

OPTIMALISASI DAN KARAKTERISASI KITOSAN JAMUR *Rhizopus oryzae* MENGGUNAKAN SUBSTRAT LIMBAH APEL SEBAGAI SUMBER KARBON

SKRIPSI

**Oleh:
ALIF PUTRA ARDIANSYA
NIM. 19620082**



**PROGRAM STUDI BIOLOGI
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM
MALANG
2023**

OPTIMALISASI DAN KARAKTERISASI KITOSAN JAMUR *Rhizopus oryzae* MENGGUNAKAN SUBSTRAT LIMBAH APEL SEBAGAI SUMBER KARBON

SKRIPSI

**Oleh:
ALIF PUTRA ARDIANSYA
NIM. 19620082**

**diajukan Kepada:
Fakultas Sains dan Teknologi
Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang
untuk Memenuhi Salah Satu Persyaratan dalam
Memperoleh Gelar Sarjana Sains (S.Si)**

**PROGRAM STUDI BIOLOGI
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM
MALANG
2023**

OPTIMALISASI DAN KARAKTERISASI KITOSAN JAMUR *Rhizopus oryzae* MENGGUNAKAN SUBSTRAT LIMBAH APEL SEBAGAI SUMBER KARBON

SKRIPSI

Oleh:
ALIF PUTRA ARDIANSYA
NIM.19620082

telah diperiksa dan disetujui untuk diuji
Tanggal: 31 Oktober 2023

Pembimbing I



Priya Dewi Fitriyani, M.Sc
NIP. 19900428 202321 2 037

Pembimbing II



Dr. Umaivatus Svarifah, M.A
NIP. 19820925 200901 2 005

Mengetahui,
Ketua Program Studi Biologi



Dewika Sandi Savitri, M.P
NIP. 19741018 200312 2 002

OPTIMALISASI DAN KARAKTERISASI KITOSAN JAMUR *Rhizopus oryzae* MENGGUNAKAN SUBSTRAT LIMBAH APEL SEBAGAI SUMBER KARBON

SKRIPSI

Oleh :
ALIF PUTRA ARDIANSYA
NIM : 19620082

Telah dipertahankan
di depan Dewan Penguji Skripsi dan dinyatakan diterima sebagai
salah satu persyaratan untuk memperoleh gelar Sarjana Sains (S.Si)
Tanggal : *14...November 2023*

1. Ketua Penguji : Prof. Dr.Ulfah Utami, M.Si
NIP. 19650509 199903 2 002
2. Anggota Penguji I : Ir. Liliek Harianie AR, M.P
NIP. 19620901 199803 2 001
3. Anggota Penguji II : Priya Dewi Fitriasari, M.Sc
NIP. 19900428 202321 2 037
4. Anggota Penguji III : Dr. Umaiyatus Syarifah, M.A
NIP. 19820925 200901 2 005

(.....)
(.....)
(.....)
(.....)

Mengesahkan
Ketua Program Studi Biologi



Dr. Lyka Sandi Savitri, M.P.
NIP. 19741018 200312 2 002

HALAMAN PERSEMBAHAN

Alhamdulillah, puji syukur kehadiran Allah Swt yang telah memberikan nikmat yang sangat luar biasa, memberikan saya kekuatan, membekali saya dengan ilmu pengetahuan, serta telah mempertemukan saya dengan orang-orang yang penuh dengan cinta di dalamnya. Atas karunia dan kemudahan yang engkau berikan akhirnya karya tulis ilmiah ini atau skripsi ini dapat terselesaikan. Sholawat serta salam selalu tercurah limpahkan kepada baginda Rasulullah Muhammad SAW. Segala perjuangan saya hingga titik ini saya persembahkan teruntuk orang-orang hebat yang selalu menjadi penyemangat, menjadi alasan penulis untuk kuat sehingga bisa menyelesaikan skripsi ini diantaranya:

1. Cinta pertamaku serta pintu surgaku, ibunda tercinta Aminarti. Beliau memang tidak sempat merasakan pendidikan hingga bangku perkuliahan. Namun hanya dengan tamatan sekolah menengah pertama yang beliau punya, beliau mampu membesarkan, mendoakan, memberikan cinta semangat, dan motivasi tiada henti hingga penulis dapat menyelesaikan studinya hingga sarjana.
2. Panutan hidupku, ayahanda tercinta Khairuddin. Beliau sangat berperan penting dalam menyelesaikan program studi penulis. Beliau juga memang tidak sempat merasakan pendidikan hingga bangku perkuliahan akan tetapi dengan pendidikan sekolah menengah atas yang beliau punya membuat beliau memiliki rasa tanggung jawab yang besar dengan harus mengantarkan kedua putranya salah satunya penulis hingga ke perguruan tinggi.
3. Saudara laki-lakiku, Deniyansyah. terimakasih atas dukungan moral berupa arahan hidup penyemangat yang diselingi dengan sedikit satir serta dukungan material yang diberikan sehingga penulis dapat menyelesaikan karya tulis ilmiah ini.
4. Beberapa teman-teman seangkatan Biologi 2019 serta kakak tingkat pada Jurusan Biologi yang membantu hingga menemani penulis dalam melaksanakan penulisan karya ilmiah ini. Berkat kalian penulis melewati masa kepenulisan karya tulis ilmiah ini jauh dari perasaan kesendirian dan keterpurukan melainkan penuh dengan perasaan kegembiraan sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini dengan baik.

5. Untuk seseorang yang belum bisa dituliskan namanya dengan jelas disini, namun sudah tertulis jelas di *Lauhul mahfudz*. Jodoh penulis kelak kamu adalah salah satu alasan penulis menyelesaikan skripsi ini, sebagai salah satu upaya memantaskan diri ketika nanti bertemu dengan dirimu, meskipun saat ini penulis tidak mengetahui keberadaanmu karena penulis yakin bahwa sesuatu yang ditakdirkan menjadi milik kita akan menuju kepada kita bagaimanapun caranya.
6. Terakhir, kepada laki-laki sederhana namun kadang sangat sulit dimengerti isi kepalanya, sang penulis karya tulis ini, saya sendiri Alif Putra Ardiansya. Seorang remaja laki-laki yang berumur 22 tahun saat menciptakan karya tulis ini namun terkadang sifatnya masih kekanak-kanakan. Terimakasih telah hadir di dunia walaupun mungkin tidak banyak yang ikut serta merayakan hadirmu di dunia ini namun selalu bersyukur karena ada juga beberapa manusia dengan bahagia merayakan kehadiranmu. Terimakasih sudah bertahan sejauh ini melewati banyaknya rintangan hidup yang tidak tertebak. Terimakasih karena tetap memilih hidup dan merayakan pencapaian dirimu sendiri hingga sampai di titik ini. Walaupun sering kali merasa putus asa atas apa yang dikerjakan dan belum berhasil namun terimakasih karena tetap menjadi manusia yang selalu mau menepis ego, berusaha, dan tidak lelah mencoba. Berbahagialah selalu dimanapun berada, Alif. Rayakan selalu kehadiran, pencapaian, serta semua hal yang membuatmu hidup bahagia. Pastikan jiwamu selalu menjadi bagian dari hal baik di alam semesta ini, berbahagialah.

Skripsi ini merupakan sebuah karya yang saya rangkai sejak September 2022 dan diselesaikan pada September 2023. Skripsi ini merupakan saksi bisu atas perjuangan yang melelahkan, kesendirian, keterasingan, pengkhianatan, dan ketidakpastian hidup adalah suatu keniscayaan bagi saya. Namun masih suatu kemungkinan bagi manusia lain pada umumnya untuk tidak melakukan hal tersebut.

Pada fase quarter life crisis ini, kadang kala kita lupa akan arti kebaikan, kebenaran, kesetiaan, ketenangan, persahabatan, dan cinta karena terlalu banyak penderitaan yang kita peroleh. Akan tetapi satu yang harus selalu kita ingat, *“dunia ini tidak pernah kehilangan orang-orang baik, hanya saja kita yang*

terlalu sering bertemu dengan orang jahat". – Dedi Irawan. Selain itu setiap orang juga memiliki masanya dan setiap masa pasti memiliki orangnya.

Skripsi ini saya persembahkan juga kepada orang-orang yang selalu melontarkan pertanyaan kepada saya "*kapan kamu wisuda?*" dan "*kenapa lama sekali menyelesaikan skripsimu?*". Terlambat lulus atau lulus tidak tepat waktu bukanlah sebuah kejahatan, bukan pula sebuah aib. Alangkah kerdilnya jika mengukur kecerdasan seseorang hanya dari siapa yang paling cepat lulus. Bukankah sebaik-baiknya skripsi adalah skripsi yang selesai? mungkin ada suatu hal dibalik terlambatnya saya lulus, dan percayalah alasan saya disini karena lambatnya saya lulus sepenuhnya merupakan alasan yang baik.

Malang, Oktober 2023

Penulis

MOTTO

*“Allah tidak membebani seseorang melainkan sesuai dengan kesanggupannya”
(Q.S al-Baqarah: 286)*

“Orang lain nggak akan bisa paham struggle dan masa sulitnya kita, yang mereka ingin tahu hanya bagian succes storiesnya. Berjuanglah untuk diri sendiri walaupun ga ada yang tepuk tangan, kelak diri kita di masa depan akan sangat bangga dengan apa yang kita perjuangkan hari ini”.

*“Skripsi yang baik merupakan skripsi yang selesai”
(Alif Putra Ardiansya)*

PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN

Saya yang bertanda tangan dibawah ini :

Nama : Alif Putra Ardiansya
NIM : 19620082
Program Studi : Biologi
Fakultas : Sains dan Teknologi
Judul Penelitian : Optimalisasi dan Karakterisasi Kitosan Fungi *Rhizopus oryzae* menggunakan Substrat Limbah Apel Sebagai Sumber Karbon

Menyatakan dengan sebenarnya bahwa skripsi yang saya tulis ini benar-banar merupakan hasil karya saya sendiri, bukan merupakan pengambilalihan data, tulisan atau pikiran orang lain yang saya akui sebagai hasil tulisan atau pikiran saya sendiri, kecuali dengan mencantumkan sumber cuplikan pada daftar pustaka.

Apabila dikemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan skripsi ini hasil jiplakan, maka saya bersedia menerima sanksi akademik maupun hukum atas perbuatan tersebut.

Malang, 27 November 2023

Yang membuat pernyataan



Alif Putra Ardiansya
NIM. 19620082

PEDOMAN PENGGUNAAN SKRIPSI

Skripsi ini tidak dipublikasikan namun terbuka untuk umum dengan ketentuan bahwa hak cipta ada pada penulis. Daftar Pustaka diperkenankan untuk dicatat, tetapi pengutipan hanya dapat dilakukan seizin penulis dan harus disertai kebiasaan ilmiah untuk menyebutkannya.

Optimalisasi dan Karakterisasi Kitosan Jamur *Rhizopus oryzae* Menggunakan Substrat Limbah Apel Sebagai Sumber Karbon

Alif Putra Ardiansya, Priya Dewi Fitriyani, Umayyatus Syarifah

Program Studi Biologi, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Islam Negeri
Maulana Malik Ibrahim Malang

ABSTRAK

Kitosan (*poly-d-glucosamine*) merupakan biopolimer alami yang bersumber dari kitin. Secara komersial kitosan diperoleh dari ekstraksi kitin yang bersumber dari limbah *crustacea* melalui tahapan deasetilasi. Adanya beberapa masalah seperti persediaan bahan baku kitosan dari *crustacea* tersebut memiliki keterbatasan sehingga perlu dilakukan pencarian alternatif dari bahan baku kitosan. Sumber alternatif produksi kitosan adalah dengan menggunakan dinding sel pada jamur tertentu. Kitosan memiliki manfaat besar dalam aplikasi farmasi, medis, industri, dan pertanian karena sifat yang sangat menguntungkan seperti biokompatibilitas, biodegradabilitas, dan toksisitas rendah. Produksi kitosan dari *Rhizopus oryzae* menggunakan limbah apel manalagi sebagai satu-satunya sumber karbon dengan variasi konsentrasi kontrol, 60%, 80%, dan 100%. Oleh karena itu, penelitian ini difokuskan pada optimalisasi kitosan dengan metode fermentasi cair (*submerged fermentation*) untuk mendapatkan berat akhir jamur untuk diekstraksi. Selanjutnya dilakukan pengamatan parameter kualitas kitosan yang dihasilkan yaitu nilai derajat deasetilasi menggunakan FTIR (*Fourier Transform Infrared*). Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental dimana menggunakan desain faktorial untuk mengetahui pengaruh kondisi fermentasi terhadap produksi kitosan dengan 4 perlakuan dan 3 kali ulangan. Data dianalisis secara statistik parametrik uji *One-Way ANOVA* menggunakan software SPSS versi 25. Biomassa kering kitosan jamur *Rhizopus oryzae* menunjukkan konsentrasi 0% sebesar 11,2 g/ml, konsentrasi 60% sebesar 13,7 mg/ml, konsentrasi 80% sebesar 18,3 mg/ml dan konsentrasi 100% sebesar 19,5 mg/ml. Sedangkan hasil karakteristik kitosan jamur *Rhizopus oryzae* menunjukkan nilai derajat deasetilasi sebesar 76,6%.

Kata kunci: Keterbatasan, Fermentasi, Kualitas kitosan, limbah, apel manalagi, konsentrasi

Optimization and Characterization of Mushroom Chitosan *Rhizopus oryzae* Using Apple Waste Substrate as a Carbon Source

Alif Putra Ardiansya, Prilya Dewi Fitriasari, Umayatus Syarifah

Biology Study Program, Faculty of Science and Technology, Maulana Malik Ibrahim State Islamic University Malang

ABSTRACT

Chitosan (*poly-d-glucosamine*) is a natural biopolymer sourced from chitin. Commercially, chitosan is obtained from the extraction of chitin from waste sources *crustacea* through the deacetylation stage. There are several problems such as the supply of chitosan raw materials from *crustacea*. It has limitations so it is necessary to search for alternatives to the chitosan raw material. An alternative source of chitosan production is to use the cell walls of certain fungi. Chitosan has great benefits in pharmaceutical, medical, industrial, and agricultural applications due to its highly favorable properties such as biocompatibility, biodegradability, and low toxicity. Chitosan production from *Rhizopus oryzae* using Manalagi apple waste as the only carbon source with varying control concentrations, 60%, 80%, and 100%. Therefore, this research is focused on optimizing chitosan using the liquid fermentation method (*submerged fermentation*) to obtain the final weight of mushrooms for extraction. Next, the quality parameters of the chitosan produced were observed, namely the value of the degree of deacetylation using FTIR (*Fourier Transform Infrared*). This research is an experimental study which uses a factorial design to determine the effect of fermentation conditions on chitosan production with 4 treatments and 3 replications. Data were analyzed using parametric statistical tests *One-Way ANOVA* using SPSS software version 25. mushroom chitosan biomass *Rhizopus oryzae* showed a 0% concentration of 11,2 g/ml, a 60% concentration of 13,7 mg/ml, an 80% concentration of 18,3 mg/ml and a 100% concentration of 19,5 mg/ml. Meanwhile, the results of the characteristics of mushroom chitosan *Rhizopus oryzae* shows a deacetylation degree value of 76.6%.

Keywords: Limitations, Fermentation, Chitosan quality, waste, Manalagi apples, concentration

تحسين وتوصيف الشيتوزان يستخدم فطر *oryzae Rhizopus* ركيزة نفايات التفاح كمصدر للكربون

أليف بوترا أوردانسيا ، بريليا ديوي فيترياساري ، أوماياتوس سياريفاه

برنامج دراسة علم الأحياء ، كلية العلوم والتكنولوجيا ، جامعة مولانا مالك إبراهيم الإسلامية الحكومية
مالانج

تجريدي

. الشيتوزان (بولي-د-الجلوكوزامين) هو بوليمر حيوي طبيعي مصدره الكيتين يتم الحصول على الشيتوزان تجارياً من استخراج الكيتين الذي يتم الحصول عليه من نفايات *cru stacea* من خلال مرحلة نزع الأستيل. هناك العديد من المشاكل مثل توريد المواد الخام الشيتوزان من *crustacea* لديه قيود لذلك من الضروري إيجاد بدائل من المواد الخام الشيتوزان. مصدر بديل لإنتاج الشيتوزان هو استخدام جدران الخلايا في بعض الفطريات. يتمتع الشيتوزان بفوائد كبيرة في التطبيقات الصيدلانية والطبية والصناعية والزراعية نظراً لخصائصه المفيدة للغاية مثل التوافق الحيوي والتحلل البيولوجي والسمية المنخفضة. يستخدم إنتاج الشيتوزان من *Rhizopus oryzae* نفايات تفاح مانالاجي كمصدر وحيد للكربون مع اختلافات تركيز التحكم ، 60% و 80% و 100%. لذلك ، ركزت هذه الدراسة على تحسين ألبسة الشيتوزان بطريقة التخمير السائل (التخمير المغمور) للحصول على الوزن النهائي للفطر المراد استخلاصه. علاوة على ذلك ، تم إجراء ملاحظات حول معلمات جودة الشيتوزان المنتج ، وهي قيمة درجة نزع الأستيل باستخدام FTIR (تحويل فورييه بالأشعة تحت الحمراء). هذه الدراسة هي دراسة تجريبية تستخدم factorial desain لتحديد تأثير ظروف التخمير على إنتاج الشيتوزان مع 4 علاجات و 3 تكرارات. تم تحليل البيانات إحصائياً / اختبار حيدوي أحادي الاتجاه ANOVA باستخدام برنامج SPSS الإصدار 25. أظهر الشيتوزان ذو الكتلة الحيوية الجافة من فطر *Rhizopus oryzae* تركيز 0% من 11.2 جم / مل ، 6% تركيز 13.7 مجم / مل ، تركيز 80% من 18.3 م جم / مل ، وتركيز 100% 19.5 م جم / مل. بينما أظهرت نتائج خصائص الشيتوزان لفطر *Rhizopus oryzae* قيمة درجة إزالة الأستيل 76.6%.

الكلمات المفتاحية: القيود ، التخمير ، جودة الشيتوزان ، النفايات ، مانالاجي التفاح ، التركيز

KATA PENGANTAR

Assalamu 'alaikum Wr, Wb.

Puji syukur kehadiran Allah Swt yang telah memberikan penulis kemudahan sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini yang berjudul “Optimalisasi dan Karakterisasi Kitosan Jamur *Rhizopus oryzae* Menggunakan Substrat Limbah Apel Sebagai Sumber Karbon” dengan baik sebagai salah satu persyaratan kelulusan di Program Studi Biologi Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang. Penulis juga mengucapkan terima kasih atas bantuan kepada semua pihak dalam penyusunan skripsi ini. Penulis menyampaikan ucapan terima kasih kepada:

1. Prof. Dr. H. M. Zainuddin, M.A selaku Rektor Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
2. Dr. Sri Harini, M.Si, selaku Dekan Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
3. Dr. Evika Sandi Savitri M.P selaku Ketua Program Studi Biologi Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
4. Priya Dewi Fitriyani, M.Sc selaku dosen pembimbing skripsi yang telah banyak meluangkan waktu, tenaga, dan pikiran untuk memberikan bimbingan dengan penuh kesabaran.
5. Dr. Umayyatus Syarifah, M.A selaku dosen pembimbing agama yang telah banyak memberikan bimbingan terkait integrasi sains dan islam.
6. Prof. Dr. Ulfah Utami, M.Si selaku dosen wali yang telah memberikan bimbingan kepada penulis dari awal hingga akhir studi.
7. Kedua orang tua ayahanda (bapak Khairuddin) dan ibunda (ibu Aminarti) yang telah memberikan doa, motivasi, dukungan moral dan material kepada penulis.
8. Beberapa teman seperjuangan Biologi 2019 yang selalu memberi semangat kepada penulis untuk menyelesaikan skripsi ini dengan baik.

Semoga amal baik yang telah diberikan kepada penulis mendapat balasan dari Allah Swt. Mungkin dalam pembuatan skripsi ini terdapat beberapa kesalahan yang belum penulis ketahui. maka dari itu penulis mohon saran dan kritik dari pembaca yang dapat membangun penulis menjadi lebih baik.

Wassalamu 'alaikum Wr. Wb.

Malang, September 2023

Penulis

DAFTAR ISI

HALAMAN DEPAN	i
HALAMAN PERSETUJUAN	ii
HALAMAN PENGESAHAN	iii
HALAMAN PERSEMBAHAN	iv
HALAMAN PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN	viii
HALAMAN PEDOMAN PENGGUNAAN SKRIPSI	ix
ABSTRAK	x
ABSTRACT	xi
تجريد	xii
KATA PENGANTAR	xiii
DAFTAR ISI	xiv
DAFTAR TABEL	xvi
DAFTAR GAMBAR	xvii
DAFTAR LAMPIRAN	xviii
DAFTAR SINGKATAN	xix
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	12
1.3 Tujuan.....	12
1.4 Manfaat penelitian.....	12
1.4.1 Bagi Peneliti	12
1.4.2 Bagi Masyarakat.....	12
1.5 Batasan Masalah	13
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	14
2.1 Jamur <i>Rhizopus oryzae</i>	14
2.1.1 Taksonomi Jamur <i>Rhizopus oryzae</i>	14
2.1.2 Karakteristik Jamur <i>Rhizopus oryzae</i>	14
2.1.3 Manfaat Jamur <i>Rhizopus oryzae</i>	16
2.2 Mekanisme Pembentukan Kitin.....	18
2.3 Apel Manalagi (<i>Malus Sylvestris</i> Mill.).....	20
2.3.1 Taksonomi Apel Manalagi (<i>Malus sylvestris</i> Mill.).....	20
2.3.2 Karakteristik Apel Manalagi (<i>Malus sylvestris</i> Mill.)	20
2.3.3 Karakteristik Dan Kandungan Limbah Apel.....	22
2.4 Kitosan.....	26
2.5 Proses Pembuatan Kitosan	27
2.5.1 Fermentasi cair (<i>Submerged Fermentation</i>).....	27

2.6 Sifat Fisikokimia Kitosan	30
2.6.1 Struktur kristal kitosan	30
2.6.2 Derajat Deasetilasi (DD).....	30
2.7 FTIR (Fourier Transform Infra-Red)	32
BAB III METODE PENELITIAN	34
3.1 Rancangan Penelitian	34
3.2 Waktu dan Tempat	34
3.3 Alat dan Bahan	35
3.3.1 Alat.....	35
3.3.2 Bahan.....	35
3.4 Prosedur Penelitian	35
3.4.1 Sterilisasi Alat dan Bahan.....	35
3.4.2 Pembuatan Media.....	36
3.4.2.1 <i>Potato Dextrose Agar</i> (PDA).....	36
3.4.2.2 <i>Potato Dextrose Broth</i> (PDB).....	36
3.4.3 Peremajaan Isolat jamur <i>Rhizopus oryzae</i>	36
3.4.4 Pembuatan Suspensi Spora <i>Rhizopus oryzae</i>	38
3.4.5 Penghitungan Jumlah Spora	38
3.4.6 Preparasi substrat dan fermentasi.....	38
3.4.6.1 Substrat Cair.....	38
3.4.6.2 Fermentasi Cair	38
3.4.7 Ekstraksi kitosan	39
3.4.8 Karakterisasi Derajat Deasetilasi Kitosan Menggunakan FTIR (<i>Fourier Transform Infra-Red</i>).....	40
3.5 Analisis Data	41
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	42
4.1 Pengaruh Penambahan Substrat Limbah Buah Apel Manalagi Terhadap Biomassa Miselium dan Kitosan <i>Rhizopus oryzae</i>	42
4.2 Derajat Deasetilasi Kitosan Jamur <i>Rhizopus oryzae</i>	51
4.3 Kajian Keislaman.....	54
BAB V PENUTUP.....	59
5.1 Kesimpulan	59
5.2 Saran.....	59
DAFTAR PUSTAKA	60
LAMPIRAN	69

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
2.1. Potensi Jamur Zygomycota Untuk Produksi Kitosan	17
2.2. Komposisi Kandungan Buah Apel Manalagi Per 100 gram	24

