 dan A17)	43

20. Uji antifungi fraksi COS	44
21. Diagram Aktivitas Antibakteri terhadap <i>Staphylococcus aureus</i>	45
22. Diagram aktivitas antibakteri terhadap <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	45
23. Spektrum FT-IR dari COS 18A12-RF	46
24. Struktur COS DP 7	47
25. Uji Aktivitas Antibakteri (a. <i>Staphylococcus aureus</i> dan b. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>) (1 dan 2 sampel; 3. Standar Glukosamin; 4. Kontrol (+); dan 5. Kontrol (-))	64
26. Uji Aktivitas Antifungi terhadap <i>Malassezia globosa</i> (1, 2 sampel; 3. Glukosamin; 4. Kontrol (+); dan 5. Kontrol (-))	64
27. Proses Pemurnian Sampel COS	65
28. Uji aktivitas antibakteri terhadap <i>Staphylococcus aureus</i>	65
29. Uji aktivitas antibakteri terhadap <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	65

I. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Crustacea dikenal sebagai hewan invertebrata yang banyak ditemukan di lautan. Perairan Indonesia sebagai salah satu perairan terbesar di dunia kaya akan biodiversitas laut, termasuk kelimpahan *crustacea*. *Crustacea* memiliki lebih dari 52.000 spesies termasuk lobster, kepiting, dan udang. Setiap tahunnya, limbah *crustacea* yang dihasilkan lebih dari 10 juta ton (Summa *et al.*, 2022). Limbah ini merupakan sisa dari proses produksi *crustacea* (Cheong *et al.*, 2020). Limbah *crustacea* memiliki komposisi yang menarik, terutama mengandung sekitar 20–30% protein, 30–40% kalsium karbonat (CaCO_3), dan 20–30% kitin (Vicente *et al.*, 2022). Salah satu jenis *crustacea* yang memiliki kandungan kitin yang melimpah adalah kulit udang (Ngasotter *et al.*, 2023).

Kandungan kitin di dalam *crustacea* sangat melimpah, namun pemanfaatannya masih terbatas karena sifat kristalinitas dan berat molekul yang tinggi, serta ketidaklarutan dalam sebagian besar pelarut (Piekarska *et al.*, 2023). Meskipun demikian, potensi pemanfaatannya dapat ditingkatkan melalui transformasi kitin menjadi produk turunan dengan karakteristik unik, seperti *Chitooligosaccharide* (COS) (Nguyen *et al.*, 2023). Karakteristik COS, seperti berat molekul rendah, derajat polimerisasi rendah, dan kelarutan tinggi dalam air, membuatnya lebih cocok untuk berbagai aplikasi industri dibandingkan dengan kitin.

Metode konvensional seperti hidrolisis kimia telah digunakan untuk memutus ikatan glikosidik dan menghasilkan COS. Namun, metode ini tidak hanya bersifat kurang ramah lingkungan karena menggunakan bahan kimia yang korosif dan toksik dalam jumlah besar, tetapi juga memberikan hasil yang relatif kecil (kurang

dari 65%) dan sulit untuk dikontrol. Konversi kitin dapat dilakukan dengan bantuan enzim seperti enzim kitinase, sebagai alternatif yang lebih berkelanjutan, sebagaimana penelitian yang diusulkan oleh Fu *et al.* (2020). Pendekatan ini lebih ramah lingkungan karena mengurangi penggunaan bahan kimia yang berbahaya dan dapat memberikan hasil yang lebih baik, serta lebih mudah dikontrol dalam produksi COS menggunakan enzim kitinase. Enzim kitinase berperan dalam hidrolisis kitin, dapat dihasilkan oleh berbagai jenis mikroorganisme, termasuk bakteri, virus, aktinomisetes dan fungi (Dukariya *and* Kumar, 2020). Hingga saat ini, beragam kitinase telah diidentifikasi dari berbagai sumber dengan tujuan meningkatkan efisiensi hidrolisis kitin (Jia *et al.*, 2023). Varietas kitinase dapat ditemukan diantara spesies fungi yang memiliki kemampuan untuk menghasilkan isomer kitinase yang berbeda, dengan sifat katalitik yang beragam.

Salah satu kelompok fungi yang menonjol dalam produksi kitinase adalah *Aspergillus* spp. Fungi tersebut menjadi sangat diminati dalam dunia bioteknologi karena memiliki beberapa keunggulan unik, termasuk efisiensi sekresi protein yang tinggi dan ketahanan yang kuat terhadap lisis (Li *et al.*, 2023; Lübeck *and* Lübeck, 2022). *Aspergillus* spp. dikenal sebagai produsen kitinase ekstraseluler yang memiliki peran penting dalam mendegradasi cangkang kepiting sebagai penghasil turunan kitin seperti COS. Pemanfaatan cangkang tersebut sebagai sumber karbon menunjukkan potensi aplikasi yang menarik dalam proses produksi kitinase. Penelitian oleh Dhole *et al.* (2021) memberikan wawasan lebih lanjut terkait dengan peran *Aspergillus* spp. dalam mengoptimalkan proses hidrolisis kitin menjadi COS.

Senyawa COS mempunyai gugus amino bermuatan positif yang dapat merusak membran sel atau dinding sel mikroorganisme (Yan *et al.*, 2021). Hal ini, menjadi keunggulan sebagai agen antimikroba yang lebih efektif karena kompatibilitasnya lebih universal dibandingkan dengan kitin dan kitosan (Chimtung, 2018). Faktor-faktor seperti bobot molekul, derajat deasetilasi, dan tipe bakteri diketahui memengaruhi aktivitas antimikroba dari COS (Guan *et al.*, 2019). Studi sebelumnya yang dilakukan oleh Widyastuti *et al.*, (2022) berhasil mengisolasi

COS dengan *Degree Polymerization* (DP) 6 sebagai agen pendegradasi dan membuktikan bahwa COS ini memiliki aktivitas sebagai agen antifungi terhadap *Malassezia globosa*. Temuan ini memberikan kontribusi penting dalam pemahaman potensi aplikatif COS sebagai agen antimikroba. Namun, terdapat permasalahan yang dihadapi, yaitu tidak semua fungi memiliki pola pemutusan COS yang sama dan aktivitasnya pun berbeda-beda.

Pada penelitian ini, dilakukan isolasi COS menggunakan fungi dari deposit Unit Pelaksanaan Teknis Laboratorium Terpadu Sentra Inovasi dan Teknologi (UPT LTSIT) yang telah dievaluasi sebagai antimikroba. Isolat fungsi digunakan sebagai agen pendegradasi kulit udang yang melibatkan kultivasi fungi (18A12RF, 19A15RF, 20BA0502RF, 20CD01RF, 21PLP1F1, dan RSM2) secara *Solid-state fermentation* (SSF), mengacu pada penelitian Widyastuti *et al.* (2022) dengan menggunakan jenis aktinomisetes. Untuk memperoleh senyawa COS, isolat fungi dikultivasi secara SSF pada limbah kulit udang mengacu pada metode (Setiawan *et al.*, 2021) selama 4 hari. Hal ini, dikarenakan fungi mampu menghasilkan enzim kitinase yang dapat mendegradasi substrat limbah kulit udang (Suryawanshi *and* Eswari, 2022). Hasil kultivasi diekstraksi menggunakan air pada temperature $\pm 100^{\circ}\text{C}$, kemudian dipekatkan menggunakan *rotary evaporator*. Ekstrak kasar COS yang diperoleh ditambah EtOH PA dengan perbandingan 1:1 (Widyastuti *et al.*, 2022), untuk memisahkan COS berdasarkan DP yang dihasilkan. Berdasarkan Goncalves *et al.* (2021) DP yang lebih rendah umumnya larut dalam air, sedangkan DP yang lebih tinggi lebih larut dalam etanol. Nilai DP kurang dari 10 dari COS dianggap larut dalam air, sedangkan kelarutan dalam air untuk DP lebih besar dari 10 bergantung pada derajat deasetilasi dan pH larutan (Widyastuti *et al.*, 2022). Ekstrak COS tersebut diuji bioaktivitasnya terhadap antimikroba secara difusi agar. Fungi yang menghasilkan ekstrak COS dengan aktivitas terbaik dipilih untuk dilakukan *scale up* agar diperoleh ekstrak yang cukup untuk dilakukan pemurnian. Pemurnian menggunakan kolom kromatografi dengan variasi pelarut isopropil alkohol, air dan 25% ammonia (NH_3) (Moon *et al.*, 2020). Kromatografi kolom dapat memisahkan COS dengan derajat polimerisasi (DP) dan sifat lainnya yang

berbeda, sehingga menghasilkan produk dengan kemurnian tinggi. Hasil pemurnian fraksi COS, difraksinasi dan dievaluasi aktivitas antibakteri dan antifungi dengan metode mikrodilusi (Royani *et al*, 2023). Hasil fraksinasi terbaik dianalisis menggunakan *Fourier Transform Infrared* (FTIR) untuk mengidentifikasi gugus fungsi (Subamia dkk., 2023), dan *Liquid Chromatography Mass Spectrometry/Mass Spectrometry* (LC-MS/MS) digunakan untuk menentukan berat molekul dan pola fragmentasi COS yang diperoleh (Thomas *et al.*, 2022).

1.2 Tujuan Penelitian

Adapun tujuan dari dilakukannya penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Memperoleh isolat fungi yang dapat mendegradasi kulit udang;
2. Memperoleh isolat fungi yang unggul dalam mengisolasi COS dari hasil degradasi kulit udang menggunakan teknik *Solid State Fermentation* (SSF);
3. Mengetahui karakteristik COS hasil degradasi dari limbah kulit udang;
4. Mengevaluasi aktivitas senyawa COS sebagai antimikroba.

1.3 Manfaat Penelitian

Pada penelitian ini dilakukan untuk mendapatkan informasi baru mengenai COS hasil degradasi kulit udang yang berpotensi sebagai antimikroba dan diharapkan dapat memberikan dasar informasi untuk mengembangkan metode fermentasi padat yang menggunakan kulit udang, terfokus pada optimalisasi dan efisiensi produksi COS selanjutnya.

II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Kulit Udang

Saat ini budidaya udang sedang mengalami pertumbuhan yang sangat pesat, sehingga menjadi komoditas ekspor non-migas yang diandalkan dan memiliki nilai ekonomis tinggi sebagai salah satu biota laut. Udang dimanfaatkan sebagai sumber makanan berkualitas tinggi yang kaya gizi (Liu *et al.*, 2021). Pada tahun 2023, produksi udang tercatat mencapai 1,829 juta ton. Angka tersebut melebihi produksi pada tahun 2022 yang mencapai 1,09 juta ton (KKP, 2023).

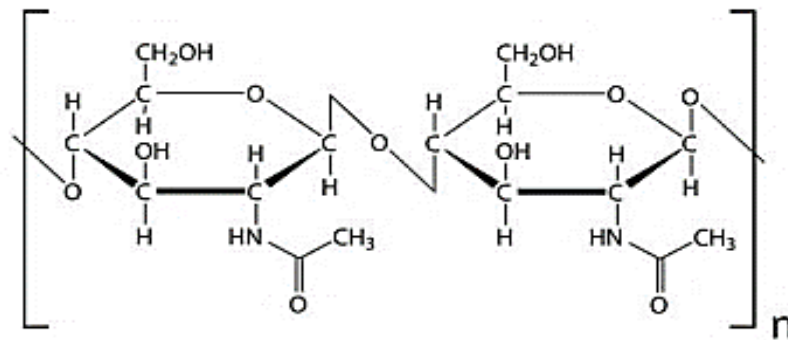
Berdasarkan data dari Badan Pusat Statistik (BPS) tahun 2021, konsumsi udang segar di Indonesia sebesar 0,353 kg per minggunya. Jumlah ini naik sebesar 6% dari tahun sebelumnya. Selain untuk konsumsi dalam negeri, udang juga memiliki potensi yang sangat bagus untuk diekspor (Annur, 2022). Produk udang Indonesia diekspor ke pasar Internasional berupa udang segar, udang beku, dan udang olahan (Aly dkk., 2023). Sebagai salah satu negara pengekspor udang beku yang telah dipisahkan dari kulitnya, membuat permintaan udang beku ekspor meningkat yang menyebabkan permasalahan limbah kulit dan kepala udang yang cukup besar. Sekitar 6-8 juta ton cangkang kepiting, udang, dan lobster di seluruh dunia setiap tahunnya. Dimana, hampir 99% dari jumlah tersebut berasal dari limbah udang. Limbah ini menyebabkan pencemaran lingkungan disekitar tempat pembuangan (Mustafiah *et al.*, 2018). Namun, limbah udang banyak mengandung kitin yang dapat dimanfaatkan sebagai bahan baku pembuatan kitin dan turunannya, mengingat masih kurangnya pemanfaatan yang hanya digunakan sebagai bahan baku terasi, kerupuk, dan tepung (Junianto *et al.*, 2021).

2.2 Kitin

Kitin adalah polisakarida amino kationik yang tidak larut dalam air, terbentuk dari N-asetilglukosamin (GlcNAc) yang terikat β -1,4 (Heggset *et al.*, 2010; Mahata *et al.*, 2014). Kitin merupakan polisakarida paling melimpah kedua di alam yang memiliki peran sebagai komponen struktural yang penting dalam berbagai organisme, termasuk artropoda, parasit protozoa, nematoda, bakteri, dan fungi (Pinteac *et al.*, 2021) serta mollusca (Luo *et al.*, 2019). Di dalam biosfer, organisme mensintesis lebih dari 1 miliar ton kitin setiap tahunnya. Kitin berikatan dengan protein, mineral dan beberapa pigmen. Kitin memiliki kemampuan untuk membentuk struktur padat sendiri, seperti yang terdapat pada sayap serangga, atau dapat bergabung dengan komponen lain, seperti kalsium karbonat, untuk membentuk zat yang lebih kuat, contohnya kulit udang.

