



EKSPLORASI AKTIVITAS ENZIMATIK DARI FUNGI ENDOFIT LAUT SERTA APLIKASINYA UNTUK HIDROLISIS KITOSAN

Muhammad Arief Budiman¹, Kustiariyah Tarman^{1,2*}, Safrina Dyah Hardiningtyas¹,
Mirah Afiza Nurazizah¹

¹Departemen Teknologi Hasil Perairan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan IPB University
Jalan Agatis Kampus IPB Dramaga, Bogor, Jawa Barat, Indonesia 16680

²Pusat Kajian Sumberdaya Pesisir dan Lautan, IPB University
Jalan Pajajaran Raya Kampus IPB Baranangsiang, Kota Bogor, Jawa Barat, Indonesia 16127

Diterima: 11 Desember 2023/Disetujui: 21 Oktober 2024

*Korespondensi:kustiaz@apps.ipb.ac.id

Cara sitasi (APA Style 7th): Budiman, M. A., Tarman, K., Hardiningtyas, S. D., & Nurazizah, M. A. (2024). Eksplorasi aktivitas enzimatik dari fungi endofit laut serta aplikasinya untuk hidrolisis kitosan. *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*, 27(11), 1035-1049. <http://dx.doi.org/10.17844/jphphi.v27i11.58419>

Abstrak

Fungi endofit laut merupakan fungi yang berasosiasi dengan jaringan organisme laut, yaitu rumput laut, koral, lamun, bunga karang maupun sedimen di lingkungan laut. Fungi dapat memproduksi metabolit sekunder berupa senyawa enzim ekstraseluler, di antaranya selulase, amilase, pektinase, kitosanase, lipase, maupun protease. Penelitian ini bertujuan menentukan potensi isolat fungi endofit berdasarkan aktivitas kitosanolitik, selulolitik, dan proteolitik untuk mendegradasi kitosan. Isolat fungi endofit laut diisolasi dari jaringan rumput laut, lamun, dan mangrove dari perairan Sukabumi dan Kepulauan Buton, Indonesia. Fungi sebanyak 20 isolat dilakukan penapisan aktivitas enzimatik (kitosanolitik, selulolitik, dan proteolitik) dengan metode difusi agar untuk mengetahui diameter zona bening yang dihasilkan. Proses hidrolisis dilakukan dengan menginokulasi isolat ke media hidrolisis yang berisi koloidal kitosan selama 7 hari. Hasil penelitian menunjukkan 12 isolat memiliki aktivitas kitosanolitik, 8 isolat selulolitik, dan 10 isolat proteolitik. Lima isolat memiliki aktivitas terhadap semua aktivitas enzimatik yang diuji. Dua isolat dengan kode KVA dan BM48A memiliki diameter zona bening kitosanolitik tertinggi. Kedua isolat tersebut diidentifikasi melalui *DNA Barcoding* sebagai spesies dengan galur *Trichoderma harzianum* KTR3 dan *Aspergillus sydowii* KTR50. Rendemen hidrolisat kitosan yang dihidrolisis menggunakan isolat *T. harzianum* KTR3 dan *A. sydowii* KTR50 7,44% dan 6,74%. Nilai viskositas yang dihidrolisis menggunakan isolat *T. harzianum* KTR3 dan *A. sydowii* KTR50 berturut-turut 21,10 cP dan 9,26 cP serta nilai bobot molekul 9,06 kDa dan 4,47 kDa. Aktivitas enzimatik yang dihasilkan oleh isolat fungi endofit laut memiliki kemampuan dalam mendegradasi kitosan, hal ini dibuktikan dengan terjadinya penurunan nilai viskositas dan bobot molekul kitosan.

Kata kunci: *Aspergillus sydowii*, kitosanolitik, proteolitik, selulolitik, *Trichoderma harzianum*

Exploration of Enzymatic Activity of Marine Endophyte Fungi and Its Application for Chitosan Hydrolysis

Abstract

Marine endophytic fungi are fungi associated with tissues of marine organisms, such as seaweed, coral, seagrass, sponges, and sediments in the marine environment. Fungi can produce extracellular enzymes, including cellulase, amylase, pectinase, chitosanase, lipase, and protease. This study aimed to determine the potential of fungal isolates to produce chitosanolytic, cellulolytic, and proteolytic activities for the degradation of chitosan. Marine endophytic fungal isolates were obtained from seaweed, seagrass,

and mangroves from the waters of the Sukabumi and Buton Islands, Indonesia. Twenty fungal isolates were screened for enzymatic activity (chitosanolytic, cellulolytic, and proteolytic) using the agar diffusion method to determine the diameter of the clear zone produced. The hydrolysis process was carried out by inoculating the isolates into hydrolysis media containing colloidal chitosan for seven days. The results showed that 12 isolates had chitosanolytic activity, 8 had cellulolytic activity, and 10 had proteolytic activity. Five isolates showed activity against all tested enzymes. Two isolates with codes KVA and BM48A had the highest chitosanolytic clear zone diameter. Isolates were identified by DNA Barcoding as species with strains *Trichoderma harzianum* KTR3 and *Aspergillus sydowii* KTR50. The yields of the chitosan hydrolysate were 7.44% and 6.74%, respectively. Meanwhile, the viscosity values produced were 21.1 cP and 9.26 cP and the molecular weight values were 9.06 kDa and 4.47 kDa. The enzymatic activity produced by marine endophytic fungal isolates has the ability to degrade chitosan, as evidenced by the decrease in the viscosity and molecular weight of chitosan.

Keywords: *Aspergillus sydowii*, cellulolytic, chitosanolytic, proteolytic, *Trichoderma harzianum*

PENDAHULUAN

Mikroorganisme berpotensi menghasilkan produk alami baru yang berkesinambungan dalam pemenuhan biomassa untuk kebutuhan berbagai bidang, khususnya bioteknologi di antaranya senyawa bioaktif (Istianah *et al.*, 2024; Kalontong *et al.*, 2022; Pannindriya *et al.*, 2021; Hariati *et al.*, 2018), enzim, eksopolisakarida, pigmen (Sibero *et al.*, 2018), dan sebagainya (Lauritano & Ianora, 2018). Carroll *et al.* (2021) menyatakan bahwa produk alami laut mewakili sekitar 47% dari total produk alami baru yang dilaporkan pada tahun 2019. Fungi endofit laut merupakan salah satu mikroorganisme yang berperan dalam menghasilkan *natural products*. Fungi laut dapat diisolasi dari sedimen anorganik dan di dalam jaringan organisme laut secara endofit tanpa memengaruhi atau memberikan efek negatif terhadap inangnya. Asal inang dari fungi akan memengaruhi profil metabolit yang dihasilkan (El-Bondkly *et al.*, 2021). Hal ini tentu akan berpengaruh terhadap potensi bioteknologi yang dihasilkan (Dastogeer *et al.*, 2018), tak terkecuali enzim yang dihasilkan dari metabolit fungi.

Fungi endofit laut mampu menghasilkan enzim-enzim melalui mekanisme ekstraseluler. Fungi endofit laut memiliki kelebihan dalam stabilitas, kemudahan produksi, optimalisasi, serta keamanannya untuk diaplikasikan dalam bidang makanan maupun kesehatan (Bhadra *et al.*, 2022). Enzim yang dihasilkan dari fungi laut memiliki stabilitas dalam kondisi yang ekstrem, yaitu salinitas yang tinggi, tekanan

yang tinggi, dan kisaran pH yang luas. Hal ini dikarenakan kondisi lingkungan laut yang ekstrem memberikan sifat alami kepada fungi yang hidup di dalamnya.

Fungi menghasilkan golongan enzim hidrolase untuk mendegradasi berbagai senyawa kompleks dan berperan sebagai dekomposer. Kemampuan yang dimiliki tersebut menjadikan fungi sebagai sumber enzim terbarukan di antaranya xilanase, pektinase, selulase, kitosanase, protease lipase, lakase dan lainnya (Pilgaard *et al.*, 2019). Fungi genus *Aspergillus*, *Fusarium*, *Nigrospora*, dan *Trichoderma* yang diisolasi dari lingkungan laut menghasilkan enzim selulase, xilanase, kitosanase, amilase protease, dan lipase (Shehata & Abd El Aty 2015; Farouk *et al.*, 2020; Elgammal *et al.*, 2020). Potensi dari fungi tersebut sangat berguna sebagai agen atau katalisator degradasi senyawa polimer, salah satunya kitosan. Aktivitas enzimatik yang dihasilkan oleh fungi dapat mendegradasi polimer, yaitu karagenan dan kitosan (Sandhya *et al.*, 2005; Tarman *et al.*, 2020).

