

**AKTIVITAS ANTIBAKTERI DAN ANTIKANKER KITOSAN DAN
SENYAWA METABOLIT SEKUNDER FUNGI DARI ISOLAT 19A15-RF
MENGUNAKAN METODE FERMENTASI**

(Tesis)

Oleh

**LARASATI GADIS ERMADI
NPM 2327011003**



**PROGRAM STUDI MAGISTER KIMIA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS LAMPUNG
BANDAR LAMPUNG
2025**

**AKTIVITAS ANTIBAKTERI DAN ANTIKANKER KITOSAN DAN
SENYAWA METABOLIT SEKUNDER FUNGI DARI ISOLAT 19A15-RF
MENGUNAKAN METODE FERMENTASI**

Oleh

LARASATI GADIS ERMADI

Tesis

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

Pada

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



**PROGRAM STUDI MAGISTER KIMIA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS LAMPUNG
BANDAR LAMPUNG
2025**

ABSTRAK

AKTIVITAS ANTIBAKTERI DAN ANTIKANKER KITOSAN DAN SENYAWA METABOLIT SEKUNDER FUNGI DARI ISOLAT 19A15-RF MENGUNAKAN METODE FERMENTASI

Oleh

LARASATI GADIS ERMADI

Produksi kitosan dari limbah krustasea menghadapi tantangan keberlanjutan dan isu lingkungan, sehingga diperlukan sumber alternatif yang lebih ramah lingkungan. Fungi laut, terutama mikroba yang berasosiasi dengan sponge, berpotensi sebagai penghasil kitosan dan metabolit bioaktif. Penelitian ini bertujuan untuk mengeksplorasi potensi isolat unggul 19A15-RF, jenis *Aspergillus ochraceus* asal perairan Gorontalo, Indonesia, dalam menghasilkan kitosan dan senyawa metabolit sekunder melalui dua metode fermentasi: terendam/ *Submerged Fermentation* (SmF) dan padat/*Solid-State Fermentation* (SSF). Produk hasil fermentasi dikarakterisasi menggunakan *Fourier Transform Infrared Spectroscopy* (FTIR) dan *Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry* (LC-MS/MS), serta divalidasi secara kualitatif melalui analisis Kromatografi Lapis Tipis (KLT). Uji aktivitas antibakteri dilakukan terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Pseudomonas aeruginosa* menggunakan metode difusi agar, sementara uji aktivitas antikanker terhadap sel A549 (kanker paru-paru), HeLa (kanker serviks), dan MCF-7 (kanker payudara) dilakukan dengan metode *Methyl Thiazolyl Tetrazolium* (MTT). Rendemen kitosan yang diperoleh sebesar 75,25% (SmF) dan 75,21% (SSF). Pada uji antibakteri, kitosan SmF menghasilkan zona hambat sebesar 17 mm terhadap *S. aureus* dan 10 mm terhadap *P. aeruginosa*, sedangkan kitosan SSF masing-masing sebesar 13 mm dan 8 mm. Aktivitas antikanker tertinggi terlihat pada metabolit yaitu hasil SSF yang mengandung β -sitosterol-D-glukosida terhadap sel kanker MCF-7 (55,99%), sedangkan kitosan yaitu hasil SmF lebih aktif terhadap sel A549 (21%) dan HeLa (18%). Kebaruan penelitian ini terletak pada eksplorasi isolat laut 19A15-RF sebagai sumber kitosan dan metabolit bioaktif yang berpotensi sebagai agen antibakteri dan antikanker. Temuan ini membuka peluang pemanfaatan biodiversitas laut Indonesia untuk pengembangan bahan bioaktif yang berkelanjutan.

Kata kunci: Kitosan fungi, metabolit sekunder, fermentasi, antibakteri, antikanker

ABSTRACT

ANTIBACTERIAL AND ANTICANCER ACTIVITY OF CHITOSAN AND FUNGAL SECONDARY METABOLITE COMPOUNDS FROM 19A15-RF ISOLATES USING FERMENTATION METHOD

By

LARASATI GADIS ERMADI

Chitosan production from crustacean waste faces sustainability and environmental challenges, making alternative, more eco-friendly sources necessary. Marine fungi, particularly sponge-associated microbes, have the potential to produce both chitosan and bioactive metabolites. This study aims to explore the potential of the superior isolate 19A15-RF, a strain of *Aspergillus ochraceus* originating from the waters of Gorontalo, Indonesia, in producing chitosan and secondary metabolite compounds through two fermentation methods: submerged fermentation (SmF) and solid-state fermentation (SSF). The fermented products were characterized using Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) and Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS), and qualitatively validated through Thin Layer Chromatography (TLC) analysis. Antibacterial activity tests were performed against *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* using the agar diffusion method, while anticancer activity was tested on A549 (lung cancer), HeLa (cervical cancer), and MCF-7 (breast cancer) cell lines using the Methyl Thiazolyl Tetrazolium (MTT) assay. The chitosan yields obtained were 75.25% (SmF) and 75.21% (SSF). In the antibacterial tests, SmF-derived chitosan produced inhibition zones of 17 mm against *S. aureus* and 10 mm against *P. aeruginosa*, while SSF-derived chitosan produced zones of 13 mm and 8 mm, respectively. The highest anticancer activity was observed in the SSF-derived metabolite containing β -sitosterol-D-glucoside, which showed 55.99% inhibition against MCF-7 cells. Meanwhile, SmF-derived chitosan showed greater activity against A549 (21%) and HeLa (18%) cells. The novelty of this research lies in the exploration of marine isolate 19A15-RF as a source of chitosan and bioactive metabolites with potential antibacterial and anticancer properties. These findings open new opportunities for utilizing Indonesia's marine biodiversity in the sustainable development of bioactive materials.

Keywords: Chitosan fungi, secondary metabolites, fermentation, antibacterial, anticancer

Judul : Aktivitas Antibakteri dan Antikanker Kitosan dan Senyawa Metabolit Sekunder Fungi dari Isolat 19A15-RF menggunakan Metode Fermentasi

Nama : Larasati Gadis Ermadi

Nomor Pokok Mahasiswa : 2327011003

Jurusan : Magister Kimia

Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

MENYETUJUI
1. Komisi Pembimbing

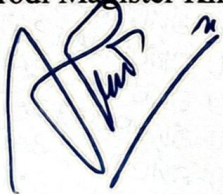


Prof. Drs. John Hendri, M.S., Ph.D.
NIP. 195810211987031001



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

2. Ketua Prodi Magister Kimia FMIPA



Prof. Dr. Ilim, M.S.
NIP. 196505251990032002

MENGESAHKAN

1. Tim Penguji

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

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

Anggota 1 : Prof. Dr. Buhani, M.Si.

Anggota 2 : Dr. Eng. Heri Satria, S.Si., M.Si.

Anggota 3 : Prof. Wasinton Simanjuntak, M.Sc., Ph.D.



Handwritten signatures of the examination team members, corresponding to the names listed on the left.

2. Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam


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

3. Direktur Pascasarjana Universitas Lampung


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

Tanggal Lulus Ujian Tesis: 15 Juli 2025

SURAT PERNYATAAN

Yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama : Larasati Gadis Ermadi
Nomor Pokok Mahasiswa : 2327011003
Jurusan/Program Studi : Kimia/ S2 Kimia
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Perguruan Tinggi : Universitas Lampung

Menyatakan dengan sebenar-benarnya dan sesungguhnya, bahwa tesis saya berjudul **“Aktivitas Antibakteri Dan Antikanker Kitosan Dan Senyawa Metabolit Sekunder Fungi Dari Isolat 19A15-RF Menggunakan Metode Fermentasi”** adalah benar karya saya sendiri. Selanjutnya saya juga tidak keberatan jika sebagian atau seluruh data di dalam tesis 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 sebenarnya untuk digunakan sebagaimana mestinya.

Bandar Lampung, 21 Juli 2025
Yang membuat pernyataan

Larasati Gadis Ermadi
NPM. 2327011003

RIWAYAT HIDUP

Penulis dilahirkan di OKU Timur pada tanggal 19 April 2001, sebagai anak ke dua dari tiga bersaudara, putri dari Bapak Iwan Ermadi dan Ibu Ilona Wati.

Jenjang pendidikan diawali dari 3 tahun sekolah Dasar (SD) di SD Charitas 02 Mojosari dan 3 tahun di SDN Blondo 3 yang diselesaikan pada tahun 2012. Penulis melanjutkan 1 tahun sekolah menengah pertama (SMP) di SMPN 1 Mungkid dan 2 tahun di SMPN 1 Belitang yang diselesaikan pada tahun 2015. Penulis melanjutkan pendidikan di Sekolah Menengah Atas (SMA) Negeri 1 Belitang dan selesai pada tahun 2018. Tahun 2018 penulis terdaftar sebagai mahasiswa Kimia FMIPA Universitas Lampung melalui jalur Seleksi Bersama Masuk Perguruan Tinggi Negeri (SBMPTN).

Selama menjadi mahasiswi, penulis pernah mengikuti organisasi kemahasiswaan dimulai menjadi Kader Muda HIMAKI (KAMI) periode 2018. Pada tahun 2019, penulis menjadi anggota pengurus Himpunan Mahasiswa Kimia (HIMAKI) di biro Penerbitan.

Pada tahun 2021 penulis melaksanakan Kuliah Kerja Nyata (KKN) di desa Sidodadi Kecamatan Belitang, Kabupaten OKU Timur. Penulis juga melakukan Praktik Kerja Lapangan pada tahun 2021 di Laboratorium Biopolimer dan di Unit Pelaksana Analisis (UPA) Laboratorium Terpadu FMIPA Universitas Lampung. Pada tahun 2023 penulis menyelesaikan studi S1 dan penelitian yang dilakukan di UPA Laboratorium Terpadu FMIPA Universitas Lampung dengan judul “Penentuan Kadar Glukosamin dari Kulit Udang Secara Fermentasi Padat oleh *Strain Actinomycetes* Isolat 19A07A1 Gorontalo dengan Variasi pH dan Waktu”, dan Penulis diterima sebagai mahasiswi Magister Kimia FMIPA Universitas Lampung. Penulis telah mengikuti seminar internasional ICICS 2024. Pada tahun 2025, Penulis telah menyelesaikan studi S2 dan penelitian dengan judul “Aktivitas

Antibakteri Dan Antikanker Kitosan Dan Senyawa Metabolit Sekunder Fungi Dari
Isolat 19A15-RF Menggunakan Metode Fermentasi”

MOTTO

"Keep Going, You Can Do It"

PERSEMBAHAN

Dengan mengucapkan

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

Alhamdulillah Puji Syukur Kehadirat Allah SWT Yang Maha Pengasih dan Maha Penyayang atas Rahmat, Karunia, dan Hidayah-Nya
Dengan segala kerendahan hati, kupersembahkan karya kecil ini sebagai tanda cinta, hormat, tanggung jawab, dan baktiku

Kepada :

Kedua Orang Tuaku
Bapak Iwan Ermadi dan Ibu Ilona Wati
Yang telah menjadi sumber kebahagiaan dan kekuatan untukku, yang telah memberikan kasih sayang, do'a, kesabaran, dukungan, serta nasihat untuk senantiasa tetap berpegang teguh pada agama Allah SWT.

Kakak dan adikku tersayang,
Putri Safirilla Ermadi dan Galilea Emona Ermadi
Atas dukungan dan Semangat yang diberikan.

Bapak Prof. John Hendri, Ph.D., dan Bapak Prof. Drs. John Hendri,, M.S.,
Ph.D., Ibu Prof . Dr. Buhani, M.Si., Bapak Dr. Eng. Heri Satria, S.Si., M.Si.,
Bapak Prof. Wasinton Simanjuntak, M.Sc., Ph.D., dan Bapak Ibu Dosen
Jurusan Kimia
Yang telah membimbingku selama menempuh pendidikan sarjana di Jurusan
Kimia Universitas Lampung.

Seluruh sahabat dan teman-teman terdekatku yang selama ini telah memberikan banyak dukungan, bantuan dan motivasi kepadaku

Serta

Almamaterku Tercinta
Universitas Lampung

SANWACANA

Segala puji dan syukur atas kehadiran Allah SWT. yang telah memberikan kesehatan bagi penulis sehingga atas rahmat dan hidayah-Nya tesis ini dapat diselesaikan. Shalawat beriring salam selalu tercurah kepada baginda Muhammad SAW. beserta para pengikutnya yang semoga mendapatkan syafaatnya di yaumul akhir kelak, Aamiin.