Kitin memiliki sifat keras, lembam, dan tidak larut dalam air serta pelarut organik lainnya. Sifat lain dari kitin adalah kemampuannya untuk mengkelat ion logam dan membentuk lapisan film serta garam polioksi. Kitin tersusun dari tiga alomorf yang mengandung α -, β -, dan γ (Liang *et al.*, 2018). α -kitin sering ditemukan pada udang, lobster, dan kepiting dengan rantai antiparalel dengan ikatan intra dan antarmolekul yang kuat. β -kitin terdiri dari rantai paralel yang terikat dengan ikatan hidrogen intrasheet yang memiliki ikatan lemah sehingga tidak stabil, dan banyak ditemukan pada cumi-cumi, sedangkan γ -kitin merupakan penggabungan dari α -kitin dan β -kitin yang terdiri dari rantai paralel dan antiparalel yang banyak ditemukan pada kumbang *Prinus* dan cumi-cumi *Loligo* (Casadidio *et al.*, 2019). Kitin sebagai biopolimer alami mempunyai banyak kelebihan seperti mempunyai sifat biokompatibilitas, biodegradabilitas dan tidak beracun (Mahyudin dkk., 2017). Kitin memiliki sifat utama, salah satunya yaitu ketahanannya yang kuat terhadap perlakuan basa. Dimana, kitin mampu bertahan dalam kondisi kimia keras, seperti larutan 1 M NaOH, sementara biopolimer lainnya terdegradasi. Kitin dapat digunakan untuk aplikasi biomedis seperti antimikroba, antiulkus, hemostatik, penyembuhan luka, fungistatik, antiasam dan antikolesterolemik (Ahamed dan Prasad, 2022). Di industri, ekstraksi kitin dan produk turunannya

biasanya dilakukan dengan metode kimiawi. Proses ekstraksi kitin dari kulit udang dimulai dengan penggunaan larutan asam kuat pekat, seperti HCl pada suhu ruang yang bertujuan untuk menghilangkan mineral. Langkah selanjutnya melibatkan penggunaan basa kuat, seperti NaOH pada suhu sekitar 100°C untuk menghilangkan protein dan pigmen warna. Hasilnya adalah serbuk kitin berwarna putih. Struktur kitin dapat dilihat pada Gambar 1.



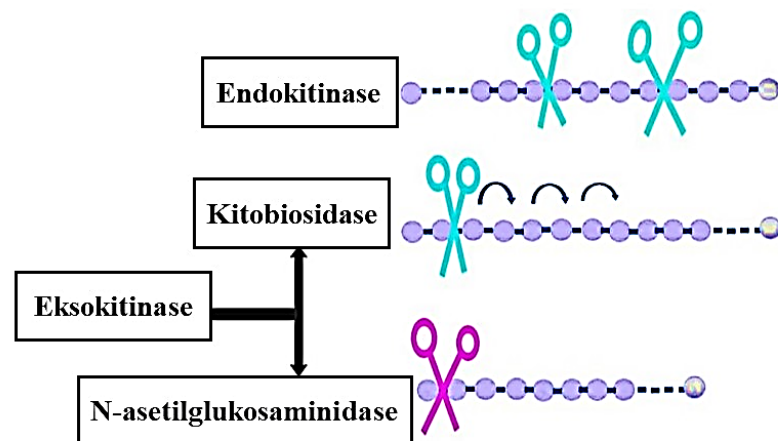
Gambar 1. Struktur Molekul Kitin (Khattak *et al.*, 2019)

2.3 Enzim Kitinase

Enzim kitinase (E.C 3.2.2.14) adalah salah satu jenis enzim yang berfungsi untuk menguraikan polimer pada kitin menjadi bentuk monomer N-asetilglukosamin atau COS. Kitinase dalam ekosistem alam memainkan berbagai peran, salah satunya adalah digunakan untuk mengisolasi protoplas fungi dan khamir. Sumber kitinase tersebar luas yang dapat ditemukan pada bakteri, serangga, virus, tumbuhan, dan hewan, yang semuanya berperan penting dalam proses fisiologi dan ekologi (Suryadi dkk., 2013). Klasifikasi kitinase ditentukan berdasarkan karakteristik, termasuk pH isoelektrik, sinyal peptida, urutan di terminal-N, induktor, dan lokalisasi enzim (Poria *et al.*, 2021).

Kitinase kelas I memiliki terminal N yang kaya sistein, mengalami lokalisasi vakuolar, dan memiliki valin atau peptida sinyal kaya leusin. Kitinase tumbuhan, sebagian besar endo-kitinase, termasuk dalam kelas I. Kitinase kelas II memiliki

urutan yang mirip dengan kelas I, tetapi tidak memiliki terminal N yang kaya sistein, dimana hanya terdiri dari ekso-kitinase dan mencakup kitinase dari tumbuhan, fungi, dan bakteri. Kitinase kelas III berbeda dari kelas I dan kelas II, yang memiliki domain katalitik GH18 dengan lipatan (β/α) 8 barel, tiga ikatan disulfida terpelihara, dan lipatan yang mirip dengan kitinase bakteri dan fungi, meskipun kesamaan urutannya rendah. Kitinase kelas IV memiliki karakteristik serupa seperti sifat imunologis, meskipun jauh lebih kecil dibandingkan dengan kelas I. Sedangkan, kitinase kelas V dan kelas VI belum dikarakterisasi dengan baik. Berdasarkan urutan gen, terminal N yang kaya sistein hilang selama evolusi, seperti yang terlihat pada beberapa contoh kitinase kelas V, yang dikarenakan tekanan seleksi yang lebih rendah. Kitinase kelas V memiliki dua domain pengikat kitin secara bersamaan (Poria *et al.*, 2021). Berdasarkan cara menguraikan kitin, kitinase dikelompokkan menjadi 2 yaitu sebagai endo-kitinase dan ekso-kitinase. Endo-kitinase (EC.3.2.1.14) menyebabkan pemecahan ikatan glikosil β -1,4 secara acak di lokasi internal kitin, menghasilkan oligomer N-asetilglukosamin dengan berat molekul rendah, seperti kitotetraosa, kitotriososa, dan kitobiosa. Sedangkan, ekso-kitinase melakukan pemecahan ikatan glikosil β -1,4 dalam kitin dari ujung non-pereduksi (Dukariya *and* Kumar, 2020), ditunjukkan dalam Gambar 2.



Gambar 2. Pola Pembelahan dengan Enzim Kitinolitik (Dukariya *and* Kumar, 2020)

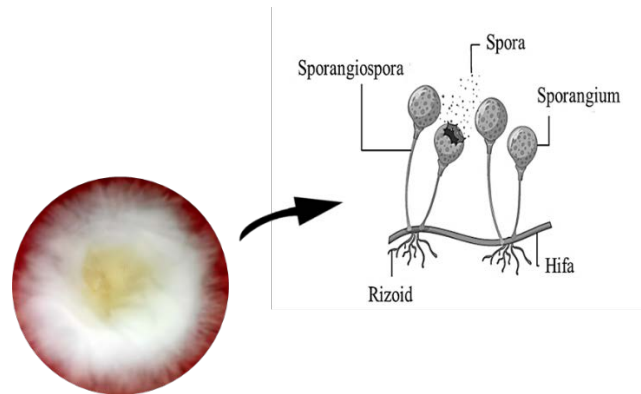
Eksokitinase dibagi menjadi dua kategori berdasarkan produk yang dihasilkan, yaitu kitobiosidase (E.C.3.2.1.29) dan β -(1,4)-N-asetil glukosaminidase

(E.C.3.2.1.30). Kitobiosidase berperan untuk memotong ikatan glikosil β -1,4 secara bergantian dalam kitin dari ujung non-pereduksi, menghasilkan kitobiosa. Di sisi lain, β -(1,4)-N-asetil glukosaminidase berperan dalam memotong ikatan glikosil β -1,4 dalam kitin dari N-asetilglukosamin, menghasilkan produk akhir non-pereduksi (Beygmoradi *et al.*, 2018, Dukariya *and* Kumar, 2020).

Keberadaan kitinase dapat mengakibatkan kerusakan pada struktur eksoskeleton udang karena terjadinya degradasi kitin. Proses degradasi kitinase ini dilakukan oleh mikroorganisme yang membutuhkan kitin sebagai sumber karbon dan nitrogen untuk kelangsungan hidupnya (Yanuhar *and* Caesar, 2020).

2.4 Fungi

Fungi atau jamur diartikan sebagai jasad eukariot, yang memiliki bentuk benang atau sel tunggal, multiseluler atau uni seluler. Kingdom fungi memiliki keragaman yang signifikan, dengan spesies-spesies yang tumbuh sebagai ragi uniseluler dan/atau hifa bercabang menghasilkan beragam spora dan struktur reproduksi lainnya. Dalam kondisi tertentu, bentuk dan kekokohan fungi sangat tergantung pada kekuatan mekanik dinding sel yang memainkan peran penting dalam interaksi fungi dengan lingkungan sekitarnya. Dinding sel fungi adalah struktur kompleks yang umumnya terdiri dari kitin, 1,3- β - dan 1,6- β -glukan, mannan, dan protein. Meskipun demikian, komposisi dinding sel seringkali sangat bervariasi antar spesies fungi yang mencerminkan bagian atau seluruh dinding sel ragi atau fungi berfilamen. Enzim biosintesis kitin dan glukan menghasilkan rantai linier panjang N-asetilglukosamin terikat β -1,4 dan glukosa terikat β -1,3 secara berurutan. Meskipun demikian, dalam dinding sel fungi terdapat banyak 1,3- β -, 1,6- β -glukan bercabang, dan terdapat adanya ikatan silang yang melibatkan kitin, glukan, dan komponen dinding lainnya (Hidayat dan Putri, 2016). Fungi dapat dilihat pada dilihat pada Gambar 3.



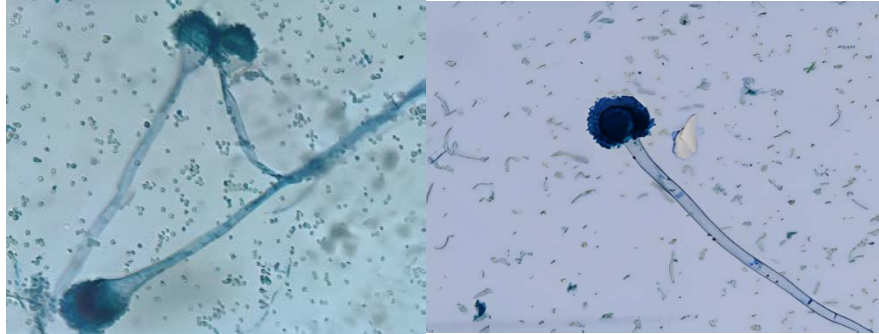
Gambar 3. Spora Fungi (Setiawan *et al.*, 2022)

Sporangiospora adalah bentuk spora dengan dinding sel yang tebal dan berfungsi untuk bertahan hidup dalam kondisi lingkungan yang tidak menguntungkan (Jennessen *et al.*, 2008). Rhizoid adalah struktur mirip akar yang ditemukan pada Fungi, lumut, dan alga. Pada Fungi, rhizoid adalah filamen tipis yang berfungsi untuk melekatkan diri ke substrat dan membantu penyerapan nutrisi. Sporangium adalah struktur pada Fungi, tumbuhan, atau protista yang menghasilkan dan menyimpan spora yang biasanya berada di ujung hifa tempat di mana spora aseksual atau seksual diproduksi (Ahmad *et al.*, 2021).

2.5 *Aspergillus*

Aspergillus merupakan saprofit yang dapat dengan mudah ditemui di sekitar kehidupan manusia dan terdiri dari beragam spesies. *Aspergillus* ditandai dengan adanya spora (konidia) yang berbentuk bulat atau oval (Bahri *et al.*, 2023). Beberapa spesies yang seringkali menjadi penyebab penyakit meliputi *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, dan *Aspergillus terreus*. Di antara spesies tersebut, *Aspergillus fumigatus* dianggap sebagai yang paling patogen, mampu tumbuh pada suhu 37°C bahkan mencapai suhu 50°C. Meskipun jarang, spesies lain seperti *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus oryzae*, dan lain-lain juga memiliki potensi menyebabkan penyakit. *Aspergillus* merupakan kelompok kapang (*Mould*) oportunistik patogen yang berpotensi menyebabkan infeksi pada manusia. Aspergilosis merupakan kelainan yang ditimbulkan yang dapat mempengaruhi berbagai bagian tubuh seperti kulit, kuku, dan terutama paru-paru.

Selain menyebabkan infeksi, kapang tersebut juga dapat menyebabkan reaksi alergi atau kolonisasi dalam paru-paru (Paulussen *et al.*, 2017). Fungi *Aspergillus* dapat dilihat pada Gambar 4.