Kitosan merupakan polimer yang dihasilkan dari sumber daya perairan (cangkang krustasea) yang tersusun dari kopolimer N-asetil glukosamin dan glukosamin yang terikat linier oleh ikatan glikosidik (Chattopadhyay & Inamdar, 2010). Kitosan bersifat polielektrolit yang larut dalam asam organik pada pH sekitar 4–6, dengan kelarutannya dipengaruhi oleh bobot molekul dan derajat deasetilasinya (Fadli *et al.*, 2018). Kitosan juga merupakan polimer alami bersifat kationik yang banyak digunakan sebagai material dalam bidang biomedis (Yuan *et al.*, 2019). Kitosan memiliki aktivitas biologis, yaitu antioksidan



dan antimikroba. Aktivitas biologis kitosan akan meningkat seiring dengan penurunan bobot molekulnya (Kulig *et al.*, 2023). Rantai polimer yang panjang dan bobot molekul yang tinggi menyebabkan adanya limitasi formulasi kitosan dalam pengaplikasian pada beberapa bidang. Depolimerisasi kitosan untuk menurunkan bobot molekul dalam upaya meningkatkan kelarutannya pada pH netral sangat perlu dilakukan (Aranaz *et al.*, 2021).

Depolimerisasi kitosan dapat dilakukan dengan hidrolisis secara kimia, fisik, maupun enzimatis (Yuan *et al.*, 2019). Degradasi kitosan melalui aktivitas enzimatis lebih diminati karena menawarkan teknologi hijau yang lebih ramah lingkungan. Enzim endoglukanase dan aktivitas kitosanolitik dari fungi memiliki kemampuan mendegradasi kitosan menjadi kitosan oligosakarida (Gonçalves *et al.*, 2023; Shehata & Abd El Aty, 2015). Enzim hidrolase di antaranya kitosanase, hemiselulase, pepsin, pranase, papain, dan lipase memiliki kemampuan dalam mendegradasi kitosan menjadi kitosan oligosakarida dengan karakteristik viskositas, bobot molekul dan derajat depolimerisasi yang bervariasi (Aranaz *et al.*, 2021).

Potensi fungi endofit laut melalui aktivitas enzimatis untuk menghidrolisis kitosan menjadi suatu sub penelitian yang menarik untuk diteliti. Hidrolisis kitosan menggunakan enzim umumnya dilakukan dengan mengekstrak senyawa enzim dari fungi untuk kemudian dimurnikan atau menggunakan enzim kasarnya untuk dihidrolisis. Penelitian yang dilakukan Gonçalves *et al.* (2023) terkait ekstraksi enzim golongan selulase dari *Aspergillus* untuk menghidrolisis kitosan menjadi oligokitosan. Penelitian hidrolisis kitosan menggunakan isolat fungi yang memiliki aktivitas kitosanolitik, selulolitik, dan proteolitik belum dilaporkan. Oleh karena itu, penelitian ini bertujuan untuk menentukan potensi isolat fungi endofit berdasarkan aktivitas kitosanolitik, selulolitik, dan proteolitik dalam mendegradasi kitosan.

BAHAN DAN METODE

Penapisan Aktivitas Enzimatis

Bahan penelitian menggunakan 20 isolat fungi dari koleksi Laboratorium Bioteknologi Hasil Perairan yang telah diisolasi dari jaringan tumbuhan rumput laut

dan daun mangrove dari perairan Sukabumi Provinsi Jawa Barat dan Perairan Kepulauan Buton Provinsi Sulawesi Tenggara. Kitosan yang digunakan berasal dari CV Bio Chitosan Indonesia Cirebon, Indonesia. Proses penelitian diawali dengan inokulasi sampel dari media *Potato Dextrose Agar* (PDA) ke media penapisan masing-masing aktivitas enzimatis.

Fungsi sebanyak 20 isolat disiapkan untuk dilakukan penapisan kualitatif aktivitas enzim kitosanolitik, selulolitik, dan proteolitik. Penapisan aktivitas selulolitik menggunakan media CMC dengan komposisi *Carboxymethylcellulose* (CMC) 10 g/L, K_2HPO_4 5 g/L, $MgSO_4$ 0,2 g/L, Fe 0,01 g/L, *yeast extract* 2 g/L, agar 20 g/L (Gonçalves *et al.*, 2023). Penapisan aktivitas kitosanolitik menggunakan media *chitosan-detection agar* yang terdiri dari larutan kitosan 1% (b/v), *yeast extract* 2 g/L, $MgSO_4$ 2 g/L dan bacto agar 20 g/L (Zu *et al.*, 2012). Penapisan proteolitik menggunakan media PDA dan susu skim (Sandhya *et al.*, 2005). Bahan pada setiap media dilarutkan dengan akuades. Inokulasi semua isolat fungi ke setiap masing-masing media di cawan dan diinkubasi selama tujuh hari. Zona bening yang terbentuk diamati untuk dihitung indeks enzimatisnya. Isolat fungi yang menghasilkan indeks enzimatis terbesar kemudian dipilih untuk digunakan dalam menghidrolisis kitosan. Persamaan perhitungan indeks enzimatis sebagai berikut:

$$\text{Indeks enzimatis (rasio diameter)} = \frac{A}{B}$$

Keterangan:

A= diameter zona bening (cm)

B= diameter koloni (cm)

Identifikasi Spesies Isolat Fungi Endofit

Isolat fungi endofit yang memiliki aktivitas enzimatis terhadap semua media penapisan dilakukan identifikasi spesies. Metode identifikasi yang digunakan, yaitu *DNA sequencing* dan penyusunan pohon filogenetik (Stackebrandt & Goebel 1994). Tahapan *DNA sequencing* dilakukan di Laboratorium PT Genetika Science menggunakan metode *bi-directional*

sequencing. Hasil DNA *sequencing* digunakan untuk identifikasi fungi endofit dengan dilakukan *alignment* menggunakan BLAST NCBI dan dianalisis kekerabatannya melalui analisis pohon filogenetik. Kekerabatan genetik antara isolat dengan *sequence* organisme laut lainnya dilakukan menggunakan software MEGA 11,0. Analisis pohon filogenetik dilakukan dengan mensejajarkan seluruh *sequence* dan *sequence* pembandingnya. Metode *multiple alignment* diterapkan menggunakan fitur *Neighbor Joining Method*, kemudian pengujian dilakukan dengan nilai *bootstrap* 10.000 kali.

Hidrolisis Enzimatis Kitosan

Isolat fungi terpilih yang memiliki aktivitas enzim kitosanolitik, selulolitik, dan proteolitik kemudian dilakukan prekulturan selama 3-4 hari. Media prekulturan merupakan media kaldu yang terdiri dari PDB 12 g/L dan koloidal kitosan 0,5% dengan volume 20% dari volume media hidrolisis yang akan dibuat. Kultur isolat yang telah berusia 3-4 hari kemudian dipindahkan ke dalam media hidrolisis kitosan yang meliputi kitosan dalam bentuk koloidal 1%, *yeast extract* 2 g/L, KH_2PO_4 2 g/L, dan MgSO_4 0,5 g/L, kemudian seluruh media dicampur ke akuades pada pH 7. Koloidan kitosan dibuat dengan melarutkan 1% kitosan (b/v) ke dalam larutan asam asetat dengan konsentrasi 1% (v/v), kemudian pH disesuaikan menjadi 6,5-7 sehingga larutan berubah menjadi koloidal kitosan. Media dihidrolisis menggunakan *rotary shaker* selama tujuh hari (Rafael *et al.*, 2019).