DAFTAR ISI

HALAMAN DEPAN	i
HALAMAN PERSETUJUAN	ii
HALAMAN PENGESAHAN	iii
HALAMAN PERSEMBAHAN	iv
HALAMAN PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN	viii
HALAMAN PEDOMAN PENGGUNAAN SKRIPSI	ix
ABSTRAK	x
ABSTRACT	xi
تجريد	xii
KATA PENGANTAR	xiii
DAFTAR ISI	xiv
DAFTAR TABEL	xvi
DAFTAR GAMBAR	xvii
DAFTAR LAMPIRAN	xviii
DAFTAR SINGKATAN	xix
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	12
1.3 Tujuan.....	12
1.4 Manfaat penelitian.....	12
1.4.1 Bagi Peneliti	12
1.4.2 Bagi Masyarakat.....	12
1.5 Batasan Masalah.....	13
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	14
2.1 Jamur <i>Rhizopus oryzae</i>	14
2.1.1 Taksonomi Jamur <i>Rhizopus oryzae</i>	14
2.1.2 Karakteristik Jamur <i>Rhizopus oryzae</i>	14
2.1.3 Manfaat Jamur <i>Rhizopus oryzae</i>	16
2.2 Mekanisme Pembentukan Kitin.....	18
2.3 Apel Manalagi (<i>Malus Sylvestris</i> Mill.).....	20
2.3.1 Taksonomi Apel Manalagi (<i>Malus sylvestris</i> Mill.).....	20
2.3.2 Karakteristik Apel Manalagi (<i>Malus sylvestris</i> Mill.)	20
2.3.3 Karakteristik Dan Kandungan Limbah Apel.....	22
2.4 Kitosan.....	26
2.5 Proses Pembuatan Kitosan	27
2.5.1 Fermentasi cair (<i>Submerged Fermentation</i>).....	27

2.6 Sifat Fisikokimia Kitosan	30
2.6.1 Struktur kristal kitosan	30
2.6.2 Derajat Deasetilasi (DD).....	30
2.7 FTIR (Fourier Transform Infra-Red)	32
BAB III METODE PENELITIAN	34
3.1 Rancangan Penelitian	34
3.2 Waktu dan Tempat	34
3.3 Alat dan Bahan	35
3.3.1 Alat.....	35
3.3.2 Bahan.....	35
3.4 Prosedur Penelitian	35
3.4.1 Sterilisasi Alat dan Bahan.....	35
3.4.2 Pembuatan Media.....	36
3.4.2.1 <i>Potato Dextrose Agar</i> (PDA).....	36
3.4.2.2 <i>Potato Dextrose Broth</i> (PDB).....	36
3.4.3 Peremajaan Isolat jamur <i>Rhizopus oryzae</i>	36
3.4.4 Pembuatan Suspensi Spora <i>Rhizopus oryzae</i>	38
3.4.5 Penghitungan Jumlah Spora	38
3.4.6 Preparasi substrat dan fermentasi.....	38
3.4.6.1 Substrat Cair.....	38
3.4.6.2 Fermentasi Cair	38
3.4.7 Ekstraksi kitosan	39
3.4.8 Karakterisasi Derajat Deasetilasi Kitosan Menggunakan FTIR (<i>Fourier Transform Infra-Red</i>).....	40
3.5 Analisis Data	41
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	42
4.1 Pengaruh Penambahan Substrat Limbah Buah Apel Manalagi Terhadap Biomassa Miselium dan Kitosan <i>Rhizopus oryzae</i>	42
4.2 Derajat Deasetilasi Kitosan Jamur <i>Rhizopus oryzae</i>	51
4.3 Kajian Keislaman.....	54
BAB V PENUTUP.....	59
5.1 Kesimpulan	59
5.2 Saran.....	59
DAFTAR PUSTAKA	60
LAMPIRAN	70

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
2.1. Potensi Jamur Zygomycota Untuk Produksi Kitosan	17
2.2. Komposisi Kandungan Buah Apel Manalagi Per 100 gram	24

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
2.1. Jamur <i>Rhizopus oryzae</i>	15
2.2. Jalur Biosintesis Kitin	20
2.3. Buah Apel Manalagi.....	21
2.4. Gejala Penyakit Buah Apel Busuk	23
2.5. Struktur Kimia	27
2.6. Klasifikasi Nilai Derajat Deasetilasi Kitosan Secara Umum	32
2.7. Pembentukan Pita Sesuai Dengan Spektrum FTIR.....	33
4.1. Gambar Pengaruh Konsentrasi ekstrak Limbah Apel Manalagi Sebagai Sumber Karbon Terhadap Biomassa Kering Kitosan <i>Rhizopus oryzae</i>	42
4.2. Spektrum FTIR Derajat Deasetilasi Kitosan Jamur <i>Rhizopus oryzae</i>	51

DAFTAR LAMPIRAN

1. Penentuan Penggunaan Konsentrasi.....	70
2. Perhitungan Nilai Derajat Deasetilasi	70
3. Analisis Data Statistik SPSS Biomassa Miselium	71
4. Analisis Data Statistik SPSS Biomassa Kitosan	72
5. Hasil Biomassa Kering Miselium Jamur <i>Rhizopus oryzae</i>	73
6. Hasil Biomassa Kering Kitosan Jamur <i>Rhizopus oryzae</i>	74
7. Alur Penelitian.....	76
8. Kegiatan Penelitian	77
9. Perhitungan Haemocytometer	81

DAFTAR SINGKATAN

Simbol/singkatan	Keterangan
β	Beta
α	Alfa
γ	Gamma
DD	Derajat Deasetilasi
GlcNAc	N-asetilglukosamin
FTIR	Fourier Transform Infrared Spectroscopy
HPLC	High performance liquid Chromatography
Solid-NMR	Solid- Nuclear Magnetic Resonance
cm^{-1}	Sentimeter invers
%	Persen
mg	Miligram
g	Gram
kDa	Kilodalton
AMMRL	Aircraft Maintenance Material Readiness List Program
IMI	Bioscience Genetic Resource Collection
ATCC	American Type Culture Collectio
MTCC	Microba Type Culture Collection and Gene Bank
kg	Kilogram
PDB	Potato Dextrose Broth
v/v%	Persen volume per volume
μm	Mikrometer
L	Liter
AIM	Alkali Insoluble Material
GlcN	Glukosamin
dll	dan lain-lain
Mdpl	Meter di Atas Permukaan Laut
$^{\circ}\text{C}$	Derajat celsius
Sp	Spesies
pH	Potensial hidrogen
NaOH	Sodium hidroksida
COCH_3	Gugus asetil
NH_2	Gugus amina
<	lebih kecil
>	Lebih besar
NH_3^+	Amonia
RAL	Rancangan Acak Lengkap
PDA	Potato Dextrose Agar
LAF	Laminar Air Flow

$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	Magnesium sulfat heptahidrat
K_2HPO_4	Dipotassium fosfat
KH_2PO_4	Monopotassium fosfat
KOH	Kalium Hidroksida
No.	Nomor
ml	Mililiter
N	Normalitas
Rpm	Revolution per minute
kBr	Kimia, Biologi, dan Radioaktif
Po	Transmitan minimum
P	Transmitan maksimum
ANOVA	Analysis of Variance
SPSS	Statistical Program for Social Science
$NH_4_2SO_4$	Amonium sulfat
NH_4NO_3	Amonium nitrat
$MgSO_4$	Magnesium sulfat
$CaCl_2$	Kalsium klorida
NH_4^+	Amonium
NO_3^-	Nitrat
C=O	Gugus fungsi amida
NH_2	Gugus fungsi amina
$NHCOCH_3$	Gugus asetamida

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Kitosan merupakan sebuah polimer β -1,4-D glukosamin yang berasal dari N-deasetilasi basa kitin (Kurniasih *et al.*, 2018). Senyawa organik ini dapat dihasilkan dengan cara proses deasetilasi kitin menggunakan kalium hidroksida pada suhu tinggi atau dengan menggunakan bantuan dari enzim. Kitosan memiliki berbagai macam sifat diantaranya sebagai biodegradable, biokompatibel, bioaktif, serta memiliki sifat sebagai antibakteri (Venkatesan dkk 2010 dalam Windarti and Hascaryo, 2022). Kitosan memiliki manfaat dalam berbagai bidang diantaranya farmasi atau obat-obatan, biomedis, rekayasa jaringan, serta kosmetik (Zargar dkk, 2015 dalam Windarti and Hascaryo, 2022).

Bahan dasar dari pembuatan kitosan yaitu kitin menjadi polisakarida yang keberadaannya terdapat di alam dan berperan sebagai bahan penyusun dari dinding sel hewan khususnya dari kelompok krustasea. α , β dan γ adalah tiga cara perakitan kitin di alam. Cangkang krustasea seperti udang dan kepiting memiliki α -kitin. β -kitin memiliki susunan rantai yang paralel dan yang biasa ditemukan di pena cumi-cumi. Sedangkan γ -kitin yang ada pada serangga, memiliki dua rantai yang sejajar dalam satu arah dan rantai ketiga menjadi antiparalel dengan dua rantai sebelumnya. Sebagian besar krustasea yang sering digunakan sebagai bahan dasar dalam pembuatan kitosan berasal dari cangkang kerang, tiram, kepiting, serta serangga. Diperkirakan jumlah kitin yang keberadaannya di alam diproduksi oleh hewan sebanyak 120 ribu ton. kitin yang berasal dari kepiting 69%, udang sebesar 30%, laba-laba dan kalajengking masing-masing 38% (Rohmah *et al.*, 2022) Produksi polisakarida amino atau kitosan yang bahan baku kitinnya

bersumber dari cangkang krustasea memiliki berbagai macam kendala diantaranya proses pembuatan dalam kurun waktu yang cukup lama dengan menggunakan basa kuat pada suhu tinggi. Selain itu, pembiayaan konversi kimia kitin ke kitosan dari krustasea yang tergolong cukup mahal (Khalaf, 2004).

Solusi bahan baku alternatif dalam menghasilkan kitin selain menggunakan cangkang krustasea salah satunya adalah dengan menggunakan jamur. Jamur didefinisikan sebagai organisme (jasad renik) yang mengandung kitin sebagai komponen struktural utama di dinding selnya. Jamur merupakan kelompok organisme terbesar kedua di bumi dengan perkiraan jumlah spesies yang berhasil teridentifikasi adalah 70.000 spesies. Dinding sel jamur terdiri dari kitin, β -glukan, dan manan. Komponen utama penyusun dinding sel dari kelas jamur tertentu diantaranya kelompok zygomycetes disusun oleh kitin, chytridiomycetes disusun oleh kitin/ β -glukan, ascomycetes disusun oleh kitin/mannan/ β -glukan, serta basidiomycetes disusun oleh kitin dan β -glukan namun secara keseluruhan diperkirakan jumlah total kitin yang terdapat di dalam dinding sel jamur sebanyak 22-44%. Perakitan kitin pada jamur menggunakan cara α dimana ikatan antar molekul yang kuat hadir dalam α -kitin, yang terdiri dari rantai antiparalel β -1,4 terkait N-asetil-D-glukosamin (GlcNAc) (Ghormade *et al.*, 2017). Produksi kitosan dari miselium jamur memiliki banyak keunggulan dibandingkan kitosan krustasea seperti proses demineralisasi tidak perlu dilakukan, derajat deasetilasi lebih tinggi, berat molekul lebih rendah, serta viskositas dan distribusi muatan kitosan jamur lebih stabil daripada kitosan krustasea (Nwe *et al.*, 2010).

Teknik analisa yang digunakan dalam mengetahui sifat fisik serta kimia dari kitosan yang dihasilkan dengan cara menghitung nilai DD (Derajat Deasetilasi). Nilai derajat deasetilasi menunjukkan bahwa kualitas kitosan yang dihasilkan berkaitan dengan kemurniannya dimana semakin tinggi nilai derajat deasetilasi kitosan yang dihasilkan maka semakin bagus pula kualitasnya. Semakin tinggi derajat deasetilasi kitosan maka semakin banyak gugus amina yang menggantikan gugus asetil (Agustini *et al.*, 2013 dalam Handayani *et al.*, 2018). Terdapat beberapa jenis metode yang digunakan untuk menghitung nilai derajat deasetilasi yaitu dengan menggunakan teknik FTIR, HPLC, C solid NMR, dan ultraviolet spectrometry.

FTIR menjadi salah satu metode yang populer untuk digunakan dalam menganalisa nilai derajat deasetilasi dikarenakan metodenya yang sangat sederhana, membutuhkan persiapan sampel yang sedikit, serta biaya yang digunakan relatif jauh lebih murah dibandingkan dengan teknik-teknik lainnya (Abo *et al.*, 2019). Pengukuran nilai DD (Derajat Deasetilasi) metode FTIR (*Fourier Transform Infrared-Spectroscopy*) dilakukan dengan mengkarakterisasi gugus fungsi atau senyawa berdasarkan pada serapan radiasi inframerah oleh atom yang mengalami vibrasi. analisis ini berdasarkan fakta bahwa molekul memiliki frekuensi vibrasi yang spesifik. Frekuensi daerah inframerah dapat terjadi pada bilangan gelombang 4000-400 cm^{-1} . Derajat deasetilasi kitosan ditentukan dengan metode base-line berdasarkan perbandingan nilai absorbansi pada bilangan gelombang 1655 cm^{-1} dan 3450 cm^{-1} (Warda *et al.*, 2022).

Jamur dari kelompok zygomycota adalah sumber potensial untuk memproduksi kitosan dibandingkan dengan jamur dari kelompok lain. Hal ini

sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Mane *et al.* (2022) bahwa kitosan yang diekstraksi dari dinding sel jamur *Benjaminiella poitrasi* kelompok zygomycota memiliki karakteristik yang sangat baik yaitu biomassa kering paling berat 60,89 mg/g dan nilai derajat deasetilasi 92,78%. Perbandingan nilai yang jauh lebih tinggi dengan jamur *Aspergillus niger* (Ascomycetes) dengan nilai biomassa kering 7,16 mg/g dan nilai derajat deasetilasi sebesar 83,64% (Abdel *et al.*, 2017). *Agaricus bisporus* (Basidiomycetes) dengan nilai biomassa kering 40 mg/g dan nilai derajat deasetilasi sebesar 64,08% (Fadhil *et al.*, 2021). Akan tetapi, jamur *Benjaminiella poitrasi* adalah spesies jamur yang sulit ditemukan keberadaannya di Indonesia hal ini dijelaskan di dalam penelitian Lee *et al.* (2018) bahwa isolat jamur *Benjaminiella poitrasi* hanya dapat ditemukan pada industri kultur koleksi di beberapa negara diantaranya Australia (AMMRL), Inggris (IMI), Amerika Serikat (ATCC), dan India (MTCC). Salah satu spesies jamur dari kelompok zygomycota berpotensi sebagai bahan pembuatan kitosan serta dapat tumbuh subur di Indonesia salah satunya adalah dengan menggunakan jamur dari spesies *Rhizopus oryzae*.

Spesies jamur yang juga sering digunakan sebagai bahan baku dalam pembuatan kitosan adalah jamur *Rhizopus oryzae*. Parameter yang digunakan untuk menunjukkan bahwa spesies *Rhizopus oryzae* digunakan untuk menghasilkan kitosan yang cukup baik mengacu kepada jumlah berat kering kitosan yang tinggi, berat molekul yang rendah, serta nilai DD (Derajat Deasetilasi) yang cukup tinggi. *Rhizopus oryzae* memiliki berat kering berkisar diantara 44-138 g/kg (Tayel *et al.*, 2014 dalam Crognale *et al.*, 2022). Karakter fisikokimia kitosan yang dihasilkan dari jamur *Rhizopus oryzae* menunjukkan hasil kitosan yang cukup baik dengan

dengan nilai derajat deasetilasi serta berat molekul yang dihasilkan yaitu 87,9% dan $6,9 \times 10^5$ kDa (Pochanavanich dan Suntornsuk, 2002).

Penjelasan terkait mikroorganisme jamur secara tersirat terdapat di dalam Q.S. Saba' (34) : 22 ;

قُلْ ادْعُوا الَّذِينَ زَعَمْتُمْ مِنْ دُونِ اللَّهِ لَا يَمْلِكُونَ مِثْقَالَ ذَرَّةٍ فِي السَّمَوَاتِ وَلَا فِي الْأَرْضِ وَمَا لَهُمْ فِيهِمَا مِنْ شَرِكٍ وَمَا لَهُ مِنْهُمْ مِنْ ظَهِيرٍ ﴿٢٢﴾

Artinya: *Katakanlah (Muhammad), “Serulah mereka yang kamu anggap (sebagai tuhan) selain Allah! Mereka tidak memiliki (kekuasaan) seberat zarrah pun di langit dan di bumi, dan mereka sama sekali tidak mempunyai peran serta dalam (penciptaan) langit dan bumi dan tidak ada di antara mereka yang menjadi pembantu bagi-Nya.”* (QS. Saba [34]: 22).

Lafadz (ذَرَّةٌ) merujuk kepada organisme yang memiliki ukuran sangat kecil sehingga dari sudut pandang manusia makhluk hidup ini tidak dapat dilihat dengan mata. Menurut tafsir Ilni Kemenag (2015) Allah Swt mengajari manusia bahwa hanya Dia-lah yang mengatur kehidupan dalam dunia jasad renik yang sangat luas. Dunia jasad renik “tersembunyi” dari manusia, dan mereka tidak memiliki kontrol apa pun atasnya. Jasad renik memiliki ukuran sangat kecil diantaranya bakteri, misalnya yang berukuran antara 0,2–0,5 mikron dan spora jamur yang berukuran 3–6 mikron. Allah Swt memberi contoh kekuasaan-Nya dengan memperlihatkan apa yang terjadi pada organisme kompleks seperti tanaman dan hewan yang telah mati. Allah memberlakukan sunah-Nya dengan membiarkan jasad renik melakukan tugasnya, yaitu melakukan proses penguraian pada makhluk hidup yang telah mati.

Hancurnya tubuh tumbuhan maupun hewan yang telah mati menjadi berkeping-berkeping merupakan hasil dari proses penguraian yang dilakukan oleh jamur yang bertujuan untuk memenuhi kebutuhan nutrisinya serta untuk nutrisi

bagi makhluk hidup lain yang berada di sekitarnya. Hal ini telah dibuktikan dengan penelitian yang telah dilakukan terhadap jamur bahwa bagian tubuh jamur berupa hifa memiliki kemampuan untuk menghasilkan beberapa enzim yang berfungsi untuk menguraikan senyawa bahan organik kompleks menjadi sederhana yang terdapat di dalam tubuh organisme sehingga proses penguraian tubuh makhluk hidup yang telah mati dapat terjadi dengan mudah. Selain peran utamanya sebagai dekomposer, pemanfaatan jamur melalui ilmu pengetahuan terbaru menunjukkan bahwa jamur dapat dijadikan sebagai bahan dasar dalam pembuatan kitosan.

Media umum yang sering digunakan untuk menumbuhkan jamur yang menghasilkan kitosan terdiri dari beberapa jenis diantaranya media PDB (*Potato Dextrose Broth*). Permasalahan yang timbul berupa karakter kitosan yang dihasilkan belum cukup optimal. Menurut penelitian yang telah dilakukan oleh Elsoud *et al.*, (2023) bahwa kitosan yang dihasilkan dari jamur *Aspergillus terreus* dengan ditumbuhkan pada media PDB (*Potato Dextrose Broth*) memiliki nilai derajat deasetilasi yaitu 71,9% sedangkan menurut penelitian Habibi *et al.*, (2021) nilai derajat deasetilasi kitosan yang dihasilkan dari jamur *Aspergillus terreus* yang ditumbuhkan pada media ekstrak limbah limbah apel ditambahkan dengan sumber nitrogen lebih tinggi yaitu 88,2%. Permasalahan selanjutnya terkait dengan biaya media budidaya pertumbuhan jamur yang harganya relatif cukup mahal seperti harga media PDA instant yang mencapai Rp 680.000 hingga Rp 1.200.000 setiap pembelian 500 g (Nurhayati *et al.*, 2021).

Terdapat beberapa pilihan alternatif dari penggunaan media PDA (*Potato Dextrose Agar*) diantaranya menggunakan bahan alami berupa limbah buah dan sayur. Hal yang harus dipertimbangkan dari suatu bahan alami untuk dijadikan sebagai media harus memiliki sumber karbon. Beberapa pilihan limbah yang dapat digunakan sebagai media alternatif diantaranya kulit pisang, bonggol jagung, kulit singkong, limbah buah apel manalagi dll. Limbah kulit pisang memiliki kadar karbon sebanyak 18,5% lignoselulosa dari 100 gr (Fatimura *et al.*, 2020), limbah bonggol jagung memiliki kadar karbon 30% selulosa dari 100 gr (Rahmadani *et al.*, 2013), limbah kulit singkong memiliki kadar karbon 59,31% selulosa dari 100 gr, dan Limbah buah apel manalagi memiliki kadar karbon 14,19% glukosa dari 100 gr (Gazali *et al.*, 2017). Walaupun rendahnya kadar karbon yang terdapat dalam limbah apel manalagi dibandingkan dengan limbah lain, akan tetapi untuk nilai kandungan gula total dengan 14,19 g sudah tergolong ke dalam nilai kandungan gula total yang cukup tinggi sehingga dapat digunakan oleh jamur mengingat persentase karbohidrat yang diperlukan dalam media pertumbuhan jamur dapat berkisar mulai dari 1% hingga lebih (Wosiacki *et al.*, 2007).

Keunggulan penggunaan limbah apel dibandingkan limbah lain terdapat pada karakter kitosan yang dihasilkan dimana penggunaan limbah apel menghasilkan kitosan dengan parameter yang lebih unggul baik dari segi biomassa kering maupun nilai derajat deasetilasi. Penelitian yang dilakukan oleh Habibi *et al.* (2021) terkait kitosan dari *Aspergillus terreus* yang difermentasikan dengan menggunakan ekstrak limbah apel selama 3 hari menghasilkan biomassa kering sebesar 140,9 mg dan nilai derajat deasetilasi sebesar 88,2%. Nilai

parameter yang dihasilkan lebih besar dibandingkan dengan kitosan dari jamur *Cunninghamella elegans* yang difermentasikan dengan menggunakan ekstrak limbah kulit singkong selama 3 hari menghasilkan biomassa kering sebesar 57,82 mg dan nilai derajat deasetilasi sebesar 82, 24% (Berger *et al.*, 2014). Kitosan jamur *Cunninghamella bertholletiae* yang ditumbuhkan pada media ekstrak ampas tebu menghasilkan kitosan sebesar 25 mg dengan nilai derajat deasetilasi sebesar 13,55% (Amorim, 2006).

Kota Malang sebagai salah satu kota yang menjual berbagai jenis buah apel diantaranya apel anna, apel rome beauty, dan apel manalagi. Apel-apel yang dijual di Kota Malang biasanya didatangkan dari beberapa tempat di Kabupaten Malang diantaranya Kecamatan Poncokusumo (997.630 kw), Kecamatan Tumpang (131.100 kw), Kecamatan Jabung (87.400 kw), Kecamatan Karangploso 13.693 kw), dan Kecamatan Pujon (176.350 kw) (Badan Pusat Statistika, 2020). Apel manalagi merupakan salah satu varietas lokal yang mayoritas paling disukai konsumen, oleh karena kelezatan rasanya dan penampilannya yang menarik. Masalahnya sekarang tidak semua apel dalam bentuk segar habis dikonsumsi oleh masyarakat. Selain itu, masih banyak apel yang disortir karena tidak masuk grade tertentu atau kategori busuk (Utomo *et al.*, 2014). Buah apel yang busuk biasanya disebabkan oleh jamur *Gloeosporium* sp. yang ditandai dengan permukaan buah apel manalagi berwarna coklat muda dengan titik kehitaman dan selanjutnya bercak melebar dan berwarna coklat tua (Toini *et al.*, 2021). Buah apel manalagi yang telah busuk biasanya telah dapat dikategorikan sebagai limbah.