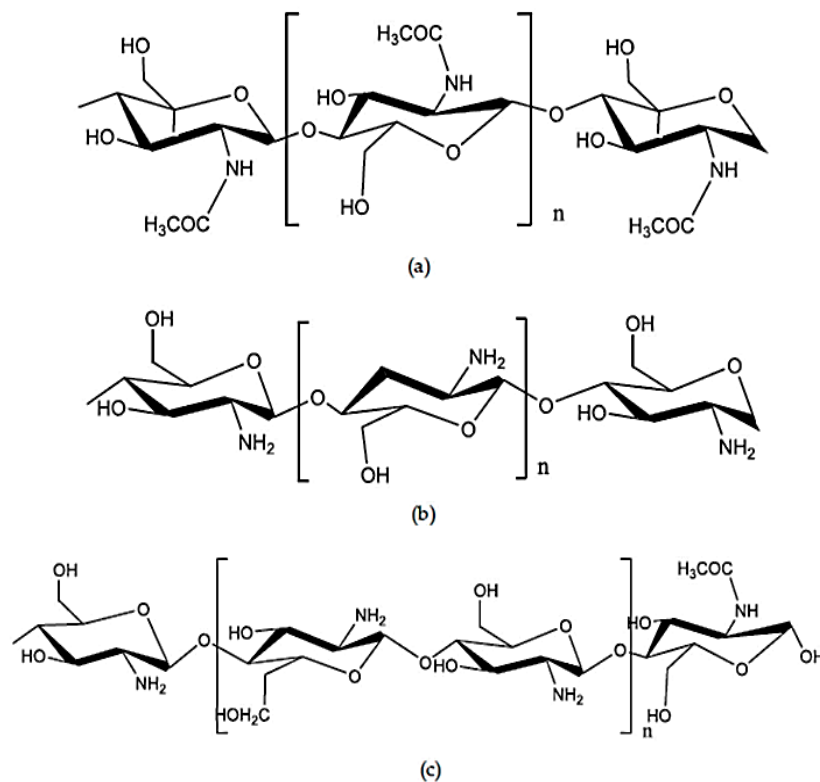


Gambar 4. Spora Fungi *Aspergillus* (Sanduri *et al.*, 2023)

2.6 *Chitooligosaccharide* (COS)

Chitooligosaccharide (COS) merupakan oligomer yang berasal dari senyawa kitin (Gambar 5a) dan kitosan (Gambar 5b), yang dapat dihasilkan baik melalui proses kimiawi, fisik, maupun enzimatik. COS juga dikenal sebagai oligomer kitosan atau kitooligomer, memiliki derajat polimerisasi ≤ 20 dan berat molekul rata-rata kurang dari 3900 Da (umumnya 0,2-3,0 kDa). Terkadang, molekul yang jauh lebih besar juga dapat disebut sebagai COS, namun perbedaan besar ada antara aktivitas oligomer pendek (0,2-0,8 kDa) dan oligomer panjang (2,0-3,0 kDa). COS memiliki keunggulan berat molekul rendah, tingkat kelarutan yang tinggi, kemampuan penyerapan air yang baik, daya serap yang kuat, dan biokompatibilitas yang baik. Selain itu, COS memiliki potensi untuk meningkatkan kualitas makanan dan kesehatan manusia, mencegah pertumbuhan bakteri dan fungi, memperlihatkan aktivitas anti tumor, mengurangi respons peradangan, dan berfungsi sebagai imunopotensiator (Anil, 2022). COS terbentuk melalui proses depolimerisasi kitin atau kitosan menggunakan metode hidrolisis asam, hidrolisis dengan pendekatan fisik, dan degradasi enzimatik (Kaczmarek *et al.*, 2019).

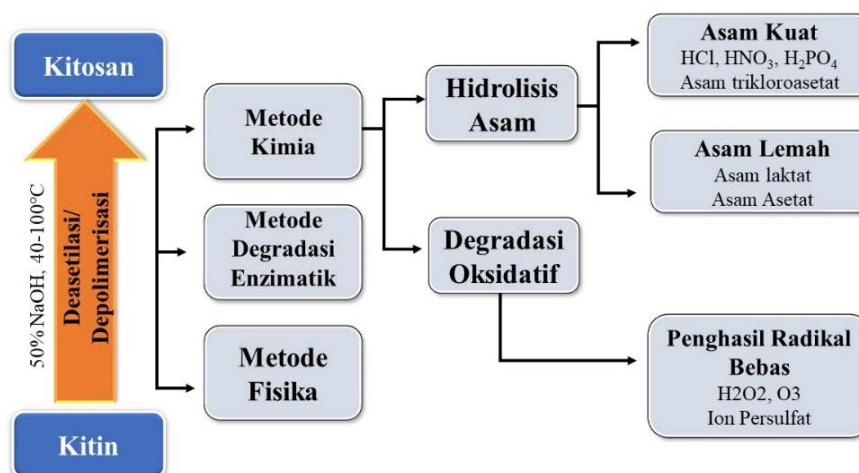
Beberapa penelitian telah melaporkan bahwa COS dapat menunjukkan aktivitas antimikroba tertentu dalam beberapa sektor (Yang *et al.*, 2023). COS terdiri dari cincin glukosamin dan glukosamin asetat yang saling terhubung melalui ikatan β -1,4-glikosidik. Molekul ini berinteraksi dengan reseptor sel dalam organisme hidup melalui gugus amino, gugus hidroksil primer (pada posisi C-2 dan C-3), dan gugus hidroksil sekunder (pada posisi C-6) (Muanprasat *and* Chatsudthipong, 2017, Lin *et al.*, 2023), dan asetat amina, yang memicu serangkaian reaksi yang saling terkait dan menghasilkan aktivitas biologis yang beragam, termasuk sifat antimikroba, antidiabetik, antiinflamasi, dan antioksidan (El-Sayed *et al.*, 2017).



Gambar 5. Struktur (a) Kitin; (b) Kitosan; (c) COS ($n < 9$) (Liang *et al.*, 2018)

COS dengan metode fisik kurang sering dieksplorasi dan efisiensinya pada skala lab masih belum diketahui (Kaczmarek *et al.*, 2019). Di sisi lain, metode kimia dan enzimatis untuk sintesis COS telah mendapatkan penelitian dan pengembangan yang cukup baik. Proses kimia dalam pembuatan COS biasanya melibatkan serangkaian langkah, termasuk hidrolisis asam, netralisasi, demineralisasi, fraksinasi kolom arang-selit, fraksinasi kromatografi cair kinerja

tinggi (HPLC), dan liofilisasi. Metode kimia paling sering digunakan untuk mendegradasi kitin dan kitosan, namun reaksi kimianya sangat kompleks, sulit dikendalikan dan dapat menyebabkan produksi berbagai senyawa sekunder yang sulit dihilangkan (Lodhi *et al.*, 2014). Metode enzimatik lebih efektif dalam sintesis COS dibandingkan dengan metode fisik dan kimia (Kaczmarek *et al.*, 2019). Sintesis COS menggunakan metode enzimatik dapat dilakukan dengan menggunakan enzim spesifik seperti kitinase, kitosanase, dan enzim nonspesifik seperti karbohidrase dan protease. metode enzimatik dianggap sebagai strategi yang sangat menarik untuk memperoleh rantai COS yang lebih panjang maupun lebih pendek (Liaqat and Eltem, 2018).



Gambar 6. Metode produksi COS (Anil, 2022)

2.7 Solid State Fermentation (SSF)

Solid-state Fermentation (SSF) adalah suatu metode heterogen tiga fase yang menggabungkan fase padat, cair, dan gas untuk mengubah substrat awal di mana mikroorganisme tumbuh pada substrat tersebut dengan fase gas yang terus-menerus. SSF menciptakan lingkungan yang sangat alami bagi mikroorganisme yang biasanya hidup di bahan padat, seperti permukaan tanaman, batu, tanah, dan material organik yang terurai seperti daun, kulit kayu, dan kayu (Jimenez and Martinez, 2017). SSF digunakan dalam produksi metabolit (seperti antibiotik, aroma, biosurfaktan, enzim, asam organik), biofuel, dan tujuan lingkungan

(bioremediasi) (Mattedi *et al.*, 2023). SSF menghasilkan lebih banyak enzim yang stabil terhadap suhu dan pH, memiliki produktivitas volumetrik yang lebih besar, dan kecil kemungkinannya mengalami masalah penghambatan substrat. Selain itu, fermentasi berlangsung lebih cepat. dan kecil kemungkinan protease yang tidak menguntungkan akan mendegradasi enzim yang dihasilkan (Hasan *et al.*, 2023).

2.8 Aktivitas Antimikroba Senyawa COS

COS merupakan salah satu senyawa yang sering menjadi fokus dalam konteks aktivitas biologis, khususnya sebagai agen antimikroba (Guan *et al.*, 2019, Hauzan Arifin dkk., 2022). Aktivitas antimikroba COS dipengaruhi oleh beberapa faktor, seperti asam deoksikolat (DA) atau disetil fosfat (DP), sifat fisikokimia dan jenis mikroorganisme lainnya. COS dapat memodifikasi permeabilitas membran sel mikroba yang mencegah masuknya bahan atau memicu kebocoran komponen sel, yang pada akhirnya mengakibatkan kerusakan bakteri. Selubung bakteri berperan sebagai lokasi aktif COS, dan kerusakan membran menyebabkan kehancuran mikroorganisme (Yan *et al.*, 2021, Anil, 2022).

2.9 Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

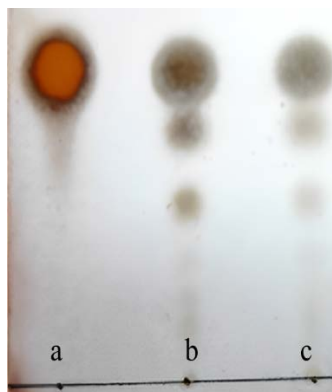
Kromatografi lapis tipis (KLT) adalah salah satu jenis metode kromatografi yang digunakan untuk memisahkan komponen-komponen suatu campuran dengan menggunakan fase diam tipis yang didukung oleh substrat inert. Teknik ini dapat digunakan pada skala analitik untuk memantau perkembangan suatu reaksi atau dalam skala preparatif untuk memurnikan sejumlah kecil senyawa. KLT merupakan alat analisis umum dan populer karena kemudahan dalam penggunaannya, biaya yang terjangkau, sensitivitas tinggi, serta kecepatan pemisahan. Prinsip dasar KLT serupa dengan kromatografi, di mana afinitas senyawa terhadap fase diam dan fase gerak berbeda, dimana memengaruhi kecepatan migrasinya (Kharb, 2021). KLT memiliki sifat primer, sederhana dalam

penggunaannya, dan menggunakan pelarut yang aman tanpa memerlukan instrumen canggih. Umumnya, metode ini melibatkan fase diam dan fase gerak yang diterapkan pada permukaan padat seperti kaca, plastik, atau aluminium foil yang dilapisi dengan bahan penyerap seperti bubuk silika, aluminium oksida, dan selulosa yang disebut sebagai fase diam (Lade *et al.*, 2014). KLT adalah jenis kromatografi cair di mana fase gerak adalah pelarut, dan fase diam adalah pelat. Pelat ini dikenal sebagai sorben. Fase gerak disebut sebagai pelarut pengembang atau eluen, yang mengangkut zat terlarut melalui fase diam. Kecepatan pergerakan zat terlarut melalui fase diam bergantung pada gaya fase gerak saat melarutkan zat terlarut dan memindahkannya ke atas pelat, serta ketahanan sorben saat menarik zat terlarut keluar dari larutan dan kembali ke dalam sorben. Molekul bergerak di sepanjang pelat dengan gerakan berhenti dan berjalan karena zat terlarut berulang kali diserap dan didesorpsi. Spot degradasi akan menyebar karena fluktuasi acak dan pergerakan partikel individu serta variasi dalam keseragaman sorben. Zat yang tertarik pada sorben bergerak lebih lambat, sedangkan zat yang bergerak lebih cepat kurang tertarik pada lapisan padat, lebih larut dalam fase gerak. Senyawa dengan sifat berbeda dapat dipisahkan satu sama lain dengan memanfaatkan interaksi antara zat terlarut dengan sorben dan fase gerak (Santiago *and* Strobel, 2013).

KLT memiliki peran penting dalam pemisahan berbagai metabolit sekunder seperti polifenol, alkaloid, saponin, flavonoid, flavanon, asam amino, amina aromatik, asam, alkohol, glikol, amida, protein, peptida, antibiotik, porfirin, asam empedu, pestisida, dan vitamin. Dalam proses pemisahan senyawa metabolit sekunder, diperlukan fasa diam seperti silika gel atau C18, yang juga memerlukan penggunaan pelarut dengan sifat yang berbeda. Penggunaan pelarut nonpolar seperti n-heksana umumnya digunakan saat menganalisis menggunakan SiO₂, sementara pelarut polar seperti MeOH dan H₂O digunakan bersamaan dengan pelat C18 (Setiawan, 2022).

Pada isolasi dan identifikasi COS diperlukan NH₃ untuk mengurangi adanya tailing, karena NH₃ dapat menurunkan viskositas keseluruhan sistem pelarut,

meningkatkan laju dan meningkatkan efisiensi spot, sehingga diperoleh DP yang dapat diamati (Mishra *et al.*, 2017). Umumnya, larutan COS pekat ditotolkan di pelat silika gel pada KLT dan dielusi dalam campuran pelarut yang terdiri dari Isopropil alkohol (IPA), air dan 25% ammonia (7:3:1 (v/v/v)). Sampel divisualisasikan dengan menyemprotkan H₂SO₄ 10% atau ninhidrin 0,1% yang dilarutkan dalam etanol (Chambon *et al.*, 2015). Uji KLT dapat dilihat pada Gambar 7.