Media dipresipitasi untuk mengendapkan hasil hidrolisis kitosan yang telah dihidrolisis menggunakan isopropil alkohol. Endapan hidrolisis kitosan yang terbentuk dipisahkan dengan media hidrolisis dan miselia fungi. Filtrat endapan kemudian dibilas menggunakan akuades hingga sisa pengotor ikut terbuang. Filtrat hidrolisis kitosan kemudian dikeringkan menggunakan dehidrator selama 12 jam pada suhu 50°C. Rendemen yang didapatkan kemudian dihitung dengan persamaan sebagai berikut:

$$\text{Rendemen (\%)} = \frac{A}{B} \times 100$$

Keterangan:

A = bobot hidrolisat kitosan kering (g)

B = bobot kitosan sebelum hidrolisis (g)

Analisis Viskositas

Viskositas diukur menggunakan *Brookfield DV-E viscometer*. Pengukuran viskositas dilakukan dengan melarutkan setiap sampel pada asam asetat 1% (v/v) dengan persentase kitosan dalam pelarut 2% (b/v). Hasil pengukuran viskositas Brookfield disebut sebagai viskositas spesifik. Sampel diukur nilai viskositasnya (cP) menggunakan spindle 2 kecepatan 100 rpm selama 60 detik pada suhu ruang dengan %*torque* pengukuran harus berada antara 10-100% untuk mencegah turbulensi dan eror. Sampel yang telah dilarutkan dimasukkan ke dalam gelas piala dengan volume 100-150 mL, kemudian *spindle* diturunkan hingga tercelup ke dalam larutan sampel. Nilai viskositas akan muncul pada alat viskometer yang digunakan sebagai data viskositas sampel.

Analisis Bobot Molekul

Bobot molekul sampel didapatkan dengan menghitung nilai viskositas intrinsiknya (Wardhani *et al.*, 2013). Nilai viskositas intrinsik diperoleh dari hasil pengukuran viskositas menggunakan viskometer Brookfield menggunakan persamaan Huggins:

$$\frac{\eta_{sp}}{C} = [\eta] + kH[\eta]^2C$$

Keterangan:

η_{sp} = viskositas spesifik (cP)

C = konsentrasi larutan g/L

kH = konstanta Huggins (0,3)

$[\eta]$ = viskositas intrinsik (dL/g)

Hubungan bobot molekul dengan viskositas pada sampel hidrolisis kitosan dapat dihitung dengan persamaan Mark Houwink. Nilai eksponen a dan konstanta k_{MH} tergantung pada jenis polimer dan pelarut yang digunakan. Nilai eksponen a dan konstanta k_{MH} dalam perhitungan ini mengikuti penelitian Chen & Tsaih (1998) dan Jonathan *et al.* (1998) yang sudah sesuai dengan penelitian ini menggunakan pelarut asam asetat dan polimer kitosan dengan persamaan:



$$[\eta] = k_{MH} \times M^a$$

$$M = \left(\frac{[\eta]}{k_{MH}} \right)^{\frac{1}{a}}$$

Keterangan:

$[\eta]$ = viskositas intrinsik (dL/g)

k_{MH} = asam asetat $4,74 \times 10^{-4}$
dan air $3,10 \times 10^{-2}$

a = asam asetat 0,723 dan air 2,03

M = berat molekul (Da)

Analisis Data

Data penelitian ini dianalisis statistika menggunakan rancangan acak lengkap (RAL) satu faktor, yaitu perbedaan jenis isolat fungi. Data dianalisis dengan metode *One Way Anova*. Parameter rasio zona bening, viskositas, dan bobot molekul. Data dianalisis sebanyak 3 kali pengulangan. Data diolah menggunakan aplikasi IBM SPSS Statistics 24.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Penapisan Aktivitas Enzimatis dari Isolat Fungi Endofit Laut

Isolat fungi endofit laut yang telah diisolasi dari jaringan rumput laut, lamun dan daun mangrove dilakukan penapisan untuk mengetahui aktivitas kualitatif enzimatisnya. Isolat yang memiliki aktivitas enzimatis pada analisis ini ditandai dengan terbentuknya zona bening disekitar koloni fungi. Aktivitas enzimatis yang dihasilkan secara kualitatif dapat dilihat pada *Table 1*.

Fungi yang dianalisis sebanyak 20 isolat. Hasil penelitian menunjukkan terdapat 12 isolat fungi yang memiliki aktivitas kitosanolitik, 8 isolat yang memiliki aktivitas selulolitik dan 10 isolat yang memiliki aktivitas proteolitik. Sarasan *et al.* (2021) melaporkan bahwa sebanyak 37,6% fungi endofit yang diisolasi dari berbagai rumput laut memiliki aktivitas selulolitik. Venkatachalam *et al.* (2015) juga melaporkan bahwa fungi endofit dari rumput laut memiliki aktivitas kitinolitik dan kitosanolitik. Aktivitas proteolitik juga ditemukan dari isolat fungi endofit *Aspergillus ochraceus* BT21 (Elgammal *et al.*, 2020). Aktivitas kitosanolitik, selulolitik, dan proteolitik yang dihasilkan oleh isolat fungi tersebut menunjukkan kemampuan isolat dalam mendegradasi senyawa kitosan,

selulosa, maupun protein (Gonçalves *et al.*, 2023). Hasil penapisan ini menunjukkan bahwa isolat fungi yang positif memiliki aktivitas enzimatis tertentu yang dapat digunakan untuk memproduksi enzim-enzim kitosanase, selulase, dan protease.

Hasil penapisan memperoleh 5 isolat yang menunjukkan hasil positif terhadap semua aktivitas enzimatis yang diamati. Kelima isolat tersebut kemudian dihitung indeks aktivitas enzimatisnya dengan mengukur diameter zona bening yang dihasilkan. Indeks aktivitas kitosanolitik, selulolitik, dan proteolitik dari 5 isolat fungi tersebut menunjukkan hasil yang berbeda nyata ($p < 0,05$). Indeks enzimatis kelima isolate fungi terpilih dapat dilihat pada *Table 2*.

Isolat KVA dan BM48A kemudian dipilih sebagai isolat yang digunakan untuk menghidrolisis kitosan. Hal ini karena kedua isolat tersebut merupakan isolat dengan indeks kitosanolitik tertinggi berdasarkan *Tukey's test*. Selain itu, indeks selulolitik dari kedua isolat tersebut juga tergolong tinggi dari isolat lainnya. Indeks proteolitik dari isolat KVA juga tinggi, namun isolat BM48A memiliki indeks yang kecil. Aranz *et al.* (2021) melaporkan bahwa aktivitas selulolitik dan proteolitik memiliki kemampuan dalam mendegradasi kitosan.

Aktivitas enzimatis yang dihasilkan oleh setiap fungi endofit sangat dipengaruhi oleh asal inangnya. Kemampuan dan jenis aktivitas enzimatis tersebut bergantung pada kondisi inang di antaranya kondisi pertumbuhan inang dan bagian tumbuhan inang yang diisolasi. Faktor lain di antaranya unsur geografis (kondisi lingkungan habitat inang), ketinggian pasang surut, lokasi geografis serta beberapa parameter abiotik suhu, cahaya, polusi nutrisi, salinitas, dan pH lingkungan (Vega-Portalatino *et al.*, 2023). Hal ini berkaitan dengan peran fungi sebagai dekomposer, dimana aktivitas enzimatisnya akan menyesuaikan dengan jenis substrat atau senyawa inangnya.