Alhamdulillahirobbil'aalamiin, penulis telah menyelesaikan tesis ini dengan judul "*Aktivitas Antibakteri Dan Antikanker Kitosan Dan Senyawa Metabolit Sekunder Fungi Dari Isolat 19A15-RF Menggunakan Metode Fermentasi*" sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Magister Sains di Universitas Lampung. Penulis mengucapkan terima kasih kepada seluruh pihak yang telah memberikan bantuan baik berupa, arahan, masukan, informasi, serta dukungan moril maupun materiil. Oleh karena itu, pada kesempatan kali ini penulis mengucapkan terima kasih kepada:

1. Allah SWT atas kenikmatan dan karunia yang telah diberikan sehingga tesis ini dapat terselesaikan.
2. Ayah Iwan Ermadi dan Ibu Ilona Wati tercinta, terimakasih telah melahirkan, mendidik, menjaga, melindungi, dan membesarkan aku hingga dapat merasakan kehidupan yang penuh kejutan ini. Terimakasih telah memberikan dukungan dan kepercayaan pada ku hingga sekarang. Semoga Allah SWT selalu merahmati, melindungi, dan menaungi Ayah dan Ibu di dunia dan di akhirat.
3. Kakakku Putri Safirilla Ermadi dan adikku Galilea Emona Ermadi, terimakasih sudah selalu mengalah, berkorban, berjuan, dan menyemangati disetiap keadaanku. Terimakasih sudah selalu berpengertian kepadaku dan semoga Allah SWT selalu meridhoi dan melindungi kalian.
4. Bapak Prof. John Hendri, Ph.D. selaku pembimbing I atas segala nasihat, bimbingan, bantuan, dan saran sehingga penelitian dan tesis ini dapat

diselesaikan dengan baik. Semoga dengan kasih sayang dan rahmat Allah SWT, bapak mendapatkan balasan terindah atas segala kebaikan Bapak.

5. Bapak Prof. Andi Setiawan, M.Sc., Ph.D. selaku pembimbing II atas bimbingan dan saran sehingga penulis dapat menyelesaikan tesis ini. Semoga Allah SWT memberikan balasan yang berlimpah atas kebaikan dan nasehat Bapak yang diberikan kepada saya
6. Ibu Prof. Dr. Buhani, M.Si., bapak Dr. Eng. Heri Satria, S.Si., M.Si., dan bapak Prof. Wasinton Simanjuntak, M.Sc., Ph.D. selaku pembahas saya yang telah membimbing, memberi arahan dan semua ilmu yang telah diberikan. Semoga kebaikan Ibu dan Bapak dibalas oleh Allah SWT dengan kemudahan dan kelancaran di dunia maupun diakhirat.
7. Seluruh Bapak dan Ibu dosen Jurusan Kimia FMIPA atas segala waktu, pendidikan, ilmu, motivasi, dukungan, dan semangat yang diberikan kepada kami tanpa pamrih. Tiada hadiah yang lebih indah dari doa dan harapan kepada Allah SWT untuk selalu merahmati dan meridhoi Ibu dan Bapak yang terhormat.
8. Bapak Dr. Eng. Heri Satria, S.Si., M.Si. selaku Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam.
9. Bapak Mulyono, S.Si., M.Si., Ph.D. selaku Wakil Dekan Bidang Akademik dan Kerjasama
10. Dr. Aristoteles, S.Si., M.Si. selaku Wakil Dekan Bidang Umum dan Keuangan
11. Dr. Junaidi, S.Si., M.Sc. selaku Wakil Dekan Bidang Kemahasiswaan dan Alumni.
12. Seluruh karyawan Jurusan Kimia, Fakultas MIPA, dan karyawan Universitas Lampung yang telah banyak membantu penulis dalam menyelesaikan berkas-berkas yang diperlukan dan menghadirkan suasana belajar yang nyaman selama masa perkuliahan hingga tesis.
13. Unit Pelaksana Analisis (UPA) Laboratorium Terpadu FMIPA Universitas Lampung yang telah memberikan kesempatan untuk belajar dan melakukan penelitian.

14. Sahabatku yang tersayang yang selalu menjagaku dengan doa-doanya, terimakasih banyak Mahsya Jauza Zanety yang selalu memberikan ku semangat dengan cerita-cerita yang menarik dan selalu mendengarkanku juga.
15. Kak Fendi Setiawan, S.Si., M.Si., terimakasih atas segala bantuan dan dukungannya. Terimakasih juga atas ilmu, waktu, kegembiraan dan kebahagiaan, motivasi, nasehat, kritik, dan saran yang engkau berikan dalam perjalanan ku selama ini. Semoga segala urusan kakak selalu dipermudah oleh Allah SWT baik didunia maupun diakhirat nantinya.
16. JH Research 2020, Alda Nurmala Dewi, Muhammad Irfan Hanafi, dan Jordy Setiawan, terimakasih atas waktu, kegembiraan, dan motivasi yang kalian berikan. Semoga dengan pertemuan dan pertemanan ini kita bisa saling memberi syafaat di akhirat kelak.
17. Seluruh pejuang yang menghuni UPA Laboratorium Terpadu, Kak Rosyi, Kurniawan, Nida, Sabina, Alysha, Gita, Hasma, Yesha, Ibnu, Rizka, Fera, Isti, Wisnu, dan lainnya, terima kasih atas ilmu, pengertian, keceriaan, dan kebahagiaan yang kalian berikan dan bagikan.
18. Terimakasih kepada Luke Lin yang selalu percaya, mendukung, pengertian, dan memberikan kebahagiaan kepada penulis saat sedih maupun senang selama penulis menempuh studi ini. Terimakasih banyak.
19. Rekan-rekan seperjuanganku S2 Kimia, Nindy, Armidla, Rista, Kharisma, Kak Rusdya, dan Kak Syukri, yang telah kebersamai dalam menempuh belajar sehingga tesis ini dapat terselesaikan.
20. Seluruh kakak-kakak senior Kimia FMIPA Unila yang senantiasa membantu dan dengan murah hati berbagi ilmu dan pengalaman.
21. Seluruh adik-adik Kimia FMIPA Unila yang membantu dan berbagi ruang dan canda tawa selama ini.
22. Seluruh pihak terkait yang tidak bisa penulis sebutkan satu per satu yang secara langsung atau tidak langsung telah memberikan dukungan dan bantuannya, baik secara moril dan materiil sehingga pelaksanaan penelitian dapat terlaksana dengan baik.

Semoga semua bantuan dan jasa yang telah diberikan kepada Penulis menambah catatan amal kebaikan dari Allah SWT.

Penulis menyadari bahwa dalam penulisan tesis ini banyak kekurangan. Oleh karena itu, kritik dan saran yang bersifat membangun Penulis harapkan untuk perbaikan penulis di masa mendatang. Penulis berharap penelitian ini akan bermanfaat bagi siapa saja yang membacanya.

Bandar lampung, 21 Juli 2025
Penulis,

Larasati Gadis Ermadi

DAFTAR ISI

Daftar Isi

DAFTAR ISI.....	i
DAFTAR TABEL	iii
DAFTAR GAMBAR.....	iv
I. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Tujuan Penelitian.....	3
1.3 Manfaat Penelitian.....	3
II. TINJAUAN PUSTAKA.....	4
2.1 Fungi.....	4
2.1.1 Dinding Sel pada Fungi	5
2.2 Kultivasi Fungi	8
2.3 Kitosan.....	9
2.3.1 Karakterisasi Kitosan menggunakan <i>Fourier Transform Infrared</i> (FT-IR).....	11
2.3.2 Karakterisasi Kitosan menggunakan <i>Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry</i> (LC-MS/MS).....	12
2.4 Metabolit Sekunder	13
2.4.1 Analisis Senyawa Metabolit Sekunder menggunakan Kromatografi Lapis Tipis (KLT).....	14
2.5 Aktivitas antibakteri	14
2.6 Aktivitas Antikanker	16
2.7 Diagram Alir Penelitian.....	17
III. METODE PENELITIAN	18
3.1 Waktu dan Tempat	18
3.2 Alat dan Bahan	18
3.3. Prosedur Penelitian.....	19
3.3.1 Pembuatan Media.....	19

3.3.2 Peremajaan (<i>Maintenance</i>) dan Identifikasi Isolat	20
3.3.3 Kultivasi	20
3.3.4 Ekstraksi	21
3.3.5 Pemurnian Senyawa Metabolit Sekunder.....	23
3.3.6 Karakterisasi Kitosan	24
3.3.7 Uji Antibakteri.....	25
3.3.8 Uji Antikanker	26
IV. HASIL DAN PEMBAHASAN.....	27
4.1 Peremajaan (<i>Maintenance</i>) dan Identifikasi Isolat	27
4.2 Kultivasi dan Ekstraksi.....	28
4.3 Pemurnian Senyawa Metabolit Sekunder.....	32
4.4 Karakterisasi	34
4.5 Uji Antibakteri.....	43
4.6 Uji Antikanker (Sitotoksik)	47
V. SIMPULAN DAN SARAN	49
5.1 Simpulan.....	49
5.2 Saran.....	49
DAFTAR PUSTAKA	51
LAMPIRAN.....	57

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Rendemen hasil fermentasi produksi kitosan yang dihasilkan	29
2. Gugus fungsi yang terkandung pada kitosan	35
3. Gugus fungsi yang terkandung pada senyawa <i>crude</i> metabolit sekunder.....	37

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Ilustrasi skematis tentang fisiologi miselium pada berbagai ukuran. (A) Ilustrasi miselium yang terdiri dari kumpulan hifa. (B) Ilustrasi hifa. (C) Ilustrasi dinding sel fungi.....	5
2. Struktur kitin	6
3. Jalur biosintesis kitin dan kitosan	7
Gambar 4. Struktur kitosan	11
5. Diagram alir penelitian.....	17
6. Isolat 19A15-RF; (a) Pengamatan makroskopik; (b) Pengamatan mikroskopik	27
7. Kultivasi isolat 19A15-RF (a) metode SmF menggunakan media PDB; (b) metode SSF menggunakan media beras	28
8. Kitosan; (a) ChiSmF; (b) ChiSSF	30
9. Ekstrak kasar metabolit sekunder; (a) A15RFSmF ; (b) A15RFSSF	31
10. Analisis KLT ekstrak kasar A15RFSmF ; (a) UV λ_{254} nm; (b) UV λ_{366} nm; (c) reagen $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$; (d) reagen Dragendorff's; (e) reagen Ninhidrin	31
11. Analisis KLT ekstrak kasar A15RFSSF; (a) UV λ_{254} nm; (b) UV λ_{366} nm; (c) reagen $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$; (d) reagen Dragendorff's; (e) reagen Ninhidrin.	31
12. Uji aktivitas antibakteri crude metabolit sekunder terhadap <i>Staphylococcus aureus</i> menggunakan metode KLT bioautography; (a) A15RFSmF ; (b) A15RFSSF	33
13. Uji KLT menggunakan pelarut n-heksan : etOAc 10:1 dan reagen $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$ Senyawa murni metabolit sekunder; (a) A15RFSmF ; (b) A15RFSSF	34
14. Spektra FTIR Kitosan	35
15. Spektra FTIR senyawa crude metabolit sekunder.....	37

16. Perkiraan Struktur ChiSmF	39
17. Perkiraan Struktur ChiSSF	39
18. Perkiraan struktur senyawa A15RFSmF pada waktu retensi 17,48 menit	41
19. Perkiraan Struktur senyawa A15RFSSF pada waktu retensi 17,5 menit	42
20. Uji aktivitas antibakteri kitosan; (a) terhadap <i>Staphylococcus aureus</i> ; (b) terhadap <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	44
21. Uji aktivitas antibakteri metabolit sekunder terhadap <i>Staphylococcus aureus</i> ; (a) A15RFSmF; (b) A15RFSSF	45
22. Uji aktivitas antibakteri metabolit sekunder terhadap <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ; (a) A15RFSmF; (b) A15RFSSF	46
23. Hasil uji aktivitas antikanker terhadap sel A549 (kanker paru-paru), HeLa (kanker serviks), dan MCF-7 (kanker payudara)	47

I. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Kitosan, komponen turunan dari kitin, telah menarik perhatian besar di pasar global karena aplikasinya yang beragam. Kitosan dapat diperoleh dari berbagai sumber seperti eksoskeleton krustasea (udang dan kepiting), serangga, serta fungi (Pellis *et al.*, 2022). Aplikasi kitosan di berbagai industri telah mengalami pertumbuhan yang signifikan, dengan nilai pasar mencapai sekitar USD 11,97 miliar pada tahun 2023. Diperkirakan, nilai ini akan terus meningkat dengan tingkat pertumbuhan tahunan gabungan (*Compound Annual Growth Rate/CAGR*) sebesar 20,9% dari tahun 2024 hingga 2032. Salah satu faktor utama yang mendorong peningkatan penggunaan kitosan adalah sifatnya yang biokompatibel dan *biodegradable*. Kitosan telah terbukti memiliki aktivitas antibakteri dan aktivitas antikanker (Ke *et al.*, 2021). Aktivitas kitosan ini dapat dipengaruhi oleh derajat deasetilasi (DD) dan berat molekulnya (Rezaei & Hama, 2024).