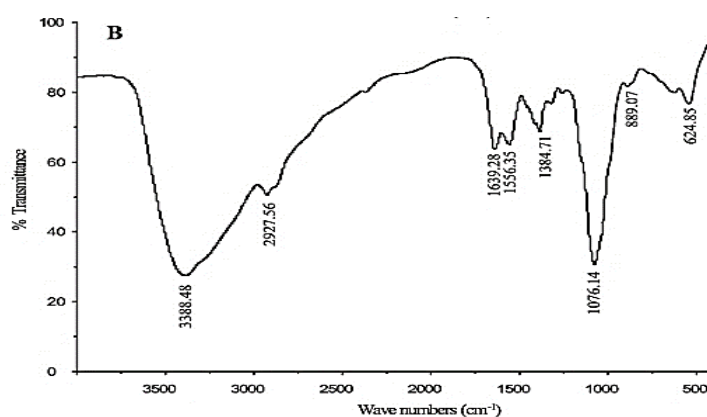
Gambar 7. Uji KLT Senyawa COS (a. standar Glukosamin, b dan c. Senyawa COS) (Varun *et al.*, 2017)

2.10 *Fourier Transform Infrared (FTIR)*

Spektroskopi *Fourier Transform Infrared (FTIR)* merupakan metode yang digunakan untuk menganalisis gugus fungsi yang terkandung dalam suatu senyawa (Jamwal *et al.*, 2021). Spektroskopi FTIR adalah alat yang telah dilengkapi inframerah dengan transformasi *fourier* untuk mendeteksi dan analisis hasil spektrumnya. Sampel dianalisis menggunakan FTIR untuk mengetahui gugus fungsi baik secara fisika maupun kimia. Spektrum FTIR reflektansi total biasanya antara bilangan gelombang 4000 cm⁻¹ (frekuensi tertinggi) - 400 cm⁻¹ (frekuensi terendah) (Hasan dkk., 2022). Spektrum FTIR dihasilkan dari pentransmisiian cahaya yang melewati sampel, pengukuran intensitas cahaya dengan detektor dan dibandingkan dengan intensitas tanpa sampel sebagai fungsi bilangan gelombang. Dalam FTIR, penyerapan radiasi IR yang dihasilkan oleh ikatan molekul diukur, menghasilkan spektrum yang biasanya direpresentasikan

sebagai transmitansi (%) dan bilangan gelombang (cm^{-1}), dan setiap jenis ikatan kimia memiliki rentang frekuensi penyerapan tertentu yang unik. Misalnya, ikatan karbon-hidrogen (C-H) mungkin menyerap di sekitar $2900\text{--}3000\text{ cm}^{-1}$, sedangkan ikatan karbon-oksigen (C=O) biasanya menyerap di sekitar 1700 cm^{-1} (Sharma *et al.*, 2018). Hal ini, disebabkan oleh kemampuannya dalam mengidentifikasi banyak gugus fungsi berdasarkan frekuensi getaran khas yang dimilikinya (Fleming and Williams, 2019). Spektrum FTIR COS memiliki pita serapan karakteristik pada $3200\text{--}3400\text{ cm}^{-1}$ dan 2874 cm^{-1} , yang mewakili keberadaan gugus NH_2 , gugus OH, dan gugus CH_2 . Puncak serapan pada 1589 dan 1375 cm^{-1} adalah pita Amida II dan pita Amida III. Puncak serapan khusus $1158\text{--}890\text{ cm}^{-1}$ sesuai dengan struktur polisakarida dan ikatan 1,4-glikosidik dalam struktur COS (Xing *et al.*, 2021).

Spektrum FTIR COS pada Gambar 5, menunjukkan puncak karakteristik pada bilangan gelombang 3388 cm^{-1} yang menunjukkan adanya tumpang tindih getaran yang berbeda sesuai gugus --OH dan NH_2 , 2927 cm^{-1} terdapat C-H *stretching*, 1556 cm^{-1} terdapat C=O *stretching*, 1384 cm^{-1} adanya pembengkokan C-H asimetris pada gugus CH_2 , 1076 cm^{-1} adanya gugus C=O-C, 889 cm^{-1} terdapat puncak serapan β (1,4)-glikosida dan 625 cm^{-1} deformasi --NH (Mei *et al.*, 2013).



Gambar 8. Spektrum FTIR COS (Mei *et al.*, 2013)

Spektrum FTIR, serapan terjadi ketika molekul menyerap radiasi inframerah pada frekuensi tertentu. Penyerapan ini berkaitan dengan getaran molekul, seperti peregangan (*stretching*) atau pembengkokan (*bending*) ikatan kimia. Serapan FTIR dijelaskan pada hukum Beer-Lambert, menjelaskan bagaimana redaman

cahaya berkaitan dengan sifat-sifat media yang dilaluinya, yang menyatakan bahwa absorbansi (A) berbanding lurus dengan konsentrasi (c) dari zat yang menyerap, panjang jalur (l) dari sinar melalui sampel, dan koefisien absorptivitas molar (ϵ) (Oshina *and* Spigulis, 2021).

$$A = \epsilon \cdot c \cdot l$$

Ket: **A** = Absorbansi (serapan)

ϵ = Koefisien absorptivitas molar

C = Konsentrasi zat yang menyerap

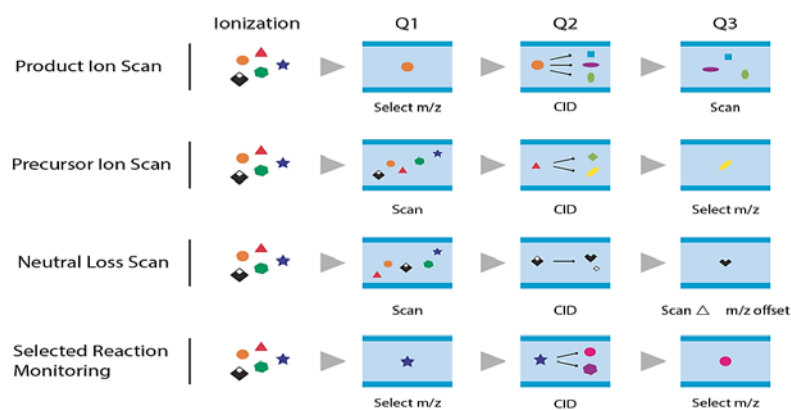
l = Panjang jalur (panjang lintasan cahaya melalui sampel)

2.11 *Liquid Chromatography Mass Spectrometry/Mass Spectrometry (LC-MS/MS)*

Liquid Chromatography Mass Spectrometry (LC-MS) merupakan metode analisis yang melibatkan pemisahan fisik senyawa target (atau analit) diikuti dengan deteksi berbasis massa. Walaupun relatif baru, LC-MS memiliki tingkat sensitivitas, selektivitas, dan akurasi yang tinggi menjadikannya metode pilihan untuk mendeteksi jumlah mikrog atau bahkan nanog dari berbagai analit, termasuk metabolit obat, pestisida, bahan pemalsuan makanan, dan ekstrak produk alami (Srividya, 2021). Analisis LC-MS dilakukan berdasarkan pada karakterisasi waktu retensi dan rasio massa terhadap muatan (Baars *and* Perlman, 2016).

Mass Spectrometry (MS) dapat digunakan secara selektif untuk mendeteksi analit dan menentukan berat molekulnya. MS berfungsi sebagai perangkat optik ion yang memisahkan ion berdasarkan rasio massa terhadap muatannya (m/z) dengan memanfaatkan gaya listrik dan magnet. Molekul gas akan terionisasi membentuk ion molekul, dan beberapa ion mengalami fragmentasi. Ion dengan nilai m/z yang berbeda akan melewati penganalisis massa dan mencapai detektor. Detektor yang dikenai oleh ion akan diubah menjadi sinyal listrik, yang dikonversi menjadi sinyal digital di dalam komputer (Kang, 2012).

MS sangat berguna untuk analisis cepat dari COS yang digunakan untuk mengidentifikasi dan kuantifikasi variasi panjang rantai polimer (DP) serta modifikasi lainnya seperti *degree of acetylation* (DA) (Oliveira *et al.*, 2008). Peningkatan identifikasi sampel dan akurasi kuantifikasi dilakukan dengan penggabungan dua alat analisis massa yang dijalankan secara berurutan. Penggabungan kromatografi cair dengan spektrometri MS (LC–MS/MS) membantu dalam memisahkan analit yang diinginkan dari komponen matriks. Teknik ini meningkatkan sensitivitas dan ketepatan analisis, serta meningkatkan spesifisitas dengan memisahkan gangguan, seperti senyawa isobarik yang sulit dipisahkan (Clarke *et al.*, 2014). Salah satu kombinasi umum adalah penggunaan *Triple quadrupole mass spectrometers* (QQQ atau TQMS) dan *quadrupole time of flight* (QTOF) sebagai spektrometer massa tandem. TQMS terdiri dari dua alat analisis massa kuadropol (Q1 dan Q3) yang dipisahkan oleh sel tumbukan (q/Q2). Sementara Q1 dan Q3 berfungsi sebagai analis massa untuk memindai rentang massa atau memonitor ion dengan nilai m/z tertentu, sel tumbukan digunakan untuk mengfragmentasi ion prekursor yang diisolasi di Q1 dengan memberikan energi tumbukan tinggi menggunakan gas netral seperti argon, helium, atau nitrogen. TQMS dapat dioperasikan dalam empat mode berbeda, dilihat pada Gambar 9.



Gambar 9. Prinsip LC–MS/MS (Srividya, 2021)

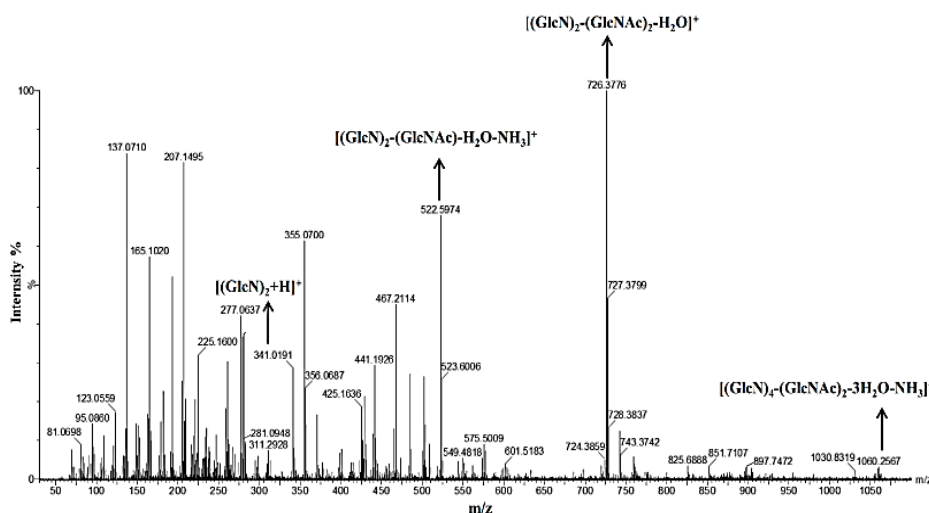
Pemindaian ion produk (*Product ion scan*) melibatkan penyesuaian Q1 untuk mengirim prekursor yang telah ditentukan sebelumnya (m/z) ke sel tumbukan, dan Q3 dipindai pada rentang massa untuk mengidentifikasi fragmen yang dihasilkan

dalam kondisi eksperimental. Sementara itu, Pemindaian ion prekursor (*Precursor ion scan*) melibatkan penggeseran pada rentang massa di kuadropol pertama (Q1) untuk menentukan prekursor ion produk tertentu dengan nilai m/z yang kemudian diamati di kuadropol terakhir (Q3). Kehilangan netral (*Neutral loss*) juga diamati dengan pemindaian Q1 dan Q3 untuk mengidentifikasi semua prekursor yang menghasilkan produk dengan menghilangkan spesies netral (tidak bermuatan) yang sama dari semua prekursor. Rentang pemindaian Q3 disesuaikan dengan nilai NL. Dalam pemantauan reaksi terpilih (*Selected reaction monitoring*), Q1 dan Q3 digunakan untuk memantau nilai m/z spesifik dari ion prekursor dan produk. Mode ini lebih disukai untuk kuantifikasi gabungan karena keunggulan dalam spesifisitas dan sensitivitas (Srividya, 2021).

Kuadropol ketiga dari triple quadrupole MS dapat digantikan oleh penganalisis TOF untuk menghasilkan spektrometer massa hibrid *quadrupole time-of-flight* (QTOF). Spektrometer massa QTOF terdiri dari dua komponen analisis massa, yaitu penganalisis massa kuadropol dan penganalisis massa waktu penerbangan yang dipisahkan oleh sel tumbukan. Instrumen QTOF telah umum digunakan dalam bidang proteomika, meskipun memiliki keterbatasan dalam kemampuan pemindaian dibandingkan dengan instrumen triple quadrupole (Li *et al.*, 2021).

Keunggulan LC-MS/MS terletak pada tingkat selektivitas analitis yang tinggi. Dalam analisis kuantitatif, sampel awalnya diolah melalui pengenceran atau penyucian untuk mengatasi kompleksitas matriks. Kemudian, sampel disuntikkan ke dalam sistem kromatografi cair. Eluen kromatografi cair yang membawa analit dimasukkan ke dalam sumber spektrometer massa, di mana ion fase gas dihasilkan. Penganalisis massa pertama menyaring ion yang masuk, membiarkan hanya ion prekursor untuk bergerak ke sel tumbukan. Di dalam sel tumbukan, ion prekursor diuraikan menjadi ion produk, yang kemudian dianalisis pada tahap terakhir spektrometer massa tandem. Hasil spektrum massa mencerminkan produksi ion, dan dengan memfokuskan pada pasangan ion prekursor/produk tertentu, analisis kuantitatif dapat dilakukan melalui teknik pemantauan reaksi terpilih (Thomas *et al.*, 2022).