Isolat dan hasil penapisan enzimatis zona hambat dari KVA dan BM48A dapat dilihat pada *Figure 1* dan *Figure 2*. Hasil penelitian menunjukkan terdapat zona bening

Table 1 Qualitative screening of enzymatic activity with clear zones of fungi isolate
Tabel 1 Penapisan kualitatif zona bening aktivitas enzimatik dari isolat fungi

Isolates code	Host/species	Chitosanolytic	Sellulolytic	Proteolytic
1. Seaweed				
KVA	<i>Vaucheria</i> sp.	+	+	+
PP5B	<i>Gellidella</i> sp.	+	-	-
NHA	<i>Halimeda</i> sp.	-	-	-
NHA1A	<i>Halimeda</i> sp.	+	-	+
IC2A	<i>Sargassum</i> sp.	-	+	+
BM48A	<i>Cladophora</i> sp.	+	+	+
UB3	<i>Ulva</i> sp.	-	-	-
LB10B	<i>Padina</i> sp.	+	+	-
WB4/2	<i>Cladophora</i> sp.	+	-	-
BB3	<i>Gracilaria</i> sp.	-	-	-
TPSA	<i>Ulva</i> sp.	+	-	-
2-A	<i>Sargassum</i> sp.	-	-	-
ABST4	<i>Ulva</i> sp.	+	+	-
NB29	<i>Solieria</i> sp.	+	+	+
UW251	<i>Ulva</i> sp.	-	-	+
SM9-1	<i>Sargassum</i> sp.	-	-	+
2. Seagrass				
Lmn53	-	-	-	-
WB5/2	-	+	+	+
WB6/2	-	+	+	+
3. Mangrove				
BKIC2	<i>R. mucronata</i> leaf	+	-	+

Table 2 Index enzymatic (ratio of diameter) of marine endophytic fungal isolates
Tabel 2 Indeks enzimatik (rasio diameter) dari isolat fungi endofit laut

Isolates code	Host	Chitosanolytic (cm)	Sellulolytic (cm)	Proteolytic (cm)
KVA	<i>Vaucheria</i> sp.	2.07±0.07 ^c	1.26±0.08 ^{ab}	1.47±0.08 ^{bc}
BM48A	<i>Cladophora</i> sp.	1.53±0.06 ^b	1.48±0.05 ^b	1.26±0.03 ^a
NB29	<i>Solieria</i> sp.	1.31±0.03 ^a	1.20±0.08 ^a	1.33±0.03 ^{ab}
WB5/2	Seagrass (unknown species)	1.37±0.11 ^{ab}	1.30±0.18 ^{ab}	1.20±0.05 ^a
WB6/2	Seagrass (unknown species)	1.41±0.03 ^{ab}	1.20±0.04 ^a	1.52±0.06 ^c

Different superscript on the same column indicate significant differences ($p < 0.05$)

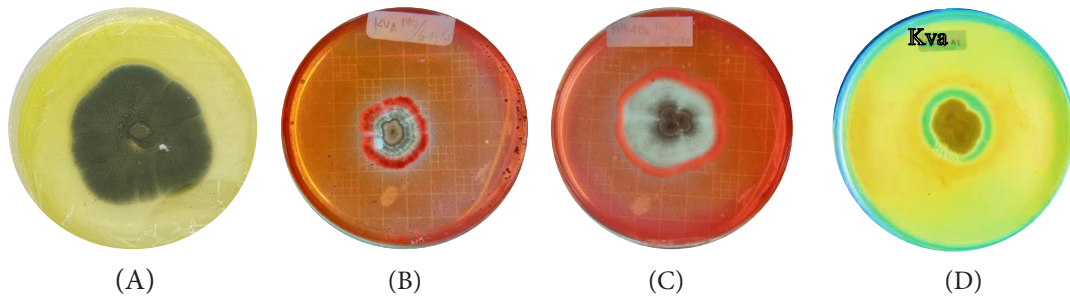


Figure 1 Fungi isolate KVA; (A) isolate of *Trichoderma harzianum* KTR3, (B) clear zone of chitosanolytic, (C) clear zone of cellulolytic, (D) clear zone of proteolytic

Gambar 1 Isolat fungi KVA; (A) isolat *Trichoderma harzianum* KTR3, (B) zona bening kitosanolitik, (C) zona bening selulolitik, (D) zona bening proteolitik

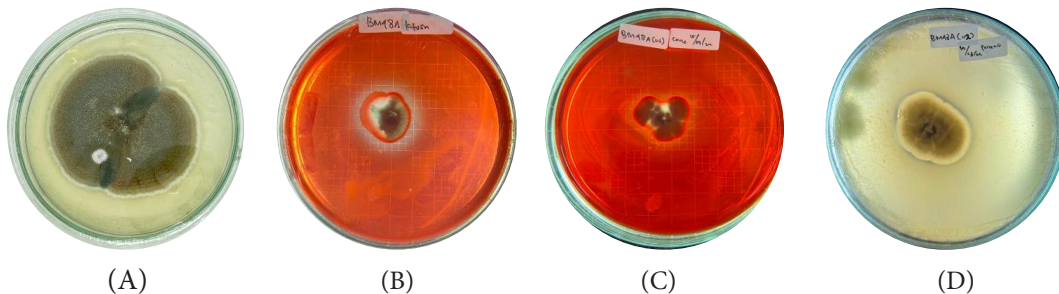


Figure 2 Isolate BM48A; (A) isolate of *Aspergillus sydowii*, KTR50 (B) clear zone of chitosanolytic, (C) clear zone of cellulolytic, (D) clear zone of proteolytic

Gambar 2 Isolat BM48A; (A) isolat *Aspergillus sydowii* KTR50, (B) zona bening kitosanolitik, (C) zona bening selulolitik, (D) zona bening proteolitik

disekitaran koloni fungi pada setiap analisis enzimatik yang diuji. Zona bening terbentuk karena aktivitas enzimatik yang dihasilkan oleh koloni fungi terdifusi melalui media agar serta mendegradasi substrat kitosan, selulosa (CMC), protein (susu skim) yang terdapat pada media. Ebadi *et al.* (2024) melaporkan, zona bening yang terbentuk dari aktivitas enzimatik karena koloni fungi menggunakan substrat media sebagai sumber energi, sehingga substrat pada media terdegradasi. Isolat KVA dan BM48A yang telah teruji memiliki aktivitas kitosanolitik, selulolitik, dan proteolitik kemudian diidentifikasi DNA *barcoding* untuk mengetahui jenis spesiesnya.

Analisis BLAST dan Pohon Filogenetik

Identifikasi spesies fungi dilakukan terhadap isolat KVA dan BM48A yang merupakan isolat terpilih untuk

menghidrolisis kitosan. Sepuluh hasil BLAST teratas berdasarkan pangkalan data NCBI digunakan untuk melihat kemiripan terhadap DNA isolat fungi yang diidentifikasi. Hasil BLAST dapat dilihat pada *Table 3*.

Hasil BLAST teratas melalui database NCBI menunjukkan isolat KVA memiliki kemiripan persentase identitas sebesar 100% dengan spesies fungi *Trichoderma harzianum*. Isolat BM48A memiliki kemiripan pada genus fungi *Aspergillus* sp. Persentase identitas di atas 95% menunjukkan bahwa sekuens DNA dari sampel isolat fungi tersebut besar kemungkinan berasal dari spesies atau susunan gen yang sama dan sangat berkerabat dekat. Perbedaan galur atau kode isolat yang terdapat pada akhir nama spesies pembandingan yang terdeteksi pada BLAST NCBI merupakan kode unik bahwa spesies tersebut diisolasi dari asal inang yang berbeda. Schönrogge *et al.* (2022) menyatakan bahwa kondisi lingkungan

Table 3 Top hit BLAST based on NCBI database
Tabel 3 Hasil BLAST teratas berdasarkan pangkalan data NCBI

Isolates code	Isolates description	Identity percentage (%)	NCBI access
KVA	<i>Trichoderma harzianum</i> isolat Mc2151	100.00	MK738146.1
	<i>Trichoderma harzianum</i> isolat 3140	100.00	MT074707.1
	<i>Trichoderma harzianum</i> isolat 3135	100.00	MT074706.1
	<i>Trichoderma harzianum</i> isolat 3134	100.00	MT074705.1
	<i>Trichoderma harzianum</i> isolat 3164	100.00	MT074704.1
	<i>Trichoderma harzianum</i> isolat 3167	100.00	MT074703.1
	<i>Trichoderma harzianum</i> isolat control	100.00	MT074702.1
	<i>Trichoderma</i> sp. isolat SDAS203914	100.00	MK870111.1
	<i>Trichoderma</i> sp. Isolat SDAS203833	100.00	MK870108.1
	<i>Trichoderma harzianum</i> isolat 580851	100.00	MK387946.1
BM48A	<i>Aspergillus versicolor</i> strain 347	99.50	OR259030.1
	<i>Aspergillus</i> sp. strain LF32_Contig1	99.83	MT214687.1
	<i>Aspergillus versicolor</i> isolat FR4	99.83	OL897314.1
	<i>Aspergillus sydowii</i> isolat Hamoon	97.88	MF480410.1
	<i>Aspergillus</i> sp. strain INV ASC14	98.03	MK123813.1
	<i>Aspergillus sydowii</i> strain MTFD2013	100.00	ON332122.1
	<i>Aspergillus sydowii</i> isolat SP9	99.82	OP797658.1
	<i>Aspergillus sydowii</i> isolat ZA203	99.65	ON408995.1
	<i>Aspergillus sydowii</i> strain MTFD2061	99.82	ON332124.1
<i>Aspergillus versicolor</i> isolat DCLZJ-7	99.82	MW800598.1	

serta asal inang akan membentuk komunitas fungi endofit yang beragam. Hokken *et al.* (2019) menyatakan ragam genetik yang dimiliki fungi menunjukkan keragaman mekanisme fisiologis dan metabolitnya. Hal ini akan membentuk komponen serta komposisi senyawa tertentu yang terkandung pada fungi sebagai sumber pertumbuhan dan sistem pertahanan hidupnya.