Produksi kitosan telah berkembang secara signifikan dari berbagai sumber, termasuk limbah industri makanan seperti cangkang kepiting dan udang, serangga, dan fungi. Berdasarkan penelitian sebelumnya, kitosan yang diperoleh dari fungi (kitosan fungi) memiliki keunggulan yang signifikan dibandingkan dengan kitosan yang berasal dari krustasea. Keunggulan kitosan fungi adalah ketersediaannya yang selalu ada sepanjang tahun, bebas dari kontaminasi logam berat seperti nikel dan tembaga, serta kemampuan menghasilkan produk dengan karakteristik yang konsisten (Huq *et al.*, 2022). Selain itu, proses produksi kitosan dari fungi lebih ramah lingkungan dibandingkan dengan proses produksi dari krustasea, yang memerlukan penggunaan larutan asam dan basa kuat untuk demineralisasi dan deproteinasi (Crognale *et al.*, 2022).

Kitosan yang dihasilkan oleh fungi melalui proses fermentasi merupakan senyawa metabolit primer utama. Namun, selain menghasilkan metabolit primer, fungi juga dikenal sebagai sumber yang kaya akan senyawa metabolit sekunder. Senyawa metabolit sekunder dari fungi memiliki potensi yang sebanding dengan kitosan, seperti sifat antibakteri dan antikanker (Devia *et al.*, 2020). Umumnya, senyawa metabolit sekunder ini diproduksi oleh endofit fungi. Dalam hubungan simbiosis mutualistiknya, endofit menerima nutrisi dan perlindungan dari tanaman inang, maka sebagai balasannya, endofit mensintesis metabolit sekunder bioaktif yang tidak hanya meningkatkan pertumbuhan tanaman inang, tetapi juga melindunginya dari patogen dan herbivora. Oleh karena itu, senyawa metabolit sekunder memiliki potensi besar untuk dimanfaatkan sebagai agen antibakteri atau antikanker pada manusia (Hridoy *et al.*, 2022).

Berdasarkan uraian di atas, penelitian ini akan dilakukan produksi kitosan dan senyawa metabolit sekunder dari kultivasi isolat fungi 19A15-RF menggunakan metode fermentasi terendam (*Submerged Fermentation/SmF*) dan fermentasi padat (*Solid-State Fermentation/SSF*) dengan media *Potato Dextrose Broth* (PDB) dan beras. Isolat 19A15-RF yang digunakan adalah jenis fungi *Aspergillus ochraceus* yang telah diisolasi dari spons jenis *Plakina jamaicensis* di perairan Gorontalo, Indonesia, khususnya di pesisir Oluhuta, Teluk Tomini (koordinat 0°25'11.9"N, 123°8'31.80"E). Produk kitosan yang dihasilkan akan dikarakterisasi menggunakan *Fourier Transform Infrared Spectroscopy* (FTIR), *Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry* (LC-MS/MS), dan analisis kemurnian secara kualitatif akan dilakukan dengan Kromatografi Lapis Tipis (KLT) dan fraksinasi menggunakan kolom kromatografi untuk memvalidasi keberadaan kitosan dan senyawa metabolit sekunder. Selanjutnya, Pengujian antibakteri akan dilakukan menggunakan metode difusi agar terhadap patogen resisten seperti *Staphylococcus aureus* dan *Pseudomonas aeruginosa*. Uji antikanker akan dilakukan menggunakan teknik *Methyl Thiazolyl Tetrazolium* (MTT) Assay dengan sel A549 (kanker paru-paru), HeLa (kanker serviks), dan MCF-7 (kanker payudara).

1.2 Tujuan Penelitian

Penelitian ini diharapkan akan mencapai tujuan berikut ini:

1. Mendapatkan kitosan dan metabolit sekunder dari isolat fungi 19A15-RF (*Aspergillus ochraceus*) yang berasal dari spons perairan Gorontalo, Indonesia.
2. Mendapatkan data aktivitas kitosan dan metabolit sekunder sebagai senyawa antibakteri dan antikanker.

1.3 Manfaat Penelitian

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi tentang kitosan fungi dan metabolit sekunder isolat 19A15-RF sebagai agen antibakteri dan antikanker yang selanjutnya dapat dikembangkan dan diaplikasikan pada sektor industri farmasi.

II. TINJAUAN PUSTAKA

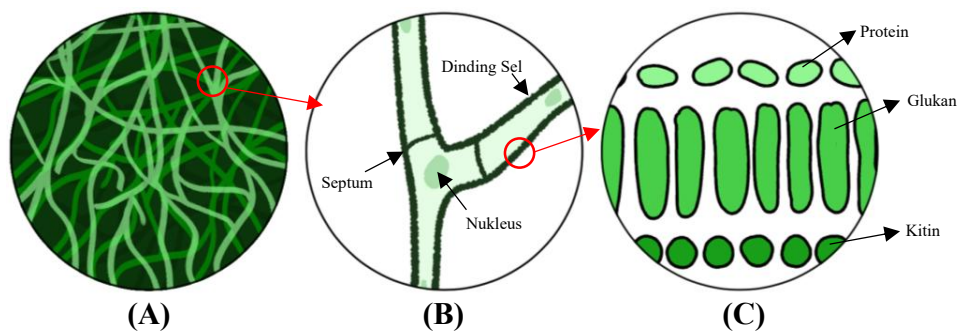
2.1 Fungi

Fungi adalah organisme eukariotik yang secara morfologi terlihat seperti ragi/yeast yang memiliki bentuk filamen tipis (hyphae) dengan panjang sekitar 2-10 μm (Hüttner *et al.*, 2020). Fungi dilindungi oleh dinding sel yang kaku untuk mencegah masuknya makro partikel sebagai sumber makanan. Sebagai gantinya, fungi menyerap mikro molekul yang larut dari lingkungan tumbuh, yang kemudian proses di luar sel. Metode penyerapan (absorpsi) ini meningkat seiring banyaknya miselium (kumpulan-kumpulan hifa) di permukaan lingkungan hidup. Fungi memiliki dua bentuk utama yaitu fungi multiseluler dengan struktur panjang dan tipis yang disebut hifa yang membentuk jaringan (miselium), dan ragi/yeast yang bersifat sel tunggal berbentuk bola kecil (Niskanen *et al.*, 2023).

Hasil dari pertumbuhan filamen fungi ini didapatkan sekresi protein serta metabolit primer dan metabolit sekunder yang memiliki manfaat yang dapat di aplikasikan dalam berbagai macam industri (Corrêa-Moreira *et al.*, 2024). Metabolit yang dihasilkan dari fungi dapat diaplikasikan pada kosmetik, biofuels, bahan bangunan, mengatasi limbah air, dan juga pada industri makanan dan minuman. Komponen dalam fungi yang memiliki kemampuan dalam mencegah dampak negatif dari hama dan meningkatkan pertumbuhan sel fungi, membuat organisme fungi dapat diaplikasikan sebagai biopestisida dan pupuk dalam industri agrikultur (Niskanen *et al.*, 2023). Selain itu, metabolit fungi yang dihasilkan juga dapat diaplikasikan pada industri farmasi seperti antibiotik (penicillin), Senyawa bernama siklosporin, diproduksi oleh *Tolypocladium inflatum*, serta lovastatin, obat untuk menurunkan kolesterol darah yang diproduksi dari *Aspergillus terreus* (Corbu *et al.*, 2023).

2.1.1 Dinding Sel pada Fungi

Dinding sel pada fungi yang terletak pada hyphae (hifa) memiliki fungsi dalam melindungi dari bahaya lingkungan seperti tekanan osmotik, yang menyebabkan pecahnya membran sel dan mengakibatkan mudahnya makromolekul berbahaya memberi efek negatif dalam pertumbuhan sel dan bentuk morfologinya (Hasim & Coleman, 2019). Dinding sel pada fungi adalah organel seluler yang kompleks yang terdiri dari polisakarida (glukan dan kitin), dan glikoprotein (Gambar 1).



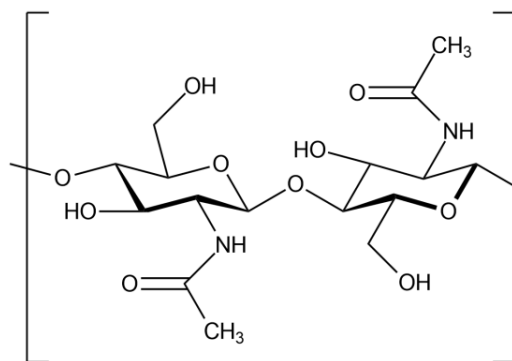
Gambar 1. Ilustrasi skematis tentang fisiologi miselium pada berbagai ukuran. (A) Ilustrasi miselium yang terdiri dari kumpulan hifa. (B) Ilustrasi hifa. (C) Ilustrasi dinding sel fungi.

2.1.1.1. Glukan

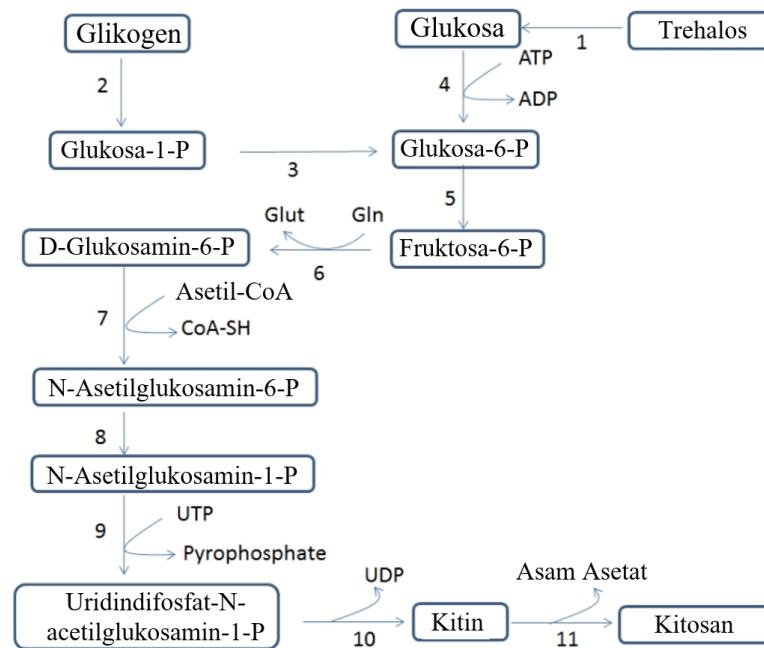
Glukan adalah senyawa polisakarida, seperti β (1-3)-glukan, didalam dinding sel fungi sebesar 40-50%. Namun, senyawa lain juga ditemukan pada beberapa fungi lain yaitu seperti β (1,6)-, campuran β (1-3)- dan β (1-4)-, α (1-3)-, dan α (1-4)-glukan. Hampir semua organisme fungi memiliki senyawa β (1-3)-glukan seperti *Candida* spp., *Aspergillus* spp., *Fusarium* spp., *Scedosporium* spp., *Exserohilum* spp. Pada fungi *Saccharomyces cerevisiae* terdapat β (1-3)-glukan dan β (1-6)-glukan, kemudian pada fungi *Saccharomyces cerevisiae* adanya β (1-6)-glukan dan α (1-4)-glukan, dan senyawa α (1-3)-glukan pada *Gossypium hirsutum* (cotton) (Zhao et al., 2023).

2.1.1.2. Kitin

Fungi memiliki jalur biosintetik yang bisa dilihat pada Gambar 3. Biosintetik ini menggunakan glukosa dan karbohidrat penyimpanannya, seperti trehalosa dan glikogen, sebagai prekursor. Jalur biosintesis kitin terbagi menjadi tiga kelompok reaksi. Kelompok pertama menghasilkan N-acetylglucosamine (GlcNAc), kelompok kedua menghasilkan uridine-5'-diphospho-N-acetylglucosamine (UDP-GlcNAc) melalui modifikasi jalur Leloir (jalur utama metabolisme galaktosa), dan kelompok ketiga membentuk polimer dengan menggunakan UDP-GlcNAc sebagai donor GlcNAc untuk pertumbuhan rantai kitin (Crognale *et al.*, 2022). Kitin adalah senyawa polimer yang terdiri dari β 1,4-N-acetylglucosamine. Kitin termasuk kedalam komponen dinding sel fungi sebesar 10-20% (Hasim & Coleman, 2019). Kitin disintesis dari n-asetil glukosamin oleh enzim kitinase, yang kemudian menghasilkan polimer kitin di bagian ekstraseluler, berdekatan dengan membran sitoplasma. Kitin memiliki fungsi tertentu dalam fungi seperti untuk morfogenesis fungi, pembelahan sel, dan integritas dinding sel (Brauer *et al.*, 2023) .