Analisis LC-MS/MS yang mengacu pada penelitian Widyastuti *et al.*, (2022), senyawa COS menghasilkan spektrum MS/MS utama dengan puncak ion pada m/z 341 untuk $[(\text{GlcN})_2+\text{H}]^+$, m/z 522.5 untuk $[(\text{GlcN})_2-(\text{GlcNAc})-\text{H}_2\text{O}-\text{NH}_3]^+$, dan m/z 726 untuk $[(\text{GlcN})_2-(\text{GlcNAc})_2-\text{H}_2\text{O}]^+$. Selain itu, terdapat puncak ion pada m/z 1060 dengan pola $[(\text{GlcN})_4-(\text{GlcNAc})_2-3\text{H}_2\text{O}-\text{NH}_3]^+$. Pola terminasi berurutan antara oligomer yang dihasilkan dengan memutus satu unit GlcN dari ion induk, menghasilkan pola tipe ion B. Dalam spektrum MS/MS, dapat diamati kehilangan molekul NH_3 dan H_2O , atau kombinasi hilangnya dua gugus fungsi. Konfirmasi adanya asetilasi pada rantai kitoheksaosa yang diperoleh, yaitu kitoheksaosa. Selain itu, fraksi ionik pada m/z 1060 dengan puncak basa m/z 726 menjadi ciri utama $(\text{GlcN})_4-(\text{GlcNAc})_2-(\text{D4A2})$ di-N-asetilkitoheksosa.



Gambar 10. Analisis LC-MS/MS *Chitooligosaccharide* (Widyastuti *et al.*, 2022)

III. METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat Pelaksanaan Penelitian

Penelitian ini dilakukan dari bulan Januari hingga Juni 2024 di Unit Pelaksanaan Teknis Laboratorium Terpadu Sentra Inovasi dan Teknologi (UPT-LTSIT) dan laboratorium Biopolimer, Universitas Lampung. Kegiatan penelitian mencakup tahap preparasi sampel, analisis *Fourier Transform Infrared Spectrometer* (FTIR) di UPT LTSIT, Universitas Lampung dan analisis *Liquid Chromatography Mass Spectrometry/Mass Spectrometry* (LC-MS/MS), di Badan Reserse Kriminal POLRI, Pusat Laboratorium Forensik, Bogor.

3.2 Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini berupa alat-alat gelas meliputi gelas kimia, pipet tetes, Erlenmeyer, tabung reaksi, gelas ukur, cawan petri, batang pengaduk, mikropipet, pinset, gunting, *cutter*, *loop ose*, *Eppendorf tube*, botol vial, *96 well pelate*, oven, pembakar spiritus, plastik wrap, *hot pelate*, spatula logam, karet gelang, spidol, *autoclave* Tomy SX-700, neraca analitik Wigen Houser, *rotary evaporator* Buchii/R-210, *laminar air flow* ESCO, *incubator* Memmert-Germany/INC-02, mikroskop cahaya axio Zeiss A1, seperangkat alat Kromatografi Lapis Tipis (KLT) dengan pelat alumunium *silica gel* DC kielsel 60 F254, lampu UV Kohler/SN402006, kolom kaca, *Liquid Chromatography Mass Spectrometer/ Mass Spectrometry* (LC-MS/MS) ACQUITY UPLC® H-Class System (Waters, Beverly, MA, USA), ACQUITY UPLC® HSS C18 column (1.8

$\mu\text{m } 2.1 \times 100 \text{ mm}$) (Waters, Beverly, MA, USA), dan Xevo G2-S Qtof Mass Spectro (Waters, Beverly, MA, USA), dan FTIR (Agilent Technologies Cary 630, United States).

Bahan-bahan yang digunakan pada penelitian ini meliputi akuades, air laut buatan, kentang, agar swallow, dekstrosa, alkohol, antibiotik komersil (*ciprofloxacin*, *amoxicillin*, *amoxicillin clavulanic*, *chloramphenicol*, *eritromycin*, *lincomycin*, *cefradroxyl tetrahydrate*, *clindamycin*, *tiamphenicol*, dan *doxycylin*), metanol (MeOH) PA, etanol (EtOH) PA, alkohol 70%, isopropil alkohol (IPA) teknis, ammonia PA, Ninhydrin, *Potato Dextrose Broth* (PDB), *Potato Dextrose Agar* (PDA), *Tryptic Soya Broth* (TSB), *Tryptic Soya Agar* (TSA), *Mueller Hilton Broth* (MHB), dan *Mueller Hilton Agar* (MHA).

3.3 Prosedur Kerja

3.3.1 Preparasi sampel

Biomaterial kulit udang dikumpulkan dari Gudang Lelang, Teluk Betung Selatan, Bandar Lampung. Biomaterial kulit udang dibersihkan dengan air dan dipisahkan secara manual dari dagingnya yang tersisa. Setelah dipisahkan, sampel limbah kulit udang yang terkumpul dibersihkan kembali dengan air untuk menghilangkan partikel pengotor lainnya yang masih menempel. Kemudian, sampel limbah kulit udang bersih dihancurkan menggunakan blender dengan ukuran kurang lebih 1 mm dan disimpan pada desikator.

3.3.2 Pembuatan Media

Media yang digunakan pada penelitian ini berupa PDB, PDA, TSB, TSA, MHB, MHA, media inokulum, dan media koloid kitin. Pembuatan media tersebut dilakukan sebagai berikut:

3.3.2.1 Pembuatan Media PDB dan PDA

Pembuatan media PDB dan PDA dilakukan berdasarkan metode yang digunakan dalam penelitian Pan *et al.* (2023) dengan sedikit modifikasi. Proses dimulai dengan membersihkan kentang dari pengotor dan dipotong menjadi irisan tipis. 10% kentang yang sudah dipotong, direbus dalam 100 mL air laut dengan salinitas 30 ppt selama 30 menit untuk mengekstraksi nutrisinya, lalu didinginkan. Filtrat yang diperoleh ditambahkan dengan 2% gula *dextrose* dan diaduk hingga homogen untuk menghasilkan media PDB. Untuk media PDA ditambahkan 3% agar swallow ke dalam filtrat (PDB) dan dihomogenkan. 100mL media PDB maupun PDA dimasukkan ke dalam Erlenmeyer 250 mL, kemudian disterilisasi menggunakan *autoclave* pada suhu 121°C selama 15 menit. Setelah dingin, disimpan dalam oven pada suhu 60°C.

3.3.2.2 Pembuatan Media TSB dan TSA

Pembuatan media cair TSA dilakukan berdasarkan metode yang digunakan dalam penelitian Laila *et al.* (2023), dengan sedikit modifikasi. Proses dimulai dengan melarutkan 3% *Tryptic Soy Broth* (TSB) dalam 100 mL akuades pada 250 mL labu Erlenmeyer dan dihomogenkan untuk menghasilkan TSB. Pembuatan media TSA, 3% *nutrient agar* ditambahkan dalam filtrat (TSB) dan dipanaskan pada suhu 100°C selama 5 menit sampai homogen. Filtrat disterilisasi menggunakan *autoclave* pada suhu 121°C selama 15 menit. Media yang telah disterilisasi kemudian disimpan dalam oven pada suhu 60°C sebagai stok media.

3.3.2.3 Pembuatan Media MHB dan MHA

Pembuatan media MHA dilakukan berdasarkan metode yang digunakan dalam penelitian (Mustarichie *et al.*, 2020) dengan sedikit modifikasi. Mula-mula 3%

Muller Hilton (MH) dilarutkan dalam 100 mL akuades pada 250 mL labu Erlenmeyer dan dihomogenkan untuk menghasilkan MHB. Pembuatan media MHA dilakukan dengan menambahkan 3% *nutrient agar* ke dalam filtrat (MHB) dan dipanaskan pada suhu 100°C selama 5 menit sampai homogen. Filtrat disterilisasi menggunakan *autoclave* pada suhu 121°C selama 15 menit. Media yang telah disterilisasi kemudian disimpan dalam oven pada suhu 60°C sebagai stok media MHA.

3.3.2.4 Pembuatan Media Inokulum Bakteri Patogen

Pembuatan media inokulum mengacu pada penelitian (Abdel-moneim *et al.*, 2022) dengan sedikit modifikasi. Pembuatan media tersebut dilakukan dengan menginokulasikan bakteri patogen pada 3 mL media TSB dalam botol vial selama kurang lebih 2 jam.

3.3.2.5 Pembuatan Media Inokulum Isolat Fungi

Pembuatan media Inokulum Isolat Fungi dilakukan dengan menggunakan 1% kitin koloid cair dalam 100 mL air laut buatan pada labu Erlenmeyer 250 mL yang dipanaskan pada suhu 100°C sampai homogen. Filtrat disterilisasi menggunakan *autoclave* pada suhu 121°C. Filtrat diinokulasikan dengan isolat fungi dan diinkubasi selama 4 hari dalam kondisi statis (Setiawan *et al.*, 2022).

3.3.3 Peremajaan Fungi

Pada penelitian ini, digunakan Fungi yang diperoleh dari deposit UPT LTSIT yang telah diisolasi dari organisme laut meliputi *sponge* dan mangrove dengan kode 18A12-RF, 19A15-RF, 20BA0502-RF, 20CD01-RF, 21PLPIFI, dan 22RSM2, yang kemudian diremajakan pada media PDA (Diao *et al.*, 2023), dan

diinkubasi selama 4 hari. Hasil inkubasi dilakukan pengamatan secara visual meliputi warna miselium dan bentuk spora sebagai indikator pertumbuhan. Arti pengkodean dari isolat fungi tersebut dapat dilihat pada Lampiran 2.

3.3.4 Identifikasi Fungi

Identifikasi fungi dilakukan dengan menggoreskan isolat pada permukaan media PDA yang telah ditutupi 4 buah *cover slip* dengan sudut kemiringan $\pm 45^\circ$ pada cawan petri (Mc Clenny, 2005) dan diinkubasi selama 4 hari. Setelah tumbuh, diidentifikasi bentuk spora menggunakan mikroskop zeiss axio imager A1 pada perbesaran 100x (Yuliasuti *et al.*, 2019).

3.3.5 Kultivasi dan Ekstraksi *Chitooligosaccharide* (COS)

Penentuan isolat unggul dilakukan dengan mengkultivasi dari keenam isolat tersebut secara *Solid State Fermentation* (SSF) berdasarkan metode Setiawan *et al.*, (2021). Pembuatan media SSF dilakukan dengan menambahkan 50 g media kulit udang yang telah dihancurkan dan disterilisasi dengan menggunakan *autoclave*. Substrat tersebut dimasukkan dalam cawan petri dan ditambahkan masing-masing 20 mL inokulum isolat fungi. Kultur diinkubasi selama 4 hari pada temperatur $25^\circ\text{C}\pm 2^\circ\text{C}$ dan kondisi statis. Selanjutnya, diekstraksi menggunakan akuades pada temperatur $\pm 90^\circ\text{C}$. ekstrak yang didapat dipisahkan antara filtrat dan endapan menggunakan mesin sentrifus. Filtrat dipekatkan menggunakan *rotary evaporator* dan ditambahkan etanol anhidros (1:1 (v/v)), kemudian disentrifugasi kembali untuk diambil endapannya. Endapan yang diperoleh dilarutkan menggunakan akuades (Setiawan *et al.*, 2022). Ekstrak COS yang diperoleh dievaluasi bioaktivitas sebagai antibiotik dan antimikroba.

3.3.6 Uji Resistensi Antibiotik

Sebelum dilakukan skrining aktivitas antibakteri, dari isolat bakteri patogen *Staphylococcus aureus* dan *Pseudomonas aeruginosa* diuji ketahanan antibiotik terlebih dahulu menggunakan metode *broth microdilution* mengacu pada *Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)* (CLSI, 2020), dengan sedikit modifikasi. Mula-mula dipersiapkan 10 antibiotik komersil meliputi *ciprofloxacin*, *amoxicillin*, *amoxicillin clavulanic*, *chloramphenicol*, *eritromycin*, *lincomycin*, *cefradroxyl tetrahydrate*, *clindamycin*, *tiamphenicol*, dan *doxycylin*. Masing-masing antibiotik dipersiapkan pada stok 2 mg/mL dalam pelarut Aq MeOH. Sebanyak 100 mL media TSB dimasukan pada sumuran 96 well *plate*. Kemudian, sebanyak 100 mL sampel antibiotik dimasukan pada kolom 1 dan dilakukan dilusi hingga kolom 10 sehingga diperoleh dosis (1000 µg/mL-1,9 µg/mL). Setelah penambahan sampel antibiotik, dimasukan 100 mL inokulum bakteri patogen 5×10^5 CFU/mL. Kolom 11 merupakan kontrol negatif, dan kolom 12 merupakan blanko. *Plate* diinkubasi selama 18 jam dan dilakukan penambahan 0.002% resazurin sebanyak 50 µL ke dalam sumuran 96 well *plate*. Warna merah muda menandakan tidak adanya hambatan, dan warna ungu menandakan adanya hambatan pertumbuhan bakteri patogen (Setiawan *et al.*, 2021).