Hasil analisis dengan BLAST menunjukkan bahwa 10 galur teratas dari spesies fungi yang memiliki kemiripan dengan sampel isolat dilakukan analisis pohon filogenetik. Analisis pohon filogenetik dilakukan untuk mengetahui kekerabatan antar spesies. Hasil analisis ditampilkan pada *Figure 3*. Isolat KVA berkerabat dekat dengan

spesies fungi *Trichoderma harzianum* isolat 3140. Isolat BM48A berkerabat dekat dengan spesies *Aspergillus sydowii* isolat Hamoon.

Analisis pohon filogenetik menunjukkan isolat KVA yang diisolasi dari jaringan rumput laut *Vaucheria* sp. merupakan spesies fungi *T. harzianum*, sedangkan isolat BM48A yang diisolasi dari rumput laut *Cladophora* sp. merupakan spesies fungi *A. sydowii*. Spesies fungi yang telah diidentifikasi diberi tambahan kode isolat menjadi *T. harzianum* KTR3 dan *A. sydowii* KTR50 untuk menunjukkan keunikan antar spesies yang sama. Setiap galur atau kode isolat yang berbeda mungkin memiliki karakteristik yang berbeda dari galur atau isolat lain dalam spesies yang sama.

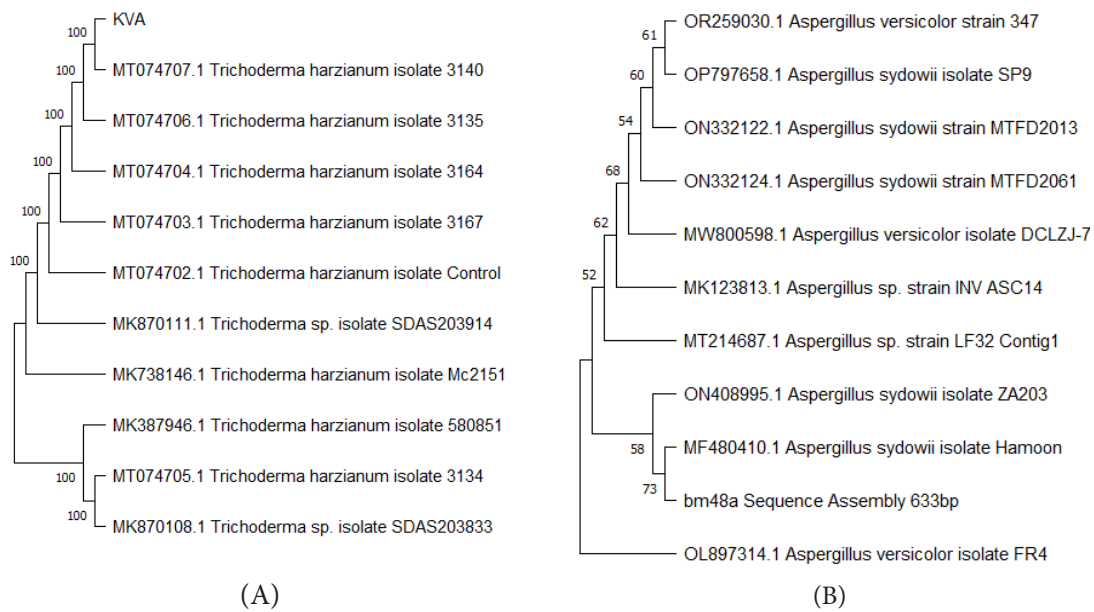


Figure 3 Analysis of phylogenetic tree; (A) isolate KVA (B) isolate BM48A
Gambar 3 Analisis pohon filogenetik; (A) isolat KVA (B) isolat BM48A

Trichoderma harzianum merupakan fungi yang dapat ditemukan pada sedimen, tanah atau pasir, lingkungan dan jaringan tubuh makhluk hidup, yaitu bunga karang, koral, rumput laut, mangrove ataupun pada tumbuhan teresterial lainnya (Guo *et al.*, 2022). Handayani *et al.* (2019) mengisolasi *T. harzianum* dari jaringan rumput laut *Padina* sp. Spesies *Aspergillus sydowii* juga merupakan fungi endofit yang berasal dari genus *Aspergillus*. Revathy *et al.* (2024) telah mengisolasi fungi dari daun mangrove *Ceriops tagal*, dimana 58% berasal dari genus *Aspergillus* dan 35% dari itu merupakan spesies *A. sydowii*. Hasil ini menunjukkan isolat *T. harzianum* KTR3 dan *A. sydowii* KTR50 merupakan salah satu dari beberapa fungi endofit yang dapat diisolasi dari lingkungan laut.

Fungi endofit dapat memproduksi enzim hidrolitik, yaitu selulase, amilase, protease, lipase, dan pektinase (Revathy *et al.*, 2024). Aktivitas tersebut dapat digunakan untuk mendegradasi kitosan. Rendemen hidrolisat kitosan yang dihidrolisis menggunakan aktivitas enzim dari isolat *T. harzianum* KTR3 dan *A. sydowii* KTR50 dapat dilihat pada *Figure 4*.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa hidrolisat kitosan menghasilkan warna kekuningan dibandingkan dengan kitosan sebelum dihidrolisis yang berwarna putih. Perubahan warna menjadi coklat atau kekuningan terjadi karena reaksi Maillard dari komponen polisakarida (gula), asam amino bebas, dan gugus asetil yang terdapat pada kitosan. Reaksi Maillard yang terjadi dipicu karena adanya pengaruh suhu tinggi, pH rendah, serta penyimpanan yang terjadi selama proses hidrolisis kitosan (Zhang *et al.*, 2020). Tian *et al.* (2004) melaporkan bahwa proses depolimerisasi kitosan dapat menyebabkan terjadinya reaksi Maillard. Hal ini disebabkan karena terjadinya deformasi di luar bidang ikatan rangkap N=C, yang mengakibatkan kitosan yang telah didepolimerisasi berwarna kekuningan atau kecokelatan.

Rendemen hidrolisat kitosan yang dihidrolisis dengan isolat *T. harzianum* KTR3, yaitu 74,4% dan 67,9% untuk yang dihidrolisis dengan isolat *A. sydowii* KTR50. Analisis sidik ragam menunjukkan rendemen yang dihasilkan dengan perbedaan perlakuan jenis isolat fungi menghasilkan nilai yang berbeda nyata ($p < 0,05$). Perbedaan jenis isolat fungi memengaruhi mekanisme



Figure 4 Appearance of of chitosan yield: (A) chitosan, (B) chitosan hydrolysisate by *T. harzianum* KTR3, (C) chitosan hydrolysisate by *A. sydowii* KTR50

Gambar 4 Ketampakan rendemen kitosan; (A) kitosan, (B) hidrolisat kitosan oleh *T. harizanium* KTR3, (C) hidrolisat kitosan oleh *A. sydowii* KTR50

reaksi enzimatisnya dalam menghidrolisis kitosan sehingga rendemen berbeda. Vega-Portalatino *et al.* (2023) menyatakan bahwa jenis isolat akan menghasilkan aktivitas enzimatis yang berbeda. Perbedaan tersebut akan memengaruhi mekanisme aktivitas enzim dalam mendegradasi kitosan serta hasil rendemen yang didapatkan.