Gambar 2. Struktur kitin



Gambar 3. Jalur biosintesis kitin dan kitosan (Crognale *et al.*, 2022).

Penomoran pada Gambar 2 telah ditetapkan untuk enzim yang mengkatalisis setiap reaksi: 1, trehalase; 2, glikogen fosforilase; 3, fosfoglukomutase; 4, heksokinase; 5, glukosa-6-fosfat isomerase; 6, glutamin-fruktosa-6-fosfat amidotransferase; 7, glukosamin-6-fosfat N-asetiltransferase; 8, N-acetylglucosamine-phosphate mutase; 9, pirofosforilase UDP-N-asetilglukosamin; 10, kitin sintase dan 11, kitin deasetilase. Singkatan yang digunakan adalah sebagai berikut: asetil KoA, asetil koenzim A; ADP, adenosine diphosphate; CoASH, koenzim A; Gln, L-glutamin; Glu, L-glutamat; UDP, uridin difosfat; UTP, uridin trifosfat (Crognale *et al.*, 2022).

2.1.1.3. Glikoprotein

Komposisi protein dalam fungi dapat mencakup sebesar 20-30% pada dinding sel. Biasanya, protein membentuk glikoprotein dengan mengikat karbohidrat melalui ikatan O atau N. Secara fungsional, protein dinding sel memiliki peran pada menjaga bentuk sel, proses adhesi, melindungi sel dari berbagai zat, menyerap molekul, serta

berkontribusi dalam sintesis dan reorganisasi komponen dinding sel (Garcia-Rubio *et al.*, 2020).

2.2 Kultivasi Fungi

Fungi dapat dilakukan melalui dua fermentasi yang berbeda, yaitu *submerged fermentation* (SmF) dan *solid-state fermentation* (SSF), dengan menggunakan media *Potato Dextrose Broth* (PDB) dan beras (raw rice grain). PDB adalah media yang kaya nutrisi yang umumnya digunakan dalam fermentasi fungi. Media ini mengandung kentang dan dextrose yang menyediakan sumber karbohidrat, asam amino, dan vitamin yang mendukung pertumbuhan dan aktivitas metabolisme jamur (Al-Sharnouby & Abd Elfatah, 2022).

Keunggulan teknik SmF di antaranya ialah kemudahan mengontrol parameter kultivasi (suhu, oksigen, pH, massa, kadar air), memiliki kemampuan transfer skala yang lebih tinggi, serta pemerolehan biomassa secara langsung dari media pertumbuhan (Chisty *et al.*, 2020). Selain itu, teknik SmF menghasilkan substrat padat yang homogen sehingga memungkinkan komposisi medium, oksigen, dan nutrisi dapat terkontrol dengan lebih baik. Teknik SmF lebih sederhana karena difusi mikroorganisme lebih baik dan proses fermentasi lebih cepat (Huq *et al.*, 2022). Fermentasi fungi secara langsung dengan teknik SmF dapat terjadi lebih cepat, namun jumlah biomassa yang dihasilkan lebih besar pada SSF dari pada SmF, sehingga produksi kitosan dengan SSF akan lebih tinggi (Irbe *et al.*, 2023).

SSF mendapat banyak perhatian dari para ilmuwan dan bisnis di seluruh dunia dalam beberapa tahun terakhir (Aisah *et al.*, 2023), karena keunggulannya dalam pengelolaan limbah padat, konservasi energi biomassa, dan penerapannya pada barang bernilai tinggi. Teknik SSF dianggap sebagai metode daur ulang limbah yang potensial dengan menggunakan limbah padat sebagai substrat pertumbuhan mikroorganisme untuk mengubahnya menjadi produk bernilai tambah. SSF memungkinkan mikroba untuk tumbuh di lingkungan yang sedikit air atau anhidrat. SSF menyerupai lingkungan alami

sebagian besar mikroorganisme, terutama fungi dan kapang. SSF tahan terhadap kontaminasi bakteri dan dapat meningkatkan efisiensi enzimatik berbagai enzim (Chilakamarry *et al.*, 2022). Penelitian ini berfokus pada pemanfaatan teknik SSF untuk produksi miselium fungi guna penggunaannya dalam produksi kitosan.

Selain teknik kultivasi, media fermentasi berperan penting dalam mempengaruhi pertumbuhan biomassa fungi. Korelasi antara media dan produksi biomassa fungi dipengaruhi oleh faktor-faktor seperti komposisi nutrisi, suhu, waktu, sterilisasi, dan strain fungi spesifik yang digunakan (Kumar *et al.*, 2021). Mengoptimalkan faktor-faktor tersebut pada media tertentu dapat meningkatkan pertumbuhan fungi dan produksi biomassa.

Pemilihan media secara signifikan dapat mempengaruhi hasil biomassa fungi secara keseluruhan, yang pada gilirannya mempengaruhi efisiensi proses fermentasi. Salah satu faktor kunci yang mempengaruhi pertumbuhan biomassa fungi adalah ketersediaan nutrisi dalam media fermentasi. Nutrisi seperti sumber karbohidrat, vitamin, dan mineral sangat penting untuk pertumbuhan dan perkembangan fungi. Misalnya, *Aspergillus niger*, strain fungi yang umum digunakan dalam proses fermentasi industri, membutuhkan karbohidrat kompleks seperti selulosa untuk pertumbuhan optimal (Iram *et al.*, 2022). Beras kaya akan karbohidrat dan protein. Menurut database United States Department of Agriculture (USDA), mikronutrien tersebut mengandung protein, karbohidrat, vitamin dan mineral, dan antioksidan (USDA, 2019). Produksi fungi dapat dicapai dengan menggunakan beras yang tersedia secara luas tanpa menambah nutrisi lain dalam kondisi SSF (Lee *et al.*, 2020).

2.3 Kitosan

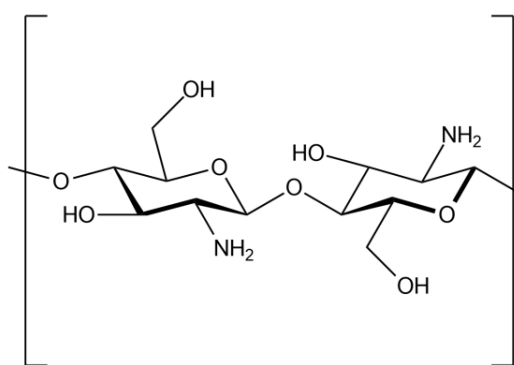
Kitosan adalah senyawa polimer dari hasil deasetilasi senyawa kitin dengan susunan β -(1–4)-N-asetil-D-glukosamin menjadi unit-unit β -(1–4)-2-amino-D-glukosa (Gambar 4) (Li *et al.*, 2020). Kitin, sebagai prekursor kitosan, terdapat dalam eksoskeleton krustasea, molluska, dan serangga. Meskipun kebanyakan kitosan berasal dari sisa-sisa

industri makanan seperti cangkang kepiting dan udang, kini tersedia juga dari sumber lain seperti serangga dan fungi (jamur) (Pellis *et al.*, 2022). Kitosan dalam fungi dapat ditemukan dalam beragam kelas, seperti *Ascomycetes*, *Basidiomycetes*, dan *Zygomycetes*. Kelas *Zygomycetes* diketahui mengandung kitosan pada dinding selnya, seperti pada *Absidia spp.*, *Gongronella spp.*, *Rhizopus spp.*, dan *Aspergillus spp.* (Abo Elsoud *et al.*, 2023). Keuntungan produksi kitosan dari fungi dibandingkan dari sumber krustasea sangat banyak. Kitosan fungi merupakan bahan baku yang tersedia sepanjang tahun, bebas dari logam berat seperti nikel dan tembaga, serta menghasilkan produk dengan karakteristik yang konsisten (Huq *et al.*, 2022). Selain itu, kitosan fungi cenderung lebih ramah lingkungan dibandingkan dengan ekstraksi dari limbah krustasea, yang memerlukan larutan asam dan basa berkonsentrasi tinggi untuk proses demineralisasi dan deasetilasi kimia (Crognale *et al.*, 2022).

Kitosan memiliki karakteristik kelarutan yang dapat dipengaruhi oleh berbagai faktor, termasuk berat molekul, derajat deasetilasi (DD), sensitivitas pH, suhu, dan kristalinitas. Meskipun kitosan tidak larut dalam air atau pelarut organik, kelarutannya dalam asam disebabkan oleh protonasi gugus NH_2 , di mana sekitar 50% protonasi mengakibatkan larutan. Kitosan dengan derajat deasetilasi yang lebih besar dapat larut lebih baik di air karena gugus amino yang lebih terkonsentrasi dalam struktur polimer, terutama $[-\text{NH}_2]$. Selain itu, berat molekul kitosan memengaruhi bioaktivitasnya, dengan varian berat molekul rendah akan menunjukkan bioaktivitas yang lebih tinggi (Aranaz *et al.*, 2021).

Kitosan dengan berat molekul rendah memiliki berat <50 kDa, sedangkan kitosan dengan berat molekul tinggi >50 kDa. Kravanja *et al.*, (2019) melaporkan bahwa kitosan dengan berat molekul rendah menunjukkan aktivitas antimikroba yang efektif terhadap beberapa patogen menggunakan metode *Minimum Inhibitory Concentration* (MIC). Pada bakteri Gram-positif *Staphylococcus aureus*, kitosan dengan berat molekul 28 kDa efektif pada konsentrasi 800 $\mu\text{g/mL}$. Peningkatan berat molekul hingga 1106 kDa meningkatkan dosis yang diperlukan hingga 1000 $\mu\text{g/mL}$. Pada bakteri Gram-negatif *Pseudomonas aeruginosa*, kitosan dengan berat molekul 49 kDa menunjukkan aktivitas

pada konsentrasi 150 $\mu\text{g/mL}$, tetapi dengan meningkatnya berat molekul hingga 1100 kDa, konsentrasi yang dibutuhkan meningkat menjadi 200 $\mu\text{g/mL}$. Kitosan juga menunjukkan aktivitas antifungi pada fungi seperti *Fusarium oxysporum* dengan berat molekul 49 kDa pada konsentrasi 500 $\mu\text{g/mL}$. Dengan peningkatan berat molekul menjadi 1100 kDa, konsentrasi kitosan yang dibutuhkan untuk aktivitas antifungi meningkat hingga 2000 $\mu\text{g/mL}$.



Gambar 4. Struktur kitosan

2.3.1 Karakterisasi Kitosan menggunakan *Fourier Transform Infrared* (FTIR)

Teknik spektroskopi FTIR sering digunakan untuk menganalisis kitosan. Radiasi inframerah dipancarkan pada sampel, di mana sebagian diserap oleh kitosan dan radiasi yang tersisa kemudian ditangkap oleh detektor setelah melewati sampel. Spektrum FTIR yang dihasilkan menunjukkan intensitas serapan inframerah oleh kitosan sebagai fungsi bilangan gelombang atau frekuensi. Serapan ini terkait dengan vibrasi molekul dan ikatan kimia di dalam kitosan. Analisis spektrum FTIR memungkinkan identifikasi gugus fungsi dan ikatan kimia dalam kitosan. Kitosan memiliki gugus fungsi khas yang dapat diidentifikasi menggunakan spektroskopi FTIR, yaitu gugus amida dan hidroksil. Puncak pada sekitar 1655 cm^{-1} menunjukkan keberadaan gugus amida I, yang berhubungan dengan vibrasi karbonil (C=O) dari kelompok N-asetil. Selain itu, puncak pada sekitar $3430 - 3450\text{ cm}^{-1}$ mencerminkan vibrasi gugus hidroksil ($-\text{OH}$). Puncak

lain pada sekitar 1550 cm^{-1} mewakili gugus amida II, yang menunjukkan vibrasi kombinasi dari N-H bending dan C-N stretching. Dengan menganalisis puncak-puncak ini, kita dapat mengonfirmasi bahwa sampel yang diuji adalah kitosan, berkat adanya gugus amida dan hidroksil yang khas dalam spektrum FTIR.