3.3.7 Skrining dan Uji Bioaktivitas Antimikroba

Sebelum diuji bioaktivitas antimikroba, semua ekstrak isolat diuji KLT terlebih dahulu untuk mengetahui pola degradasi yang menandakan adanya senyawa COS yang unggul dibandingkan dengan standar glukosamin. Ekstrak kasar diambil menggunakan pipa kapiler dan ditotolkan pada fase diam berupa pelat silica gel F₂₅₄ dengan fase gerak menggunakan campuran larutan Isopropil alkohol (IPA), air, dan 25% ammonia dengan perbandingan 7:2:1 (v/v/v) (Moon *et al.*, 2020). Selanjutnya, divisualisasi pereaksi ninhydrin (1% (w/v) dalam etanol) untuk mengetahui komponen asam-asam amino. Kemudian, diamati dan dihitung nilai

Rf masing-masing komponen untuk menentukan bioaktivitas antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Pseudomonas aeruginosa* serta antifungi terhadap *Malassezia globosa* dilakukan pengujian menggunakan metode difusi agar (Phongpaichit *et al.*, 2005, Hossain *et al.*, 2022). Sebanyak 25 mL media agar (MHA untuk antibakteri *Staphylococcus aureus*, TSA untuk antibakteri *Pseudomonas aerugin*, dan PDA untuk antifungi) dituangkan pada cawan petri steril dan ditunggu hingga mengeras. Kemudian digoreskan mikroba patogen (0.5 Mc Farland) secara merata pada media agar menggunakan *cotton swab* steril. Lalu dipasang ring uji pada media agar. Sebanyak 50 μ L sampel (10 mg/mL) dimasukkan ke dalam ring uji. Pada uji antibakteri, kontrol negatif berupa metanol 12,5% dan kontrol positif yaitu antibiotik *ciprofloxacin* (2 mg/mL). Sedangkan kontrol positif pada uji antifungi berupa *ketconazole* (10 mg/mL). Kemudian cawan diinkubasi selama 18 jam untuk antibakteri dan 24-48 jam untuk antifungi. Uji aktif ditandai dengan adanya zona bening (tidak adanya pertumbuhan bakteri) disekitaran ring uji (Afroz *et al.*, 2021)

3.3.8 Kultivasi (*Scale up*) dan Pemurnian Senyawa COS

Isolat penghasil COS dengan aktivitas terbaik dikultivasi secara besar sebanyak 200 g kulit udang dalam beberapa Erlenmeyer 2000 mL. Kemudian di ekstrak menggunakan air pada temperatur 100°C dan ekstrak dipekatkan dengan *rotary evaporator* pada 23 mbar. Ekstrak diendapkan menggunakan etanol anhidros (1:1 v/v) dan dimurnikan menggunakan beberapa tahapan metode kolom kromatografi seperti Kromatografi Lapis Tipis (KLT) dan kolom silica gel terbuka. Pada uji KLT, ekstrak kasar dipindahkan menggunakan pipa kapiler dan ditempatkan pada fase diam berupa pelat silica gel F₂₅₄, dengan fase gerak menggunakan campuran isopropil alkohol, air, dan 25% ammonia (7:2:1) (Moon *et al.*, 2020). Selanjutnya, divisualisasi pereaksi ninhidrin (1% w/v dalam etanol) untuk mengetahui komponen asam-asam amino yang terkandung dan diamati. Pemurnian lebih lanjut dilakukan menggunakan kromatografi kolom dengan kolom *silica gel*

terbuka pada isopropil alkohol, air dan 25% ammonia (15:2:1 (v/v/v)). Masing-masing fraksi yang diperoleh diuji aktivitasnya sebagai antimikroba.

3.3.9 Uji Aktifitas Antimikroba

Uji aktivitas antifungi dan antibakteri dilakukan secara berbeda. Uji aktivitas antifungi dilakukan dengan dipersiapkan inokulum terlebih dahulu pada media PDB sebanyak 3-5 mL, kemudian diencerkan hingga kekeruhan 0,5 McFarland ($1-5 \times 10^6$ CFU/mL) dan diencerkan (hingga $1-5 \times 10^5$ CFU/mL). Sumuran pertama (A1-A3) secara berurutan diisi dengan 100 μ L kontrol positif, kontrol negatif (A5-A7) dan ekstrak kasar COS (A9-A11). Pada sumuran 2 (B1-B7) dan 3 (C1-C7) secara berurutan ditambahkan 100 μ L sampel COS. Sumuran keempat (E1-E3) diisi dengan media PDB sebagai kontrol kontaminasi. Setelah itu, *plate* diinkubasi dan selama 24 jam pada uji antifungi suhu ruang (Krochma and Wicher, 2021). Setelah itu, ditambahkan 0.002% resazurin sebanyak 50 μ L pada masing-masing sumuran.

Pada uji antibakteri dilakukan menggunakan metode difusi agar (Phongpaichit *et al.*, 2005; Hossain *et al.*, 2022). Mula-mula disiapkan terlebih dahulu 3 mL inokulum bakteri patogen *Staphylococcus aureus* dalam media TSB dan *Pseudomonas aeruginosa* dalam media MHB. Selanjutnya, sebanyak 25 mL media MH agar dituangkan pada cawan petri steril dan ditunggu hingga mengeras. Inokulum bakteri patogen (0.5 Mc Farland) digoreskan secara merata pada media agar menggunakan *cotton swab* steril. Lalu dipasang ring uji pada media agar. Sebanyak 50 μ L sampel COS (10 mg/mL) dimasukkan ke dalam ring uji. Kontrol negatif berupa metanol 12,5% dan kontrol positif yaitu antibiotik *ciprofloxacin* (2 mg/mL). Kemudian, cawan diinkubasi selama 18 jam. Dilakukan secara duplo. Uji aktif ditandai dengan adanya zona bening (tidak adanya pertumbuhan bakteri) disekitaran ring uji (Afroz *et al.*, 2021).

3.3.10 Karakterisasi *Chitooligosaccharide*

Karakterisasi COS dilakukan dengan menggunakan *Fourier Transform Infrared* (FTIR dan *Liquid Chromatography Mass Spectrometry/Mass Spectrophotometer* (LC-MS/MS), yang dapat dilihat sebagai berikut:

3.3.10.1 *Fourier Transform Infrared* (FTIR)

Sampel COS yang dihasilkan dari konversi kulit udang dikarakterisasi menggunakan spektrofotometer *Fourier Transform Infrared* (FTIR) jenis Agilent Technologies Cary 630, United States digunakan untuk mengidentifikasi berbagai gugus fungsi dalam sampel dengan menganalisis spektrum serapan inframerah. *Scanning* dilakukan pada daerah frekuensi 4.000 cm^{-1} hingga 400 cm^{-1} (Kumari *et al.*, 2021). Spektrum yang dihasilkan dari karakterisasi menggunakan spektrofotometer FTIR kemudian diinterpretasi meliputi bilangan gelombang (cm^{-1}) dan transmitansinya (%) untuk mengidentifikasi gugus fungsi yang ada dalam sampel, serta mengevaluasi intensitas serapannya. Hasil dari pembacaan variasi masing-masing dibandingkan dengan spektrum standar untuk analisis perbandingan (Subamia dkk., 2023).

3.3.10.2 *Liquid Chromatography Mass Spectrometry/Mass Spectrophotometer* (LC-MS/MS)

Liquid Chromatography Mass Spectrometry/Mass Spectrophotometer (LC-MS/MS) digunakan untuk menentukan berat molekul dan pola fragmentasi senyawa. Dalam karakterisasi menggunakan LC-MS/MS, COS disuntikkan ke dalam kolom kromatografi. Fase gerak didorong ke kolom oleh pompa bertekanan tinggi dengan laju aliran yang dapat direproduksi. Elusi gradien umumnya digunakan saat komposisi fase gerak (persentase polar dengan non-polar) bervariasi selama proses, seperti waktu yang dibutuhkan untuk mengeluarkan

analit yang diinginkan, membersihkan kolom, dan kemudian menyeimbangkan kembali kolom (Thomas *et al.*, 2022).

V. SIMPULAN DAN SARAN

5.1 Simpulan

Berdasarkan pembahasan penelitian, maka dapat disimpulkan;

1. Isolat fungi dengan kode 18A12RF, 19A15RF, 20BA0502RF, 20CD01-RF, 21PLPIFI, dan 22RSM2 berpotensi dalam mendegradasi kulit udang menjadi senyawa COS dan glukosamin.
2. Isolat 18A12RF merupakan isolat unggul yang dapat mendegradasi kulit udang menjadi COS dengan waktu inkubasi 4 hari, dibuktikan dengan analisis KLT.
3. Karakterisasi produk hasil degradasi isolat 18A12RF menggunakan FTIR dan LCMS-MS mengindikasikan bahwa COS memiliki DP 7.
4. COS yang dihasilkan dari degradasi isolat 18A12RF dapat menghambat pertumbuhan mikroba patogen seperti *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, dan *Malassezia globosa* pada dosis 2 mg/mL.

5.2 Saran

Berdasarkan hasil penelitian, saran yang dapat diberikan pada penelitian selanjutnya adalah:

1. Perlu dilakukan pemurnian dengan sistem eluen yang tepat untuk menghasilkan senyawa COS yang lebih murni.
2. Perlu dilakukan analisis *Thermogravimetric Analysis* (TGA) dan *Differential Scanning Calorimetry* (DSC) untuk mengetahui sifat termal dari COS.

DAFTAR PUSTAKA

- Abdel-moneim, A. E., El-saadony, M. T., Shehata, A. M., Saad, A. M., Ali, S., Ouda, S. M., and Mesalam, N. M. (2022). Antioxidant and Antimicrobial Activities of *Spirulina pelatensis* Aextracts and Biogenic Selenium Nanoparticles Against Selected Pathogenic Bacteria and Fungi. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 29(2), 1197–1209. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2021.09.046>
- Afroz, M. M., Kashem, M. N. H., Piash, K. M. P. S., and Islam, N. (2021). *Saccharomyces Cerevisiae* as an Untapped Source of Fungal Chitosan for Antimicrobial Action. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 193(11), 3765–3786. <https://doi.org/10.1007/s12010-021-03639-0>
- Ahamed, M. I., and Prasad, R. (2022). *Application of Microbes in Environmental and Microbial Biotechnology*. Springer Nature Singapore. <https://books.google.co.id/books?id=LJpXEAAAQBAJ>
- Ahmad, A., Pulukadang, A. P., and Yusuf, A. (2021). Mushroom Activity Test *Rhizopusstolonifer* In Bread , Rice And Tempe That Cause Digestive. *Ilmiah Dr Aloe Saboe*, 8(02), 1–10.
- Alsya, B. I., Hidayat, C. F., Firliy, F., Alfi, M., Nugraha, and Febriyani, W. T. (2023). Analisis Hambatan Tarif dan Non-Tarif dalam ekspor Kulit Udang ke Amerika Serikat. *Jurnal Economina*, 2(2), 553–561.
- Anil, S. (2022). Potential Medical Applications of Chitooligosaccharides. *Polymers*, 14(17), 1–22. <https://doi.org/10.3390/polym14173558>
- Annur, C. M. (2022). Konsumsi Ikan dan Udang di Indonesia Meningkat, Capai Rekor pada 2021. *Katadata*, 2021. <https://databoks.katadata.co.id/datapublish/2022/10/10/konsumsi-ikan-dan-udang-di-indonesia-meningkat-capai-rekor-pada-2021>
- Asadpoor, M., Peeters, C., Henricks, P. A. J., Varasteh, S., Pieters, R. J., Folkerts, G., and Braber, S. (2020). Anti-pathogenic Functions of non-digestible Oligosaccharides in vitro. *Nutrients*, 12(6), 1–30. <https://doi.org/10.3390/nu12061789>

- Baars, O., and Perlman, D. H. (2016). Small Molecule LC-MS/MS Fragmentation Data Analysis and Application to Siderophore Identification. *Applications from Engineering with MATLAB Concepts*, 9, 191–214. <https://doi.org/10.5772/63018>
- Bahri, M. Z., Elfiati, D., Susilowati, A., and Amelia, R. (2023). Isolation and Identification of Cellulolytic Fungi Under *Swietenia macrophylla*, *Mimusops elengi*, and *Polyalthia longifolia* Stands at the Universitas Sumatera Utara campus, Indonesia. *Global Forest Journal*, 01(01), 11–18.
- Beygmoradi, A., Homaei, A., Hemmati, R., Santos-Moriano, P., Hormigo, D., and Fernández-Lucas, J. (2018). Marine Chitinolytic Enzymes, A Biotechnological Treasure Hidden in The Ocean? *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102(23), 9937–9948. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9385-7>
- Cao, P., Li, C., Wang, H., Yu, Z., Xu, X., Wang, X., Zhao, J., and Xiang, W. (2020). Community Structures and Antifungal Activity of Root-Associated Endophytic Actinobacteria in Healthy and Diseased Cucumber Plants and *Streptomyces* sp. HAAG3-15 as a Promising Biocontrol Agent. *Microorganisms*, 8(2), 1–18. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8020236>
- Casadidio, C., Peregrina, D. V., Gigliobianco, M. R., Deng, S., Censi, R., and Di Martino, P. (2019). Chitin and chitosans: Characteristics, Eco-friendly Processes, and Applications in COSmetic Science. *Marine Drugs*, 17(6), 1–30. <https://doi.org/10.3390/md17060369>
- Chambon, R., Despras, G., Brossay, A., Vauzeilles, B., Urban, D., Beau, J. M., Armand, S., Cottaz, S., and Fort, S. (2015). Efficient Chemoenzymatic Synthesis of Lipo-chitin oligosaccharides as Plant Growth Promoters. *Green Chemistry*, 17(7), 3923–3930. <https://doi.org/10.1039/c5gc00623f>
- Cheong, J. Y., Muskhazli, M., Nor Azwady, A. A., Ahmad, S. A., and Adli, A. A. (2020). Three Dimensional Optimisation for the Enhancement of Astaxanthin Recovery from Shrimp Shell Wastes by *Aeromonas hydrophila*. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 27(December 2019), 101649. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101649>
- Chimtung, S. (2018). Antibacterial Activity of Chito-oligosaccharides (COSS) from Shrimp Shells Wastes. *Advances in Plants and Agriculture Research*, 8(6), 392–394. <https://doi.org/10.15406/apar.2018.08.00356>
- Clarke, W., Molinaro, R., Bachmann, L., Botelho, J., Cao, Z., French, D., Garg, S., Gawoski, J., and Grant, R. (2014). C62-A Liquid Chromatography-Mass Spectrometry Methods; Approved Guideline. *Clinical and Laboratory Standards Institute*, 34(16), 1–13. www.clsi.org.