Trichoderma dan *Aspergillus* merupakan genus fungi yang terbukti memiliki aktivitas enzimatis dalam mendegradasi kitosan. Kitosan yang dihidrolisis dengan aktivitas enzimatis dari *A. sydowii* KTR50 menghasilkan rendemen lebih sedikit dibandingkan dengan *T. harzianum* KTR3. Venkatachalam *et al.* (2015) melaporkan bahwa fungi dari genus *Aspergillus* memiliki aktivitas kitinolitik yang tidak dimiliki *Trichoderma*. Hal ini akan berpengaruh terhadap akumulasi aktivitas enzimatis dan laju reaksi dari masing-masing jenis fungi dalam mendegradasi kitosan. Aktivitas enzimatis β -glikosidase yang berperan dalam pemotongan ikatan glikosidik pada genus *Aspergillus* lebih tinggi dibandingkan dengan genus *Trichoderma*. (Xie *et al.*, 2010). Hal ini mengakibatkan rendemen hidrolisat kitosan dari perlakuan *A. sydowii* KTR50 lebih kecil, karena salah satu faktor keberhasilan proses hidrolisis terjadinya penurunan rendemen akibat degradasi.

Rendemen kitosan yang dihidrolisis menggunakan beberapa perlakuan di antaranya enzim papain sebesar 83,50%, perlakuan sinar UV-C sebesar 61,67% dan

perlakuan kombinasi UV-C dan enzim papain sebesar 84,84% (Pari *et al.*, 2022). Gonçalves *et al.* (2021) melaporkan hidrolisis kitosan menggunakan enzim selulase, pepsin, lipase, dan kitosanase menghasilkan kitosan bobot molekul rendah dengan rendemen berturut-turut 49%, 48%, 50%, dan 45%. Perbedaan antara hasil penelitian dan literatur dikarenakan perbedaan jenis enzim, metode, dan tingkat kemurnian enzim yang digunakan. Gonçalves *et al.* (2021) melaporkan bahwa ada 3 faktor utama yang memengaruhi hidrolisis kitosan secara enzimatis, yaitu suhu, waktu, derajat keasaman, konsentrasi, serta asal enzim yang digunakan.

Kitosan yang dihidrolisis oleh enzim memiliki reaksi yang lebih spesifik dibandingkan dengan metode hidrolisis lainnya. Spesifitas memungkinkan kontrol reaksi dan ukuran oligomer yang dihasilkan lebih seragam (Roncal *et al.*, 2007). Reaksi enzimatis bekerja dengan spesifik di tempat reaktif dan memecah molekul secara endogenus maupun eksogenus serta melepaskan monomer atau dimer secara berurutan (Aguila-Almanza *et al.*, 2019). Aktivitas kitosanolitik yang dimiliki isolat *T. harzianum* KTR3 dan *A. sydowii* KTR50 mengidentifikasi bahwa mekanisme degradasi kitosan terjadi secara spesifik, dimana pemotongan rantai polimer terjadi pada glikosidik di antara 2 monomer D-glukosamin. Aktivitas selulolitik dan proteolitik terjadi secara nonspesifik, dengan pemotongan rantai polimer kitosan pada



ikatan glikosidik cenderung terjadi di antara monomer N-asetil-glukosamin dengan N-asetil-glukosamin lainnya (Aranaz *et al.*, 2021)

Viskositas dan Bobot Molekul Hidrolisat Kitosan

Hidrolisis kitosan merupakan proses depolimerisasi yang dapat menurunkan viskositas dan bobot molekul kitosan. Penelitian ini menggunakan perlakuan aktivitas enzimatik dari isolat *T. harzianum* KTR3 dan *A. sydowii* KTR50. Hidrolisis melibatkan fungsi sehingga media hidrolisis kitosan terlebih dahulu harus disterilisasi menggunakan autoklaf dengan suhu 121°C dan tekanan 1 atm selama 15 menit. Penelitian ini menunjukkan bahwa isolat *T. harzianum* KTR3 dan *A. sydowii* KTR50 yang diisolasi dari jaringan rumput laut memiliki kemampuan dalam mendegradasi senyawa kitosan. Hal ini dibuktikan dengan terjadinya penurunan viskositas dan bobot molekul kitosan pasca hidrolisis. Hasil viskositas dan bobot molekul dapat dilihat pada *Table 4*.

Nilai viskositas dan bobot molekul menunjukkan perlakuan menggunakan isolat fungi berpengaruh signifikan terhadap penurunan viskositas dan bobot molekul ($p < 0,05$). Analisis lanjut *Tukey's test* menunjukkan viskositas dan bobot molekul setiap sampel berbeda signifikan ($p < 0,05$). Kitosan yang dihidrolisis dengan *A. sydowii* KTR50 menghasilkan nilai viskositas dan bobot molekul terendah dibandingkan perlakuan lainnya.

Viskositas kitosan merupakan ukuran dari kekentalan larutan kitosan terhadap aliran. Nilai viskositas yang didapatkan dari

pengukuran alat dapat digunakan untuk menentukan bobot molekul suatu polimer, termasuk kitosan. Semakin tinggi viskositas maka akan berbanding lurus dengan bobot molekul. Bobot molekul kitosan didapatkan dengan menghitung persamaan nilai viskositas intrinsiknya (Wardhani *et al.*, 2013). Nilai viskositas intrinsik akan digunakan ke dalam persamaan Mark Houwink untuk mendapatkan nilai bobot molekulnya.

Kitosan dapat diklasifikasikan ke dalam beberapa kategori berdasarkan bobot molekulnya, yaitu bobot molekul rendah (<100 kDa), bobot molekul sedang (100 – 1000 kDa), dan bobot molekul tinggi (>1000 kDa) (Santoso *et al.*, 2020). Kitosan oligosakarida memiliki rentang bobot molekul <10 kDa (Muanprasat & Chatsudthipong, 2017). Hasil bobot molekul yang didapat dari penelitian ini menunjukkan bahwa aktivitas enzimatik *T. harzianum* KTR3 dan *A. sydowii* KTR50 mampu menghasilkan kitosan oligosakarida dengan bobot molekul berturut-turut 9,06 kDa dan 4,47 kDa.

Aktivitas enzimatik yang dihasilkan fungsi memiliki kemampuan dalam mendegrasi kitosan. Proses degradasi secara enzimatik dapat terjadi secara spesifik maupun nonspesifik. Degradasi kitosan dengan enzim spesifik dilakukan oleh aktivitas kitosanolitik dan kitinolitik yang menghidrolisis ikatan glikosidik dari kitosan (Thadathil & Velappan, 2014). Hidrolisis menggunakan aktivitas kitosanolitik dengan mendegradasi lebih banyak polimer yang tersusun atas glukosamin dengan sejumlah kecil N-asetil-glukosamin, sedangkan aktivitas kitinolitik mendegradasi polimer yang tersusun atas sebagai besar N-asetil-glukosamin dan sebagian kecil

Table 4 Viscosity and molecular weight of chitosan hydrolysate
Tabel 4 Viskositas dan bobot molekul hidrolisat kitosan

Treatments	Viscosity (cP)	Molecular weight (kDa)
Chitosan	343.5±0.71 ^d	75.58 ±0.11 ^d
Autoclaf	104.3±0.42 ^c	31.77±0.10 ^c
<i>T. harzianum</i> KTR3	21.1±0.99 ^b	9.06±0.35 ^b
<i>A. sydowii</i> KTR50	9.26±0.31 ^a	4.47±0.13 ^a

Different superscript on the same column indicate significant differences ($p < 0,05$)

glukosamin. Hal ini menyebabkan karakteristik kitosan yang dihidrolisis dengan aktivitas kitosanolitik dan kitinolitik berbeda (Aam *et al.*, 2010). Aktivitas enzim nonspesifik, yaitu protease, lipase, selulase, dan hemiselulase mampu mendegrasi kitosan. Selain mendegradasi ikatan glikosidik pada kitosan, enzim nonspesifik dari proteolitik seperti papain dan pepsin juga dapat menurunkan derajat asetilasi pada kitosan (Aranaz *et al.*, 2021).