Limbah buah apel manalagi menjadi salah satu solusi sebagai media pertumbuhan jamur dalam memproduksi kitosan. Seiring berjalannya waktu sepertiga buah-buahan yang tidak terjual dan masih berada di toko buah maka akan mengalami proses pembusukan diperkirakan dari 400 buah apel yang tidak terjual di toko buah, setengahnya 200 buah mengalami pembusukan dan menyebar ke buah apel segar lainnya (Sultana *et al.*, 2022). Limbah buah apel tersusun atas biomassa padat dengan kadar air yang cukup tinggi sekitar 84,05% (Putri *et al.*, 2020). Buah apel manalagi yang telah busuk biasanya telah dapat dikategorikan sebagai limbah sehingga tidak dikonsumsi atau diolah menjadi produk yang jadi seperti sari buah, selai, dodol, dll. Komposisi dari limbah apel terdiri dari kulit dan daging buah menyumbang sekitar 95% dan 2-5% terdiri dari biji apel (Lyu *et al.*, 2020). Kandungan senyawa yang terdapat di dalam limbah apel cukup bervariasi dengan jumlah ketersediannya yang cukup banyak. limbah apel manalagi dapat menjadi sumber karbohidrat, protein, asam amino, vitamin, dan senyawa lain yang menjanjikan (Perusello *et al.*, 2017).

Penggunaan media fermentasi limbah buah apel manalagi mengandung sumber karbon yang sangat diperlukan oleh jamur untuk dapat tumbuh. Terdapat beberapa kandungan nutrisi yang berada di dalam limbah apel manalagi diantaranya total gula 8,29 gram; fruktosa, 4,5 gram; glukosa 3,72 gram, sukrosa 3,72 gram, gula/asam 42,65 gram, vitamin C 6,60 gram, protein 0,26 gram, dan gula pereduksi 6,96 gram (Sa'adah dan Estiasih, 2015). Sumber karbon berguna sebagai energi bagi jamur dalam membentuk sel-sel (Wantini dan Octavia, 2018). Terpenuhinya zat karbon pada media limbah apel manalagi menyebabkan pertumbuhan miselium dan jumlah kitin dari jamur dapat meningkat sehingga

kitosan yang dihasilkan memiliki jumlah yang banyak. Jamur *Rhizopus oryzae* memiliki enzim amilolitik yang akan memecah amilum (gula kompleks) menjadi gula sederhana seperti sukrosa, gula (sukrosa) yang terdapat di dalam ekstrak limbah apel lalu memecahnya menjadi fruktosa dan galaktosa dengan menggunakan bantuan enzim karbohidrase dan protease (Sanjaya *et al.*, 2020).

Penggunaan limbah buah apel manalagi sebagai substrat dapat dilakukan dalam dua metode yaitu fermentasi padat (*Solid-state fermentation*) dan fermentasi cair (*Submerged fermentation*). Fermentasi cair merupakan proses inokulasi mikroorganisme ke dalam larutan yang mengandung semua nutrisi yang dibutuhkan untuk pertumbuhan (Utarti *et al.*, 2023). Proses pembuatan kitosan biasanya lebih banyak menggunakan metode fermentasi cair dari pada fermentasi padat hal ini dikarenakan terdapat beberapa keunggulan diantaranya kontrol terhadap kontaminan lebih mudah, durasi panen lebih singkat, temperatur dan pH lebih mudah dikontrol, serta inokulasi lebih mudah (Kanwal *et al.*, 2023).

Beberapa penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa ekstrak limbah buah apel manalagi sebagai bahan yang menjadi sumber karbon bagi jamur dapat dilakukan melalui proses fermentasi cair. Hal tersebut sesuai dengan penelitian Habibi *et al.*, (2021) bahwa variabel penggunaan ekstrak limbah apel sebagai sumber karbon pertumbuhan jamur *Aspergillus terreus* melalui metode fermentasi cair selama 7 hari dilakukan dengan cara pemberian jumlah konsentrasi yang berbeda yaitu 20%, 40%, 60%, dan 80%. Hasil dari pemberian konsentrasi yang berbeda menunjukkan hasil yang berpengaruh, hal ini ditandai peningkatan biomassa miselium jamur pada setiap perlakuan yang diberikan berbanding lurus dengan peningkatan jumlah konsentrasi yang diberikan yaitu 9,1 gr, 17 gr, 23,50

gr dan 25,84 gr serta menghasilkan biomassa kitosan sebesar 140,9 mg untuk perlakuan 100%.

Pengaruh jumlah konsentrasi sumber karbon pada substrat dapat mempengaruhi biomassa akhir kitosan yang dihasilkan serta nilai dari derajat deasetilasi kitosan. Hal ini disebabkan karena reaksi deasetilasi akan bergantung pada jumlah kitosan yang sebelumnya telah diekstraksi dari kitin jamur untuk dilakukan proses deasetilasi. Penggunaan konsentrasi substrat yang lebih tinggi, maka mengakibatkan lebih banyak miselium yang dihasilkan sehingga proses deasetilasi kitosan menggunakan asam dan basa yang kuat untuk menghilangkan unit glukosamin akan lebih tinggi. Produk hasil kitosan dipengaruhi oleh beberapa faktor diantaranya konsentrasi substrat, jenis enzim, rasio enzim/substrat, dan lama inkubasi (Hasri, 2010).

Berdasarkan uraian di atas, ekstrak limbah buah apel manalagi dapat dijadikan sebagai sumber karbon untuk menghasilkan kitosan dari jamur *Rhizopus oryzae*. Oleh karena itu, tujuan dilakukannya penelitian kali ini adalah untuk mengetahui pengaruh penambahan ekstrak limbah buah apel manalagi sebagai sumber karbon yang berpotensi sebagai media pertumbuhan jamur *Rhizopus oryzae* untuk memproduksi miselium dan kitosan melalui metode fermentasi cair (*Submerged Fermentation*) serta untuk mengetahui nilai derajat deasetilasi kitosan jamur *Rhizopus oryzae* menggunakan metode FTIR (*Fourier Transform Infra-Red*).

1.2 Rumusan Masalah

Adapun rumusan masalah pada penelitian ini adalah:

1. Bagaimana pengaruh variasi konsentrasi substrat limbah buah apel manalagi sebagai sumber karbon terhadap biomassa kering miselium dan kitosan jamur *Rhizopus oryzae*?
2. Bagaimana karakteristik kitosan jamur *Rhizopus oryzae* berdasarkan nilai derajat deasetilasi kitosan hasil fermentasi cair menggunakan substrat limbah buah apel manalagi sebagai sumber karbon?

1.3 Tujuan

Tujuan dilaksanakan penelitian ini adalah:

1. Untuk mengetahui pengaruh variasi konsentrasi substrat limbah buah apel manalagi sebagai sumber karbon terhadap biomassa kitosan jamur *Rhizopus oryzae*
2. Untuk mengetahui nilai derajat deasetilasi kitosan jamur *Rhizopus oryzae* menggunakan substrat limbah buah apel manalagi sebagai sumber karbon.

1.4 Manfaat Penelitian

1.4.1 Bagi Peneliti

Manfaat penelitian ini adalah untuk mendapatkan ilmu pengetahuan serta keterampilan baru dalam pengembangan mengenai kegiatan dalam memproduksi kitosan dari jamur *Rhizopus oryzae* dengan menggunakan metode fermentasi cair yang didapatkan dari pemanfaatan substrat limbah buah apel manalagi.

1.4.2 Bagi Masyarakat

Manfaat penelitian ini untuk masyarakat adalah dapat memberikan, menambah, serta dapat menjadi salah satu sumber sebagai referensi terkait informasi

mengenai ilmu tentang tata cara produksi kitosan serta pemberian informasi ilmiah mengenai pengaruh penggunaan bahan alami yang ramah lingkungan serta limbah yang sebelumnya tidak dimanfaatkan untuk memproduksi kitosan dengan menggunakan metode fermentasi cair dari substrat limbah buah apel manalagi.

1.5 Batasan Masalah

Batasan masalah pada penelitian ini adalah:

1. Jamur *Rhizopus oryzae* diperoleh dari koleksi CV. Wiyasa Mandiri.
2. Sampel limbah buah apel manalagi diperoleh dari toko buah “Fresh fruit” Kecamatan lowokwaru, Kota Malang.
3. Bagian limbah buah apel manalagi yang digunakan adalah seluruh bagian buah kecuali bagian buah yang telah busuk.
4. Variasi Konsentrasi ekstrak limbah apel manalagi yang digunakan adalah kontrol, Kontrol, 60%, 80% dan 100 (v/v %).
5. Karakterisasi derajat deasetilasi kitosan menggunakan metode FTIR (*Fourier Transform Infrared-Spectroscopy*).
7. Metode fermentasi kitosan menggunakan metode fermentasi cair (*submerged fermentation*).

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Jamur *Rhizopus oryzae*

2.1.1 Taksonomi Jamur *Rhizopus oryzae*

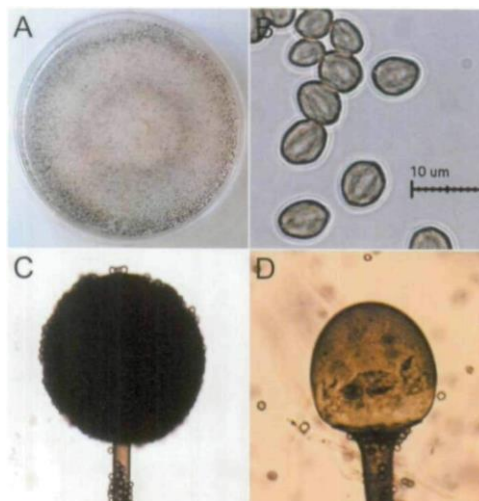
Kedudukan taksonomi jamur *Rhizopus oryzae* menurut Haghayegh dan Hashemi (2011) adalah sebagai berikut:

Kingdom	: Fungi
Filum	: Zygomycota
Ordo	: Mucorales
Family	: Mucoraceae
Genus	: <i>Rhizopus</i>
Spesies	: <i>Rhizopus oryzae</i>

2.1.2 Karakteristik Jamur *Rhizopus oryzae*

Rhizopus sp adalah genus jamur benang yang termasuk filum Zygomycota ordo Mucorales. *Rhizopus oryzae* mempunyai ciri khas yaitu memiliki hifa yang berbentuk rhizoid untuk menempel ke substrat. Ciri lainnya adalah memiliki hifa senositik, sehingga tidak bersepta atau bersekat. Miselium dari *Rhizopus oryzae* yang juga disebut stolon menyebar di atas substratnya karena aktivitas dari hifa vegetatif. *Rhizopus oryzae* bereproduksi secara aseksual dengan memproduksi banyak sporangiofor yang bertangkai. Sporangiospora ini tumbuh ke arah atas dan mengandung ratusan spora. Sporangiofor ini biasanya dipisahkan dari hifa lainnya oleh sebuah dinding seperti septa (Maimuna *et al.*, 2019). Secara makroskopis jamur *Rhizopus oryzae* memiliki ukuran koloni rata-rata dengan diameter koloninya 9 cm. Ciri-ciri koloni dari *Rhizopus oryzae* diantaranya koloni berwarna putih keabuan. Tekstur koloni cottony atau

menyerupai kapas. Permukaan koloni tidak memperlihatkan adanya growing zone, tidak terdapat zonasi, dan tidak memiliki garis pertumbuhan radial. Hasil pengamatan dengan menggunakan mikroskop menunjukkan bahwa *Rhizopus oryzae* memiliki sporangium, rizoid dan stolon (Jagat *et al.*, 2021).



Gambar 2.1. Jamur *Rhizopus oryzae*. (A) Koloni *Rhizopus oryzae* pada media PDA yang diinkubasi 7 hari, (B) Sporangium, (C) Kolumella, (D) Sporangiospora (Kwon *et al.*, 2011).

Rhizopus oryzae memiliki stolon dengan dinding bertekstur halus atau agak kasar, warna bervariasi mulai dari putih (hampir tidak memiliki warna) hingga berwarna cokelat kekuningan. Rhizoid berwarna kecokelatan, bercabang, terletak berlawanan arah, dengan sporangiofor atau muncul langsung dari stolon tanpa adanya rhizoid. Sporangiofor dapat berjumlah tunggal dan berbentuk struktur seperti garpu, serta berdinding halus, memiliki panjang 150-2000 µm dan berdiameter 6-14 µm. Sporangia berbentuk bulat hingga semi bulat dengan dinding berduri berwarna cokelat gelap hingga cokelat kehitaman dan berdiameter 50-200 µm. Kolumela memiliki bentuk bulat tidak beraturan dengan diameter lebih dari 100 µm. Khamidiospora berbentuk bulat berbentuk elips dan silinder berdiameter 10-35 µm (Sine & Soetarto 2018).

2.1.3 Manfaat Jamur *Rhizopus oryzae*

Kitin merupakan bagian integral dari dinding sel jamur pada jamur tertentu terutama dari yang termasuk ke dalam zygomycota. Beberapa jenis jamur diantaranya *Rhizopus oryzae* dapat menghasilkan kitosan berupa produk turunan dari kitin. Hasil kitosan yang telah diekstraksi dari beberapa galur spesies *Rhizopus oryzae* dilaporkan dengan jumlah yang cukup bervariasi mulai dari 330-645mg/L (Hang, 1990). Biomassa kering kitosan dengan hasil produktivitas tinggi dihasilkan dengan cara melakukan proses fermentasi anaerob pada jamur *Rhizopus oryzae*. Miselium *Rhizopus oryzae* merupakan sumber kaya protein berkisar antara 35-42%. Selain protein, dinding sel jamur tersusun dari bahan yang tidak larut alkali (Alkali Insoluble Material/AIM) dari biomassa. Glucosamine (GlcN) dan N-acetyl glucosamine (GlcNAc) menghasilkan 61-65% sebagai bahan penyusun AIM. GlcN yang menyusun dinding sel *Rhizopus oryzae* merupakan prekursor atau bahan dasar dalam pembuatan kitosan (Vinche *et al.*, 2012).

adanya variasi karakter kitosan yang dihasilkan dari kelompok jamur zygomycota tidak terlepas dari jenis spesies jamur yang digunakan dari kelompok ini. Selain *Rhizopus oryzae* terdapat juga beberapa jenis spesies jamur dari kelompok zygomycota yang dapat dijadikan bahan baku sebagai penghasil kitosan diantaranya *Rhizopus arrhizus*, *Mucor racemosus*, *mucor rouxii*, *Gongronella butleri* dll. Akan tetapi, spesies jamur *Rhizopus oryzae* menjadi spesies yang paling optimal dibandingkan dengan spesies lain dari kelompoknya untuk dijadikan sumber penghasil kitin dalam memproduksi kitosan. Hal ini didasarkan pada biomassa serta nilai derajat deasetilasi kitosan yang tinggi. Menurut

Ghormadeet *et al.*, (2017) bahwa nilai karakter kitosan bergantung kepada spesies jamur yang digunakan hal ini ditunjukkan pada tabel 2.1 berikut:

Tabel 2.1 Potensi jamur Zygomycota untuk produksi kitosan.

Spesies jamur	Nilai Biomassa kitosan (g/kg)	Nilai derajat Deasetilasi (%)
<i>Absidia glauca</i>	59	76
<i>Cuninghamella bertholletiae</i>	55	88
<i>Gongronella butleri</i>	40	89
<i>Mucor racemosus</i>	60	83
<i>Mucor rouxii</i>	35	70
<i>Rhizopus arrhizus</i>	29	86
<i>Rhizopus oryzae</i>	58	89

Peran dari jamur juga telah dirasakan oleh umat manusia sejak era Islam berjaya, salah satunya dapat dilihat dalam Q.S Saba (34) : 3 ;

وَقَالَ الَّذِينَ كَفَرُوا لَا تَأْتِينَا السَّاعَةُ قُلْ بَلَىٰ وَرَبِّي لَتَأْتِيَنَّكُمْ عِلْمُ الْغَيْبِ لَا يَعْزُبُ عَنْهُ مِثْقَالُ ذَرَّةٍ فِي السَّمَوَاتِ وَلَا فِي الْأَرْضِ وَلَا أَصْغَرُ مِنْ ذَلِكَ وَلَا أَكْبَرُ إِلَّا فِي كِتَابٍ مُّبِينٍ ﴿٣﴾

Artinya : Dan orang-orang yang kafir berkata, “Hari Kiamat itu tidak akan datang kepada kami.” Katakanlah, “Pasti datang, demi Tuhanku Yang mengetahui yang gaib, Kiamat itu pasti akan datang kepadamu. Tidak ada yang tersembunyi bagi-Nya sekalipun seberat zarah baik yang di langit maupun yang di bumi, yang lebih kecil dari itu atau yang lebih besar, semuanya (tertulis) dalam Kitab yang jelas (Lauh Mahfuz),” (QS. Saba’ [34]: 3)

Menurut tafsir Ilmi Kemenag (2015) menjelaskan bahwa Allah Swt telah membuat suatu bentuk kehidupan yang ukurannya sangat kecil yang dalam bahasa ilmiah disebut dengan mikroba (*Microbes*) atau mikroorganisme (*microorganism*). Makhluk mikroba dapat dikelompokkan ke dalam beberapa golongan diantaranya jamur (fungi). Khusus dari golongan jamur sendiri bisa

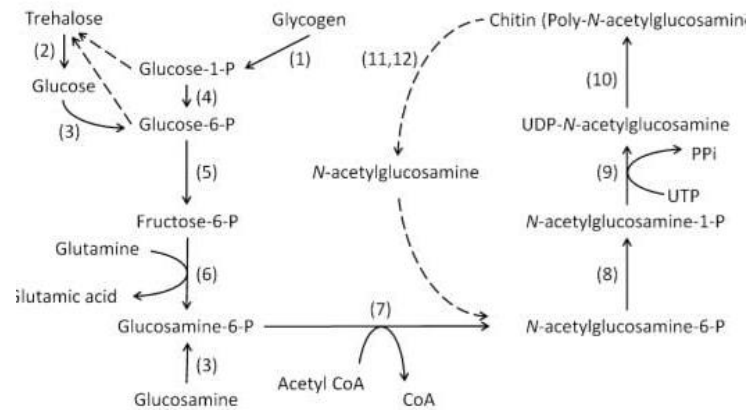
mendatangkan berbagai macam manfaat bagi manusia diantaranya sebagai obat seperti antibiotik dan bidang pangan seperti kombucha dan tempe. Salah satu spesies jamur yang sering kita jumpai serta memiliki manfaat adalah jamur *Rhizopus oryzae* yang sering digunakan pada pembuatan tempe. Selain itu, pengolahan lebih lanjut pada jamur ini dapat menghasilkan kitosan yang diekstraksi dari kitin penyusun dinding selnya yang memiliki berbagai macam manfaat.

2.2 Mekanisme Pembentukan Kitin

Kitin (β -(1 \rightarrow 4)-*N*-acetyl-*D*-glucosamine) menjadi biopolimer yang keberadaannya melimpah di alam seperti pada dinding sel jamur, ragi, kutikula serangga, dan cangkang krustasea (lobster, kepiting, udang). Biopolimer kitin disintesis oleh sejumlah besar organisme hidup serta tingkat produksi kitin setiap tahun meningkat karena tingkat pertumbuhan organisme. Kitin menjadi biopolimer paling melimpah di alam setelah selulosa. sifat yang dimiliki oleh kitin yaitu toksisitas yang cukup rendah dalam saluran pencernaan hewan serta dapat terurai di alam bebas secara hayati dengan menggunakan bantuan enzim kitinase yang dimiliki oleh makhluk hidup lain (Rinaudo, 2006). Keberadaan kitin di alam masih berasosiasi dengan mineral dan protein di dalam cangkang maupun dinding sel pada jamur. Oleh karena itu, untuk mendapatkan kitin yang murni perlu dilakukan proses demineralisasi dan deproteinasi. Kedua proses isolasi kitin tersebut bisa dilakukan dengan dua macam metode yaitu metode enzimatik dan metode kimiawi. Enzim protease dan fermentasi asam laktat digunakan di dalam metode enzimatik, sedangkan di dalam metode kimiawi digunakan senyawa asam dan basa (Afriani *et al.*, 2017).

Mekanisme pembentukan kitin pada dinding sel jamur diawali dengan glikogen diubah oleh glikogen fosforilase 1 menjadi glukosa-1-P, yang dimasukkan ke dalam glikolisis atau digunakan untuk sintesis trehalose. Trehalose pada gilirannya dapat dimobilisasi dengan hidrolisis menjadi glukosa yang dikatalisis oleh trehalase 2. Konversi glukosa menjadi fruktosa-6-P melibatkan heksokinase 3-EC, fosfoglukomutase 4-EC, dan glukosa-6-P isomerase 5-EC. Dari fruktosa-6-P jalur biosintesis kitin bercabang, dengan enzim pertama yang mengkatalisis cabang ini adalah glutamin-fruktosa-6-fosfat amidotransferase 6-GFAT, EC. Reaksi yang dikatalisis oleh GFAT mengubah fruktosa-6-P menjadi glukosamin-6-fosfat dengan mentransfer amonia dari ko-substrat-*glutamin* dan isomerisasi fruktosimin-6-fosfat yang dihasilkan (Merzendorfer, 2011).

Gugus asetil dari koenzim A ditambahkan *glucosamine-6 P* acetyltransferase 7-EC untuk mendapatkan *N-acetylglucosamine (GlcNAc)-6-P*, yang fosfatnya kemudian dipindahkan dari posisi C-6 ke C-1 yang dikatalisis oleh *phospho acetylglucosamine mutase* 8-EC. *GlcNAc-1-P* yang dihasilkan, akhirnya, diuridinilasi oleh *UDP-GlcNAc pyrophosphorylase* 9-EC menghasilkan *UDP-GlcNAc* yang berfungsi sebagai substrat untuk kitin sintase 10-CHS, glikosiltransferase membran-integral yang mentransfer bagian gula dari *UDP-GlcNAc* ke rantai kitin yang sedang tumbuh. Kitin terdegradasi oleh kitinase 11-EC dan *N-acetylglucosaminidase* 12-EC menghasilkan *GlcNAc* yang dapat digunakan kembali untuk biosintesis kitin (Merzendorfer, 2011).



Gambar 2.2. Jalur Biosintesis Kitin Jamur (Merzendorfer, 2011)

2.3 Apel Manalagi (*Malus sylvestris* Mill.)

2.3.1 Taksonomi Apel manalagi (*Malus sylvestris* Mill.)

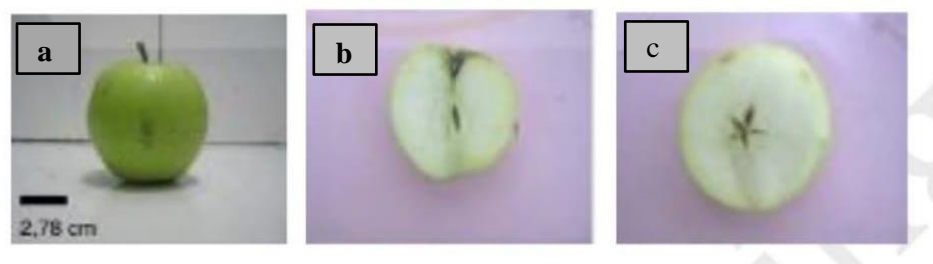
Kedudukan taksonomi apel manalagi (*Malus sylvestris* Mill.) menurut Pourdarbani *et al.*, (2020) adalah sebagai berikut:

Kingdom	: Plantae
Divisi	: Tracheophyta
Class	: Magnoliopsida
Ordo	: Rosales
Family	: Rosaceae
Genus	: Malus
Spesies	: <i>Malus sylvestris</i> Mill.

2.3.2 Karakteristik Apel Manalagi (*Malus sylvestris* Mill.)

Apel adalah tanaman buah tahunan yang berasal dari kawasan Asia Barat beriklim sub tropis. Apel dapat tumbuh di Indonesia setelah tanaman apel ini beradaptasi dengan iklim Indonesia, yaitu iklim tropis (Baskara, 2010). Apel menjadi buah dengan kandungan nilai gizi tinggi yang sangat diperlukan oleh tubuh manusia. Kandungan senyawa yang berada di dalam buah apel

diantaranya meliputi vitamin A, Vitamin C, gula (Karbohidrat), Asam tartarat, mineral dan sebagainya. Indonesia tepatnya di daerah Provinsi Jawa Timur Kabupaten Malang menjadi salah satu daerah sebagai pusat budidaya buah apel manalagi (*Malus sylvestris*). Daerah Kecamatan Poncokusumo menjadi sentral produksi buah apel manalagi karena memiliki ketinggian yang cukup ideal untuk dijadikan daerah budidaya yang berkisar diantara 680-1.700 mdpl. Daerah poncokusumo memang ideal untuk lahan perkebunan apel manalagi mengingat letaknya yang tinggi dengan suhu yang dingin berkisar 22°C, dan memiliki tanah dari material vulkanik yang subur dengan pH tanah antara 6-7 (selliatasari *et al.*, 2013).