- CLSI. (2020). *M100 Performance Standards for Antimicrobial* (30th Ed.). Clinical and Laboratory Standards Institute.
- Côté, N., Fleury, A., Dumont-Blanchette, É., Fukamizo, T., Mitsutomi, M., and Brzezinski, R. (2006). Two exo- β -D-GluCOsaminidases/Exochitosanases from Actinomycetes Define a New Subfamily within Family 2 of GlyCOside Hydrolases. *Biochemical Journal*, 394(3), 675–686. <https://doi.org/10.1042/BJ20051436>
- Dhole, N. P., Dar, M. A., and Pandit, R. S. (2021). Recent Advances in the Bioprospection and Applications of Chitinolytic Bacteria for Valorization of aste chitin. *Archives of Microbiology*, 203(5), 1953–1969. <https://doi.org/10.1007/s00203-021-02234-5>
- Diao, Y., Jin, J., Xiong, X., Yu, C., Tian, Y., Li, D., and Liu, H. (2023). Transcription Factor VM1G_06867: A Requirement for Growth, Pathogenicity, Development, and Maintenance of Cell Wall Integrity in *Valsa mali*. *Journal of Fungi*, 9(6), 1–12. <https://doi.org/10.3390/jof9060692>
- Dukariya, G., and Kumar, A. (2020). Distribution and Biotechnological Applications of Chitinase: A Review. *International Journal of Biochemistry and Biophysics*, 8(2), 17–29. <https://doi.org/10.13189/ijbb.2020.080201>
- Dwivedi, C., Pandey, I., Pandey, H., Ramteke, P. W., Pandey, A. C., Mishra, S. B., and Patil, S. (2017). Electrospun Nanofibrous Scaffold as a Potential Carrier of Antimicrobial Therapeutics for Diabetic Wound Healing and Tissue Regeneration. In *Nano- and Microscale Drug Delivery Systems: Design and Fabrication*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-52727-9.00009-1>
- El-Sayed, S. T., Ali, A. M., El-Sayed, E. S. M., Shousha, W. G., and Omar, N. I. (2017). Characterization and Potential Antimicrobial Effect of Novel Chitooligosaccharides Against Pathogenic Microorganisms. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 7(6), 006–012. <https://doi.org/10.7324/JAPS.2017.70602>
- Farag, A. M., Abd-Elnabey, H. M., Ibrahim, H. A. H., and El-Shenawy, M. (2016). Purification, Characterization and Antimicrobial Activity of Chitinase from Marine-derived *Aspergillus terreus*. *Egyptian Journal of Aquatic Research*, 42(2), 185–192. <https://doi.org/10.1016/j.ejar.2016.04.004>
- Fu, X., Guo, Y., Jin, Y., and Ma, M. (2020). Bioconversion of chitin waste using a cold-adapted chitinase to produce chitin oligosaccharides. *LWT - Food Science and Technology*, 133(June), 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109863>
- Gauba, A., and Rahman, K. M. (2023). Evaluation of Antibiotic Resistance Mechanisms in Gram-Negative Bacteria. *Antibiotics*, 12(11), 1–30. <https://doi.org/10.3390/antibiotics12111590>

- Goncalves, C., Ferreira, N., and Lourenco, L. (2021). Production of Low Molecular Weight Chitosan and Chitooligosaccharides (COS): A Review. *Polymers*, *13*(15), 1–23. <https://doi.org/10.3390/polym13152466>
- Guan, G., Abul Kalam Azad, M., Lin, Y., Kim, S. W., Tian, Y., Liu, G., and Wang, H. (2019). Biological Effects and Applications of Chitosan and Chitooligosaccharides. *Frontiers in Physiology*, *10*(516), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fphys.2019.00516>
- Hasan, M., Nazar, M., Utami, A., Khairani, C. P., Nafilah, F., Parma, R., Tasya, G., Ramdani, S., and Tuddin, H. (2022). *Bioplastik untuk pengemasan Makanan Berbasis Pati dan Kitosan*. BANDAR PUBLISHING. <https://books.google.co.id/books?id=7PukEAAAQBAJ>
- Hasan, S., Anwar, Z., Khalid, W., Afzal, F., Zafar, M., Ali, U., Refai, M. Y., Afifi, M., AL-Farga, A., and Aljobair, M. O. (2023). Laccase Production from Local Biomass Using Solid State Fermentation. *Fermentation*, *9*(2), 1–20. <https://doi.org/10.3390/fermentation9020179>
- Hauzan Arifin, M., Suyatma, N. E., and Indrasti, D. (2022). Karakterisasi Kitoooligosakarida yang Didepolimerisasi dengan Metode Berbeda dan Kajiannya sebagai Active Film. *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*, *25*(1), 18–33. <https://doi.org/10.17844/jphpi.v25i1.39632>
- Heggset, E. B., Dybvik, A. I., Hoell, I. A., Norberg, A. L., Sørli, M., Eijsink, V. G. H., and Vårum, K. M. (2010). Degradation of Chitosans with A Family 46 Chitosanase from streptomyces coelicolor A3(2). *Biomacromolecules*, *11*(9), 2487–2497. <https://doi.org/10.1021/bm1006745>
- Hidayat, N., and Putri, A. I. (2016). *Mikologi Industri*. Universitas Brawijaya Press. <https://books.google.co.id/books?id=BqZPDwAAQBAJ>
- Hossain, M. L., Lim, L. Y., Hammer, K., Hettiarachchi, D., and Locher, C. (2022). A Review of Commonly Used Methodologies for Assessing the Antibacterial Activity of Honey and Honey Products. *Antibiotics*, *11*(7), 1–17d. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11070975>
- Jamwal, R., Amit, Kumari, S., Sharma, S., Kelly, S., Cannavan, A., and Singh, D. K. (2021). Recent Trends in The Use of FTIR Spectroscopy Integrated with Chemometrics for The Detection of Edible Oil Adulteration. *Vibrational Spectroscopy*, *113*(1), 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.vibspec.2021.103222>
- Jennessen, J., Schnürer, J., Olsson, J., Samson, R. A., and Dijksterhuis, J. (2008). Morphological Characteristics Of Sporangiospores Of The Tempe Fungus Rhizopus Oligosporus Differentiate It From Other Taxa Of The R. microsporus Group. *Mycological Research*, *112*(5), 547–563. <https://doi.org/10.1016/j.mycres.2007.11.006>

- Jia, L., Qi, W., Wang, K., Yuan, Z., Kang, H., Hou, J., Li, Q., Lu, F., and Liu, Y. (2023). Efficient Bioconversion of Chitinous Waste to N-Acetylchitobiose and N-Acetylglucosamine Using a Novel Salt-Tolerant Chitinase from *Bacillus clausii*. *ACS Sustainable Chemistry and Engineering*, *11*(31), 11470–11481. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.3c01291>
- Jimenez, M. A. L., and Martinez, R. H. (2017). Solid-state Fermentation (SSF): Diversity of Applications to Valorize Waste and Biomass. *Biotech*, *7*(44), 1–9. <https://doi.org/10.1007/s13205-017-0692-y>
- Junianto, Ivanna, S. T., Muhammad, R. S., and Intan, U. F. (2021). Article Review : Chitin Extraction from Shrim Shells. *Global Scientific Journals*, *9*(5), 2009–2018.
- Kaczmarek, M. B., Struszczyk-Swita, K., Li, X., Szczęśna-Antczak, M., and Daroch, M. (2019). Enzymatic Modifications of Chitin, Chitosan, and Chitooligosaccharides. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, *7*(SEP), 1–26. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2019.00243>
- Kang, J.-S. (2012). Principles and Applications of LC-MS/MS for the Quantitative Bioanalysis of Analytes in Various Biological Samples. In J. K. Prasain (Ed.), *Tandem Mass Spectrometry*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/32085>
- Kharb, S. (2021). General Lab Techniques. In *Mind Maps in Clinical Chemistry (Part II)*. LibreTexts. <https://doi.org/10.2174/9789814998758121010012>
- Khattak, S., Wahid, F., Liu, L.-P., Jia, S.-R., Chu, L.-Q., Xie, Y.-Y., Li, Z.-X., and Zhong, C. (2019). Applications of Cellulose and Chitin/Chitosan Derivatives and Composites as Antibacterial Materials: Current State and Perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *103*(5), 1989–2006. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-09602-0>
- KKP. (2023). Statistik KKP: Data Produksi Udang. In *Statistik.Kkp.Go.Id*. https://statistik.kkp.go.id/home.php?m=prod_ikan_provandi=2#panel-footer-kpda
- Krochma, B. K., and Wicher, R. D. (2021). The Minimum Inhibitory Concentration of Antibiotics: Methods, Interpretation, Clinical Relevance. *Pathogens*, *10*(2), 1–21. <https://doi.org/10.3390/pathogens10020165>
- Kumari, N., Bangar, S. P., Petru, M., Ilyas, R. A., Singh, A., and Kumar, P. (2021). Development and characterization of fenugreek protein-based edible film. *Foods*, *10*(9), 1–13. <https://doi.org/10.3390/foods10091976>
- Lacombe-Harvey, M. È., Brzezinski, R., and Beaulieu, C. (2018). Chitinolytic Functions in Actinobacteria: Ecology, Enzymes, and Evolution. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *102*(17), 7219–7230. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9149-4>

- Lade, B. D., Patil, A. S., Paikrao, H. M., Kale, A. S., and Hire, K. K. (2014). A Comprehensive Working Principles and Applications of Thin Layer Chromatography. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*, 5(4), 486–503.
- 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., and Hendri, J. (2023). Exploration and Biorefinery Antimicrobial Agent through Solid State Fermentation from Indonesia's Marine Actinomycetes. *Fermentation*, 9(4). <https://doi.org/10.3390/fermentation9040334>
- Li, C., Chu, S., Tan, S., Yin, X., Jiang, Y., Dai, X., Gong, X., Fang, X., and Tian, D. (2021). Towards Higher Sensitivity of Mass Spectrometry: A Perspective From the Mass Analyzers. *Frontiers in Chemistry*, 9(December), 1–21. <https://doi.org/10.3389/fchem.2021.813359>
- Li, Y., Li, C., Muhammad Aqeel, S., Wang, Y., Zhang, Q., Ma, J., Zhou, J., Li, J., Du, G., and Liu, S. (2023). Enhanced Expression of Xylanase in *Aspergillus niger* Enabling A Two-step Enzymatic Pathway for Extracting β -glucan from Oat Bran. *Bioresource Technology*, 377(128962), 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2023.128962>
- Liang, S., Sun, Y., and Dai, X. (2018). A review of the Preparation, Analysis and Biological Functions of Chitooligosaccharide. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(8), 1–19. <https://doi.org/10.3390/ijms19082197>
- Liaquat, F., and Eltem, R. (2018). Chitooligosaccharides and Their Biological Activities: A Comprehensive Review. *Carbohydrate Polymers*, 184(December 2017), 243–259. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.12.067>
- Lin, C., Luan, F., Su, S., Jiang, A., Tan, W., and Guo, Z. (2023). Water-soluble Fluorine-functionalized Chitooligosaccharide Derivatives: Synthesis, Characterization and Antimicrobial Activity. *Carbohydrate Research*, 533(September 2023), 108935. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2023.108935>
- Lin, L., Zhang, T., and Xu, J. (2023). Genetic and Environmental Factors Influencing the Production of Select Fungal Colorants: Challenges and Opportunities in Industrial Applications. *Journal of Fungi*, 9(5). <https://doi.org/10.3390/jof9050585>
- Liu, Z., Liu, Q., Zhang, D., Wei, S., Sun, Q., Xia, Q., Shi, W., Ji, H., and Liu, S. (2021). Comparison of the Proximate Composition and Nutritional Profile of Byproducts and Edible Parts of Five Species of Shrimp. *Foods*, 10(11), 1–16. <https://doi.org/10.3390/foods10112603>