Proses yang menghasilkan kitosan dari kitin melibatkan deasetilasi, yaitu konversi gugus asetamida pada posisi C-2 kitin menjadi gugus amino ($-\text{NH}_2$) yang membentuk senyawa kitosan (Tahtat *et al.*, 2019). DD yang merupakan salah satu karakteristik utama, mempengaruhi kualitas kitosan dengan menentukan kelarutannya dalam lingkungan asam. Apabila persentase gugus amino mencapai 50% atau lebih, kitosan akan larut dalam lingkungan asam (Yusharani *et al.*, 2019).. Proses deasetilasi ini dipengaruhi oleh beberapa faktor seperti waktu reaksi, konsentrasi alkali, suhu, rasio padat/cair, dan ukuran partikel kitin, yang semuanya berkontribusi pada karakteristik akhir dari kitosan yang dihasilkan (Sugiyanti *et al.*, 2018).

2.3.2 Karakterisasi Kitosan menggunakan *Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry* (LC-MS/MS)

LC-MS/MS adalah metode analitik yang kuat untuk memisahkan, mengidentifikasi, dan mengukur jumlah campuran kompleks senyawa. Teknik ini menggabungkan kromatografi cair (LC) untuk pemisahan fisik dengan spektrometri massa tandem (MS/MS) untuk analisis massa. LC-MS/MS sangat bermanfaat untuk menganalisis kitosan, sebuah biopolimer dengan banyak aplikasi dalam farmasi, biomedis, dan makanan. Proses LC-MS/MS melibatkan pemisahan senyawa berdasarkan sifat kimianya menggunakan kromatografi cair (LC), di mana senyawa-senyawa terpisah kemudian dianalisis menggunakan spektrometer massa untuk mengukur rasio massa terhadap muatan (m/z) (Grundy *et al.*, 2024).

Kitosan larut dalam pelarut seperti asam asetat untuk menciptakan larutan homogen. Larutan ini disuntikkan ke dalam sistem LC, yang memisahkan komponen-komponen berdasarkan berat molekul dan sifat kimianya sebelum dianalisis dengan spektrometer

massa. Sistem MS/MS kemudian memfragmentasikan ion-ion tersebut, menciptakan pola fragmen yang digunakan untuk mengidentifikasi senyawa-senyawa tersebut. LC-MS/MS juga berguna untuk mengukur distribusi berat molekul kitosan, yang penting untuk memahami karakteristik dan aplikasi dari senyawa ini. Teknik ini juga dapat mendeteksi dan mengukur kotoran dalam kitosan, memastikan kemurnian dan kualitasnya untuk berbagai keperluan.

2.4 Metabolit Sekunder

Metabolit adalah produk dari metabolisme yang memiliki berbagai fungsi dalam organisme. Metabolit terbagi menjadi 2, yaitu metabolit primer dan metabolit sekunder. Metabolit primer adalah metabolit yang di produksi untuk membantu pertumbuhan fungi, yang terdiri dari asam amino, gula, vitamin, lipid, nukleotida, dan karbohidrat, yang memiliki peran dalam berbagai proses metabolisme termasuk respirasi dan mengkonsumsi nutrisi. Sedangkan metabolit sekunder tidak masuk kedalam senyawa yang esensial dan diperlukan untuk menjalankan jalur metabolisme secara efektif dan metabolit sekunder memiliki peran dalam menjaga organisme saat berinteraksi lingkungan (Pinar & Rodríguez-Couto, 2024).

Beberapa peneliti telah menemukan metabolit sekunder dari organisme jamur (fungi) yang dapat berkontribusi pengembangan obat-obatan baru, seperti agen antimikroba, antioksidan, antikanker dan obat untuk meningkatkan sistem kekebalan tubuh. Fungi merupakan sumber yang kaya akan metabolit sekunder, termasuk poliketida, terpenoid, steroid, alkaloid dan peptida (Devi *et al.*, 2020). Senyawa MS dari fungi telah didapatkan 553 senyawa baru pada tahun 2023 dengan 40% (212 senyawa metabolit sekunder) sebagai senyawa bioaktif. Sekitar 41% poliketida, 26% terpenoid, 20% alkaloid, 7% steroid, dan 6% peptida. Dari penelitian sebelumnya, senyawa MS dengan struktur terpenoid memiliki aktivitas *cytotoxic* (sitotoksik) sedangkan poliketida memiliki aktivitas antibakteri yang tinggi (Shi *et al.*, 2023).

2.4.1 Analisis Senyawa Metabolit Sekunder menggunakan Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Kromatografi lapis tipis (KLT) merupakan teknik analisis yang sering digunakan untuk memisahkan, mengidentifikasi, dan mengukur senyawa kimia. KLT bekerja dengan memisahkan senyawa berdasarkan perbedaan afinitas terhadap fase diam (umumnya berupa silika gel atau alumina) dan fase gerak (pelarut atau campuran pelarut). Fase diam kemudian diaplikasikan pada fase gerak, dimana senyawa yang ditotol pada fase diam akan perlahan mengikuti fase gerak bergerak keatas. Penerapan ekstrak kasar fungi pada analisis KLT, pada titik awal harus sekecil dan serapi mungkin dan pergerakan harus merata. Setelah dilakukannya KLT, spot pigmen dapat terlihat langsung di bawah sinar matahari, sementara produk lain bisa divisualisasikan dengan sinar UV. Jika senyawa sulit dideteksi di bawah cahaya tampak atau ultraviolet, dapat ditambahkan reagen deteksi universal atau spesifik untuk membentuk produk berwarna secara langsung atau dibawah sinar UV (Urbain & Simões-Pires, 2020).

Serium sulfat ($\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$) dan reagen Dragendorff adalah dua reagen umum yang digunakan dalam KLT untuk mendeteksi dan mengidentifikasi berbagai senyawa. Serium sulfat adalah reagen umum yang terdiri dari asam sulfat pekat dan anhidrida asetat, yang memiliki sifat destruktif dan oksidatif. Ketika aplikasikan pada pelat KLT yang terdapat senyawa yang ingin diuji, serium sulfat bereaksi dengan senyawa yang menyebabkan terbentuknya spot-spot coklat. Serium sulfat digunakan untuk mendeteksi berbagai senyawa, termasuk steroid, terpenoid, dan fenolik. Reagen Dragendorff digunakan untuk mendeteksi alkaloid, yang merupakan basa nitrogen. Reagen ini terdiri dari subnitrat bismut, asam asetat glasial, dan kalium iodida. Ketika tambahkan pada pelat KLT, reagen Dragendorff bereaksi dengan alkaloid, menyebabkan terbentuknya spot-spot berwarna oranye (Bahri *et al.*, 2024).

2.5 Aktivitas antibakteri

Aktivitas antibakteri merujuk pada proses penghancuran atau penghambatan pertumbuhan bakteri penyebab infeksi. Antibakteri ini memegang peranan penting

dalam mengatasi patogen berbahaya serta mencegah penyakit. Kitosan terhadap bakteri telah dianalisis dan dilaporkan di banyak artikel. Meskipun sifat antibakteri kitosan erat kaitannya dengan strukturnya, karakteristik fisiokimianya, serta kondisi lingkungan, dan kelompok hidroksil reaktif pada posisi C-3 dan C-6, cara kerja kitosan terhadap mikroba dapat dibedakan menjadi efek ekstraseluler, intraseluler, atau keduanya. Kitosan dengan berat molekul tinggi umumnya tidak dapat menembus dinding sel atau membran sel, efek antibakteri utamanya melibatkan pengikatan logam penting, menghalangi penyerapan nutrisi dari luar sel, dan mengubah permeabilitas sel. Namun, kitosan berat molekul rendah tidak hanya memiliki aktivitas antibakteri ekstraseluler tetapi juga intraseluler yang dapat mempengaruhi sintesis RNA, protein, dan fungsi mitokondria (Ke *et al.*, 2021).

Mekanisme utama kitosan sebagai antibakteri adalah dengan mengikat dinding sel bakteri yang bermuatan negatif menggunakan muatan positifnya sendiri. Hal ini menyebabkan kerusakan pada dinding sel dan meningkatkan permeabilitas membran polimer dalam sel bakteri. Kitosan juga dapat berikatan dengan asam nukleat dan menghambat replikasi DNA. Keefektifitasan antibakteri kitosan dipengaruhi oleh derajat deasetilasi dan berat molekulnya (Rezaei & Hama, 2024a).

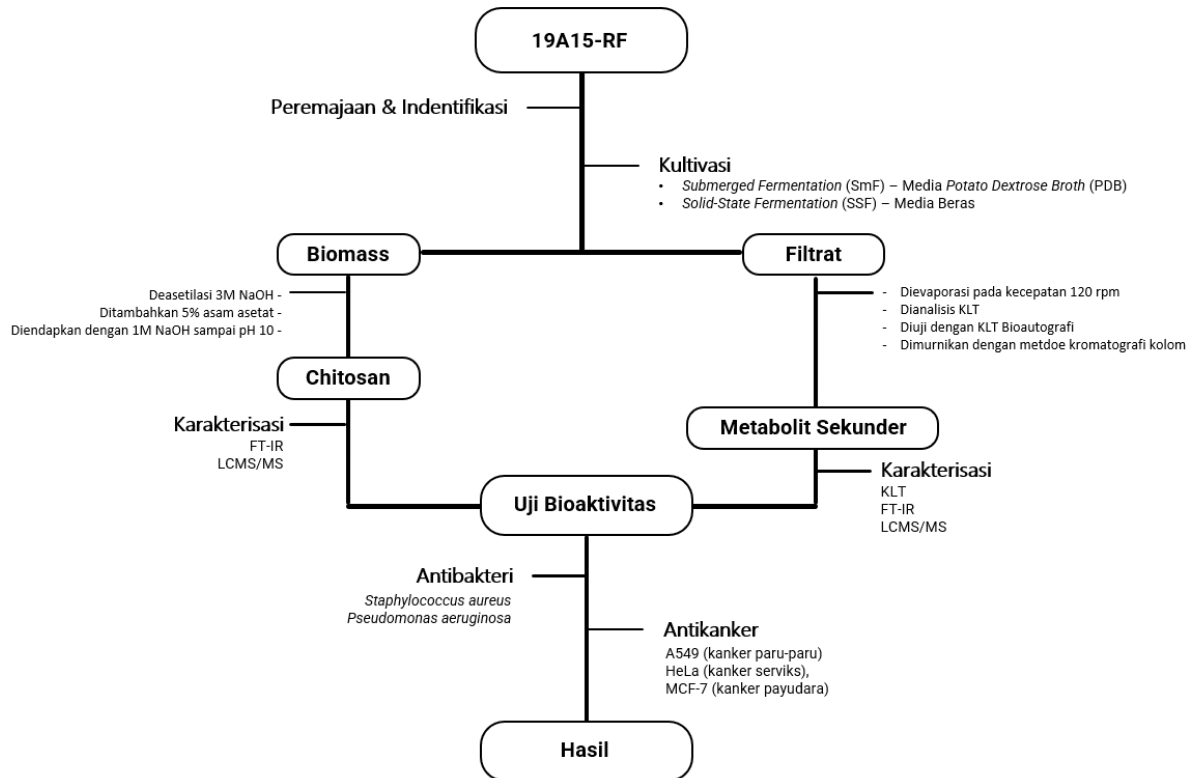
Polimer kitosan efektif melawan bakteri Gram-positif seperti *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus megaterium*, *Lactobacillus plantarum*, *Listeria monocytogenes*, *Lactobacillus brevis*, dan *Lactobacillus bulgaricus*, serta bakteri Gram-negatif seperti *Salmonella typhimurium*, *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Enterobacter aerogenes*, dan *Vibrio cholera*. Perbedaan struktural dalam dinding sel bakteri Gram-positif, yang memiliki peptidoglikan lebih tebal, sedangkan bakteri Gram-negatif kaya akan lipopolisakarida, menjelaskan mengapa bakteri Gram-negatif cenderung lebih rentan terhadap kitosan daripada bakteri Gram-positif (Abd El-Hack *et al.*, 2020).

2.6 Aktivitas Antikanker

Kitosan memiliki kemampuan untuk menembus membran sel kanker, meningkatkan efek antikanker agen lain dengan cara memengaruhi mekanisme pertahanan antioksidan, angiogenesis, jalur apoptotik, serta fungsi enzimatis seluler (Rezaei & Hama, 2024a). Kitosan memiliki beberapa karakteristik yang membuatnya sangat menarik untuk digunakan dalam pengobatan kanker. Salah satu sifat unggul kitosan adalah non-toksik dan kitosan dapat diuraikan menjadi produk yang tidak berbahaya, menjadikannya pilihan yang aman untuk aplikasi medis. Kitosan memiliki afinitas yang kuat terhadap membran mukosa, yang memungkinkannya menempel dengan baik pada sel kanker. Sifat ini sangat penting karena dapat meningkatkan efisiensi pengiriman agen terapeutik langsung ke sel target. Dengan menempel pada sel kanker, kitosan dapat memastikan bahwa obat atau agen antikanker mencapai sel yang dituju dengan konsentrasi yang lebih tinggi dan meningkatkan efektivitas pengobatan (Virmani *et al.*, 2023).