Gambar 2.3. Buah apel manalagi, (a) buah apel utuh, (b) buah apel dipotong melintang, (c) Buah apel dipotong membujur (Setiyanto *et al.*, 2021)

secara umum buah apel (*Malus domestica*) memiliki karakteristik diantaranya buah berbentuk elipsoid sampai obovoid, buah apel tergolong ke dalam buah pome dengan bentuk hampir menyerupai bola yang menjorok pada bagian pangkal maupun ujungnya. Diameter buah apel biasanya lebih besar dari 5 cm dengan berat 200-350 gram. Setiap buah apel memiliki korteks daging yaitu bagian daging buah yang dapat dimakan, terletak di antara kulit dan garis inti buah. Inti pusat memiliki bagian berpembuluh (empulur) berdaging dengan kapsul tipis dari lima karpel yang menyatu. Setiap karpel

biasanya berisi dua biji. Bijinya halus, mengkilap, dan berwarna cokelat (Oced, 2018).

Salah satu ciri utama dari apel manalagi adalah memiliki bentuk yang kecil dan bulat. diameter buah apel manalagi berkisar di antara 4-7 cm dengan berat 75-160 per buahnya. Apel manalagi memiliki kulit yang berwarna hijau kekuningan dengan semburat merah sebesar 1,5-2%. Daging buah memiliki warna kuning keputihan dengan kadar airnya mencapai 84,05%. Bentuk bijinya bulat dengan ujung tumpul berwarna cokelat tua. Apel manalagi memiliki rasa yang manis dan aroma yang harum segar. seiring dengan tingkat kematangan buah apel, membuat kandungan gula dalam buah apel manalagi bertambah (Putri *et al.*, 2020).

2.3.3 Karakteristik dan Kandungan Limbah Apel

Buah apel manalagi dalam proses budidayanya rentan terhadap beberapa patogen yang dapat menyebabkan terjadinya proses pembusukan pada buah. Terdapat beberapa jamur patogen yang memiliki peran dalam proses pembusukan buah yaitu *gloeosporium* sp., *Penicillium*, *botrytis*, *monilinia*. Selain dari jamur di atas genus *alternaria*, *colletotrichum*, dan *fusarium* dikenal sebagai patogen terpenting dari buah apel (Grahovac *et al.*, 2011). Secara umum, limbah apel manalagi merupakan bahan yang tidak stabil baik dari sisi fisika (perubahan sifat) maupun dengan stabilitas kimia seperti kandungan air yang relatif berubah tinggi sehingga rentan untuk digunakan sebagai tempat pertumbuhan mikroflora. Limbah buah apel dapat menimbulkan masalah untuk pabrik pengolahan buah apel karena merupakan bahan yang tidak dapat digunakan (Perusello *et al.*, 2017).

Limbah buah apel manalagi merupakan keadaan seluruh atau sebagian wilayah buah apel yang sudah tidak layak untuk dikonsumsi bahkan diolah. Hal ini dapat diidentifikasi dengan jelas melalui penampakan buah apel dimana pada permukaan buah yang telah busuk ditandai dengan tekstur buah yang lembek, berair, dan berwarna cokelat muda. Beberapa hari kemudian dari gejala tersebut secara umum timbul miselium jamur yang berwarna putih (Shabrina *et al.*, 2018). Penyusun limbah buah apel sama dengan penyusun dari buah apel segar yang terdiri dari kulit dan daging buah yang sekitar 95%, biji 2-4%, dan batang buah 1% (Perusello *et al.*, 2017). Limbah buah apel mengandung sedikit nutrisi diantaranya seperti, protein, mineral, pektin, serat makanan, polifenol, asam organik, dan vitamin (termasuk vitamin C) sehingga jamur menggunakan nutrisi tersebut untuk memenuhi kebutuhannya melalui aktivitas enzim (katalase biologi) yang disekresikan ke permukaan buah apel sehingga dapat mendegradasikan nutrisi yang terdapat di buah apel (Sopandi dan Wardah, 2020).



Gambar 2.4. Gejala penyakit buah apel busuk (Fauziah *et al.*, 2021)

Pembusukan yang terjadi pada buah apel dengan daerah pembusukan hanya sebagian atau sedikit maka buah tersebut masih dapat dimanfaatkan. Proses pemanfaatan limbah apel manalagi ini dapat dilakukan dengan cara menyingkirkan bagian busuk buah apel dan hanya memanfaatkan bagian buah yang masih segar. Menurut Sa'adah dan Estiasi (2015) bahwa nilai gizi buah apel

manalagi per 100 gram ditunjukkan pada tabel 2.1 berikut:

Tabel 2.2 Komposisi kandungan buah apel manalagi per 100 gram

No.	Kandungan gizi	Jumlah
1.	Total gula	8.29 gr
2.	Kadar asam	0.32 gr
3.	Glukosa	3.72 gr
4.	Fruktosa	4.5 gr
5.	Sukrosa	4.54 gr
6.	Gula/asam	42.56 gr
7.	Ph	4.62
8.	Vitamin C	6.60 mg
9.	Gula pereduksi	6.96 gr
10.	Antioksidan	6.53 gr
11.	Total padatan terlarut	17.10 Brix
12.	Protein	0,26 gr
13.	Lemak	0,17 gr
14.	Kalsium	6 mg
15.	Fosfor	11 mg

Komposisi kimia pada bagian limbah apel manalagi yang masih segar kaya akan nutrisi sehingga dapat digunakan untuk substrat perkembangan mikroorganisme, mengingat kandungan gula total yang tinggi. Melalui cara memanfaatkan limbah buah apel manalagi busuk dalam proses bioteknologi menawarkan alternatif yang menarik untuk media komersial yang digunakan dalam mendapatkan kitosan (Streit *et al.*, 2009). Ekstrak air limbah apel merupakan media yang baik untuk perkembangan mikroorganisme, mengingat kandungan gula atau karbon yang berada di dalamnya.

Pemanfaatan ekstrak limbah apel manalagi secara tersirat di jelaskan di dalam Q.S al-Baqarah (2) : 195 ;

وَأَنْفِقُوا فِي سَبِيلِ اللَّهِ وَلَا تُلْقُوا بِأَيْدِيكُمْ إِلَى التَّهْلُكَةِ وَأَحْسِنُوا إِنَّ اللَّهَ يُحِبُّ الْمُحْسِنِينَ ﴿١٩٥﴾

Artinya: Dan infakkanlah (hartamu) di jalan Allah, dan janganlah kamu jatuhkan (diri sendiri) ke dalam kebinasaan dengan tangan sendiri, dan berbuatbaiklah. Sungguh, Allah menyukai orang-orang yang berbuat baik. (QS. al-Baqarah [2]: 195).

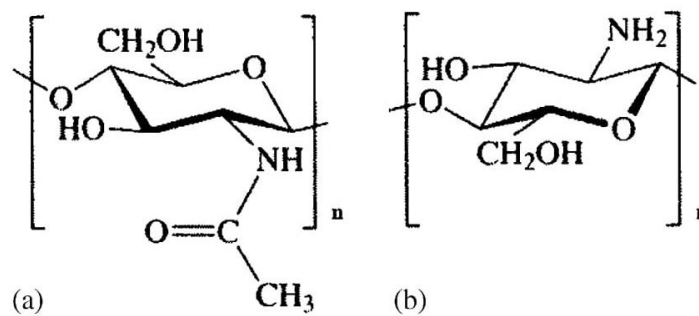
Ayat ini menunjukkan prinsip tidak merusak dan tidak menyebabkan kerugian. menurut tafsir al Jalalain (2010) bahwa terdapatnya larangan untuk membuang harta dan kekayaan melalui tangan manusia, serta melarang manusia menjadi penyebab atas kerugiannya sendiri dan orang lain melalui tangannya sehingga menganjurkan kepada manusia untuk menerapkan prinsip-prinsip kebijaksanaan keadilan, dan pemeliharaan sumber daya alam. Meskipun tidak secara langsung terkait dengan pemanfaatan buah busuk, prinsip ini dapat diterapkan dalam pemahaman bahwa kita sebaiknya tidak membuang atau memubazirkan sumber daya alam atau barang-barang yang masih bisa dapat dimanfaatkan, termasuk buah yang mungkin mengalami kebusukan atau kerusakan sebagian. Dalam Islam, ditekankan untuk tidak menyia-nyiakan dan merusak sumber daya, sehingga ayat ini dapat diinterpretasikan sebagai tuntunan untuk memanfaatkan semaksimal mungkin sumber daya alam tanpa pemborosan.

Pemanfaatan limbah apel manalagi merupakan salah satu cara untuk mengimplementasikan makna dari Q.S al-Baqarah ayat 195 dimana umumnya limbah buah apel manalagi sudah dianggap sebagai limbah atau sampah yang tidak dapat diolah kembali padahal penelitian terkini telah membuktikan bahwa di dalam limbah apel manalagi masih terdapat beberapa kandungan senyawa berharga salah satunya adalah sumber karbon. Pemanfaatan limbah apel manalagi dengan menggunakan bagian buah yang masih segar kemudian diambil ekstraknya dapat digunakan sebagai media untuk pertumbuhan jamur *Rhizopus oryzae* yang merupakan jamur penghasil kitin untuk memproduksi kitosan.

2.4 Kitosan

Kitosan merupakan sebuah nama yang diberikan kepada sekelompok polimer yang dideasetilasi pada kitin. Perbedaan kitin dan kitosan terletak pada derajat deasetilasinya. Kitosan yang larut dalam air, larut tanpa adanya asam sering dibutuhkan karena asam merupakan zat yang tidak diinginkan dalam pembuatan produk seperti kosmetik, obat-obatan, dan makanan. Kitosan menjadi agen koagulasi dan flokulan yang sangat baik karena kepadatan gugus amino yang sangat tinggi pada rantai polimernya sehingga dapat dengan mudah berinteraksi dengan zat bermuatan negatif seperti protein, padatan, serta pewarna (Li *et al.*, 2020).

Kitosan sebagai turunan kitin memiliki berbagai banyak manfaat pada berbagai bidang diantaranya kitosan digunakan sebagai bahan gizi (bahan tambahan makanan, makanan fungsional, agen antimikroba, dan antioksidan (pelindung makanan), untuk pelapis antimikroba makanan seperti buah dan sayur. Potensi kitosan dalam industri minuman dalam memproduksi minuman anggur dapat digunakan untuk menjernihkan, deasidifikasi, stabilisasi, serta mengeliminasi zat dan enzim yang tidak diinginkan pada minuman. Aplikasi kitosan pada bidang farmasi dapat digunakan sebagai sistem penghantar obat yang dibuat dalam bentuk larutan, gel, tablet, kapsul, serat, film, dan spons. Akibatnya kitosan dapat digunakan dalam obat dengan cara oral, okular, hidung, parental, intravesikal, dan transdermal. Selain itu, kitosan dapat digunakan sebagai implan untuk pengiriman obat baik secara implan maupun injeksi (Morin *et al.*, 2019).



Gambar 2.5. Struktur kimia, (a) struktur kitin (*N-acetyl-D-glucosamine*), (b) struktur kitosan (*D-Glucosamine*) (Rinaudo, 2006)

2.5 Proses Pembuatan Kitosan

Kitin ditemukan berasosiasi dengan biopolimer lain dalam organisme yang berbeda. Misalnya pada serangga dan invertebrata kitin secara kovalen atau tidak berasosiasi dengan protein tertentu. Kitin dari organisme laut seperti krustasea ditemukan berasosiasi dengan mineral terutama garam karbonat anorganik, kompleks kitin-protein, dan juga mengandung karotenoid (terutama astaxanthin) dan lipid. Kitin pada jamur terikat secara kovalen baik secara langsung atau tidak langsung melalui jembatan peptida ke glukukan pada dinding sel. Berdasarkan variasi asosiasi kitin dengan biopolimer lain yang berbeda-beda maka teknik ekstraksi yang berbeda perlu untuk dilakukan. Misalnya, kitin serangga dan krustasea membentuk bagian dari eksoskeleton sementara pada jamur kitin membuat senyawa fleksibel kompleks di dinding sel yang secara kovalen terkait dengan glukukan (Pellis *et al.*, 2022).

Jumlah komponen kitin krustasea berasosiasi dengan protein, lipid, mineral, pigmen, kelimpahannya bervariasi. Umumnya, cangkang krustasea mengandung kitin 20-30%, protein 30-40%, lipid 0-14%, mineral 30-50%. Persentase ini bervariasi tergantung pada sumber, atau bahkan spesies, dari mana kitin diisolasi. Berbeda dengan krustasea, serangga umumnya mengandung 30-

60% protein, 10-25% lipid, 5-25% kitin, 5-15% pigmen dan 2-10% mineral. Dinding sel jamur adalah struktur kompleks fleksibel yang tersusun terutama 2-44% terdiri dari kitin dan secara kimia terhubung melalui α - dan β - dengan glukukan (80-90%), 3-20% glikoprotein, dan sebagian kecil terdiri dari lipid, pigmen, dan garam anorganik (Pellis *et al.*, 2022).

Proses ekstraksi kitin jamur yang bertujuan untuk demineralisasi dan deproteinasi dapat menggunakan beberapa jenis cara diantaranya melalui proses kimiawi melalui penambahan senyawa alkali tinggi yaitu NaOH yang bertujuan untuk mendegradasi dinding sel serta menghilangkan protein, lipid, dan karbohidrat larut, serta senyawa alkali lainnya yang masih menempel pada kitin. Untuk bahan biopolimer sisa yang tidak larut dengan NaOH maka perlu dilakukan penambahan senyawa asam asetat untuk menghilangkan bahan larut asam yang menempel pada kitin. Bahan larut asam yang telah murni kitosan kemudian dibilas kembali menggunakan NaOH diikuti dengan proses sentrifugasi dan pencucian dengan menggunakan etanol dan aseton. Perlu diperhatikan bahwa konsentrasi alkali serta asam yang cukup tinggi dapat menyebabkan oksidasi kitosan. Tahapan selanjutnya yang mungkin diperlukan untuk beberapa spesies jamur adalah proses penghilangan warna atau pemutihan untuk menghilangkan pigmen yang alami dari jamur. Cara yang dapat dilakukan dengan cara penambahan aseton dan natrium hipoklorit (Pellis *et al.*, 2022).

Selain teknik ekstraksi kitin yang berbasis bahan kimia (kimiawi), teknologi fermentasi (enzimatis) mikroba atau bakteri sebagai agen penghasil asam laktat yang diproduksi secara biologis dapat menjadi cara yang lebih efisien dalam menghasilkan kitosan yang berkualitas tinggi. Proses ekstraksi kitin secara

enzimatis menggunakan bantuan dari beberapa spesies bakteri *Lactobacillus* misalnya *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus plantarum*, dan *Lactobacillus helveticus* untuk menghasilkan asam organik. Asam organik dinilai lebih baik serta efisien dalam proses demineralisasi. Proses deproteinasi enzimatis menggunakan enzim protease yang dihasilkan mikroorganisme. Persentase keberhasilan deproteinasi dan demineralisasi melalui cara enzimatis yaitu 95,3% dan 99,6% (Pellis *et al.*, 2022).

2.5.1 Fermentasi Cair (*Submerged Fermentation*)

Fermentasi substrat cair merupakan metode fermentasi yang terjadi pada medium yang berbentuk cair. Cara ini mengambil oksigen untuk kehidupan mikroorganisme yang digunakan untuk fermentasi. Mikroorganisme aerob tumbuh di bagian atas, sedangkan mikroorganisme anaerob tumbuh di bagian dasar, mikroorganisme fakultatif tumbuh di semua bagian tabung fermentasi. Bahan cair yang digunakan antara lain adalah tahan sterilisasi menggunakan panas dan tidak boleh mengandung zat yang berbahaya bagi mikroorganisme dan konsumen yang akan menggunakan. Pada umumnya fermentasi dilakukan menggunakan substrat cair ini, sistemnya ada empat macam, yaitu:

1. Batch sederhana. Pada fermentasi ini, substrat cair dan inokulum dimasukkan di awal proses dan fermentasi dilakukan dalam waktu tertentu. Contoh dari fermentasi ini adalah produksi asam cuka.
2. Fed batch. Pada jenis fermentasi ini, inokulum dimasukkan dan sebagian substrat yaitu $\pm 10\%$ dari volume fermentor dimasukkan ke dalam fermentor. Sisa substrat yang $\pm 90\%$ dari volume fermentor dimasukkan secara bertahap.

3. Semi batch. Fermentasi semi batch dilaksanakan seperti fermentasi fed batch, tetapi pada waktu panen, yang diambil hanya 90% substrat, kemudian ditambahkan 10% substrat baru.
4. Kontinyu. Pada fermentasi jenis kontinyu, substrat ditambahkan ke dalam fermentor secara kontinyu dan hasil panen dikeluarkan secara kontinyu pula (Wignyanto dan Hidayat, 2017).

2.6 Sifat Fisikokimia Kitosan

2.6.1 Struktur Kristal Kitosan

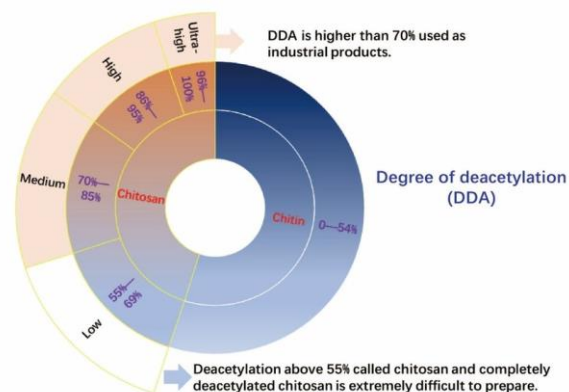
Kitosan tersedia dalam keadaan padat dimana molekul kitosan umumnya tersusun dalam kristalit dengan bentuk sangat teratur yang terkandung dalam daerah amorf yang cukup besar. Terdapat dua amorf kristal kitosan utama salah satunya disebut polimorf atau tendon kitosan. Polimorf merupakan bentuk terhidrasi dan paling umum. Bentuk kedua yaitu Polimorf anil adalah bentuk kristal anhidrat. Dalam kedua polimorf, sel kristal dibentuk oleh dua molekul kitosan antiparalel dengan konformasi heliks ganda yang distabilkan oleh ikatan hidrogen. Perbedaan di antara polimorf muncul dari adanya molekul air di antara sel kristal yang menstabilkan struktur dengan ikatan hidrogen ganda. Melalui perlakuan pemanasan, dimungkinkan untuk mengubah bentuk polimorf atau tendon menjadi bentuk polimorf anil akan tetapi polimorf anil tidak dapat diubah ke bentuk polimorf.

2.6.2 Derajat Deasetilasi (DD)

Persen derajat deasetilasi dapat digunakan sebagai parameter dalam mengetahui kualitas kitosan. Proses deasetilasi melibatkan penghilangan gugus asetil (COCH_3) dari rantai molekul kitin, menyisakan gugus amina (NH_2) yang

memiliki reaktivitas tinggi. Derajat deasetilasi merupakan parameter penting dalam memproduksi kitosan karena dapat mempengaruhi sifat fisiknya sehingga dapat ditentukan aplikasi yang tepat bagi produk akhir kitosan. Semakin tinggi derajat deasetilasi kitosan, maka gugus asetil kitosan semakin rendah. Nilai derajat deasetilasi menentukan sebagian besar sifat kitosan termasuk kelarutan, kerentanan terhadap biodegradasi, bioaktivitas, dan biokompatibilitas. Derajat deasetilasi dapat ditentukan dengan mencatat puncak tertinggi dan mengukur pita dasar yang dipilih pada spektrum IR dengan metode baseline (garis dasar) pada pengujian FTIR. Jika derajat deasetilasi berada pada nilai $<60\%$, maka polimer tersebut dinamakan kitin dan apabila derajat deasetilasi berada pada nilai $>60\%$, maka polimer disebut kitosan. Pada proses deasetilasi terjadi pemutusan ikatan antara gugus asetil kitin dengan atom nitrogen kitin sehingga berubah menjadi gugus amina (NH_2) (Ritonga dan Khuzaimah, 2022).

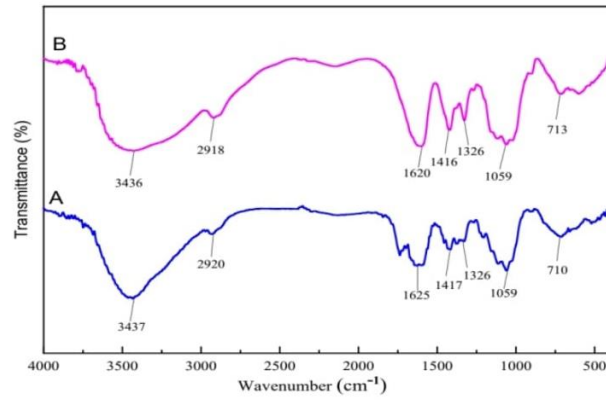
Derajat N-deasetilasi merupakan dasar penentuan kelarutan kitosan. Kerapatan muatan pada rantai kitosan dapat meningkat seiring dengan meningkatnya nilai DD (Derajat Deasetilasi). Meningkatnya nilai derajat deasetilasi pada molekul kitosan disebabkan karena gugus NH_2 pada molekul kitosan terprotonasi membentuk ion NH_3^+ setelah pemberian asam dan basa yang kuat. Semakin tinggi derajat deasetilasi, semakin banyak gugus amina bebas pada rantai molekul. Tingginya nilai DD juga mempengaruhi tingkat fleksibilitas kitosan akibatnya pada kitosan dengan nilai DD yang tinggi membentuk struktur spiral acak pada rantai dan ikatan hidrogen yang lebih intramolekul (Li *et al.*, 2020).



Gambar 2.6. Klasifikasi nilai derajat deasetilasi kitosan secara umum
(Li *et al.*, 2020)

2.7 FTIR (Fourier Transform Infra-Red)

FTIR (*Fourier Transform Infra-Red*) merupakan salah satu metode yang dapat digunakan dalam menganalisa nilai derajat deasetilasi kitosan yang telah dihasilkan. Gugus fungsi yang terkandung dalam kitosan harus dianalisis menggunakan uji FTIR. Spektroskopi FTIR adalah salah satu alat yang digunakan dalam studi untuk menganalisis gugus fungsi yang terkandung dalam suatu senyawa. FTIR merupakan metode yang menggunakan spektroskopi inframerah. kitosan yang telah dibuat dianalisis menggunakan FTIR guna untuk mengetahui gugus fungsi baik secara fisika maupun kimia pada pembuatan kitosan. Derajat Deasetilasi kitin sebagai persentase pada jumlah rata-rata unit D-glukosamin per 100 monomer dari kitosan. (Hasan *et al.*, 2022). Kelebihan mengukur derajat deasetilasi dengan metode garis dasar spektroskopi IR (FTIR) yaitu relatif lebih cepat dibanding metode lainnya, bahan yang digunakan tidak perlu terlalu murni, tingkat ketelitian hasil spektrometer tinggi dengan kisaran derajat deasetilasi yang luas dibandingkan dengan teknik titrimetri dan metode spektroskopi lainnya (Sari, 2020).



Gambar 2.7. Pembentukan pita sesuai dengan spektrum FTIR. (A) Kitosan diestraksi dengan nilai DD = 75,44%; (B) kitosan komersial dengan DD (70,20%) (Kusnadi, 2021)

BAB III METODE PENELITIAN

3.1 Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian kali ini bersifat penelitian eksperimental RAL (Rancangan Acak Lengkap). Penelitian ini bersifat RAL bertujuan untuk mengetahui pengaruh substrat ekstrak limbah apel manalagi (*Malus sylvestris* Mill.) terhadap produksi biomassa kering kitosan serta karakteristik sifat kitosan berdasarkan nilai derajat deasetilasi dengan menggunakan metode fermentasi cair sebagai substrat pertumbuhan jamur. Ekstraksi kitosan dilakukan pada isolat jamur *Rhizopus oryzae* yang ditumbuhkan pada media PDA (*Potato Dextrose Agar*) kemudian ditumbuhkan kembali pada media sumber karbon apel manalagi (*Malus sylvestris* Mill.) dengan variasi konsentrasi 0% (kontrol), 60%, 80% dan 100%. Masing-masing perlakuan dilakukan dengan tiga kali ulangan. Hasil yang didapatkan selanjutnya dilakukan karakterisasi berdasarkan analisis nilai derajat deasetilasi menggunakan FTIR (*Fourier Transform Infra-Red*).