- Lodhi, G., Kim, Y. S., Hwang, J. W., Kim, S. K., Jeon, Y. J., Je, J. Y., Ahn, C. B., Moon, S. H., Jeon, B. T., and Park, P. J. (2014). Chitooligosaccharide and its Derivatives: Preparation and Biological Applications. *BioMed Research International*, 2014, 1–13. <https://doi.org/10.1155/2014/654913>
- Lübeck, M., and Lübeck, P. S. (2022). Fungal Cell Factories for Efficient and Sustainable Production of Proteins and Peptides. *Microorganisms*, 10(4), 1–24. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10040753>
- Luo, Q., Wang, Y., Han, Q., Ji, L., Zhang, H., Fei, Z., and Wang, Y. (2019). Comparison of The Physicochemical, Rheological, and Morphologic Properties of Chitosan from Four Insects. *Carbohydrate Polymers*, 209(January 2019), 266–275. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.01.030>
- Mahata, M., Shinya, S., Masaki, E., Yamamoto, T., Ohnuma, T., Brzezinski, R., Mazumder, T. K., Yamashita, K., Narihiro, K., and Fukamizo, T. (2014). Production of Chitooligosaccharides from *Rhizopus oligosporus* NRRL2710 Cells by Chitosanase Digestion. *Carbohydrate Research*, 383, 27–33. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2013.06.002>
- Mattedi, A., Sabbi, E., Farda, B., Djebaili, R., Mitra, D., Ercole, C., Cacchio, P., Del Gallo, M., and Pellegrini, M. (2023). Solid-State Fermentation: Applications and Future Perspectives for Biostimulant and Biopesticides Production. *Microorganisms*, 11(6), 2–22. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11061408>
- McClenny, N. (2005). Laboratory Detection and Identification of *Aspergillus* Species by Microscopic Observation and Culture: The Traditional Approach. *Medical Mycology : Official Publication of the International Society for Human and Animal Mycology*, 43(1), 125–138. <https://doi.org/10.1080/13693780500052222>
- Mei, Y. xia, Chen, H. xia, Zhang, J., Zhang, X. dan, and Liang, Y. xiang. (2013). Protective Effect of Chitooligosaccharides Against Cyclophosphamide Induced Immunosuppression in Mice. *International Journal of Biological Macromolecules*, 62, 330–335. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2013.09.038>
- Mishra, P., Durgbanshi, A., and Pawar, R. P. (2017). Screening of Antituberculosis Drugs by Thin Layer Chromatography. *Asian Journal of Chemistry*, 29(7), 1583–1586. <https://doi.org/10.14233/ajchem.2017.20590>
- Moon, C., Seo, D. J., Song, Y. S., and Jung, W. J. (2020). Antibacterial Activity of Various Chitosan Forms Against *Xanthomonas Axonopodis* Pv. *Glycines*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 156, 1600–1605. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.11.211>

- Muanprasat, C., and Chatsudthipong, V. (2017). Chitosan Oligosaccharide: Biological Activities and Potential Therapeutic Applications. *Pharmacology and Therapeutics*, 170, 80–97. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2016.10.013>
- Mustafiah, M., Darnengsih, D., Sabara, Z., and Abdul Majid, R. (2018). Pemanfaatan Kitosan dari Limbah Kulit Udang sebagai Koagulan Penjernihan Air. *Journal Of Chemical Process Engineering*, 3(1), 21. <https://doi.org/10.33536/jcpe.v3i1.190>
- Mustarichie, R., Sulistyarningsih, S., and Runadi, D. (2020). Antibacterial Activity Test of Extracts and Fractions of Cassava Leaves (*Manihot esculenta* Crantz) against Clinical Isolates of *Staphylococcus epidermidis* and *Propionibacterium acnes* Causing Acne. *International Journal of Microbiology*, 2020(8472), 1–9. <https://doi.org/10.1155/2020/1975904>
- Ngasotter, S., Xavier, K. A. M., Meitei, M. M., Waikhom, D., Madhulika, Pathak, J., and Singh, S. K. (2023). Crustacean Shell Waste Derived Chitin and Chitin Nanomaterials for Application in Agriculture, Food, and Health: A Review. *Carbohydrate Polymer Technologies and Applications*, 6, 1–24. <https://doi.org/10.1016/j.carpta.2023.100349>
- Nguyen, T. L. A., and Bhattacharya, D. (2022). Antimicrobial Activity of Quercetin : An Approach to Its. *Molecules*, 27(2494), 1–13.
- Nguyen, T. T. H., Vuong, T. Q., Han, H. Le, Li, Z., Lee, Y. J., Ko, J., Nedashkovskaya, O. I., and Kim, S. G. (2023). Three Marine Species of The Genus *Fulvivirga* , Rich Sources of Carbohydrate - Active Enzymes Degrading Alginate , Chitin , Laminarin , Starch , and Xylan. *Scientific Reports*, 13, 1–16. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-33408-4>
- Oliveira, E. N., El Gueddari, N. E., Moerschbacher, B. M., Peter, M. G., and Franco, T. T. (2008). Growth of Phytopathogenic Fungi in The Presence of Partially Acetylated Chitooligosaccharides. *Mycopathologia*, 166(3), 163–174. <https://doi.org/10.1007/s11046-008-9125-0>
- Oshina, I., and Spigulis, J. (2021). Beer – Lambert Law for Optical Tissue Diagnostics : Current State of the Art and the Main Limitations. *Biomedical Optics*, 26(October), 1–17. <https://doi.org/10.1117/1.JBO.26.10.100901>
- Oyeleye, A., and Normi, Y. M. (2018). Chitinase: Diversity, Limitations, and Trends in Engineering for Suitable Applications. *Bioscience Reports*, 38(4), 1–21. <https://doi.org/10.1042/BSR20180323>
- Paulussen, C., Hallsworth, J. E., Álvarez-Pérez, S., Nierman, W. C., Hamill, P. G., Blain, D., Rediers, H., and Lievens, B. (2017). Ecology of Aspergillosis: Insights into The Pathogenic Potency of *Aspergillus fumigatus* and Some other *Aspergillus* species. *Microbial Biotechnology*, 10(2), 296–322. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12367>

- Phongpaichit, S., Pujenjob, N., Rukachaisirikul, V., and Ongsakul, M. (2005). Antimicrobial Activities of The Crude Methanol Extract of *Acorus calamus* Linn. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, 27(December 2004), 517–523.
- Piekarska, K., Sikora, M., Owczarek, M., Józwiak-Pruska, J., and Wiśniewska-Wrona, M. (2023). Chitin and Chitosan as Polymers of the Future—Obtaining, Modification, Life Cycle Assessment and Main Directions of Application. *Polymers*, 15(4), 1–31. <https://doi.org/10.3390/polym15040793>
- Pinteac, R., Montalban, X., and Comabella, M. (2021). Chitinases and Chitinase Like Proteins as Biomarkers in Neurologic Disorders. *Neurology, Neuroimmunology and Neuroinflammation*, 8(1), 1–14. <https://doi.org/10.1212/NXI.0000000000000921>
- Poria, V., Rana, A., Kumari, A., Grewal, J., Pranaw, K., and Singh, S. (2021). Current Perspectives on Chitinolytic Enzymes and Their Agro-industrial Applications. *Biology*, 10(12), 1–20. <https://doi.org/10.3390/biology10121319>
- Purwanto, E., Marmansari, D., Sari, D. K. and, and Hatta, M. (2019). Jurnal Riset Veteriner Indonesia. *Jurnal Riset Veteriner Indonesia*, 3(2), 56–60.
- Reynolds, D., and Kollef, M. (2021). The Epidemiology and Pathogenesis and Treatment of *Pseudomonas aeruginosa* Infections: An Update. *Drugs*, 81(18), 2117–2131. <https://doi.org/10.1007/s40265-021-01635-6>
- Sanduri, A., Bora, S., Muthyala, A., Chandravathi, T., Yadala, R., Lakshman, M., Anwesh, Y., and Gurram, S. (2023). Incidence of Aspergillosis in Different Avian Species. *Indian Journal of Veterinary Pathology*, 47(4), 361–364. <https://doi.org/10.5958/0973-970x.2023.00065.2>
- Santiago, M., and Strobel, S. (2013). Thin layer chromatography. In *Methods in Enzymology* (1st ed., Vol. 533). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-420067-8.00024-6>
- Setiawan, A., Lutfiah, R., Juliasih, N. L. G. R., Setiawan, W. A., Hendri, J., and Arai, M. (2022). Antibacterial Activity of EtOAc Extract from Marine-Derived Fungus *Aspergillus nomiae* A12-RF Against Clinical Pathogen Bacteria, *Staphylococcus aureus*. *AAFL Bioflux*, 15(3), 1413–1421.
- Setiawan, A., Setiawan, F., Juliasih, N. L. G. R., Widyastuti, W., Laila, A., Setiawan, W. A., Djailani, F. M., Mulyono, M., Hendri, J., and Arai, M. (2022). Fungicide Activity of Culture Extract from *Kocuria palustris* 19C38A1 against *Fusarium oxysporum*. *Journal of Fungi*, 8(280), 1–11. <https://doi.org/10.3390/jof8030280>

- Setiawan, A., Widyastuti, Irawan, A., Wijaya, O. S., Laila, A., Setiawan, W. A., Juliasih, N. L. G. R., Nonaka, K., Arai, M., and Hendri, J. (2021). Solid State Fermentation of Shrimp Shell Waste Using *Pseudonocardia carboxydivorans* 18a13o1 to Produce Bioactive Metabolites. *Fermentation*, 7(4), 1–10. <https://doi.org/10.3390/fermentation7040247>
- Setiawan, F. (2022). *Isolasi Dan Karakterisasi Senyawa Bioaktif Hasil Fermentasi Aktinomisetes Asosiasi Biota Laut Sebagai Fungisida*. [http://digilib.unila.ac.id/64940/%0Ahttp://digilib.unila.ac.id/64940/3/TESIS TANPA BAB PEMBAHASAN.pdf](http://digilib.unila.ac.id/64940/%0Ahttp://digilib.unila.ac.id/64940/3/TESIS%20TANPA%20BAB%20PEMBAHASAN.pdf)
- Sharma, S. K., Verma, D. S., Khan, L. U., Kumar, S., and Khan, S. B. (2018). Handbook of Materials Characterization. In *Springer International* (Issue July 2020). American. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-92955-2>
- Shoab, M., Aqib, A. I., Muzammil, I., Majeed, N., Bhutta, Z. A., Kulyar, M. F. e. A., Fatima, M., Zaheer, C. N. F., Muneer, A., Murtaza, M., Kashif, M., Shafqat, F., and Pu, W. (2023). MRSA Compendium of Epidemiology, Transmission, Pathophysiology, Treatment, and Prevention within one Health Framework. *Frontiers in Microbiology*, 13(January), 1–30. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.1067284>
- Srividya, K. (2021). Analysis and LC-MS / MS. *Technology Networks, LC-MS*, 1–16.
- Subamia, I. D. P., Widiasih, N. N., Sri Wahyuni, I. G. A. N., and Pratami Kristiyanti, P. L. (2023). Optimasi Kinerja Alat Fourier Transform Infrared (FTIR) Melalui Studi Perbandingan Komposisi dan Ketebalan Sampel-KBr. *Jurnal Pengelolaan Laboratorium Pendidikan*, 5(2), 58–69. <https://doi.org/10.14710/jplp.5.2.58-69>
- Summa, D., Lanzoni, M., Castaldelli, G., Fano, E. A., and Tamburini, E. (2022). Trends and Opportunities of Bivalve Shells' Waste Valorization in a Prospect of Circular Blue Bioeconomy. *Resources*, 11(5), 1–16. <https://doi.org/10.3390/resources11050048>
- Suryadi, Y., Priyatno, T. P., Susilowati, D. N., Samudra, I. M., Yudhistira, N., and Purwakusumah, E. D. (2013). Isolasi dan Karakterisasi Kitinase asal *Bacillus cereus* 11 UJ (Isolation and Chitinase Characterization of *Bacillus cereus* 11 UJ). *Jurnal Biologi Indonesia*, 9(1), 51–62.
- Suryawanshi, N., and Eswari, J. S. (2022). Purification and Characterization of Chitinase Produced by Thermophilic Fungi *Thermomyces lanuginosus*. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 52(9), 1087–1095. <https://doi.org/10.1080/10826068.2022.2028639>

- Thomas, S. N., French, D., Jannetto, P. J., Rappold, B. A., and Clarke, W. A. (2022). Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry for Clinical Diagnostics. *Nature Reviews Methods Primers*, 2(1), 1–14. <https://doi.org/10.1038/s43586-022-00175-x>
- Varun, T. K., Senani, S., Kumar, N., Gautam, M., Gupta, R., and Gupta, M. (2017). Extraction and characterization of chitin, chitosan and chitooligosaccharides from crab shell waste. *Indian Journal of Animal Research*, 51(6), 1066–1072. <https://doi.org/10.18805/ijar.v0iOF.8456>
- Widyastuti, W., Setiawan, F., Al Afandy, C., Irawan, A., Laila, A., Juliasih, N. L. G. R., Setiawan, W. A., Arai, M., Hendri, J., and Setiawan, A. (2022). Antifungal Agent Chitooligosaccharides Derived from Solid-State Fermentation of Shrimp Shell Waste by *Pseudonocardia antitumoralis* 18D36-A1. *Fermentation*, 8(8), 1–11. <https://doi.org/10.3390/fermentation8080353>
- Xing, R., Xu, C., Gao, K., Yang, H., Liu, Y., Fan, Z., Liu, S., Qin, Y., Yu, H., and Li, P. (2021). Characterization of Different Salt forms of Chitooligosaccharides and Their Effects on Nitric Oxide Secretion by Macrophages. *Molecules*, 26(9), 1–17. <https://doi.org/10.3390/molecules26092563>
- Yan, D., Li, Y., Liu, Y., Li, N., Zhang, X., and Yan, C. (2021). Antimicrobial Properties of Chitosan and Chitosan Derivatives in The Treatment of Enteric Infections. *Molecules*, 26(23), 1–27. <https://doi.org/10.3390/molecules26237136>
- Yang, X., Lan, W., and Sun, X. (2023). Antibacterial and Antioxidant Properties of Phenolic Acid Grafted Chitosan and its Application in Food Preservation: A Review. *Food Chemistry*, 428(June), 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2023.136788>
- Yanuhar, U., and Caesar, N. R. (2020). *Penyakit Virulogik pada Ikan*. Universitas Brawijaya Press. <https://books.google.co.id/books?id=GkADEAAAQBAJ>
- Yuliasuti, E., Kusdawarti, R., and Sudarno. (2019). The Prevalence of Fungi on Groupers (*Epinephelus* sp.) in Cage Mariculture Systems of The Northern Coast of Surabaya, East Java. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 236(1), 1–5. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/236/1/012007>