Hasil pada *Table 2* menunjukkan bahwa isolat KVA dan BM48A yang merupakan jenis *T. harzianum* KTR3 dan *A. sydowii* KTR50 selain memiliki aktivitas kitosanolitik yang tinggi juga memiliki aktivitas selulolitik dan proteolitik. Aktivitas enzimatik memiliki kemampuan dalam mendegradasi ikatan glikosidik kitosan. Rafael *et al.* (2019) menyebutkan *T. harzianum* memiliki kemampuan dalam mendegradasi substrat polimer dengan memproduksi enzim ekstraseluler. *T. harzianum* juga mampu menghasilkan kitosan oligosakarida melalui sistem kitin hidrolitik yang dihidrolisis selama tujuh hari. *A. sydowii* juga mampu memproduksi enzim ekstraseluler yang bersifat hidrolitik. Enzim tersebut dapat mendegradasi senyawa polisakarida, yaitu selulosa, lignin, pektin, dan amilosa (Ibrahim *et al.*, 2023). Isolat *A. sydowii* KTR50 yang diisolasi dari jaringan endofit tumbuhan laut memiliki kemampuan dalam mendegradasi senyawa kitosan. Hal ini dibuktikan dengan terjadinya penurunan viskositas dan bobot molekul kitosan pasca hidrolisis.

KESIMPULAN

Dua isolat fungi *T. harzianum* KTR3 dan *A. sydowii* KTR50 dari total 20 isolat terbukti memiliki aktivitas enzimatik terbaik dengan rata-rata nilai diameter zona bening paling tinggi. Kedua isolat tersebut berhasil mendegradasi polimer kitosan menjadi kitosan oligosakarida, dibuktikan dengan terjadinya penurunan viskositas yang signifikan dari 343,5 cP menjadi 21,1 cP dan 9,26 cP serta secara signifikan menghasilkan bobot molekul dibawah 10 kDa.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terimakasih kepada Kemeneterian Pendidikan, Kebudayaan, Riset, dan Teknologi atas dana hibah melalui skema Penelitian Teesis Magister (PTM) dengan nomor kontrak 027/E5/PG.02.00.PL/2024 tanggal 11 Juni 2024 yang diberikan kepada Dr.rer.nat. Kustiariyah, S.Pi, M.Si.

DAFTAR PUSTAKA

- Aam, B. B., Heggset, E. B., Norberg, A. L., Sørli, M., Vårum, K. M., & Eijsink, V. G. (2010). Production of chitoooligosaccharides and their potential applications in medicine. *Marine drugs*, 8(5), 1482-1517. <https://doi.org/10.3390/md8051482>
- Aguila-Almanza, E., Salgado-Delgado, R., Vargas-Galarza, Z., García-Hernández, E., & Hernández-Cocoletzi, H. (2019). Enzymatic depolymerization of chitosan for the preparation of functional membranes. *Journal of Chemistry*, 1, 1-8. <https://doi.org/10.1155/2019/5416297>
- Aranaz, I., Alcántara, A. R., Civera, M. C., Arias, C., Elorza, B., Heras Caballero, A., & Acosta, N. (2021). Chitosan: An overview of its properties and applications. *Polymers*, 19, 1-27. <https://doi.org/10.3390/polym13193256>
- Bhadra, F., Gupta, A., Vasundhara, M., & Reddy, M. S. (2022). Endophytic fungi: a potential source of industrial enzyme producers. *3 Biotech*, 12(4), 1-9. <https://doi.org/10.1007/s13205-022-03145-y>
- Carroll, A. R., Copp, B. R., Davis, R. A., Keyzers, R. A., & Prinsep, M. R. (2021). Marine natural products. *Natural Product Reports*, 38(2), 362-413. <https://doi.org/10.1039/D0NP00089B>
- Chattopadhyay, D. P., & Inamdar, M. S. (2010). Aqueous behaviour of chitosan. *International Journal of Polymer Science*, 1, 1-7. <https://doi.org/10.1155/2010/939536>
- Chen, R. H., & Tsaih, M. L. (1998). Effect of temperature on the intrinsic viscosity and conformation of chitosans in dilute HCl solution. *Biological Macromolecules*, 23(2), 135-141. [https://doi.org/10.1016/S0141-8130\(98\)00036-1](https://doi.org/10.1016/S0141-8130(98)00036-1)



- Dastogeer, K. M., Li, H., Sivasithamparam, K., Jones, M. G. K., & Wylir, S. J. (2018). Host specificity of endophytic mycobiota of wild nicotiana plants from Arid regions of Northern Australia. *Microbial Ecology*, 75, 74–87. <https://doi.org/10.1007/s00248-017-1020-0>
- Ebadi, M., Ahmadi, F., Tahmouresi, H., Pazhang, M., & Mollaei, S. (2024). Investigation the biological activities and the metabolite profiles of endophytic fungi isolated from *Gundelia tournefortii* L. *Scientific Reports*, 14(1), 1-11. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-57222-8>
- El-Bondkly, E. A. M., El-Bondkly, A. A. M., & El-Bondkly, A. A. M. (2021). Marine endophytic fungal metabolites: A whole new world of pharmaceutical therapy exploration. *Heliyon*, 7(3), 1-15. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e06362>
- Elgammal, E. W., El-Khonezy, M. I., Ahmed, E. F., & Abd-Elaziz, A. M. (2020). Enhanced production, partial purification, and characterization of alkaline thermophilic protease from the endophytic fungus *Aspergillus ochraceus* BT21. *Egyptian Pharmaceutical Journal*, 19(4), 338-349. https://doi.org/10.4103/epj.epj_31_20
- Fadli, A., Drastinawati, D., Alexander O., & Huda, F. (2018). Pengaruh rasio massa kitin/NaOH dan waktu reaksi terhadap karakteristik kitosan yang disintesis dari limbah industri udang kering. *Journal Sains Materi Indonesia*, 18(2), 61-67. <https://doi.org/10.17146/jsmi.2017.18.2.4166>.
- Farouk, H. M., Attia, E. Z., & El-Katatny, M. M. H. (2020). Hydrolytic enzyme production of endophytic fungi isolated from soybean (*Glycine max*). *Journal Modern Research*, 2(1), 1-7. <https://dx.doi.org/10.21608/jmr.2019.15748.1008>
- Gonçalves, C. G. E., Lourenço, L. D. F. H., Philippsen, H. K., Santos, A. S., Santos, L. N. D., & Ferreira, N. R. (2023). Crude enzyme concentrate of filamentous fungus hydrolyzed chitosan to obtain oligomers of different sizes. *Polymers*, 15(9), 1-16. <https://doi.org/10.3390/polym15092079>
- Guo, R., Li, G., Zhang, Z., & Peng, X. (2022). Structures and biological activities of secondary metabolites from *Trichoderma harzianum*. *Marine Drugs*, 20(11), 1-17. <https://doi.org/10.3390/md20110701>
- Handayani, D., Ananda, N., Artasasta, M. A., Ruslan, R., Fadriyanti, O., & Tallei, T. E. (2019). Antimicrobial activity screening of endophytic fungi extracts isolated from brown algae *Padina* sp. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 9(3), 9-13. <https://doi.org/10.7324/JAPS.2019.90302>
- Hariati, S., Wahjuningrum, D., Yuhana, M., Tarman, K., Effendi, I., & Saputra, F. (2018). Aktivitas antibakteri ekstrak kapang laut *Nodulisporium* sp. KT29 terhadap *Vibrio harveyi*. *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*, 21(1), 250-257. <https://doi.org/10.17844/jphpi.v21i2.22855>
- Hokken, M. W. J., Zwaan, B. J., Melchers, W. J. G., & Verweij, P. E. (2019). Facilitators of adaptation and antifungal resistance mechanisms in clinically relevant fungi. *Fungal Genetics and Biology*, 132, 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2019.103254>
- Ibrahim, S. R., Mohamed, S. G., Alsaadi, B. H., Althubyani, M. M., Awari, Z. I., Hussein, H. G., Aljohani, A. A., Albasri, J. F., Faraj, S. A., & Mohamed, G. A. (2023). Secondary metabolites, biological activities, and industrial and biotechnological importance of *Aspergillus sydowii*. *Marine Drugs*, 21(8), 1-53. <https://doi.org/10.3390/md21080441>
- Isti'anah, I., Tarman, K., Suseno, S. H., Nugraha, A. W., & Effendi, I. (2024). Penapisan senyawa bioaktif antibakteri fungi laut endofit asal Pulau Buton Sulawesi Tenggara, *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*, 27(7), 553-563. <http://dx.doi.org/10.17844/jphpi.v27i7.50489>
- Jonathan, Z. K., Mohammad, R. K., Tam, B., & Katherine, A. C. (1998). Characterization of deacetylated chitosan and chitosan molecular weight review. *Canadian Journal of Chemistry*, 76(11), 1699-1706.
- Kalontong, P. K., Safithri, M., & Tarman, K.