3.2 Waktu dan Tempat

Penelitian dilakukan pada bulan Juni-September yang bertempat di Laboratorium Mikrobiologi Program Studi Biologi Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang. Pengambilan limbah buah apel manalagi dilakukan pada Toko Buah Fresh Fruit Lowokwaru. Uji karakterisasi derajat deasetilasi kitosan menggunakan alat FTIR (*Fourier Transform Infra-Red*) dilakukan di Laboratorium Farmasi Universitas Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang.

3.3 Alat dan Bahan

3.3.1 Alat

Alat yang digunakan pada penelitian ini antara lain autoklaf, inkubator, oven, ayakan, nampan, mortar dan alu, timbangan analitik (Sartorius), *Laminar Air Flow* (LAF), FTIR (*Fourier Transform Infra-Red*), hotplate, inkubator shaker, haemocytometer, mikroskop, sentrifuge, beaker glass (Iwaki) 500 ml, erlenmeyer (Iwaki) 250 ml, gelas ukur (Iwaki) 10 ml dan 100 ml, pipet tetes, tabung eppendorf, mikropipet, cawan petri, magnetic stirrer, kertas saring (Whatman No.4), kapas, kasa, aluminium foil, plastik wrap, tabung reaksi, rak tabung reaksi, bunsen, korek, jarum ose, object glass, cover glass, blue tip.

3.3.2 Bahan

Bahan yang digunakan pada penelitian ini antara lain isolat jamur *Rhizopus oryzae*, limbah buah apel manalagi, media PDA (*Potato Dextrose Agar*), media PDB (*Potato Dextrose Broth*), kloramfenikol, larutan tween 80%, etanol, asam asetat, aseton, magnesium sulfat heptahidrat ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$), Dipotassium fosfat (K_2HPO_4), Monopotassium fosfat (KH_2PO_4), Amonium nitrat, larutan KOH, aquades steril.

3.4 Prosedur Penelitian

3.4.1 Sterilisasi Alat dan Bahan

Alat dan bahan yang akan digunakan pada penelitian ini terlebih dahulu disterilisasi. Keseluruhan alat berbahan kaca dicuci, dikeringkan dan masing-masing dibungkus rapi dengan kertas kemudian dimasukkan ke dalam plastik dan diikat. Bahan atau media diletakkan ke dalam tabung erlenmeyer dan ditutup rapat dengan kapas atau aluminium foil, serta dimasukkan ke dalam plastik lalu diikat.

Selanjutnya digunakan autoklaf untuk proses sterilisasi pada suhu 121 °C dalam waktu 15-30 menit (Abdassah *et al.*, 2015).

3.4.2 Pembuatan Media

3.4.2.1 *Potato Dextrose Agar (PDA)*

Pembuatan media PDA (*Potato Dextrose Agar*) dilakukan dengan cara dilarutkan 39 gram media PDA instan ke dalam 1000 ml aquades di dalam tabung erlenmeyer kemudian dihomogenkan dengan magnetic stirer di atas hotplate. Suhu larutan media didinginkan hingga mencapai suhu berkisar 36-37 °C. Tabung erlenmeyer ditutup rapat kemudian autoklaf digunakan untuk proses sterilisasi media pada suhu 121 °C selama 15 menit dengan tekanan 2 atm (Aulia dan Handayani, 2022). Proses sterilisasi selesai, kemudian ditambahkan kloramfenikol 20 ml ke dalam larutan media lalu dihomogenkan. Media PDA yang telah homogen lalu dituangkan ke dalam cawan petri secara aseptis di dalam LAF (*Laminar Air Flow*) dan dibiarkan hingga memadat (Rianto, 2018).

3.4.2.2 *Potato Dextrose Broth (PDB)*

Pembuatan media PDB dilakukan dengan cara dilarutkan 26,5 gram media PDB (*Potato Dextrose Broth*) instan ke dalam 1000 ml aquades steril. Dilakukan proses sterilisasi media PDB dengan cara media dimasukkan ke dalam alat autoklaf, lalu alat autoklaf digunakan selama 15 menit pada suhu 121°C dengan tekanan 2 atm (Suleman dan Arna, 2022).

3.4.3 Peremajaan Isolat jamur *Rhizopus oryzae*

Media PDA yang sebelumnya ditambahkan kloramfenikol sebagai anti bakteri digunakan untuk proses peremajaan Isolat jamur *Rhizopus oryzae*. Diambil isolat jamur pada botol isolat dengan jarum ose ukuran 0.5-1 cm. Isolat jamur

dipindahkan dan diletakkan pada cawan petri yang berisi media PDA masih baru dan diinkubasi pada suhu ruang selama 7 hari (Nurjasmi dan Suryani, 2020).

3.4.4 Pembuatan Suspensi Spora *Rhizopus oryzae*

koloni jamur *Rhizopus oryzae* yang telah berumur 7 hari di dalam cawan petri berisi media PDA selanjutnya dibuat larutan suspensi sporanya. Pembuatan larutan suspensi spora dilakukan dengan cara diberikan larutan tween 80% sebanyak 2 tetes pada permukaan koloni jamur yang bertujuan untuk membantu proses perontokan konidia. Miselium jamur kemudian ditambahkan 10 ml larutan aquades hingga permukaan koloni jamur terbanjiri. Kuas digunakan untuk proses pelepasan spora dengan cara digerus secara perlahan hingga spora tercabut dari permukaan media. Spora yang telah tercabut selanjutnya dipindahkan ke dalam tabung reaksi kemudian dikocok dengan vortex selama 1-3 menit hingga suspensi spora menjadi homogen (Hardiansyah *et al.*, 2023).

3.4.5 Penghitungan Jumlah Spora

Dihomogenkan larutan spora dengan cara divortex selama 1-3 menit. Suspensi spora yang telah homogen selanjutnya diambil sebanyak 0,1 ml atau 100 μ l, dimasukkan ke dalam haemocytometer (Mujim, 2010). Penggunaan haemocytometer terlebih dahulu dilakukan dengan cara dibersihkan permukaan haemocytometer dengan alkohol kemudian dikeringkan dengan cara dilap secara perlahan. diletakkan haemocytometer serta kaca penutupnya di bawah mikroskop lalu ditetaskan suspensi spora sebanyak 100 μ l ke dalam haemocytometer. Haemocytometer diamati pada mikroskop dengan perbesaran 40x . Jumlah spora yang didapatkan yang terdapat di dalam kotak kecil yang berada posisi tengah dihitung. Penggunaan kotak kecil sebagai perhitungan jumlah spora hanya

digunakan 5 perwakilan dari kotak kecil yaitu pojok kiri atas, pojok kanan atas, pojok kiri bawah, pojok kanan bawah dan tengah. Seluruh spora yang berada di dalam 5 perwakilan kotak kecil kemudian dihitung jumlahnya (Utami *et al.*, 2018). Menurut Fuentes (2023) Jumlah spora yang didapatkan dihitung dengan rumus sebagai berikut :

jumlah sel tiap petak x 1000 x pengenceran x luas petak x kedalaman petak

3.4.6 Preparasi substrat dan fermentasi

3.4.6.1 Substrat cair

Persiapan substrat untuk fermentasi cair dilakukan dengan metode soxhletasi. Terlebih dahulu bagian busuk dari buah apel manalagi dipotong dari bagian apel yang masih segar selanjutnya dicuci hingga bersih lalu dipotong kecil-kecil. Nutrisi terlarut dari limbah apel manalagi didapatkan dengan cara diekstraksi sebanyak 1 kg limbah apel manalagi direbus di dalam 2 liter aquades steril pada 100°C selama 30 menit. Ekstrak limbah apel disaring dan disimpan pada suhu 4°C (Habibi *et al.*, 2021).

3.4.6.2 Fermentasi Cair

Fermentasi cair dilakukan sesuai dengan metode Habibi *et al.*, (2021) yaitu diinokulasikan konsentrasi spora yang sama pada setiap perlakuan yaitu sebanyak 2 ml suspensi spora *Rhizopus oryzae*. Terdapat beberapa perlakuan yang digunakan untuk diketahuinya pengaruh ekstrak limbah apel manalagi sebagai sumber karbon terhadap pertumbuhan jamur *Rhizopus oryzae* dengan digunakan variasi konsentrasi 60%, 80%, dan 100% yang sebelumnya telah dihitung pada rumus sebagai berikut:

$$Volume (ml) = konsentrasi (\%) \times 100$$

Pembuatan larutan mineral dan nitrogen terdiri dari 0,1 gr $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1 gr K_2HPO_4 , 1 gr KH_2PO_4 dan 3 gr NH_4NO_3 dilarutkan kedalam 500 ml aquades. Total perlakuan yang digunakan sebanyak 4 perlakuan dengan penggunaan media PDB (*Potato Dextrose Broth*) sebagai kontrol. Setiap perlakuan dilakukan sebanyak 3 kali ulangan. Setiap labu erlenmeyer diinkubasi dalam shaker incubator kecepatan 120 rpm pada suhu 30°C selama 72 jam (Hazaa *et al.*, 2013). Massa sel miselium yang diperoleh dipisahkan dengan filter vakum kertas saring Whatman No.1. Miselium dikeringkan dalam oven pada suhu $50\text{-}55^\circ\text{C}$ sampai kering serta aluminium foil digunakan sebagai alas. Menurut (Habibi *et al.*, 2021) berat kering biomassa miselium dihitung dengan rumus sebagai berikut:

$$\text{biomassa (g/l)} = \text{berat kering biomassa} - \text{berat aluminium foil}$$

3.4.7 Ekstraksi kitosan

Proses ekstraksi kitosan dilakukan dengan metode Habibi *et al.*, (2021) yaitu setelah jamur ditumbuhkan pada media fermentasi, miselia jamur yang telah kering dihaluskan dengan cara ditumbuk dengan alu dan mortar lalu ditimbang biomassa kitin yang di dapatkan. Kitin dipindahkan ke tabung eppendorf steril lalu disuspensikan dengan larutan KOH 1N perbandingan 1:30 (1 gr sampel kitin disuspensikan di dengan 30 ml KOH 1N). Tahap selanjutnya kitin diaduk secara kuat selama 15 menit dengan vortex agar larutan KOH dan kitin tercampur merata. Proses selanjutnya sterilisasi dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 20 menit. Untuk mendapatkan fraksi yang tidak larut alkali, dilakukan sentrifugasi pada kecepatan 4500 rpm selama 25 menit dan dicuci dengan aquades untuk didapatkan pH yang netral (pH 7).

Kitin dikeringkan pada suhu 40°C hingga kering. Kitin yang kering kemudian ditambahkan larutan asam asetat dengan perbandingan 1:30 (1 gr sampel kitin disuspensikan dengan 30 ml asam asetat) kemudian dioven kembali pada suhu 95°C selama 6 jam. Dilakukan sentrifugasi kembali pada kecepatan 4500 rpm selama 25 menit untuk dihilangkan komponen asam yang tidak larut. Supernatan yang didapatkan dikondisikan pada pH 10-12 dengan ditambahkan larutan KOH 2N dengan perbandingan 1:15 (1 gr sampel disuspensikan di dalam dalam larutan 15 ml larutan KOH) dan disentrifugasi kembali pada 4500 rpm selama 20 menit. Supernatan yang didalamnya terkandung kitosan divortex untuk mendapatkan pelet. Pelet dicuci dengan aquades 30 ml, ethanol 16 ml dan aseton 6 ml hingga pH netral, dan dikeringkan pada suhu 40°C selama 8 jam sampai kering.

3.4.8 Karakterisasi Derajat Deasetilasi kitosan Dengan FTIR (*Fourier Transform Infra-Red*)

Pengamatan karakterisasi dengan cara digunakan alat FTIR untuk diamati nilai derajat deasetilasi. Pengamatan derajat deasetilasi sampel dilakukan dengan dihaluskan 2 mg sampel kemudian selanjutnya ditambahkan 100 mg KBr untuk dijadikan pelet dengan pencetak vakum. Pelet yang didapatkan kemudian dikenai dengan sinar infra merah pada gelombang 4000-400 cm^{-1} . Selanjutnya penghilangan latar belakang absorpsi dengan metode cakram KBr dijadikan satu pada tiap pengukuran. Derajat deasetilasi kitin ditentukan dengan metode baseline. Metode ini berdasarkan perbandingan nilai absorbansi pita serapan dari spektrum inframerah pada bilangan gelombang 1655 cm^{-1} dan 3450 cm^{-1} . Absorbansi (A) dinyatakan sebagai persamaan berikut (Azhar *et al.*, 2010).

$$A = \text{Log} \frac{P_0}{p}$$

Keterangan:

P_0 = % Transmittan pada baseline (serapan minimum)

P = % Transmittan pada serapan maksimum

Derajat Deasetilasi (DD) dapat dihitung dengan metode baseline yang dapat dilihat pada Persamaan berikut (Warda *et al.*, 2022).

$$\% DD = \left[100 - \left(\frac{A_{1665}}{A_{3450}} \right) \times \frac{100}{1,33} \right]$$

Keterangan:

DD = Derajat deasetilasi

A_{1655} = Nilai absorbansi pada 1655 cm⁻¹ (penyerapan pada gugus amida)

A_{3450} = Nilai absorbansi pada 3450 cm⁻¹ (penyerapan pada gugus hidroksil).

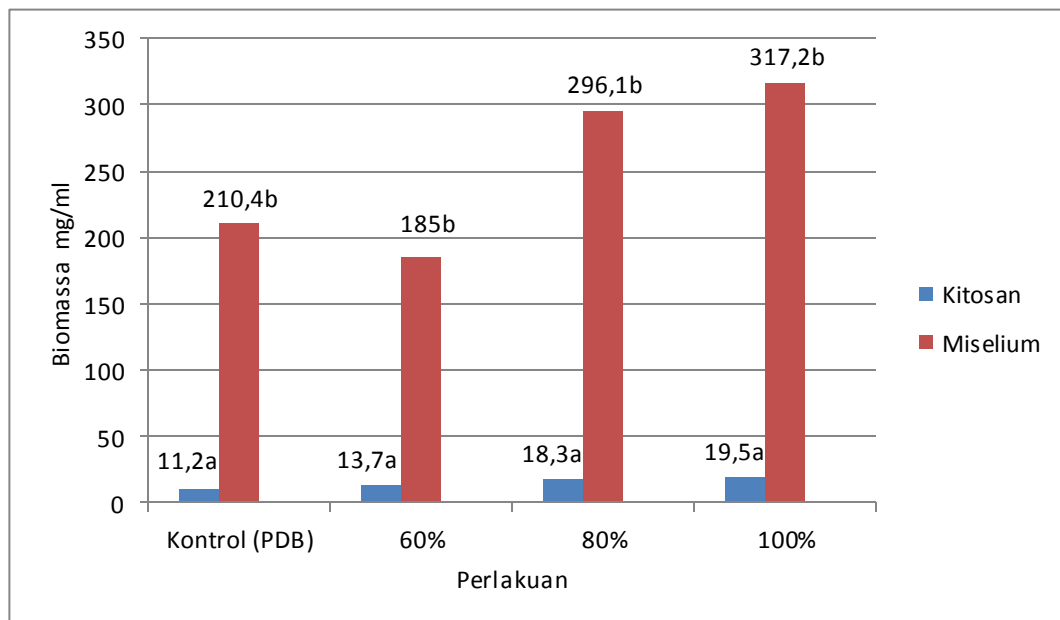
3.5 Analisis Data

Analisis data dilakukan secara deskriptif dan statistik. Analisis hasil data derajat deasetilasi (DD) yang disajikan dalam bentuk grafik dan deskripsi. Data dari hasil analisis pengaruh variasi konsentrasi substrat sumber karbon yang dihasilkan dari limbah apel manalagi terhadap produksi kitosan jamur *Rhizopus oryzae* serta dianalisis menggunakan statistika yaitu uji normalitas dan homogenitas, apabila terdapat perbedaan nyata, maka dilanjutkan dengan statistik parametrik One-Way ANOVA menggunakan software SPSS versi 25.0.

BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Pengaruh Penambahan Substrat Limbah Buah Apel Manalagi Terhadap Biomassa Miselium dan Kitosan *Rhizopus oryzae*

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan hasil biomassa kering produksi miselium dan kitosan jamur *Rhizopus oryzae* dengan menggunakan ekstrak dari limbah buah apel manalagi (*Malus sylvestris* Mill.) dapat dilihat pada gambar 4.1 bawah ini.



Gambar 4.1 Gambar pengaruh konsentrasi ekstrak limbah apel manalagi sebagai sumber karbon terhadap biomassa kering miselium dan kitosan *Rhizopus oryzae*. Angka yang diikuti huruf yang sama menunjukkan tidak adanya perbedaan yang nyata berdasarkan uji One-Way ANOVA, Sig > 0,05

Berdasarkan gambar 4.1 di atas bahwa hasil produksi miselium dari jamur *Rhizopus oryzae* menggunakan substrat ekstrak limbah apel manalagi dari keempat perlakuan menunjukkan bahwa produksi maksimum terkait berat kering biomassa miselium dihasilkan pada perlakuan dengan konsentrasi 100% yaitu

317,2 mg/ml dibandingkan dengan perlakuan kontrol media PDB (*Potato Dextrose Broth*) sebesar 210,4. Peningkatan perlakuan penggunaan jumlah sumber karbon limbah apel manalagi dari 60%, 80%, hingga 100% berbanding lurus dengan peningkatan biomassa miselium jamur hingga dapat melewati jumlah biomassa miselium yang ditumbuhkan dari media komersial yaitu PDB. Hal ini sesuai dengan penelitian yang telah dilakukan oleh Habibi *et al.*, (2021) bahwa peningkatan jumlah karbon ekstrak limbah apel menggunakan metode fermentasi cair selama 7 hari berbanding lurus dengan peningkatan hasil biomassa miselium dari jamur *Aspergillus terreus* yaitu perlakuan 20% (9,1 g/L), 40% (17 g/L), 60% (22 g/L), dan 80% (25,84 g/L). Menurut penelitian yang dilakukan oleh Amorim *et al.*, (2006) bahwa peningkatan penggunaan sumber karbon dari sari tebu yang jumlahnya terus meningkat sebanyak 20 gr, 40, gr, 60, gr, 80 gr, dan 100 gr serta menambahkan sumber nitrogen yaitu amonium sulfat ((NH₄)₂SO₄) sebanyak 0,5 gram dapat meningkatkan hasil biomassa miselium jamur *Syncephalastrum racemosum* yaitu 4 g, 4,3 g, 6 g, dan 6,9 g, dan 7,8 g.

Rendahnya hasil biomassa miselium pada perlakuan 60% dibandingkan dengan media PDB (*Potato Dextrose Broth*) disebabkan karena rendahnya jumlah sumber karbon yang digunakan pada perlakuan 60% sebanyak 60 ml sehingga kandungan karbon yang berada di dalam media pertumbuhan juga rendah. Sumber karbon berupa gula sederhana seperti glukosa yang memiliki peran untuk pertumbuhan jamur sebagai sumber energi untuk pembentukan sel. Komposisi media sangat berpengaruh terhadap pertumbuhan sel dan produksi enzim. Karbohidrat berfungsi sebagai sumber karbon sehingga dapat menambah nutrisi pada media tanam. Karbon merupakan unsur penting yang sangat dibutuhkan

jamur sebagai sumber energi dalam menjalankan aktivitas metabolismenya. Penambahan karbohidrat yang lebih banyak pada media tanam jamur dapat mempercepat munculnya tubuh buah dan menambah berat basah tubuh buah jamur (Budipraman, 2012). Peningkatan biomassa miselium jamur *Rhizopus oryzae* menggunakan substrat limbah apel manalagi yang melampaui jumlah miselium yang diproduksi menggunakan substrat PDB terjadi pada perlakuan 80% dan 100%.

Faktor yang mempengaruhi jumlah biomassa miselium jamur *Rhizopus oryzae* yang dihasilkan yaitu terdiri dari sumber karbon berupa ekstrak limbah apel manalagi dan sumber nitrogen (NH_4NO_3) yang berfungsi sebagai media pertumbuhan jamur *Rhizopus oryzae* dalam menghasilkan spora. Spora melakukan proses berkecambah ketika berada di substrat yang tepat salah satunya adalah limbah apel manalagi yang kaya akan sumber karbon. Proses perkecambahan spora menghasilkan hifa jamur yang terus melakukan percabangan hingga menghasilkan miselium vegetatif yang digunakan jamur untuk melakukan proses reproduksi sehingga menghasilkan spora baru. Spora baru yang tumbuh kemudian berkecambah lagi menjadi hifa dan melakukan percabangan menjadi miselium dan siklus ini terus dilakukan terus-menerus oleh jamur *Rhizopus oryzae* sehingga menghasilkan miselium jamur yang banyak. Hal ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Surbakti *et al.*, (2022) bahwa pertumbuhan jamur berasal dari spora yang memanfaatkan sumber karbon sebagai makanan untuk melakukan proses perkecambahan.

Meningkatnya jumlah miselium jamur akibat melimpahnya sumber karbon hal ini berdampak kepada jumlah biomassa kering kitosan yang juga mengalami

peningkatan yaitu untuk perlakuan kontrol PDB (11,2 mg/ml), 60% (13,7 mg/ml), 80% (18,3 mg/ml), dan 100% (19,5 mg/ml). Peningkatan jumlah sumber karbon berupa ekstrak limbah apel manalagi menghasilkan kitosan yang memiliki biomassa lebih unggul dibandingkan kitosan yang diproduksi menggunakan media kimia yaitu PDB sehingga media alternatif penggunaan ekstrak limbah apel manalagi dapat menggantikan media PDB dalam memproduksi kitosan. Hal ini sesuai dengan penelitian yang telah dilakukan oleh Cardoso *et al.*, (2012) bahwa peningkatan jumlah biomassa kering kitosan *Rhizopus arrhizus* berbanding lurus dengan peningkatan jumlah sumber karbon yang digunakan yaitu .limbah jagung (*corn steep liquor*). Penggunaan limbah jagung sebanyak 16 ml menghasilkan biomassa kitosan 19,80 mg kemudian mengalami peningkatan biomassa pada perlakuan penggunaan sumber karbon sebanyak 32 ml dengan menghasilkan biomassa 23,90 mg. Peningkatan jumlah biomassa kitosan *Cunninghamella bertholletia* sejalan dengan peningkatan penggunaan molase sebagai sumber karbon yang digunakan dengan penambahan sumber nitrogen yaitu ekstrak yeast sebanyak 15 mg. perlakuan penggunaan 70 mg sumber karbon menghasilkan berat kering kitosan sebanyak 28 mg lebih banyak dibandingkan dengan penggunaan 50 mg sumber karbon yang hanya menghasilkan 25 mg kitosan dan penggunaan 20 mg sumber karbon menghasilkan berat kering kitosan terendah yaitu 16 mg (Amorim *et al.*, 2006).

Jamur *Rhizopus oryzae* penghasil kitosan ditumbuhkan dengan cara menggunakan metode fermentasi cair (*Submerged Fermentation*). Metode fermentasi cair yang digunakan dalam menumbuhkan jamur *Rhizopus oryzae* yaitu dengan menggunakan media broth yang terdiri dari ekstrak limbah apel

manalagi dan cairan sumber nitrogen dengan takaran penggunaan sesuai konsentrasi yang telah ditetapkan sebelumnya. shaker digunakan sebagai alat dalam melakukan proses fermentasi cair. Pergerakan yang terjadi di dalam shaker bertujuan meningkatkan kondisi hidup jamur hal ini disebabkan karena pencampuran media secara homogen, distribusi nutrisi pada media lebih baik, peningkatan aerasi, Menurut Maftuchah *et al.*, (2015) bahwa interaksi aktivitas sel mikroba dengan senyawa yang terdapat di dalam media cair sering dilakukan menggunakan shaker. Shaker bertujuan sebagai alat penggoyangan media dalam kecepatan tertentu. Pembuatan kitosan melalui metode fermentasi cair menggunakan metode batch sederhana dengan cara memasukan substrat ekstrak limbah apel serta inokulum jamur di awal proses. Proses fermentasi hanya dilakukan dalam waktu 3 hari atau 72 jam (Wignyanto dan Hidayat, 2017). Pemilihan waktu untuk dilakukannya proses pertumbuhan jamur di dalam kondisi fermentasi cair selama 3 hari dikarenakan masa pertumbuhan jamur untuk memasuki fase eksponensial menuju fase stasioner berada pada hari ketiga setelah proses inokulasi (Chatterjee *et al.*, 2019).