2.7 Diagram Alir Penelitian

Berikut merupakan langkah penelitian pada Gambar 5 di bawah ini:



Gambar 5. Diagram alir penelitian

III. METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat

Penelitian dilaksanakan pada bulan Juni 2024- Januari 2025, dan bertempat di Unit Pelaksana Analisis (UPA) Laboratorium Terpadu Universitas Lampung. Analisis morfologi isolat fungi dengan menggunakan mikroskop dan karakterisasi kitosan hasil isolasi menggunakan FTIR dilakukan di Unit Pelaksana Analisis (UPA) Laboratorium Terpadu, Universitas Lampung dan analisis LC-MS/MS dilakukan Badan Reserse Kriminal POLRI, Pusat Laboratorium Forensik, Bogor..

3.2 Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini meliputi LC-MS/MS, FTIR Cary 630 (Agilent, Santa Clara, CA, United States), mikroskop Zeiss Axio Imager A1, *rotary evaporator* BUCHI/R210, Buchii/R210, *autoclave* Tomy SX-700, oven Jisico, *hot plate stirrer* Thermolyne, *centrifuge* Hitachi CF 16RX II, dan inkubator Kaltis 499, *laminar air flow*, mikropipet Biohit, plat aluminium silica gel DC Kiesel 60 F254 serta lampu UV Kohler/SN402006, gelas beaker Iwaki, Erlenmeyer Iwaki, tabung reaksi Iwaki, cawan petri, botol semprot, spatula logam, batang pengaduk, jarum ose, kapas, kasa Onemed, plastik tahan panas, indikator pH universal.

Bahan-bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah aquades, air laut buatan/*artificial seawater* (ASW), agar swallow, glukosa, kentang segar, beras, malt *extract*, etil asetat (EtOAc), *Tryptic Soya Broth* (TSB), *Tryptic Soya Agar* (TSA), metanol (MeOH) teknis, asam asetat teknis, NaOH teknis, Asam Klorida (HCl), dextrose, kitosan standar, akuades, alkohol 70%, etanol (EtOH), reagen visualisasi KLT meliputi $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$ (10% Ce(IV) dan 15% H_2SO_4 dalam akuades), ninhidrin (2%

ninhidrin dalam pelarut EtOH), dan reagen *Dragendorff's*, dan *Mueller Hinton Agar* (MHA). Adapun bakteri yang digunakan dalam uji adalah bakteri patogen resisten klinis *Pseudomonas aeruginosa* dan *Staphylococcus aureus*, serta uji antikanker dilakukan pada sel A549 (kanker paru-paru), HeLa (kanker serviks), dan MCF-7 (kanker payudara).

3.3. Prosedur Penelitian

Adapun prosedur dalam penelitian ini adalah sebagai berikut.

3.3.1 Pembuatan Media

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

Pembuatan media PDB dan PDA mengikuti metode pada penelitian Pan *et al.* (2023), dengan perbedaan pada tahap akhir di mana PDB tidak mengandung agar, sedangkan PDA mengandung agar. Komposisi media dibuat dengan perbandingan (w/v) 10% kentang, 2% gula dextrose, dan tambahan 3% nutrient agar (hanya untuk PDA) dalam air laut buatan dengan salinitas 30 ppt.

Proses pembuatan dimulai dengan mengupas, mencuci, dan memotong kentang menjadi irisan tipis. Kentang yang telah dipotong, direbus dalam air laut selama 30 menit untuk mengekstraksi nutrisi, kemudian dibiarkan dingin. Filtrat yang diperoleh dari proses perebusan tersebut ditambahkan dengan 2% gula dextrose dan diaduk hingga homogen untuk menghasilkan media PDB.

Media PDA dibuat dengan menambahkan 3% nutrient agar ke dalam filtrat (PDB) (w/v), kemudian dihomogenkan untuk memastikan distribusi agar yang merata. Setelah persiapan media selesai, baik PDB maupun PDA disterilisasi dengan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit untuk memastikan tidak ada kontaminasi mikroba.

3.3.1.2 Media *Tryptic Soy Agar* (TSA)

Pembuatan media TSA didasarkan pada metode yang dijelaskan oleh Laila *et al.*, (2023), dengan adanya modifikasi. Proses pembuatan dimulai dengan menyiapkan larutan campuran (w/v) yang terdiri dari 3% *Tryptic Soy Broth* (TSB) dan 3% nutrient agar yang dilarutkan dalam aquadest. Campuran ini kemudian dipanaskan hingga mencapai suhu 100°C selama 5 menit untuk memastikan agar dan TSB terlarut sepenuhnya dan tercampur homogen. Media TSA kemudian di autoclave pada suhu 121°C selama 15 menit untuk memastikan tidak ada kontaminasi mikroba.

3.3.2 Peremajaan (*Maintenance*) dan Identifikasi Isolat

Isolat fungi *Aspergillus ochraceus* dengan kode 19A15-RF dari deposit UPT LTSIT dilakukan peremajaan mengacu pada Barwant dan Lavhate (2020) dengan sedikit modifikasi. Fungi diremajakan pada media PDB kemudian disimpan pada suhu ruang selama 14 hari dalam inkubator.

3.3.3 Kultivasi

Proses kultivasi dimulai dengan menumbuhkan fungi dalam 50 mL media PDB sebagai media awal (*starter*). Inokulum ini kemudian diinkubasi selama 3 hari untuk memastikan pertumbuhan awal yang optimal.

3.3.3.1 Kultivasi dengan metode SmF

Proses kultivasi dengan metode SmF, dilakukan pada media PDB yang merujuk pada Afroz *et al.* (2021) dengan adanya modifikasi. Sebanyak 200 mL PDB steril disiapkan dalam labu Erlenmeyer 500 mL dan diinokulasi dengan 1 mL inokulum yang telah ditumbuhkan sebelumnya. Kultur tersebut diinkubasi selama 7 hari pada suhu ruang untuk memungkinkan pertumbuhan fungi yang optimal. Setelah periode kultivasi selesai, biomassa fungi dipisahkan dari media kultur melalui proses filtrasi. Filtrat yang didapatkan akan disimpan untuk tahap selanjutnya yaitu proses ekstraksi senyawa MS dan Biomassa yang diperoleh akan dicuci dengan aquadest, kemudian dikeringkan

pada suhu 60°C selama 24 jam untuk menghilangkan kelembaban dan mempersiapkannya untuk tahap ekstraksi kitosan selanjutnya.

3.3.3.2 Kultivasi dengan metode SSF

Proses kultivasi dengan metode SSF, dilakukan pada media beras yang merujuk pada metode Aisah *et al.* (2023). Sebanyak 30 g beras ditimbang dan dimasukkan ke dalam labu Erlenmeyer. Media beras ini kemudian disterilisasi menggunakan autoclave selama 15 menit pada temperatur 121°C untuk menghilangkan kontaminan. Setelah proses sterilisasi, media beras diinokulasi dengan 5 mL inokulum yang telah disiapkan sebelumnya dan diinkubasi pada suhu ruang selama 7 hari.

Setelah periode inkubasi selesai, biomassa fungi pada permukaan beras kemudian digerus kasar dan ditambahkan dengan etil asetat sampai terendam. Selanjutnya, biomassa akan dicuci aquadest dan dikeringkan dalam oven pada suhu 60°C selama 24 jam untuk menghilangkan kelembaban. Biomassa kering yang diperoleh akan digunakan untuk tahap ekstraksi kitosan selanjutnya.

3.3.4 Ekstraksi

3.3.4.1 Ekstraksi pada kultivasi metode SmF

Ekstrak filtrat dan biomassa kering yang didapatkan, diolah lebih lanjut dalam dua tahap yang berbeda. Ekstraksi senyawa metabolit sekunder didapatkan dari filtrat hasil kultivasi fungi akan diberi perlakuan dengan penambahan etil asetat. Campuran ini kemudian dievaporasi pada kecepatan 120 rpm untuk menghasilkan ekstrak pekat yang mengandung metabolit sekunder (Talukdar *et al.*, 2021).

Pada tahap ekstraksi kitosan pada miselia akan mengacu kepada Aisah *et al.* (2023) dengan adanya modifikasi. Perlakuan pertama dilakukan deasetilasi dengan menambahkan 3M NaOH 1:40 (w/v) dan diaduk pada suhu 60°C selama 3 jam. Proses ini bertujuan untuk memecah komponen seluler dan menghasilkan Alkali Insoluble Material (AIM). AIM yang terbentuk kemudian dinetralkan dengan akuades untuk

menghilangkan sisa alkali dan dioven pada suhu 60°C selama 5 jam. Selanjutnya, AIM akan ditambahkan 5% asam asetat (1:40 w/v) dan diaduk selama 6 jam untuk melarutkan kitosan. Campuran ini kemudian disaring untuk memisahkan filtrat yang mengandung kitosan terlarut. Filtrat yang didapatkan akan ditambahkan dengan 3M NaOH hingga mencapai pH 10 dan didinginkan selama 24 jam untuk mengendapkan kitosan. Endapan kitosan yang terbentuk dilakukan pencucian beberapa kali dengan akuades untuk menetralkannya, memastikan tidak ada sisa asam atau basa. Setelah itu, endapan dibilas dengan metanol teknis dan kitosan dikeringkan menggunakan gas nitrogen

3.3.4.2 Ekstraksi pada Kultivasi metode SSF

Metode ekstraksi kitosan dari biomassa beras mengikuti prosedur yang dijelaskan oleh Stanley-Raja *et al.* (2021) dengan adanya modifikasi. Pertama, biomassa kering ditambahkan ke dalam larutan 3M NaOH dengan rasio 1:40 (w/v) dan diautoklaf selama 15 menit pada suhu 121°C. Alkali Insoluble Material (AIM) yang dihasilkan kemudian dicuci menggunakan aquadest hingga mencapai pH netral, dan dikeringkan pada suhu 60°C selama 5 jam untuk menghilangkan kelembaban.

AIM kemudian diolah lebih lanjut dengan penambahan larutan 5% asam asetat (1:40 w/v) dan diaduk selama 6 jam untuk melarutkan kitosan. Campuran ini kemudian disaring untuk memisahkan filtrat yang mengandung kitosan terlarut. Filtrat tersebut kemudian diautoklaf dengan larutan 3M NaOH hingga mencapai pH 10, dan didinginkan selama 24 jam untuk mengendapkan kitosan.

Endapan kitosan yang terbentuk selanjutnya dicuci beberapa kali dengan akuades untuk menetralkannya, memastikan tidak ada sisa asam atau basa yang tersisa. Setelah itu, endapan dibilas dengan metanol teknis untuk membersihkan sisa-sisa pengotor dan pelarut organik. Proses terakhir melibatkan pengeringan kitosan menggunakan metode *freeze-dried* untuk mempertahankan kestabilan dan kebersihan kitosan.

3.3.5. Uji Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Analisis KLT untuk ekstrak pekat kultivasi yang diperoleh dilakukan menggunakan fase diam Silica Gel F254 nm dan variasi pelarut n-hexana dan EtOAc sebagai fase gerak. Hasil penotolan KLT diidentifikasi menggunakan UV 254 nm untuk penentuan senyawa ikatan rangkap terkonjugasi, $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$ sebagai reagen dalam memvisualisasi senyawa organik dan reagen spesifik Dragendorffs untuk senyawa alkaloid pada ekstrak fungi.

3.3.5 Pemurnian Senyawa Metabolit Sekunder

Ekstrak yang berasal dari ekstrak kasar isolat 19A15RF dimurnikan hingga mendapatkan senyawa bioaktif menggunakan metode kolom kromatografi. Proses pemurnian dilakukan dengan beberapa metode kromatografi, termasuk KLT dan pemurnian melalui kromatografi kolom terbuka. Pemurnian dengan kolom kromatografi ini menggunakan silika gel (SiO_2) sebagai fase diam yang dihidrasi menggunakan pelarut n-heksan dan dielusi dengan pelarut n-heksan : etil dan diakhiri dengan metanol 100%. Pada proses pemurnian kolom kromatografi disiapkan dalam kondisi kering, dan kapas diletakkan pada kolom tersebut. Kemudian pelarut n-heksana ditetaskan dengan pipet tetes ke dalam kolom melalui dinding kolom untuk memadatkan kapas. Kapas bertindak sebagai penyaring.