- (2022). Penambatan molekul senyawa aktif *Spirulina platensis* sebagai Inhibitor TMPRSS2 untuk Mencegah Infeksi SARS-COV-2. *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*, 25(2), 253-267. <https://doi.org/10.17844/jphpi.v25i2.40645>
- Kulig, D., Król-Kilińska, Ż., Bobak, Ł., Żarowska, B., Jarmoluk, A., & Zimoch-Korzycka, A. (2023). Functional properties of chitosan oligomers obtained by enzymatic hydrolysis. *Polymers*, 15(18), 1-17. <https://doi.org/10.3390/polym15183801>
- Lauritano, C., & Ianora, A. (2018). Grand challenges in marine biotechnology: Overview of Recent EU-Funded Projects. In P. H. Rampelotto, & A. T. Trincone (Ed.), *Grand Challenges in Marine Biotechnology* (pp. 425-449).
- Muanprasat, C., & Chatsudthipong, V. (2017). Chitosan oligosaccharide: Biological activities and potential therapeutic applications. *Pharmacology & Therapeutics*, 170, 80-97. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2016.10.013>
- Pannindriya P., Safithri, M., & Tarman, K. (2021). Analisis in silico senyawa aktif *Spirulina platensis* sebagai inhibitor tirosinase. *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*, 24(1), 70-77. <https://doi.org/10.17844/jphpi.v24i1.33122>
- Pari, R. F., Mayangsari, D., Hardiningtyas, S. D. (2022). Depolimerisasi kitosan dari cangkang udang dengan enzim papain dan iradiasi sinar ultraviolet. *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*, 25(1), 118-131. <http://dx.doi.org/10.17844/jphpi.v25i1.40311>
- Pilgaard, B., Wilkens, C., Herbst, F. A., Vuillemin, M., Rhein-Knudsen, N., Meyer, A. S., & Lange, L. (2019). Proteomic enzyme analysis of the marine fungus *Paradendryphiella salina* reveals alginate lyase as a minimal adaptation strategy for brown algae degradation. *Scientific Reports*, 9, 1-13. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-48823-9>
- Rafael, O. H. D., Fernando, Z. G. L., Abraham, P. T., Alberto, V. L. P., Guadalupe, G. S., & Pablo, P. J. (2019). Production of chitosan-oligosaccharides by the chitin-hydrolytic system of *Trichoderma harzianum* and their antimicrobial and anticancer effects. *Carbohydrate research*, 486, 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2019.107836>
- Revathy, M. R., Mohan, A. S., Kesavan, D., Sarasan, M., & Philip, R. (2024). Endophytic fungi of spurred mangrove, *Ceriops tagal* and its bioactivity potential: Predominance of *Aspergillus* species and its ecological significance. *The Microbe*, 4, 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.microb.2024.100144>
- Roncal, T., Oviedo, A., de Armentia, I. L., Fernández, L., & Villarán, M. C. (2007). High yield production of monomer-free chitosan oligosaccharides by pepsin catalyzed hydrolysis of a high deacetylation degree chitosan. *Carbohydrate Research*, 342(18), 2750-2756. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2007.08.023>
- Sandhya, C., Sumantha, A., Szakacs, G., & Pandey, A. (2005). Comparative evaluation of neutral protease production by *Aspergillus oryzae* in submerged and solid-state fermentation. *Process biochemistry*, 40(8), 2689-2694. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2004.12.001>
- Santoso, J., Adiputra, K. C., Soerdirga, L. C., & Tarman, K. (2019, September 9-10). Effect of acetic acid hydrolysis on the characteristics of water soluble chitosan [Conference session]. The World Seafood Congress, Penang, Malaysia. In *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/414/1/012021>
- Sarasan, M., Job, N., Puthumana, J., Ravinesh, R., Kachiprath, B., & Philip, R. (2021). Enzyme profiling of macroalgal endophytes: an attempt to uncover the arsenal of novel biocatalysts. *Journal Marine Biological Association of India*, 62(2), 112-116. <https://doi.org/10.6024/jmbai.2020.62.2.2183-14>
- Schönrogge, K., Gibbs, M., Oliver, A., Cavers, S., Gwen, H. S., Ennos, R. A., Cottrell, J., Iason, G. R., & Taylor, J. (2022).



- Environmental factors and host genetic variation shape the fungal endophyte communities within needles of Scots pine (*Pinus sylvestris*). *Fungal Ecology*, 57, 1-10. <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2022.101162>
- Shehata, A. N., & Abd El Aty A. A. (2015). Improved production and partial characterization of chitosanase from a newly isolated *Chaetomium globosum* KM651986 and its application for chitosan oligosaccharides. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 7(1), 727-40.
- Sibero, M. T., Tarman, K., Radjasa, O. K., Sabono, A., Trianto, A., & Bachtiarini, T. U. (2018). Produksi pigmen dan identifikasi kapang penghasilnya menggunakan pendekatan DNA Barcoding. *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*, 21(1), 99-108. <https://doi.org/10.17844/jphpi.v21i1.21454>
- Stackebrandt, E., & Goebel, B. M. (1994). A place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 44, 846-849.
- Tarman, K., Sadi, U., Santoso, J., Hardjito, L. (2020). Carrageenan and its enzymatic extraction. *Encyclopedia of Marine Biotechnology*, 1, 147-159. <https://doi.org/10.1002/9781119143802.ch96>
- Thadathil, N., & Velappan, S. P. (2014). Recent developments in chitosanase research and its biotechnological applications: A review. *Food chemistry*, 150, 392-399. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.10.083>
- Tian, F., Liu, Y., Hu, K., Zhao, B. (2004). Study of the depolymerization behavior of chitosan by hydrogen peroxide. *Carbohydrate polymers*, 57(1), 31-37. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2004.03.016>
- Vega-Portalatino, E. J., Rosales-Cuentas, M. M., Valdiviezo-Marcelo, J., Arana-Torres, N. M., Espinoza-Espinoza, L. A., Moreno-Quispe, L. A., & Cornelio-Santiago, H. P. (2023). Antimicrobial and production of hydrolytic enzymes potentials of bacteria and fungi associated with macroalgae and their applications: a review. *Frontiers in Marine Science*, 10, 1-15. <https://doi.org/10.3389/fmars.2023.1174569>
- Venkatachalam, A., Govinda Rajulu, M. B., Thirunavukkarasu, N., & Suryanarayanan, T. S. (2015). Endophytic fungi of marine algae and seagrasses: a novel source of chitin modifying enzymes. *Mycosphere*, 6, 345-355. <https://doi.org/10.5943/MYCOSPHERE/6/3/10>
- Wardhani, I. K., Badres, S., & Prasetyaningrum. (2013). Kinetika reaksi depolimerisasi karaginan pada suhu dan pH optimum dengan katalisator asam sulfat. *Jurnal Teknologi Kimia dan Industri*, 2(4), 177-183.
- Xie, Y., Wei, Y., & Hu, J. (2010). Depolymerization of chitosan with a crude cellulase preparation from *Aspergillus niger*. *Applied biochemistry and biotechnology*, 160, 1074-1083. <https://doi.org/10.1007/s12010-009-8559-2>
- Yuan, X., Zheng, J., Jiao, S., Cheng, G., Feng, C., Du, Y., & Liu, H. (2019). A review on the preparation of chitosan oligosaccharides and application to human health, animal husbandry and agricultural production. *Carbohydrate Polymers*, 220, 60-70. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.05.050>
- Zhang, J., Mei, Z., Huang, X., Ding, Y., Liang, Y., & Mei, Y. (2020). Inhibition of Maillard reaction in production of low-molecular-weight chitosan by enzymatic hydrolysis. *Carbohydrate Polymers*, 236, 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.116059>
- Zu, G. R., Chen, M., & Zhang, C. Z. (2012). Screening, identification of a marine fungal strain producing chitosanase. *Advanced Materials Research*, 581, 1189-1192. <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/AMR.581-582.1189>