Rendahnya biomassa kering kitosan yang dihasilkan dengan menggunakan media PDB (*Potato Dextrose broth*) sebagai kontrol disebabkan karena rendah kadar sumber nitrogen yang terdapat di dalam media PDB. rendahnya kadar nitrogen membuat jamur sedikit memproduksi enzim hidrolisis sehingga memperlambat proses penyerapan gula dari sumber karbon. Komposisi yang terdapat di dalam media PDB (*Potato Dextrose Broth*) diantaranya hanya terdiri dari 4 gr ekstrak kentang, 20 gr dextrose, dan pH 5,1 (Mac, 1985 dalam Acumedia 2011). Rendahnya kadar nitrogen di dalam media PDB Yang hanya didapatkan

dari ekstrak kentang mengakibatkan pertumbuhan miselium jamur serta pembentukan dinding sel jamur kurang optimal. Hal ini disebabkan karena kemampuan hifa jamur dalam memproduksi enzim hidrolisis belum cukup baik sehingga kemampuan jamur untuk menyerap sumber karbon belum optimal. Rendahnya hasil biomassa kitosan dengan penggunaan media PDB (*Potato Dextrose Broth*) dibandingkan dengan media alternatif telah dibuktikan oleh beberapa penelitian sebelumnya. Hal ini sesuai dengan penelitian yang telah dilakukan oleh Rashad dan Nooman (2008) bahwa biomassa kering kitosan jamur *Rhizopus oryzae* yang dihasilkan melalui metode fermentasi cair selama 14 hari dengan menggunakan media fermentasi okara (limbah kedelai) dengan penambahan larutan nitrogen yaitu 59,4 gr dan media fermentasi irisan ubi jalar dengan penambahan larutan nitrogen yaitu 17,6 gr lebih tinggi dari pada penggunaan media PDB (*Potato Dextrose Broth*) yang hanya menghasilkan 13,3 gr biomassa kering kitosan.

Peningkatan hasil biomassa kitosan dari perlakuan 60%, 80%, hingga 100% disebabkan karena kandungan karbon ekstrak limbah apel manalagi yang terdapat di dalam media meningkat jumlahnya. Meningkat jumlah karbon yang terdapat di dalam media pertumbuhan mengakibatkan produksi sintesis kitin juga meningkat. Selain meningkatnya jumlah karbon penggunaan sumber nitrogen anorganik berupa amonium nitrat (NH_4NO_3) juga ikut menunjang peningkatan pertumbuhan jamur *Rhizopus oryzae* dalam memproduksi kitin. Menurut penelitian yang telah dilakukan oleh Denardi *et al.*, (2018) bahwa mengenai nutrisi, hubungan manfaat antara sumber karbon dengan sumber nitrogen pada media pertumbuhan kisaran jumlah idealnya berada pada 4:1 hingga 10:1 selama

proses fermentasi oleh *Rhizopus oryzae*. Meningkatnya sumber karbon dengan diikutsertakan adanya pemberian sumber nitrogen akan berdampak pada peningkatan biomassa kitosan.

Hasil pemberian ekstrak limbah apel manalagi sebagai substrat pertumbuhan jamur *Rhizopus oryzae* sebagai sumber karbon untuk mendapatkan biomassa kering miselium dan kitosan didapatkan tidak adanya perbedaan nyata atau signifikan dari pemberian perlakuan yang diberikan. Hal ini didasarkan pada analisis menggunakan *software* SPSS versi 25.0 untuk mengetahui adanya perbedaan nyata antara perbedaan pemberian perlakuan 0% (kontrol), 60%, 80%, 100%. Berdasarkan hasil uji normalitas dan homogenitas didapatkan bahwa pemberian perlakuan 1 konsentrasi kontrol dan 3 konsentrasi ekstrak limbah apel manalagi yang berbeda sebagai substrat didapatkan masing-masing hasil uji $> 0,05\%$, sehingga proses analisa dilanjutkan dengan uji parametrik One-Way ANOVA menggunakan *software* spss 25.0. Hasil uji One-Way ANOVA menunjukkan bahwa nilai sebesar ,246 yang menunjukkan nilai $>0,05$ sehingga dapat dikatakan bahwa pemberian variasi konsentrasi ekstrak limbah apel manalagi tidak berpengaruh terhadap biomassa kering kitosan.

Tidak adanya pengaruh variasi konsentrasi ekstrak limbah apel manalagi terhadap jumlah biomassa kering kitosan *Rhizopus oryzae* dipengaruhi oleh beberapa faktor. Lama waktu proses fermentasi yang dilakukan untuk menghasilkan biomassa miselium dan kitosan yang dalam penelitian mempengaruhi hasil akhir dari biomassa miselium serta kitosan yang sedikit dari jamur *Rhizopus oryzae*. Proses fermentasi yang hanya dilakukan dalam penelitian kali ini hanya dilangsungkan dengan rentang waktu cukup singkat yaitu selama 3

hari saja sehingga menghasilkan biomassa miselium yang sedikit, akan tetapi Penggunaan waktu fermentasi selama 3 hari merupakan waktu yang paling bagus untuk pengujian terkait optimalisasi produksi kitosan hal ini disebabkan karena pada kurva pertumbuhan jamur *Rhizopus oryzae* pertumbuhan optimal atau fase eksponensial dan fase awal stasioner terjadi pada waktu 72 jam. Hal ini sesuai dengan penelitian Hazaa *et al.*, (2013) bahwa pertumbuhan optimal jamur *Rhizopus oryzae* untuk memasuki fase pertumbuhan akhir eksponensial menuju fase awal stasioner terjadi pada waktu 72 jam. Penurunan daya konsumsi karbon diduga karena terjadinya fase kematian pada jamur *Rhizopus oryzae*. Lama fermentasi 0 hingga 48 jam memiliki fase pertumbuhan dimana pada fase ini nilai residu karbon akan terus mengalami penurunan dikarenakan pada fase ini sel-sel akan terus memperbanyak diri dan enzim yang diperlukan untuk mendegradasi serta menyerap karbon untuk diubah menjadi asam amino semakin banyak namun pada lama fermentasi setelah 72 jam kedepan mengalami penurunan disebabkan jumlah sel semakin menurun dan akhirnya mati (Mahendra *et al.*, 2016).

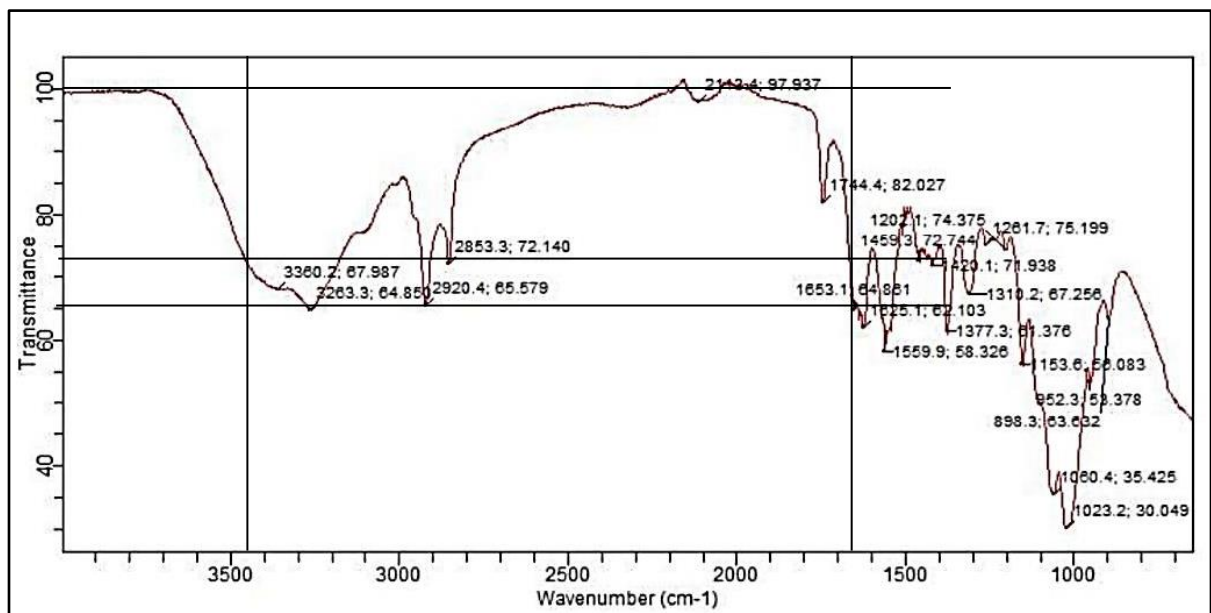
Produksi kitosan dengan penggunaan miselium jamur yang melewati masa eksponensial hingga fase kematian (autolisis sel) akan berdampak pada penurunan kualitas kitin yang dihasilkan dari miselium jamur *Rhizopus oryzae* yang nantinya juga akan berdampak pada kualitas kitosan yang dihasilkan. Dampak miselium jamur yang melalui masa stasioner yang cukup lama terkait produksi kitin serta biopolimer turunannya yaitu kitosan diantaranya dapat menyebabkan kualitas serta kemurnian kitin menjadi menurun, memerlukan efisiensi waktu yang cukup lama untuk mengekstraksi atau mengubah kitin menjadi kitosan, serta mempengaruhi sifat fisik dan kimia dari kitin yang

dihasilkan. Faktanya, jumlah biomassa kitosan yang dapat diekstraksi paling tinggi terdapat pada fase pertumbuhan eksponensial akhir khusus untuk jamur *Absidia coerulea*, *Rhizopus oryzae*, dan *Cunninghamella bertholletia* kemudian biomassa kitosan akan menurun secara signifikan setelah fase eksponensial (Amorim *et al.*, 2006) Menurut penelitian yang dilakukan oleh Tan *et al.*, (1996) bahwa molekul kitosan jumlahnya bebas melimpah selama fase eksponensial karena pertumbuhan dinding sel aktif, sedangkan pada fase stasioner kitin mengalami proses pengikatan yang cukup kuat pada komponen lain dinding sel jamur sehingga pada saat dilakukan proses ekstraksi kitin menjadi kitosan kurang optimal.

Faktor berikutnya yang mempengaruhi menurunnya tingkat produksi biomassa kitosan dari jamur *Rhizopus oryzae* yaitu jamur sering dilakukan proses isolasi. Isolasi merupakan suatu proses yang bertujuan untuk memisahkan mikroorganisme dari campurannya menjadi biakan murni dengan menggunakan sumber spora. Pengendalian produktivitas untuk mendapatkan kultur murni dilakukan melalui proses isolasi kultur yang dapat berdampak kepada penurunan produktivitas mengakibatkan hasil yang kurang optimal dalam hal produksi biomassa dan metabolit jamur yang diinginkan (Kusmiati *et al.*, 2022). Subkultur berulang sebanyak empat kali hingga lebih pada perlakuan tanpa pemurnian mengakibatkan penurunan viabilitas spora. Semakin banyak dilakukannya proses subkultur akan menurunkan viabilitas spora dari suatu spesies jamur karena energi yang tersimpan di dalam spora semakin rendah serta terjadinya penurunan energi disebabkan kandungan kitin dan protein rendah (Rachmawati, *et al.*, 2016).

4.2 Derajat Deasetilasi Kitosan jamur *Rhizopus oryzae*

Hasil penelitian terkait karakteristik kitosan yang diproduksi dari jamur *Rhizopus oryzae* menggunakan ekstrak limbah apel manalagi didasarkan pada analisa nilai derajat deasetilasi. Pengukuran nilai derajat deasetilasi kitosan yang kitosan diukur dengan menggunakan alat FTIR (*Fourier Transform Infrared Spectroscopy*). Hasil penelitian yang diperoleh dari proses analisis derajat deasetilasi kitosan *Rhizopus oryzae* yang ditumbuhkan dengan menggunakan ekstrak limbah buah apel manalagi dihitung berdasarkan persamaan oleh warda *et al.*, (2022) yaitu dengan membandingkan nilai absorbansi atau penyerapan pada panjang gelombang A_{1655} dan A_{3450} .



Gambar 4.2. Spektrum FTIR Derajat Deasetilasi Kitosan Jamur *Rhizopus oryzae*.

FTIR bertujuan untuk menganalisis karakter kitosan dengan cara mengidentifikasi gugus fungsional dalam struktur molekul kitosan. Kitosan adalah senyawa poli(-2-amino-2-deoksi-β-(1-4)-D-glukopiranos) dengan rumus molekul (C₆H₁₁NO₄). Mutu kitosan dipengaruhi oleh nilai derajat deasetilasi yang

merupakan salah satu karakter kimia yang paling penting (Bahri *et al.*, 2015). gugus fungsional yang terdapat di dalam kitosan diantaranya gugus hidroksil, gugus amina, dan gugus polar lainnya (Li *et al.*, 2020). Kitosan jamur *Rhizopus oryzae* yang telah dilakukan uji derajat deasetilasi menggunakan FTIR didapatkan serapan pita gugus fungsi dengan berbagai jenis dan untuk menganalisa tingkat nilai derajat deasetilasi maka yang perlu diperhatikan adalah gugus fungsi yang pitanya terserap pada sekitar gelombang 3450 dan gelombang 1655. Kitosan yang dianalisa berhasil menangkap adanya serapan pita pada daerah sekitar gelombang 3450 dan gelombang 1655. Adanya keberadaan kitosan ditunjukkan dengan terdapatnya pita serapan pada gelombang $3360,2\text{ cm}^{-1}$ dan $3263,3\text{ cm}^{-1}$ yang merupakan serapan dari vibrasi ulur gugus fungsi amina (NH_2). selanjutnya terdapat juga penyerapan pada pita $1653,1\text{ cm}^{-1}$ merupakan serapan pita dari gugus fungsi amida (C=O). Berdasarkan analisis gugus fungsi ini maka secara kualitatif dapat disebutkan bahwa kitosan telah berhasil disintesis.

Hasil FTIR kitosan *Rhizopus oryzae* menunjukkan nilai serapan gelombang 1653 cm^{-1} , 1625 cm^{-1} , 1559 cm^{-1} , 1459 cm^{-1} , 1420 cm^{-1} , yang menunjukkan adanya gugus fungsi C=O atau amida yang mengalami pemanjangan penyerapan. Hal ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Tan *et al.*, (2020) bahwa kitosan ditandai dengan adanya puncak khas gugus amida yang biasanya berada pada daerah disekitar gelombang 1655 cm^{-1} . Menurut penelitian yang dilakukan oleh Kanto *et al.*, (2021) bahwa kitosan yang diekstraksi dari jamur *Pleurotus ostreatus* menunjukkan hasil serapan gugus fungsi amida yang didasarkan pada serapan gelombang 1636 cm^{-1} , 1511 cm^{-1} , dan 1318 cm^{-1} . Pita spektrum serapan radiasi infra merah (IR) amida terbagi menjadi 3 yaitu amida I

(1600-1700 cm^{-1}), amida II (1470-1570 cm^{-1}), Amida III (1250-1350 cm^{-1}) (Ji *et al.*, 2020).

Serapan spektor inframerah (IR) yang perlu diperhatikan selanjutnya adalah serapan yang berada pada sekitar gelombang 3450 cm^{-1} . Serapan yang berada pada gelombang 3450 cm^{-1} menunjukkan adanya gugus amina. Berdasarkan gambar hasil FTIR kitosan *Rhizopus oryzae* ditunjukkan bahwa terdapat serapan gugus amina yang ditandai dengan serapan pada gelombang 3360 cm^{-1} dan 3263 cm^{-1} . Hal ini menandakan bahwa kitosan berhasil dideasetilasi sehingga gugus asetil yang terdapat di dalam kitosan telah digantikan dengan gugus amina (NH_2). Hal ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Berger *et al.*, (2014) bahwa kitosan yang diproduksi dari jamur *Rhizopus arrhizus* memiliki gugus amina yang ditandai dengan adanya serapan pita pada gelombang 3441 cm^{-1} . Proses deasetilasi adalah penghilangan gugus asetil dari rantai molekul kitin dan menghasilkan senyawa kitosan dengan gugus amina (NH_2) yang reaktif. Mekanisme deasetilasi adalah hidrolisis dari gugus asetamida (NHCOCH_3), yang berubah menjadi gugus amina (NH_2) dengan perlakuan pemberian basa dalam larutan NaOH (Sedyadi dan Huda, 2016).

Hasil perhitungan nilai derajat deasetilasi kitosan jamur *Rhizopus oryzae* yang ditumbuhkan pada substrat ekstrak limbah apel manalagi menunjukkan bahwa nilai derajat deasetilasi yang dihasilkan adalah 76,6%. Hal ini sangat dipengaruhi oleh tingginya serapan pita pada gugus amina (NH_2) karena berhasil menggantikan posisi gugus asetil pada kitin dari jamur *Rhizopus oryzae* dengan menggunakan larutan NaOH sebagai larutan basa. Derajat deasetilasi (DD) merupakan nilai hilangnya gugus asetil pada gugus asetamida kitin atau

banyaknya gugus amino bebas yang dihasilkan setelah proses deasetilasi. Semakin tinggi nilai DD maka semakin banyak gugus amina ($-NH_2$) pada molekul kitosan, sehingga kitosan semakin reaktif. Kitosan dihasilkan melalui deasetilasi kitin menggunakan pelarut alkali dengan konsentrasi tinggi dan suhu tinggi. Fungsi alkali adalah memutus ikatan antar karbon pada gugus asetil (CH_3COO) dengan nitrogen yang ada pada kitin. Gugus asetil akan terlepas kemudian gugus amina (NH_2) terbentuk. Persentase gugus asetil yang terlepas selama proses deasetilasi disebut sebagai nilai derajat deasetilasi.

Nilai derajat deasetilasi yang dihasilkan yaitu 76,59 % menunjukkan bahwa biopolimer yang dihasilkan setelah melalui proses demineralisasi dan deproteinasi menggunakan asam dan basa yang kuat menunjukkan terdapatnya kitosan pada kitin dari jamur *Rhizopus oryzae*. Nilai pada rentang 70% menunjukkan bahwa kitosan yang dihasilkan memiliki kualitas sedang. Hal ini sesuai dengan penelitian yang telah dilakukan oleh Harris *et al.*, (2013) bahwa derajat deasetilasi biopolimer turunan kitin terbagi menjadi beberapa kelompok diantaranya 58%-70% menunjukkan nilai derajat deasetilasi kitosan yang dihasilkan rendah, 70-85% menunjukkan nilai derajat deasetilasi kitosan yang dihasilkan sedang, dan 85%-95% menunjukkan nilai derajat deasetilasi kitosan yang tinggi.

4.3 Kajian Keislaman

Hasil dari penelitian dengan judul “Optimalisasi dan Karakterisasi Kitosan jamur *Rhizopus oryzae* Menggunakan Substrat Limbah Apel Sebagai Sumber Karbon” merupakan suatu topik yang masih jarang untuk diteliti karena pada umumnya penelitian terkait pembuatan kitosan biasanya menggunakan bahan dari cangkang krustasea seperti udang dan kepiting. Kitosan sebagai turunan dari

polimer kitin memiliki segudang khasiat dan manfaat bagi umat manusia mulai dari industri tekstil, fotografi, kertas, pengolahan limbah, kosmetik, obat-obatan, dan penelitian (Irawan, 2013). Penelitian terkait ekstraksi kitosan dari kitin yang bersumber dari jamur ternyata memiliki keunggulan dibandingkan dengan kitosan yang diekstraksi dari kitin krustasea diantaranya tingkat deasetilasi yang tinggi, pasokan biomassa jamur yang lebih tinggi, dan berat molekul sedang hingga rendah yang sangat bermanfaat jika diaplikasikan pada bidang biomedis (Imtihatish *et al.*, 2020). Penciptaan udang dan jamur *Rhizopus oryzae* merupakan dua makhluk hidup yang sangat jauh berbeda dimana keduanya berada pada kingdom yang berbeda yaitu kingdom animalia dan fungi. Akan tetapi dari keberagaman makhluk hidup diciptakan oleh Allah Swt terkait krustasea dan jamur ternyata memiliki persamaan yaitu sebagai bahan dalam pembuatan kitosan. Allah Swt telah menciptakan segala jenis keberagaman makhluk hidup sesuai dengan ukuran dan nilai kebermanfaatannya bagi makhluk hidup lain seperti firman Allah Swt dalam Q.S an-Nahl (16) : 13;

وَمَا ذَرَأَ لَكُمْ فِي الْأَرْضِ مُخْتَلِفًا أَلْوَانُهُ إِنَّ فِي ذَلِكَ لَآيَةً لِّقَوْمٍ يَذَّكَّرُونَ ﴿١٣﴾

Artinya: “(Dia juga mengendalikan) apa yang Dia ciptakan untukmu di bumi ini dengan berbagai jenis dan macam warnanya. Sesungguhnya pada yang demikian itu benar-benar terdapat tanda (kebesaran Allah) bagi kaum yang mengambil pelajaran”.

al-Qarni (2008) menjelaskan bahwa Allah Swt menundukan seluruh hambanya yang telah diciptakan pada permukaan bumi baik itu berupa binatang-binatang ternak, buah-buahan, bahan-bahan tambang dan lain-lain yang berbeda-beda warna dan kegunaanya. Penciptaan objek-objek dengan keberagamannya yang menunjukkan, perbedaan warna dan kegunaanya benar-benar terdapat pelajaran bagi orang-orang yang mau mengambil pelajaran dan menyadari bahwa

dalam pengendalian hal-hal tersebut terdapat tanda-tanda keesaan Allah dan keesaan-Nya untuk diibadahi.

Kata “berbagai jenis” dari potongan arti Q.S An-Nahl ayat 13 menjelaskan tentang Allah Swt telah memberikan berbagai anugerah dan menciptakan beragam makhluk hidup di dunia ini. Keragaman ini melibatkan berbagai jenis makhluk, termasuk manusia, hewan (kepiting dan udang), tumbuhan, dan jamur (*Rhizopus oryzae*). Keberagaman makhluk hidup yang Allah ciptakan di bumi tidak terlepas dari nilai kebermanfaatannya bagi makhluk hidup lain. Hal ini terkait dengan kitosan yang merupakan turunan biopolimer dari dua makhluk hidup yang sangat berbeda akan tetapi memiliki berbagai nilai manfaat yang dapat dimanfaatkan oleh manusia. Terkait dengan penelitian kali ini yaitu produksi biopolimer turunan kitin menggunakan ekstrak limbah apel manalagi didapatkan bahwa biopolimer yang dihasilkan merupakan kitosan. Hal ini didasarkan pada proses pengujian karakter kimia yaitu penentuan nilai derajat deasetilasi biopolimer yang menghasilkan nilai DD yang sedang sehingga biopolimer yang dihasilkan dari proses ekstraksi kitin *Rhizopus oryzae* dapat dikatakan sebagai kitosan. Penelitian ini dapat memberikan informasi bahwa penggunaan ekstrak limbah apel manalagi sebagai substrat dapat menghasilkan kitosan dengan kualitas yang baik.