Tahap selanjutnya, disiapkan fase diam berupa silika gel 60 yang telah ditambahkan pelarut organik. Silika gel 60 kemudian ditambahkan ke dalam kolom dan dipadatkan. Ketika ketinggian fase diam kolom telah stabil dan padat, ekstrak kasar dari isolat unggul yang dilarutkan dalam pelarut organik dialirkan melalui bagian atas kolom menggunakan pipet tetes. Eluen ditambahkan dengan perbandingan yang berbeda (v/v) untuk membentuk gradien. Setiap fraksi yang didapat ditampung ke dalam botol-botol *vial* (Supardan, 2022). Tahap selanjutnya dilakukan uji KLT, ekstrak diaplikasikan menggunakan pipa kapiler ke fase diam berupa pelat *silica gel* F254, dengan fase gerak campuran n-heksan dan etil asetat (EtOAc) dengan perbandingan (3:1) (Martosuyono *et al.*, 2014). Visualisasi pelat KLT dilakukan dengan menggunakan reagen spesifik

ninhidrin, Dragendorff, dan serium (IV) sulfat. Masing-masing fraksi yang didapatkan selanjutnya diuji aktivitasnya sebagai antibakteri.

3.3.6 Karakterisasi Kitosan

3.3.6.1 *Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR)*

Analisis FTIR dilakukan untuk menentukan derajat deasetilasi (DD) pada kitosan. Scanning dipindai pada daerah frekuensi antara 4000 cm⁻¹ sampai dengan 400 cm⁻¹ (Afroz *et al.*, 2021). Kemudian metode kuantitatif dilakukan dengan menghitung %DD pada panjang gelombang 1655 untuk gugus amida (-NH) dan 3450 untuk gugus hidroksil (-OH). Derajat deasetilasi dihitung dengan cara sebagai berikut:

$$\%DD = 100 - \left[\left(\frac{A_{1655}}{A_{3450}} \right) \times \frac{100}{1.33} \right]$$

Keterangan:

DD : Derajat Deasetilasi

A₁₆₅₅ : Absorbansi pada bilangan gelombang 1655 cm⁻¹ yang menunjukkan serapan dari amida

A₃₄₅₀ : Absorbansi bilangan gelombang 3450 cm⁻¹ yang menunjukkan serapan hidroksil

Faktor 1.33 : Nilai perbandingan untuk kitosan yang terdeasetilasi 100%.

3.3.6.2 *Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS)*

LC-MS/MS digunakan untuk menentukan berat molekul dan pola fragmentasi senyawa. Ekstrak metabolit isolat fungi disuntikkan ke dalam kolom kromatografi. Identifikasi dan karakterisasi ekstrak metabolit dan kitosan fungi yang dihasilkan isolat 19A15RF dilakukan dengan menggunakan Mode Positif LC-MSMS. Fraksi aktif dilarutkan dalam metanol dan dianalisis melalui analisis LC-MSMS yang dilengkapi dengan ACQUITY UPLC® H-Class System (Waters, Beverly, MA, USA), kolom

ACQUITY UPLC® HSS C18 (1,8 μ m 2,1 $\times$ 100 mm) (Waters, Beverly, MA, USA), dan Xevo G2-S Qtof Mass Spectro (Waters, Beverly, MA, USA) (Thomas *et al.*, 2022).

3.3.7 Uji Antibakteri

3.3.7.1 Metode Difusi Agar

Uji bioaktivitas kitosan sebagai agen antibakteri dilaksanakan melalui metode difusi agar untuk mengevaluasi kemampuannya dalam menghambat pertumbuhan mikroba patogen. Larutan kitosan dibuat dengan melarutkan kitosan dalam 5% asam asetat (w/v). Patogen bakteri (*Staphylococcus aureus* dan *Pseudomonas aeruginosa*) ditumbuhkan pada Mueller Hinton Agar (MHA). Kultur mikroba diinkubasi selama 18 jam untuk memastikan pertumbuhan optimal.

Selanjutnya, cincin steril ditempatkan pada media agar, kemudian 50 μ L larutan kitosan ditambahkan ke dalam salah satu cincin tersebut. Sebagai kontrol negatif digunakan 50 μ L metanol 12,5%, dan 50 μ L ciprofloxacin (2 mg/mL) untuk kontrol positif pada uji antibakteri, sedangkan pada uji antifungi digunakan ketoconazole (10 mg/mL). Media kemudian diinkubasi selama 24 jam. Zona inhibisi yang terbentuk di sekitar cincin menunjukkan aktivitas antibakteri kitosan, dengan ukuran zona sebagai indikator efektivitasnya (Afroz *et al.*, 2021).

Selanjutnya, uji *Minimum Inhibitory Concentration* (MIC) dilakukan dengan metode broth microdilution menggunakan resazurin 0,005% sebagai indikator viabilitas sel. Perubahan warna resazurin menandakan aktivitas metabolik mikroba, memungkinkan penentuan konsentrasi minimum kitosan yang efektif menghambat pertumbuhan patogen.

3.3.7.2 Uji KLT Bioautografi

Uji KLT Bioautografi dengan agar overlay pada ekstrak senyawa metabolit terhadap *Staphylococcus aureus* mengacu pada Rizky *et al.*, (2020) dengan sedikit modifikasi.

Mula-mula sampel ditotolkan pada plat SiO₂ dan dielusi menggunakan 2 sistem pelarut n-heksana dan etil asetat (10:1). Uji bioautografi dilakukan dengan persiapan biakan bakteri pada media MHA selama 18 jam, kemudian dibuat inokulum pada media TSB 3% hingga kekeruhan mencapai 0,5 McFarland. Kemudian Plat KLT dengan sampel yang telah dielusi ditempatkan pada cawan petri steril dan dituangkan media MHA sebanyak 10 mL (9 mL media TSB 3% dan 1 mL suspensi bakteri 0.5 McFarland) hingga merata, diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Kemudian ditetesi dengan 1 mL larutan uji dengan pereaksi resazurin. selanjutnya Zona hambat yang terbentuk diamati disekeliling cawan petri.

3.3.8 Uji Antikanker

Pengujian antikanker (sitotoksik) dari kitosan dan metabolit sekunder dilakukan pada tiga sel kanker A549 (kanker paru-paru), HeLa (kanker serviks), dan MCF-7 (kanker payudara) dengan menggunakan metode MTT plate assay yang mengacu pada Shingaki *et al.* (2016). Sel yang telah diukur dengan haemocytometer akan dipindahkan pada 96 well plate pada konsentrasi 1×10^5 sel/mL yang kemudian akan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37 °C dibawah 5% CO₂ untuk dilakukan pelekatan sel. Selanjutnya, sel yang tidak terikat akan dikeluarkan secara hati-hati. Tahap berikutnya, sel akan dilakukan 100 µL pengenceran seri fraksi hasil fraksinasi ekstrak isolat fungi unggul pada konsentrasi 100, 50, 25, 12,5, dan 6,25 mg/mL, serta doksorubisin sebagai kontrol positif pada konsentrasi 16, 8, 4, 2, dan 1 mg/mL, selanjutnya diinkubasi selama 72 jam. Reagen 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) (5mg/mL) ditambahkan ke setiap *well* (sumur) dan diinkubasi pada 5% CO₂, 37°C selama 4 jam.

V. SIMPULAN DAN SARAN

5.1 Simpulan

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, maka dapat disimpulkan bahwa:

1. Kitosan berhasil diisolasi dari isolat fungi 19A15-RF (*Aspergillus ochraceus*) melalui metode SmF dan SSF, dari hasil DD yang sama, yaitu sekitar 75% dan hasil analisis LC-MS/MS menunjukkan kitosan dengan DP 6 untuk kitosan hasil metode SmF (ChiSmF) dan DP 7 pada kitosan hasil metode SSF (ChiSSF). Kedua kitosan yang diperoleh menunjukkan aktivitas antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus* dengan zona inhibisi 17 mm (SmF) dan 13 mm (SSF), serta terhadap *Pseudomonas aeruginosa* dengan zona inhibisi 10 mm (SmF) dan 8 mm (SSF).
2. Senyawa metabolit sekunder telah berhasil diperoleh yang ditunjukkan melalui analisis LC-MS/MS dan interpretasi struktur yang menunjukkan keberadaan senyawa seperti struktur kompleks polyether lipid-amine (SmF) dan β -sitosterol-D-glukosida (SSF). Kedua senyawa menunjukkan aktivitas antibakteri terhadap *S. aureus* dan *P. aeruginosa*.
3. Senyawa metabolit hasil SSF juga menunjukkan aktivitas antikanker yang paling tinggi dari ketiga senyawa yang lain terhadap sel kanker payudara MCF-7 dengan persentase inhibisi sebesar 55,99%, yang mengindikasikan potensi sebagai kandidat senyawa antikanker alami.

5.2 Saran

Penelitian selanjutnya disarankan mengoptimalkan proses deasetilasi untuk meningkatkan tingkat kemurnian senyawa kitosan yang dihasilkan dan karakterisasi struktur senyawa perlu dilanjutkan menggunakan metode spektroskopi lanjutan seperti NMR untuk memastikan senyawa lebih akurat

DAFTAR PUSTAKA

DAFTAR PUSTAKA

- Abd El-Hack, M. E., El-Saadony, M. T., Shafi, M. E., Zabermawi, N. M., Arif, M., Batiha, G. E., Khafaga, A. F., Abd El-Hakim, Y. M., & Al-Sagheer, A. A. (2020). Antimicrobial and antioxidant properties of chitosan and its derivatives and their applications: A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 164, 2726–2744.
- Abo Elsoud, M. M., Mohamed, S. S., Selim, M. S., & Sidkey, N. M. (2023). Characterization and Optimization of Chitosan Production by *Aspergillus terreus*. *Arabian Journal for Science and Engineering*, 48(1), 93–106.
- Afroz, Md. M., Kashem, Md. N. H., Piash, K. M. P. S., & Islam, N. (2021). *Saccharomyces Cerevisiae* as an Untapped Source of Fungal Chitosan for Antimicrobial Action. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 193(11), 3765–3786.
- Aisah, S., Lutfiah, R., Juliasih, N. L. G. R., & Setiawan, A. (2023). Utilization Of Mangrove Endophytic Fungi As A Sustainable And Environmentally Friendly Source Of Chitosan. *Muhammadiyah International Public Health and Medicine Proceeding*, 3(1), Article 1.
- Al-Sharnouby, S., & Abd Elfatah, S. I. (2022). Fermentative Production, Characterization and Antimicrobial Activity of Chitosan from Some Zygomycetes Fungi. *Egyptian Journal of Chemistry*, 65(131), 1579–1589.
- Armas, F., Pacor, S., Ferrari, E., Guida, F., Pertinhez, T. A., Romani, A. A., Scocchi, M., & Benincasa, M. (2019). Design, antimicrobial activity and mechanism of action of Arg-rich ultra-short cationic lipopeptides. *PLOS ONE*, 14(2), e0212447.
- Bahri, S., Fajarwati, A. E., Setiawan, A., Hendri, J., Yuwono, S. D., Ambarwati, Y., & Zainul, R. (2024). Steroid Compounds from Endophytic (*Penicillium* sp.) of Mangrove *Avicennia marina*. *Journal of Medicinal and Chemical Sciences*, 7(2), 402–425.
- Bao, X., Zhang, Y., Zhang, H., & Xia, L. (2022). Molecular Mechanism of β -Sitosterol and its Derivatives in Tumor Progression. *Frontiers in Oncology*, 12.