Selain itu, penggunaan variasi ekstrak sumber karbon yaitu 60%, 80%, dan 100% sebagai media alternatif memberikan hasil terkait peningkatan biomassa kering kitosan dibandingkan penggunaan media konvensional yaitu PDB (*Potato Dextrose Broth*). Pengujian terkait optimalisasi biomassa kitosan menggunakan ekstrak limbah apel manalagi merupakan salah satu penciptaan

metode alternatif dari pemanfaatan buah apel yang telah dikategorikan sebagai limbah karena busuk. Hal ini menandakan bahwa limbah apel yang sering dianggap oleh manusia sebagai sampah yang tidak memiliki nilai manfaat lagi ternyata setelah melalui proses pengolahan secara ilmiah menunjukkan bahwa limbah masih memiliki kebermanfaatan terhadap makhluk hidup lain seperti jamur untuk bertahan hidup. Allah Swt menciptakan alam semesta beserta dengan isinya pasti semuanya memiliki tujuan dan manfaat tersendiri di dalamnya karena pada hakikatnya Allah Swt tidak mungkin menciptakan sesuatu dengan sia-sia. Hal ini dijelaskan oleh Allah Swt dalam Q.S. al-baqarah (2): 172;

يَا أَيُّهَا النَّاسُ كُلُوا مِمَّا فِي الْأَرْضِ حَلَالًا طَيِّبًا وَلَا تَتَّبِعُوا خُطُوَاتِ الشَّيْطَانِ إِنَّهُ لَكُمْ عَدُوٌّ مُّبِينٌ ﴿١٧٢﴾

Artinya : *Wahai manusia! Makanlah dari (makanan) yang halal dan baik yang terdapat di bumi, dan janganlah kamu mengikuti langkah-langkah setan. Sungguh, setan itu musuh yang nyata bagimu* (QS. Al-Baqarah [2]: 168)

Menurut tafsir Ilmi Kemenag (2013) Kandungan utama suatu makanan diantaranya buah adalah air protein, lemak, dan karbohidrat. Selain itu, makanan juga memiliki unsur penting dalam jumlah yang kecil diantaranya yaitu vitamin, mineral, antioksidan, dan serat. Nilai serta pemanfaatan gizi suatu makanan sangat bergantung kepada sumber makanan serta jumlah penggunaan makanan dalam mendapatkan nutrisi sehingga dengan demikian dapat membantu kita umat manusia dalam memilih makanan yang ingin dijadikan target untuk digunakan. Pemanfaatan karbon merupakan energi atau kalori yang terbentuk dari sebuah reaksi di dalam tubuh organisme untuk pembentukan sel. Berdasarkan hal tersebut sumber bahan bakar bagi jamur serta organisme lainnya adalah karbon.

Penciptaan langit dan bumi yang didalamnya berisi beraneka ragam ciptaan Allah Swt seperti sumber alam yang terdiri dari air, tanah, dan angin

sebagai makhluk abiotik dan makhluk biotik yang terdiri dari hewan, tumbuhan, jamur, dan mikroorganisme. Penciptaan keberagaman makhluk hidup merupakan tanda-tanda kebesaran Allah Swt. Manusia sebagai khalifah di muka bumi yang tugasnya menjaga kelestarian alam diberikan kesempatan untuk memanfaatkan sumber-sumber ini untuk kehidupan mereka. Hal ini mengingatkan manusia untuk menjaga dan merawat alam semesta serta sumber-sumber alam yang berada disekitarnya, termasuk memanfaatkan limbah organik buah apel manalagi seperti dalam penelitian kali ini dengan baik dan benar secara optimal. Pengelolaan limbah organik yang baik seperti pembuatan substrat untuk media pertumbuhan jamur dari buah apel manalagi adalah salah satu cara untuk menjaga keseimbangan alam dan memanfaatkan sumber daya alam secara berkelanjutan dan ini menjadi bukti bahwa manusia khususnya para ilmuwan harus memiliki rasa bertanggung jawab atas pengelolaan sumber daya alam yang diberikan Allah Swt kepada kita dengan cara menjaga keseimbangan alam untuk generasi yang akan datang melalui salah satunya pemanfaatan limbah buah apel manalagi.

BAB V PENUTUP

5.1 Kesimpulan

Adapun kesimpulan dari dilaksanakan penelitian kali ini adalah:

1. Pengaruh variasi konsentrasi penggunaan ekstrak limbah apel manalagi sebagai sumber karbon dengan menggunakan metode fermentasi cair (*submerged fermentation*) terhadap biomassa miselium dan kitosan jamur *Rhizopus oryzae* menunjukkan tidak terdapat perbedaan nyata atau signifikan hal ini ditandai dengan nilai signifikan $>0,05$ atau $0,246$.
2. karakteristik kitosan jamur *Rhizopus oryzae* berdasarkan nilai derajat deasetilasi kitosan hasil fermentasi cair menggunakan substrat limbah apel manalagi sebesar 76,6% yang menunjukkan nilai derajat deasetilasi kitosan tergolong ke dalam kategori sedang.

5.1 Saran

Saran yang dapat dilakukan untuk penelitian kali ini adalah:

1. Untuk peningkatan biomassa kitosan dapat dilakukan dengan cara penambahan waktu fermentasi menjadi 7 hari.
2. Untuk peningkatan nilai derajat deasetilasi dapat dilakukan dengan menggunakan bahan asam dan basa yang berbeda dari penelitian kali ini serta periode waktu serta suhu yang digunakan dalam proses ekstraksi miselium yang didalamnya mengandung kitin untuk diubah menjadi kitosan.

DAFTAR PUSTAKA

- Abdassah, M., Noviardani, T., Levita, J., & Suherman, SE (2015). Formulasi dan Uji Stabilitas Tetes Mata Sulfasetamida. *Jurnal Sains dan Teknologi Farmasi Indonesia*, 2 (1), 33
- Abdurrahman bin Nashir as-Sa'di, Syaikh. (2015). *Tafsir Al-Qur'an jilid 7*. Jakarta: Darul Haq.
- al-Qarni, Aidh (2008) *Aidh, Tafsir Muyassar, Terj. Tim Penerjemah Qishti Press, Jilid I*, Jakarta: Qishti Press.
- al-Mahalli, Jalaluddin., dan as-Suyutī, Jalaluddin. (2010). *Tafsir Jalalain*. Bandung: Sinar Baru Algensindo.
- Amorim, R.V.D.S.; Pedrosa, R.P.; Fukushima, K.; Martínez, C.R.; Ledingham, W.M.; Campos-Takaki, D.; Maria, G. (2006). Alternative Carbon Sources From Sugar Cane Process For Submerged Cultivation of *Cunninghamella bertholletiae* to Produce Chitosan. *Food Technol. Biotechnol.* 44, 519–523
- Anonim. (2011). *Potato Dextrose Broth (7585). Technical Service or Questions Involving Dehydrate Culture Media Preparation*. Acumedia Manufacture.
- Arif, E. A., & Isnawati, W. (2014). Pertumbuhan dan Produktivitas Jamur Tiram Putih (*Pleurotus ostreatus*) pada Media Campuran Serbuk Tongkol Jagung dan Ampas tebu. *Lentera Bio*, 3(3), 255-260.
- Abo Elsoud, M. M., & El Kady, E. M. (2019). Current Trends in Fungal Biosynthesis of Chitin and Chitosan. *Bulletin of the National Research Centre*, 43(1), 1-12.
- Abdel-Gawad, K. M., Hifney, A. F., Fawzy, M. A., & Gomaa, M. (2017). Technology Optimization of Chitosan Production From *Aspergillus niger* Biomass and Its Functional Activities. *Food Hydrocolloids*, 63, 593-601.
- Afriani, Y., Fadli, A., Maulana, S., & Karina, I. (2017). *Sintesis, Kinetika Reaksi*
- Agus Nurawan, M. P., Yiyi Sulaeman, S. P., & Hamdani, K. K. (2022). *Teknologi Perbenihan dan Budidaya Kopi Arabika*. PT Penerbit IPB Press..
- Amorim, R. V. S., Ledingham, W. M., Kennedy, J. F., & Campos-Takaki, G. M. (2006). Chitosan From *Syncephalastrum racemosum* Using Sugar Cane substrates as Inexpensive carbon Sources. *Food Biotechnology*, 20(1), 43-53.
- Aulia, I. A. N., & Handayani, D. (2022). Keanekaragaman Cendawan dari Cairan Ecoenzyme dengan Sumber Bahan Organik Berbagai Jenis Kulit Jeruk. *Jurnal Serambi Biologi*, 7(1), 114-119.
- Azhar, M., Efendi, J., Sofyeni, E., Lesi, R. F., & Novalina, S. (2010). Pengaruh Konsentrasi NaOH dan KOH Terhadap Derajat Deasetilasi Kitin dari Limbah Kulit Udang. *Eksakta*, 1.
- Baskara, Medha. (2010). *Pohon Apel Itu Masih (Bisa) Berbuah Lebat*. *Majalah Ilmiah Populer Bakosurtanal-Ekspedisi Geografi Indonesia 2010 Jawa Timur*. 78-82.
- Badan Pusat Statistik Kabupaten Malang, (2020). Produksi Buah-Buahan Kecamatan Menurut dan Jenis Buah di Kabupaten Malang. Kabupaten Malang : Badan Pusat Statistik.
- Bahri, S., Rahim, E. A., & Syarifuddin, S. (2015). Derajat Deasetilasi Kitosan dari Cangkang Kerang Darah Dengan Penambahan NaOH Secara Bertahap.

KOVALEN: Jurnal Riset Kimia, 1(1).

- Berger, L. R. R., Stamford, T. C. M., Stamford-Arnaud, T. M., De Alcântara, S. R. C., Silva, A. C. D., Silva, A. M. D., ... & de Campos-Takaki, G. M. (2014). Green Conversion of Agroindustrial Wastes Into Chitin and Chitosan by *Rhizopus arrhizus* and *Cunninghamella elegans* Strains. *International journal of molecular sciences*, 15(5), 9082-9102.
- Berman, J. Jules. (2022). *Classification Made Relevant*. India: Mara Corner.
- Budipramana, L. S. (2012). Pertumbuhan Miselium dan Produksi Tubuh Buah Jamur Tiram Putih (*Pleurotus Ostreatus*) dengan Memanfaatkan Kulit Ari Biji Kedelai sebagai Campuran pada Media Tanam. *Jurnal Penelitian Pertanian Terapan*, 12(3), 163-168.
- Cardoso, A., Lins, C. I. M., Dos Santos, E. R., Silva, M. C. F., & Campos-Takaki, G. M. (2012). Microbial Enhance of Chitosan Production by *Rhizopus arrhizus* Using Agroindustrial Substrates. *Molecules*, 17(5), 4904-4914.
- Chatterjee, S., Guha, A. K., & Chatterjee, B. P. (2019). Evaluation of Quantity and Quality of Chitosan Produce From *Rhizopus oryzae* by Utilizing Food Product Processing Waste Whey and Molasses. *Journal of Environmental Management*, 251, 109565.
- Chattopadhyay, D. P., & Inamdar, M. S. (2010). Aqueous behaviour of chitosan. *International Journal of Polymer Science*.
- Citrowati, A. N., Satyantini, W. H., & Mahasri, G. (2017). Nilai Derajat Deasetilasi Kitosan Dari Cangkang Kerang Kampak. *Journal of Aquaculture and Fish Health*, 6(2), 1-9.
- Crestini, C., Kovac, B., & Giovannozzi-Sermanni, G. (1996). Production and Isolation of Chitosan By Submerged and Solid-State Fermentation From *Lentinus Edodes*. *Biotechnology and Bioengineering*, 50(2), 207-210.
- Crognale, S., Russo, C., Petruccioli, M., & D'annibale, A. (2022). Chitosan Production by Fungi: Current State of Knowledge, Future Opportunities and Constraints. *Fermentation*, 8(2), 76.
- Denardi-Souza, T., Massarolo, K. C., Tralamazza, S. M., & Badiale-Furlong, E. (2018). Monitoring of Fungal Biomass Changed by *Rhizopus oryzae* in Relation to Amino Acid and Essential Fatty Acids Profile in Soybean Meal, Wheat and Rice. *CyTA-Journal of Food*, 16(1), 156-164.
- Fadhil, A., & Mous, E. F. (2021). Some Characteristics and Functional Properties of Chitin Produced From Local Mushroom *Agaricus bisporus*. In *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science* (Vol. 761, No. 1, p. 012127). IOP Publishing.
- Falony, G.; Armas, J. C.; Mendoza, J. C. D.; Hernández, J. L. M. (2006). Production of Extracellular Lipase from *Aspergillus niger* by Solid-State Fermentation. *Food Technology & Biotechnology*. 44(2).
- Farissi H. El., et al. (2017). Removal of RR-23 Dye From Industrial Textile Wastewater by Adsorption on *Cistus ladaniferus* Seeds and Their Biochar. *Journal of Environment and Earth Science*, 7(11).
- Fatimura, M., Masriatini, R., & Putri, F. (2020). Pemanfaatan Limbah Kulit Pisang Menjadi Karbon Aktif Dengan Variasi Konsentrasi Aktivator NaCl. *Jurnal Redoks*, 5(2), 87-95.
- Fauziyah, N., Agustina, D., Triwiratno, A., & Endarto, O. (2021). *Identifikasi dan Pengendalian Hayati Penyakit Busuk Buah Apel di Kota Batu, Jawa Timur*

- (Doctoral dissertation, Sebelas Maret University).
- Gabriel, L. S., Prestes, R. A., Pinheiro, L. A., Barison, A., & Wosiacki, G. (2013). Multivariate Analysis of the Spectroscopic Profile of The Sugar Fraction of Apple Pomace. *Brazilian archives of Biology and Technology*, 56, 439-446.
- Gautam, A. K., Sharma, S., Avasthi, S., & Bhadauria, R. (2011). Diversity, Pathogenicity and Toxicology of *A. niger*: an Important Spoilage Fungi. *Research Journal of Microbiology*, 6(3), 270-280.
- Gazali, A., & Munawwaroh, A. (2017). Pemanfaatan Buah Apel (*Malus sylvestris* Mill.) lewat Matang Sebagai Substrat Nata De Apple. *Jurnal Biota*, 3(2), 60-65.
- Ghormade, V., Pathan, E. K., & Deshpande, M. V. (2017). Can Fungi Compete With Marine Sources For Chitosan Production?. *International journal of biological macromolecules*, 104, 1415-1421.
- Grahovac, M., Inđić, D., Tanović, B., Lazić, S. Vuković, J., Hrustić, S., Gvozdenac. (2011). Integrated management of causal agents of postharvest fruit rot of apple. *Pesticides and Phytomedicine*, 26(4), 289-299
- Gunawan, F. (2015). Perbedaan Kitosan Berat Molekul Rendah dan Tinggi Terhadap Jumlah Sel Limfosit Pada Proses Penyembuhan Luka Pencabutan Gigi. *DENTA*, 9(1), 113-121.
- Habibi, A., Karami, S., Varmira, K., & Hadadi, M. (2021). Key Parameters Optimization of Chitosan Production From *Aspergillus terreus* Using Apple Waste Extract as Sole Carbon Source. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 44, 283-295.
- Haedar, N., Fahrudin, F., Aryanti, W., & Natsir, H. (2017). Produksi dan Karakterisasi Enzim Kitinase dari Bakteri Kitinolitik Asal Kerang Anadara granosa. *Jurnal Ilmu Alam dan Lingkungan*, 8 (1).
- Fuentes, Maria. 3 oktober 2023. *Hemocytometer*. Positive SSL: United State.
- Handayani, L., Syahputra, F., & Astuti, Y. (2018). Utilization and Characterization of Oyster Shell as Chitosan and Nanochitosan. *Jurnal Kimia Sains Dan Aplikasi*, 21(4), 224-231.
- Hang, Y. D. (1990). Chitosan Production from *Rhizopus oryzae* Mycelia. *Biotechnology letters*, 12(12), 911-912.
- Hardiansyah, M., Anshary, A., & Nasir, B. (2023). Uji Efektifitas Jamur *Beauveria bassiana* Terhadap Pupa *Conopomorpha cramerella snellen* (Lepidoptera: Gracillariidae) di Laboratorium. *Agrotekbis. E-Jurnal Ilmu Pertanian*, 11(3), 768-776.
- Harris, R., Acosta, N., & Heras, A. (2013). *Chitosan and Inhalers: a Bioadhesive Polymer For Pulmonary Drug Delivery*. In *Inhaler Devices* (pp. 77-93). Woodhead Publishing.
- Hasan., et al. (2022). *Bioplastik Untuk Pengemas Makanan Berbasis Pati dan Kitosan*. Banda Aceh: Banda Publisihing.
- Hasri, H. (2010). Prospek Kitosan dan Kitosan Termodifikasi Sebagai Biopolimer Alami yang Menjanjikan. *CHEMICA" Jurnal Ilmiah Kimia dan Pendidikan Kimia"*, 11(2), 1-7.
- Hazaa, M. M., Shash, S. M., Swailam, H. M., Aziz, N. H., & Emam, D. A. (2013). Influence of Gibberellic Acid on Enhancement Growth of *Aspergillus niger* for Chitosan Production. *Journal of Nuclear Technology in Applied Science*, 1(1), 83-90.

- Herlinda, S., Utama, MD, & Pujiastuti, Y. (2006). Kerapatan dan Viabilitas Spora *Beauveria bassiana* (Bals.) Akibat Subkultur dan Pengayaan Media, Serta Virulensinya Terhadap Larva *Plutella xylostella* (Linn.). *Jurnal Hama dan Penyakit Tumbuhan Tropika*, 6 (2), 70-78.
- Imtihani, H. N., Wahyuono, R. A., & Permatasari, S. N. (2020). *Biopolimer Kitosan dan Penggunaannya Dalam Formulasi Obat*. Penerbit Graniti.
- Irawan, Bambang. (2013). *Karsinologi Dengan Penjelasan Deskriptif dan Fungsional*. Surabaya: Airlangga University Press.
- Jagat, L. M. S. S., Darmayasa, I. B. G., & Wijana, I. M. S. (2021). Potential *Rhizopus* spp. in Control the Growth of *Aspergillus flavus* FNCC6109 in Broiler Chicken Concentrate Feed. *Jurnal Biologi Udayana*, 25(2), 147-156.
- Jamilatun, M., Azzahra, N., & Aminah, A. (2020). Perbandingan Pertumbuhan *Aspergillus fumigatus* pada Media Instan Modifikasi Carrot Sucrose Agar dan Potato Dextrose Agar. *Jurnal Mikologi Indonesia*, 4(1).
- Jamiolkowska, A., & Kopacki, M. (2020). Natural Compounds Against Plant Pests and Pathogens. In *Natural Remedies for Pest, Disease and Weed Control* (pp. 55-63). Academic Press.
- Ji, Y., Yang, X., Ji, Z., Zhu, L., Ma, N., Chen, D., ... & Cao, Y. (2020). DFT-calculated IR Spectrum Amide I, II, and III Band Contributions of N-Methylacetamide Fine Components. *ACS omega*, 5(15), 8572-8578.
- Junaidi, D., Santoso, M. C. K. P., Retnoningtyas, E. S., & Hartono, S. B. (2018). Penurunan Kadar Sianida Pada Umbi Gadung (*Dioscorea hispida*) Dengan Proses Fermentasi Menggunakan Kapang *Rhizopus Oryzae*. *Widya Teknik*, 14(1), 9-14.
- Kanwal, M., Wattoo, A. G., Khushnood, R. A., Liaqat, A., Iqbal, R., & Song, Z. (2023). *Advancements and challenges in production of biosurfactants. In Applications of Next Generation Biosurfactants in the Food Sector* (pp. 239-259). Academic Press.
- Kanto, DAR, Apriani, R., Ilhami, M., & Eva, A. (2021). Kitosan Dari Jamur Tiram (*Pleurotus Ostreatus*) Dan Aplikasinya Sebagai Adsorben Logam Krom (Cr). *Jurnal Lantanida*, 9 (1), 498689.
- Kalsum, U., Fatimah, S., & Wasonowati, C. (2011). Efektivitas Pemberian Air Leri Terhadap Pertumbuhan dan Hasil Jamur Tiram Putih (*Pleurotus ostreatus*). *Agrovigor: Jurnal Agroekoteknologi*, 4(2), 86-92.
- Kemenag RI. (2016). *Tafsir Ringkas Jilid I*. Jakarta: Lajnah Pentashihan Mushaf Al-Qur'an.
- Khalaf, S, A. (2004). Production and Characterization of Fungal Chitosan Under Solid-State Fermentation Conditions. *International Journal of Agriculture and Biology*, 6(6), 1033-1036.
- Kumaresapillai, N., Basha, R. A., & Sathish, R. (2011). Production and Evaluation of Chitosan From *Aspergillus niger* MTCC strains. *Iranian journal of pharmaceutical research: IJPR*, 10(3), 553.
- Kurniasih, M., Cahyati, T., & Dewi, R. S. (2018). Carboxymethyl Chitosan as An Antifungal Agent on Gauze. *International journal of biological macromolecules*, 119, 166-171.
- Kusmiati, Si, K. M., M., Nurpalah, R., Aryantha, I. N., & Kartawinata, D. T. G. (2002). Kultivasi dan Optimasi Pertumbuhan Jamur *Ganoderma lucidum* (LINGZHI). Jakad Media Publishing.

- Kusnadi. (2021). *Inovasi Biskuit Fungsional Kaya Antioksidan Berbasis Ekstrak Rosella (Hibiscus sabdariffa L.) dan Kitosan*. Banyumas: CV. ZT Corpora.
- Kwon, J. H., Kim, J., & Kim, W. I. (2011). First Report of *Rhizopus oryzae* as a Postharvest Pathogen of Apple in Korea. *Mycobiology*, 39(2), 140-142.
- Lajnah Pentashihan Mushaf Al-Qur'an dan lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia. (2015). Tafsir Ilmi, Tafsir Ilmi: Jasad Renik dalam Perspektif AlQur'an dan Sains. Jakarta: Lajnah Pentashihan Mushaf Al-Qur'an Mushaf Al-Qur'an.
- Lajnah Pentashihan Mushaf Al-Qur'an dan lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia. (2013). Tafsir Ilmi, Tafsir Ilmi: Makanan dan Minuman dalam Perspektif AlQur'an dan Sains. Jakarta: Lajnah Pentashihan Mushaf Al-Qur'an Mushaf Al-Qur'an.
- Lajnah Pentashihan Mushaf Al-Qur'an dan lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia. (2011). Tafsir Ilmi, Tafsir Ilmi: Tumbuhan dalam Perspektif AlQur'an dan Sains. Jakarta: Lajnah Pentashihan Mushaf Al-Qur'an Mushaf Al-Qur'an.
- Lamçe, F., Karauli, J., Ruci, M., Ferraj, B., Sulaj, K., & Kyçyk, O. (2022). The Influence Of Climatic Conditions On The Chemical And Bioactive Components Of Some Apple Varieties Cultivated In The Area Of Korça. In Proceedings Of Iv. *International Agricultural, Biological & Life Science Conference Agbiol 2022* (p. 458).
- Lee, S. H., Nguyen, T. T., & Lee, H. B. (2018). Isolation and Characterization of Two Rare Mucoralean Species With Specific Habitats. *Mycobiology*, 46(3), 205-21
- Li, Q., Dunn, E. T., Grandmaison, E. W., & Goosen, M. F. (2020). *Applications and Properties of Chitosan*. In *Applications of Chitin and Chitosan* (pp. 3-29). CRC Press
- Lianah. (2021). *Dasar-Dasar Mikologi*. Semarang: CV. Alinea Media Dipantara.
- Li, B., Elango, J., & Wu, W. (2020). Recent Advancement of Molecular Structure and Biomaterial Function of Chitosan From Marine Organisms For Pharmaceutical and Nutraceutical aApplication. *Applied Sciences*, 10(14), 4719.
- Liu, H., Kumar, V., Jia, L., Sarsaiya, S., Kumar, D., Juneja, A., ... & Awasthi, M. K. (2021). Biopolymer Poly-Hydroxyalkanoates (PHA) Production From Apple Industrial Waste Residues: A review. *Chemosphere*, 284, 131427.
- Lyu, F., Luiz, S. F., Azeredo, D. R. P., Cruz, A. G., Ajlouni, S., & Ranadheera, C. S. (2020). Apple pomace as a Functional And Healthy Ingredient In Food Products: A Review. *Processes*, 8(3), 319.
- Maftuchah, M. P., Winaya, I. A., MM, M. S., & Ir Agus Zainudin, M. P. (2015). *Teknik Dasar Analisis Biologi Molekuler*. Deepublish.
- Mahendra, Y. A., Al Rasyid, H., & User, S. (2016). Pengaruh Jenis Mikroorganisme dan Lama Fermentasi Terhadap Protein Residu Produk Fermentasi Hasil Samping Udang. *Inovasi Pembangunan: Jurnal Kelitbangan*, 4(02), 195-207
- Maimunah, S., Nurbaya, S., & Zuhairiah, Z. (2019). Daya Simpan Sirup Apel Hijau (*Pyrus malus*) dengan Variasi Gula. *Jurnal Farmanesia*, 6(2), 109-114.
- Mane, S., Pathan, E., Tupe, S., Deshmukh, S., Kale, D., Ghormade, V., ... & Deshpande, M. (2022). Isolation and Characterization of Chitosans From Different Fungi With Special Emphasis on Zygomycetous Dimorphic