- Baysal, Ö., Genç, D., Silme, R. S., Kırboğa, K. K., Çoban, D., Ghafoor, N. A., Tekin, L., & Bulut, O. (2024). Targeting Breast Cancer with N-Acetyl-D-Glucosamine: Integrating Machine Learning and Cellular Assays for Promising Results. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, 24(5), 334–347.
- Biesebeke, R., Ruijter, G., Rahardjo, Y. S. P., Hoogschagen, M. J., Heerikhuisen, M., Levin, A., Driel, K. G. A., Schutyser, M. A. I., Dijksterhuis, J., Zhu, Y., Weber, F. J., Vos, W. M., Hondel, K. A. M. J. J., Rinzema, A., & Punt, P. J. (2002). *Aspergillus oryzae* in solid-state and submerged fermentations. *FEMS Yeast Research*, 2(2), 245–248.
- Brauer, V. S., Pessoni, A. M., Freitas, M. S., Cavalcanti-Neto, M. P., Ries, L. N. A., & Almeida, F. (2023). Chitin Biosynthesis in *Aspergillus* Species. *Journal of Fungi*, 9(1), Article 1.
- Corbu, V. M., Gheorghe-Barbu, I., Dumbravă, A. Ștefania, Vrâncianu, C. O., & Șesan, T. E. (2023). Current Insights in Fungal Importance—A Comprehensive Review. *Microorganisms*, 11(6), Article 6.
- Corrêa-Moreira, D., Baptista, B. de O., Giosa, D., & Oliveira, M. M. E. (2024). Editorial: Emerging fungal pathogens: perspectives. *Frontiers in Fungal Biology*, 5. <https://doi.org/10.3389/ffunb.2024.1369062>
- Crognale, S., Russo, C., Petruccioli, M., & D'Annibale, A. (2022). Chitosan Production by Fungi: Current State of Knowledge, Future Opportunities and Constraints. *Fermentation*, 8, 76.
- Devia, R., Kaur, T., Guleria, G., Rana, K. L., Kour, D., Yadav, N., Yadav, A. N., & Saxena, A. K. (2020). In *Fungal secondary metabolites and their biotechnological applications for human health—ScienceDirect* (Chapter 9, pp. 147–161). Elsevier Inc.
- Fang, Z., Cong, W., Zhou, H., Zhang, J., & Wang, M. (2024). Biological activities, mechanisms and applications of chitoooligosaccharides in the food industry. *Journal of Functional Foods*, 116, 106219.
- Garcia-Rubio, R., de Oliveira, H. C., Rivera, J., & Trevijano-Contador, N. (2020). The Fungal Cell Wall: *Candida*, *Cryptococcus*, and *Aspergillus* Species. *Frontiers in Microbiology*, 10.
- Grundy, P. L., Jarvis, P. R., Jefferson, B., Fawell, J., Haley, J. A., & Goslan, E. H. (2024). A validated reverse-phase LC-MS/MS method for the analysis of haloacetic acids in drinking water: Supporting the transition from HAA5 to HAA9. *H2Open Journal*, 7(3), 272–285.

- Guan, Z., & Feng, Q. (2022). Chitosan and Chitooligosaccharide: The Promising Non-Plant-Derived Prebiotics with Multiple Biological Activities. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(12), Article 12.
- Gugnani, H. C. (2003). Ecology and taxonomy of pathogenic aspergilli. *Frontiers in Bioscience*, 8(6), s346-357.
- Hasim, S., & Coleman, J. J. (2019). Targeting the Fungal Cell Wall: Current Therapies and Implications for Development of Alternative Antifungal Agents. *Future Medicinal Chemistry*, 11(8), 869–883.
- He, X., Li, K., Xing, R., Liu, S., Hu, L., & Li, P. (2016). The production of fully deacetylated chitosan by compression method. *Egyptian Journal of Aquatic Research*, 42(1), 75–81. <https://doi.org/10.1016/j.ejar.2015.09.003>
- Hridoy, M., Gorapi, M. Z. H., Noor, S., Chowdhury, N. S., Rahman, M. M., Muscari, I., Masia, F., Adorisio, S., Delfino, D. V., & Mazid, M. A. (2022). Putative Anticancer Compounds from Plant-Derived Endophytic Fungi: A Review. *Molecules*, 27(1), Article 1.
- Huq, T., Khan, A., Brown, D., Dhayagude, N., He, Z., & Ni, Y. (2022). Sources, production and commercial applications of fungal chitosan: A review. *Journal of Bioresources and Bioproducts*, 7(2), 85–98.
- Hüttner, S., Johansson, A., Gonçalves Teixeira, P., Achterberg, P., & Nair, R. B. (2020). Recent advances in the intellectual property landscape of filamentous fungi. *Fungal Biology and Biotechnology*, 7(1), 16.
- Irbe, I., Andze, L., Blumfelde, M., Filipova, I., Verovkins, A., & Zoldners, J. (2023). Harvesting Mycelial Biomass of Selected Basidiomycetes for Chitosan Biopolymer Extraction. *Polymers*, 15(17), 3548.
- Kanto, D. A. R., Apriani, R., Ilhami, M., & Eva, A. (2021). Kitosan Dari Jamur Tiram (*Pleurotus ostreatus*) Dan Aplikasinya Sebagai Adsorben Logam Krom (Cr). *Lantanida Journal*, 9(1), 75–81.
- Ke, C.-L., Deng, F.-S., Chuang, C.-Y., & Lin, C.-H. (2021). Antimicrobial Actions and Applications of Chitosan. *Polymers*, 13(6), Article 6. <https://doi.org/10.3390/polym13060904>
- Koc, B., Akyuz, L., Cakmak, Y. S., Sargin, I., Salaberria, A. M., Labidi, J., Ilk, S., Cekic, F. O., Akata, I., & Kaya, M. (2020). Production and characterization of chitosan-fungal extract films. *Food Bioscience*, 35, 100545.

- Kravanja, G., Primožič, M., Knez, Ž., & Leitgeb, M. (2019). Chitosan-based (Nano)materials for Novel Biomedical Applications. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 24(10), 1960.
- Laila, A., Setiawan, F., Widyastuti, W., Fadhilah, M. R., Setiawan, A., Juliasih, N. L. G. R., Setiawan, W. A., Apriliana, E., Ahmadi, P., Arai, M., & Hendri, J. (2023). Exploration and Biorefinery Antimicrobial Agent through Solid State Fermentation from Indonesia's Marine Actinomycetes. *Fermentation*, 9(4), Article 4.
- Li, H., Li, Y., Wang, Y., Liu, L., Dong, H., & Satoh, T. (2022). Membrane-active amino acid-coupled polyetheramine derivatives with high selectivity and broad-spectrum antibacterial activity. *Acta Biomaterialia*, 142, 136–148.
- Martosuyono, P., Pratitis, A., Prasetya, A., and Prabawati, E. K. 2014. Desalination Of Chitooligosaccharides Using Gel Filtration and Ultrafiltration. *Squalen Bulletin of Marine and Fisheries Postharvest and Biotechnology*, 9(3), 127–136.
- Mn, I., Oe, A., Kc, U., & Ka, A. (2020). Antibacterial Activity of Chromatography Fractions from *Jateorhiza macrantha* (Hook F.) Exell Mendonça (Menispermaceae) Leaves. *Saudi Journal of Medical and Pharmaceutical Sciences*, 06(02), 212–216.
- Niskanen, T., Lücking, R., Dahlberg, A., Gaya, E., Suz, L. M., Mikryukov, V., Liimatainen, K., Druzhinina, I., Westrip, J. R. S., Mueller, G. M., Martins-Cunha, K., Kirk, P., Tedersoo, L., & Antonelli, A. (2023). Pushing the Frontiers of Biodiversity Research: Unveiling the Global Diversity, Distribution, and Conservation of Fungi. *Annual Review of Environment and Resources*, 48(Volume 48, 2023), 149–176.
- Pan, C., Yang, K., Erhunmwunsee, F., Wang, B., Yang, D., Lu, G., Liu, M., Li, Y., & Tian, J. (2023). Antifungal Activity of Perillaldehyde on *Fusarium solani* and Its Control Effect on Postharvest Decay of Sweet Potatoes. *Journal of Fungi*, 9(2), Article 2.
- Pandya, R. P., Kapadiya, I. B., Patel, M. L., & Gadhiya, V. C. (2024). Chitosan applications in plant disease control: A mini review. *Farming & Management*, 9(2), 92–101.
- Pellis, A., Guebitz, G. M., & Nyanhongo, G. S. (2022). Chitosan: Sources, Processing and Modification Techniques. *Gels*, 8(7), 393.
- Pinar, O., & Rodríguez-Couto, S. (2024). Biologically active secondary metabolites from white-rot fungi. *Frontiers in Chemistry*, 12.

- Pliszka, M., & Szablewski, L. (2021). Glucose Transporters as a Target for Anticancer Therapy. *Cancers*, 13(16), 4184.
- Poeloengasih, C. D., Hernawan, H., & Angwar, M. (2010). Isolation and characterization of chitin and chitosan prepared under various processing times. *Indonesian Journal of Chemistry*, 8(2), Article 2.
- Qureshi, S., Al-Shabanah, O. A., Al-Bekairi, A. M., Al-Harbi, M. M., Al-Gharably, N. M., & Raza, M. (2000). Studies on the cytotoxic, biochemical and anti-carcinogenic potentials of ninhydrin on Ehrlich ascites carcinoma cell-bearing Swiss albino mice. *Investigational New Drugs*, 18(3), 221–230.
- Rezaei, M., & Hama, N. H. (2024a). Antibacterial, antifungal, antiviral, and anticancer activities of chitosan and its derivatives: Basic mechanisms. *Micro Nano Bio Aspects*, 3(1), 23–28.
- Rezaei, M., & Hama, N. H. (2024b). Antibacterial, antifungal, antiviral, and anticancer activities of chitosan and its derivatives: Basic mechanisms. *Micro Nano Bio Aspects*, 3(1), 23–28.
- Sekandi, P., Namukobe, J., Byamukama, R., Nagawa, C. B., Barbini, S., Bacher, M., Böhmendorfer, S., & Rosenau, T. (2023). Antimicrobial, antioxidant, and sun protection potential of the isolated compounds from *Spermacoce princeae* (K. Schum). *BMC Complementary Medicine and Therapies*, 23(1), 201.
- Seratlić, N., Hromiš, N., Popović, S., Šuput, D., Pantić, J., & Čabarkapa, I. (2024). Degree of Chitosan Deacetylation: Potential of Experimental Equations Application. *Kemija u Industriji*, 73(13), 563–569.
- Setiawan, A., Setiawan, F., Susianti, S., Setiawan, W. A., Ahmadi, P., Pangestu, R., Hendri, J., & Juliasih, N. L. G. R. (2025). Chemical Profile of The Ethyl Acetate Extract of *Aspergillus sydowi*, 22-PLP1-F1, as Antibacterial Agent Against Clinically Resistant Strains of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Multidisciplinary Applied Natural Science*, 5(1), 184–199.
- Shi, Y., Ji, M., Dong, J., Shi, D., Wang, Y., Liu, L., Feng, S., & Liu, L. (2023). New bioactive secondary metabolites from fungi: 2023. *Mycology*, 0(0), 1–39.
- Shingaki, M., Wauke, T., Ahmadi, P., & Tanaka, J. (2016). Four Cytotoxic Spongian Diterpenes from the Sponge *Dysidea* cf. *Arenaria*. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 64(3).
- Supardan, A. D. 2022. Uji Toksisitas Hasil Fraksinasi Kolom Kromatografi Ekstrak Metanol Buah Mahkota Dewa (*Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl). *Jurnal Sains Terapan*, 12(1), 32–42.

- Stanley-Raja, V., Senthil-Nathan, S., Chanthini, K. M.-P., Sivanesh, H., Ramasubramanian, R., Karthi, S., Shyam-Sundar, N., Vasantha-Srinivasan, P., & Kalaivani, K. (2021). Biological activity of chitosan inducing resistance efficiency of rice (*Oryza sativa* L.) after treatment with fungal based chitosan. *Scientific Reports*, *11*, 20488.
- Talukdar, R., Padhi, S., Rai, A. K., Masi, M., Evidente, A., Jha, D. K., Cimmino, A., & Tayung, K. (2021). Isolation and Characterization of an Endophytic Fungus *Colletotrichum coccodes* Producing Tyrosol From *Houttuynia cordata* Thunb. Using ITS2 RNA Secondary Structure and Molecular Docking Study. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, *9*.
- Thomas, S. N., French, D., Jannetto, P. J., Rappold, B. A., & Clarke, W. A. (2022). Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry for Clinical Diagnostics. *Nature Reviews Methods Primers*, *2*(1), 1–14.
- Urbain, A., & Simões-Pires, C. (2020). *Thin-Layer Chromatography for the Detection and Analysis of Bioactive Natural Products*. 1–29.
- Virmani, T., Kumar, G., Sharma, A., Pathak, K., Akhtar, M. S., Afzal, O., & Altamimi, A. S. A. (2023). Amelioration of Cancer Employing Chitosan, Its Derivatives, and Chitosan-Based Nanoparticles: Recent Updates. *Polymers*, *15*(13), Article 13.
- Younes, I., & Rinaudo, M. (2015). Chitin and Chitosan Preparation from Marine Sources. Structure, Properties and Applications. *Marine Drugs*, *13*(3), Article 3.
- Zhao, C.-R., You, Z.-L., Chen, D.-D., Hang, J., Wang, Z.-B., Ji, M., Wang, L.-X., Zhao, P., Qiao, J., Yun, C.-H., & Bai, L. (2023). Structure of a fungal 1,3- β -glucan synthase. *Science Advances*, *9*(37), eadh7820.
- Zheng, R., Li, S., Zhang, X., & Zhao, C. (2021). Biological Activities of Some New Secondary Metabolites Isolated from Endophytic Fungi: A Review Study. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(2), Article 2.