- Fungus *Benjaminiella poitrasii*: Evaluation of Its Chitosan Nanoparticles For the Inhibition of Human Pathogenic Fungi. *Biomacromolecules*, 23(3), 808-815.
- Matica, M. A., Aachmann, F. L., Tøndervik, A., Sletta, H., & Ostafe, V. (2019). Chitosan As a Wound Dressing Starting Material: Antimicrobial Properties and Mode of Action. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(23), 5889.
- Merzendorfer, H. (2011). The Cellular Basis of Chitin Synthesis in Fungi and Insects: Common Principles And Differences. *European Journal Of Cell Biology*, 90(9), 759-769.
- Morin-Crini, N., Lichtfouse, E., Torri, G., & Crini, G. (2019). Applications of Chitosan in Food, Pharmaceuticals, Medicine, Cosmetics, Agriculture, Textiles, Pulp and Paper, biotechnology, and Environmental Chemistry. *Environmental Chemistry Letters*, 17(4), 1667-1692.
- Mujim, S. (2010). Pengaruh Ekstrak Rimpang Jahe (*Zingiber officinale* Rosc.) Terhadap Pertumbuhan *Pythium* Sp. Penyebab Penyakit Rebah Kecambah Mentimun Secara In Vitro. *Jurnal Hama dan Penyakit Tumbuhan Tropika*, 10(1), 59-63.
- Muñoz, G., Valencia, C., Valderruten, N., Ruiz-Durántez, E., & Zuluaga, F. (2015). Extraction of Chitosan From *Aspergillus niger* Mycelium and Synthesis of Hydrogels For Controlled Release of Betahistine. *Reactive and Functional Polymers*, 91, 1-10.
- Muthmainnah, A. W., Srigede, L., & Jiwintarum, Y. (2019). Penggunaan Bahan Dasar Pisang Ambon (*Musa Acuminata*) Sebagai Media Alternatif Untuk Pertumbuhan Jamur *Aspergillus Niger*. *Jurnal Analis Medika Biosains (JAMBS)*, 6(2), 93-97.
- Nasution, Z., Agusnar, H., Alfian, Z., & Wirjosentono, B. (2017). Pengaruh Viskositas Kitosan dari Berbagai Berat Molekul Terhadap Pembuatan Kitosan Nanopartikel Menggunakan Ultrasonic Bath. *Jurnal Teknologi Kimia Unimal*, 2(2), 68-79.
- Noferdiman, N., Rizal, Y., Mirzah, M., Heryandi, Y., & Marlida, Y. (2008). Penggunaan Urea Sebagai Sumber Nitrogen Pada Proses Biodegradasi Substrat Lumpur Sawit Oleh Jamur *Phanerochaete chrysosporium*. *Jurnal Ilmiah Ilmu-ilmu Peternakan*, 11(4), 75-82.
- Novitasari, A., Warkoyo, W., & Winarsih, S. (2019). Pemanfaatan Limbah Padat Sari Apel Sebagai Bahan Baku Cuka Apel Menggunakan Metode Backslop. *Jurnal Teknologi Pangan dan Ilmu Halal*, 2 (1), 55-72.
- Nurhayati, E., Salim, M., & Putri, A. (2021). Pertumbuhan Koloni *Aspergillus niger* Pada Media Agar Tepung Beras Dekstrosa Dengan Metode Dilusi. *Jurnal Vokasi Kesehatan*, 6(2), 100-103.
- Nurjasmi, R., & Suryani, S. (2020). Uji Antagonis Actinomycetes Terhadap Patogen *Colletotrichum capsici* Penyebab Penyakit Antraknosa pada Buah Cabai Rawit. *Jurnal Ilmiah Respati*, 11(1), 1-12.
- Nwe, N., & Stevens, W. F. (2004). Effect Of Urea On Fungal Chitosan Production In Solid Substrate Fermentation. *Process Biochemistry*, 39(11)
- Nwe, N., Furuike, T., & Tamura, H. (2010). Production of Fungal Chitosan by Enzymatic Method and Applications in Plant Tissue Culture and Tissue Engineering: 11 Years of Our Progress, Present Situation and Future

- Prospects. *Biopolymers*, 7(135), e162.
- Oecd. (2018). *Harmonisation of Regulatory Oversight in Biotechnology Safety Assessment of Transgenic Organisms in the Environment, Volume 9 OECD Consensus Document of the Biology of Crops: Apple, Safflower, Rice*. Prancis: OECD Publishing.
- Pangesti, Nwi, Pangastuti, A., & Retnaningtyas, E. (2012). Pengaruh Penambahan Molase pada Produksi Enzim Xilanase oleh Jamur *Aspergillus niger* dengan Substrat Jerami Padi. *Jurnal Bioteknologi Tropis Asia*, 9 (2), 41-48.
- Pellis, A., Guebitz, G. M., & Nyanhongo, G. S. (2022). Chitosan: Sources, Processing and Modification techniques. *Gels*, 8(7), 393.
- Perussello, C. A., Zhang, Z., Marzocchella, A., & Tiwari, B. K. (2017). Valorization Of Apple Pomace By Extraction Of Valuable Compounds. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 16(5), 776-796.
- Pochanavanich, P., & Suntornsuk, W. (2002). Fungal Chitosan Production and Its Characterization. *Letters in Applied Microbiology*, 35(1), 17-21.
- Pourdarbani, R., Sabzi, S., Kalantari, D., Karimzadeh, R., Ilbeygi, E., & Arribas, J. I. (2020). Automatic Non-Destructive Video Estimation of Maturation Levels in Fuji Apple (*Malus malus pumila*) Fruit in Orchard Based on cColour (Vis) and Spectral (NIR) data. *Biosystems Engineering*, 195, 136-151.
- Pratiwi, R. (2014). Manfaat Kitin dan Kitosan Bagi Kehidupan Manusia. *Oseana*, 39(1), 35-43.
- Pridiatama, R., Kurniawan, A., & Sudrajat, S. (2019). Karakteristik Dan Tipologi Industri Mikro, Kecil, Dan Menengah Agroindustri Apel Di Kota Batu. *Media Komunikasi Geografi*, 20(1).
- Putri, D. N., Windiana, L., & Pakpahan, O. P. (2020). *Teknologi Frozendough Dan Sourdough (Vol. 1)*. Malang: UMMPress.
- Rachmawati, R., Mayang, D. M., & Himawan, T. (2016). Virulensi Jamur *Beauveria Bassiana* (Bals.) Vuill.(Hypocreales: Cordycipitaceae) dengan Pemurnian Kembali Pada Serangga (Passage Insect) terhadap *Plutella xylostella* Linnaeus (Lepidoptera: Plutellidae). *Jurnal HPT (Hama Penyakit Tumbuhan)*, 4(1), 45-53.
- Rashad, M. M., & Nooman, M. U. (2008). Isolation and Characterization of Fungal Chitosan Using Different Substrates. *Advances in Food Sciences*, 30(1), 24-29.
- Rianto, M. B. M. R. (2018). Pertumbuhan *Candida* sp dan *Aspergillus* sp dari Bilasan Bronkus Penderita Tuberkulosis Paru pada Media Bekatul. *Jurnal Ilmu Alam dan Lingkungan*, 9(18), 74-82.
- Rinaudo, M. (2006). Chitin and Chitosan: Properties and Applications. *Progress in Polymer Science*, 31(7), 603-632.
- Ritonga, H., & Khuzaimah, W. O. S. (2022). *Aplikasi Simultan Foliar Spray Nano Fertilizer TiO2 dan Hidrogel sebagai Pembenh Tanah*. Penerbit NEM.
- Rohmah, A. A. Z., Fajrin, A. N. A., & Gunawan, S. (2022). Aplikasi Kitosan berbasis Kulit Udang Sebagai Alternatif Substitusi Lilin Pelapis dalam Rangka Peningkatan Umur Simpan Buah-Buahan: A Review. *Halal Research Journal*, 2(2), 120-136.
- Sa'adah, L. I. N., & Estiasih, T. (2015). Karakterisasi Minuman Sari Apel Produksi Skala Mikro dan Kecil di Kota Batu. *Jurnal Pangan dan*

- Agroindustri*, 3(2), 374-380.
- Sanjaya, A. R., Mulyati, A. H., & Citroreksoko, P. (2020). Diversifikasi Talas Bogor (*Colocasia esculenta* (L) Schott) sebagai Upaya Olahhan Produk Tapai Khas Bogor. *Ekologia: Jurnal Ilmiah Ilmu Dasar dan Lingkungan Hidup*, 18(2), 72-77.
- Santoso, I. (2014). Identifikasi Potensi Dan Permasalahan Serta Analisis Pengembangan Industri Olahhan Buah Di Kota Batu Provinsi Jawa Timur.
- Saputra, D. A. D., & Sumanto, A. (2022). Pengaruh Pengaruh Luas Lahan, Tenaga Kerja, dan Modal Terhadap Produksi Apel di Desa Tulungrejo, Kota Batu. *Primanomics: Jurnal Ekonomi & Bisnis*, 20(2).
- Sari, N. A. (2020). Uji Perbandingan Metode Penentuan Derajat Deasetilasi Kitosan Menggunakan Spektroskopi Infra Merah Dan Metode Volumetri.
- Schuster, E., Dunn-Coleman, N., Frisvad, J.; Van Dijck, P. (2002). On the Safety of *Aspergillus niger*—a Review. *Applied microbiology and biotechnology*, 59 (4-5), 426-435.
- Sedyadi, E., & Huda, K. (2016). Kajian Adsorpsi remazol yellow FG oleh montmorillonit-kitosan. *Integrated Lab Journal*, 4(2), 139-152.
- Sellitasari, S., Ainurrasyid, A., & Suryanto, A. (2013). Perbedaan Produksi Tanaman Apel (*Malus Sylvestris* Mill.) Pada Agroklimat Yang Berbeda. *Jurnal Reproduksi Tanaman*, 1(1).
- Setiyanto, A. E. R., et al. (2021). *Buah-Buahan Indonesia: Tinjauan Biologi dan Kesehatan*. Malang: Media Nusa Creative.
- Shabrina, A., Sukmawati, D., & Hidayat, I. (2018). Isolasi dan Uji Patogenitas Kapang Perusak pada Apel Malang (*Malus sylvestris* Mill.) Pasca Panen. *Bioma*, 14(1), 30-36.
- Sine, Y & Soetarto, Endang, S. 2018. Isolasi dan Identifikasi Kapang *Rhizopus* pada Tempe Gude (*Cajanus cajan* L.): Savana Cendana. *Jurnal Pertanian Lahan Kering*. 3 (4): 67-68.
- Siswanta, D., & Sudiono, S. (2018). *Dekontaminasi Ion Logam Dengan Biosarben*. Yogyakarta: Gadjah Mada University Press.
- Sobczak, P., Nadulski, R., Kobus, Z., & Zawislak, K. (2022). Technology for Apple Pomace Utilization Within a Sustainable Development Policy Framework. *Sustainability*, 14(9), 5470.
- Sopandi, T. dan Wardah. (2020). *Mikologi – Dasar dan Aplikasi*. CV Andi Offset: Yogyakarta
- Stevens, M.P. 2007. *Kimia Polimer*. Jakarta: Pradnya Paramita.
- Streit, F., Koch, F., Laranjeira, M., & Ninow, J. L. (2009). Production of Fungal Chitosan in Liquid Cultivation Using Apple Pomace as sSubstrate. *Brazilian Journal of Microbiology*, 40, 20-25.
- Subagyo, P. (2010). Pemungutan Pektin Dari Kulit Dan Amapas Apel Secara Ekstraksi. *Eksergi*, 10(2), 47-51.
- Suleman, A. W., & Arna, A. N. (2022). Isolasi Fungi Endofit Umbi Talas (*Colocasia esculenta* (L.) Schott) Sebagai Antibakteri Terhadap Bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus* Secara Klt-Bioautografi. *Medical Sains: Jurnal Ilmiah Kefarmasian*, 7(1), 39-48.
- Sultana, N., Jahan, M., & Uddin, M. S. (2022). An Extensive Dataset for Successful Recognition of Fresh and Rotten fruits. *Data in Brief*, 44, 108552.

- Surbakti, E. S. P., Duniaji, A. S., & Nocianitri, K. A. (2022). Pengaruh Jenis Substrat Terhadap Pertumbuhan *Rhizopus oligosporus* DP02 Bali Dalam Pembuatan Ragi Tempe. *Jurnal Ilmu dan Teknologi Pangan*, 11(1), 92-99.
- Tan, S.C.; Tan, T.K.; Wong, S.M.; Khor, E. (1996). The Chitosan Yield of Zygomycetes at Their Optimum Harvesting Time. *Carbohydr. Polym.* 30, 239–242.
- Toini, Y. N., Kandowanko, N. Y., & Uno, W. D. (2021). The Morphology of Pathogenic Fungi As The Cause of Rotten Cacao (*Theobroma Cacao* L.) Fruits in Tumba Village. *Jambura Edu Biosfer Journal*, 3(1), 28-36.
- Tudzynski, B. (2014). Nitrogen Regulation of Fungal Secondary Metabolism in Fungi. *Frontiers in microbiology*, 5, 656.
- Utami, U., et al. (2018). *Buku Panduan Prktikum Mikrobiologi Umum*. Uin Maliki Press: Malang.
- Utarti, E., Syahidah, D. A., & Arimurti, S. Skrining Aktinomisetes Pendegradasi Nikotin Pada Daun Tembakau (*Nicotiana tabacum* L.). *Metamorfosa: Journal of Biological Science*, 10(1), 133-142.
- Utomo, D., Wahyuni, R., & Novia, C. (2014). Diversifikasi Produk Olahan Apel Manalagi Kualitas Afkir Menjadi Selai dan Dodol. *Agrika*, 8(2).
- Vidović, S., Horecki, A. T., Vladić, J., Šumić, Z., Gavarić, A., & Vakula, A. (2020). *Apple. In Valorization of Fruit Processing By-Products* (pp. 17-42). Academic Press.
- Wantini, S., & Octavia, A. (2018). Perbandingan Pertumbuhan Jamur *Aspergillus flavus* Pada Media PDA (*Potato Dextrose Agar*) dan Media Alternatif dari Singkong (*Manihot esculenta* Crantz). *Jurnal Analis Kesehatan*, 6(2), 625-631.
- Warda, A., Busyairi, M., & Kahar, A. (2022). Pemanfaatan Limbah Rajungan (*Portunus Pelagicus* Untuk. Memproduksi Kitosan Sebagai Pupuk Organik Cair Dalam Penentuan Konsentrasi Optimum Pada Tanaman. *Jurnal Teknologi Lingkungan UNMUL*, 6(1), 1-9.
- Wijanarka, W., Ferniah, R. S., & Salamah, S. (2008). Produksi Inulinase *Pichia alni* DUCC-W4 pada Tepung Umbi Dahlia (*Dahlia variabilis* Willd) dengan Variasi Konsentrasi Ammonium Nitrat dan Waktu Inkubasi. *Bioma*, 10(2), 58-64.
- Wignyanto., dan Hidayat, Nur. (2017). *Bioindustri*. UB Press: Malang.
- Windarti, T., & Hascaryo, F. A. D. (2022). Kitosan Termodifikasi Tripolifosfat Sebagai Kandidat Material Pelapis Artefak Kayu. *Borobudur*, 16(1), 39-50.
- Wosiacki.G, A. Nogueira, F. Denardi, and R.G Viera. (2007). Sugar Composition of Depectinized Apple Juices. *Proceding Semina Ciencias Agrarias, Londrina*, 28(4): 645-652.
- Yamin, M., Ayu, D. F., & Hamzah, F. (2017). Lama Pengeringan Terhadap Aktivitas Antioksidan dan Mutu Teh Herbal Daun Ketepeng Cina (*Cassia alata* L.). *Jurnal Online Mahasiswa (JOM) Bidang Pertanian*, 4(2), 1-15.
- Yao, K., Li, J., Yao, F., dan Yin, Y. 2012. *Chitosan-Based Hidrogels: Functions and Applications*. USA: CRC Press.
- Yazid, E. 2005. *Kimia Fisika Untuk Paramedis*. Yogyakarta: Penerbit Andi.
- Yulianti, S., et al. (2006). *Khasiat dan Manfaat Apel*. Jakarta: Agro Media Pustaka.

Yulina, R., Winiati, W., Kasipah, C., Septiani, W., Mulyawan, A. S., & Wahyudi, T. (2014). Pengaruh Berat Molekul Kitosan Terhadap Fiksasi Kitosan pada Kain Kapas Sebagai Antibakteri. *Arena Tekstil*, 29(2).

LAMPIRAN

Lampiran 1. Penentuan Penggunaan Konsentrasi

$$0\% \text{ (Kontrol)} = \frac{0}{100} \times 100 = 0 \text{ ml}$$

$$60\% \text{ ekstrak limbah apel} = \frac{60}{100} \times 100 = 60 \text{ ml}$$

$$80\% \text{ ekstrak limbah apel} = \frac{80}{100} \times 100 = 80 \text{ ml}$$

$$100\% \text{ ekstrak limbah apel} = \frac{100}{100} \times 100 = 100 \text{ ml}$$

Lampiran 2. Perhitungan Nilai Derajat Deasetilasi

$$A_{3450} = \text{Log} \frac{100}{72} = 0,1426$$

$$A_{1665} = \text{Log} \frac{72}{65} = 0,0444$$

$$= \% DD = \left[100 - \left(\frac{A_{1665}}{A_{3450}} \right) \times \frac{100}{1,33} \right]$$

$$= \% DD = \left[100 - \left(\frac{0,0444}{0,1426} \right) \times \frac{100}{1,33} \right]$$

$$= \% DD = \left[100 - (0,3113) \times \frac{100}{1,33} \right]$$

$$= \% DD = \left[100 - x \frac{31,13}{1,33} \right]$$

$$= \% DD = [100 - 23,40]$$

$$= \% DD = 76,6$$

Lampiran 3. Analisis Data Statistika SPSS Biomassa Miselium

Uji Normalitas

	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	Df	Sig.	Statistic	Df	Sig.
Perlakuan	,250	12	,037	,816	12	,014
ulangan	,213	12	,139	,811	12	,012

a. Lilliefors Significance Correction

nilai sig > 0,05 maka data terdistribusi normal.

Uji Homogenitas

		Levene Statistic	df1	df2	Sig.
biomassa	Based on Mean	5,775	3	8	,021
	Based on Median	,707	3	8	,574
	Based on Median and with adjusted df	,707	3	3,123	,607
	Based on trimmed mean	4,974	3	8	,031

nilai sig > 0,05 maka data homogen.

Uji One Way Anova

ANOVA

	Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	37254,220	3	12418,073	1,413	,309
Within Groups	70313,340	8	8789,168		
Total	107567,560	11			

nilai sig > 0,05 maka dapat disimpulkan tidak ada perbedaan nyata berat miselium dari pemberian perlakuan yang berbeda.

Lampiran 4. Analisis data statistika spss biomassa kitosan

Uji Normalitas

	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	Df	Sig.
Perlakuan	,250	12	,037	,816	12	,014
ulangan	,213	12	,139	,811	12	,012

a. Lilliefors Significance Correction

nilai sig > 0,05 maka data terdistribusi normal.

Uji Homogenitas

		Levene Statistic	df1	df2	Sig.
biomassa	Based on Mean	,786	3	8	,535
	Based on Median	,160	3	8	,920
	Based on Median and with adjusted df	,160	3	5,447	,919
	Based on trimmed mean	,713	3	8	,571

nilai sig > 0,05 maka data homogen.

Uji *One Way Anova*

ANOVA


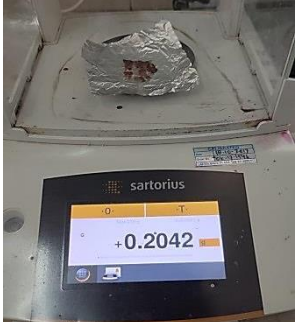
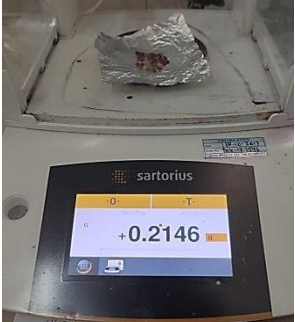



biomassa


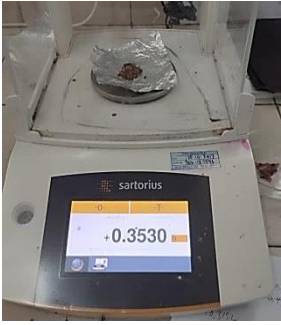

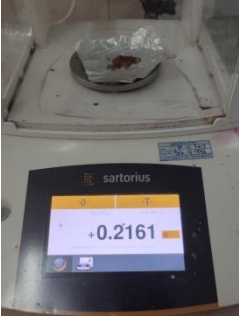

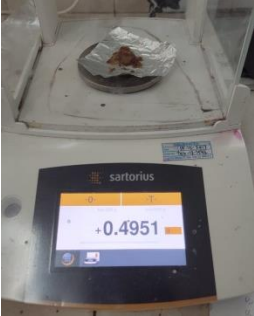
	Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	136,589	3	45,530	1,688	,246
Within Groups	215,720	8	26,965		
Total	352,309	11			

nilai sig > 0,05 maka dapat disimpulkan tidak ada perbedaan nyata berat kitosan dari pemberian perlakuan yang berbeda.

Lampiran 5. Hasil biomassa Kering Miselium Jamur *Rhizopus oryzae*










Perlakuan	Ulangan			Total (mg/ml)	Rata-rata (mg/ml)
	1	2	3		
0%	212,5	204,2	214,6	631,3	210,4
60%	104	163,7	287,4	555,1	185
80%	276,3	353	259,1	888,4	296,1
100%	216,1	240,5	495,1	951,7	517,2

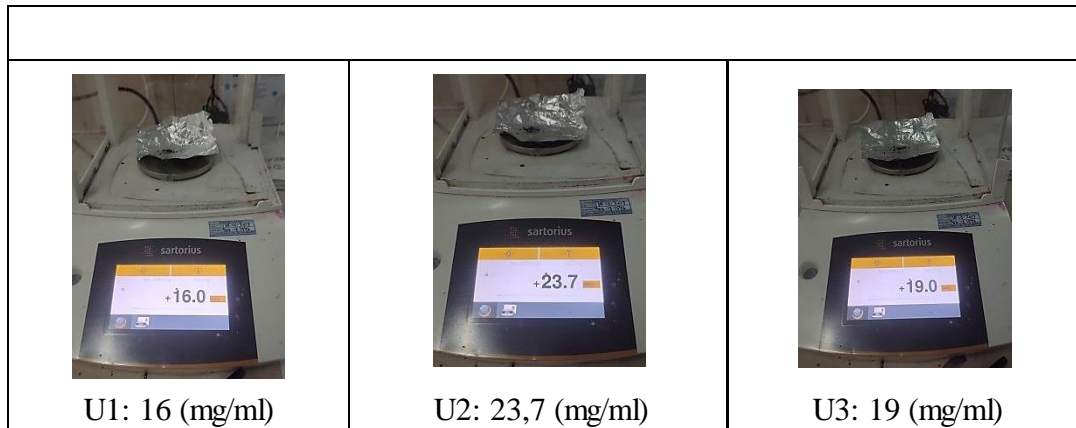
Perlakuan kontrol (PDB)		
Ulangan 1	Ulangan 2	Ulangan 3
 <p>U1: 212,5 (mg/ml)</p>	 <p>U2: 204,2 (mg/ml)</p>	 <p>U3: 214,6 (mg/ml)</p>
Perlakuan 60%		
 <p>U1: 104 (mg/ml)</p>	 <p>U2: 163,7 (mg/ml)</p>	 <p>U3: 287,4 (mg/ml)</p>

Perlakuan 80%		
		
U1: 276,3 (mg/ml)	U2: 353 (mg/ml)	U3: 259,1 (mg/ml)
Perlakuan 100%		
		
U1: 216,1 (mg/ml)	U2: 240,5 (mg/ml)	U3: 495,1 (mg/ml)

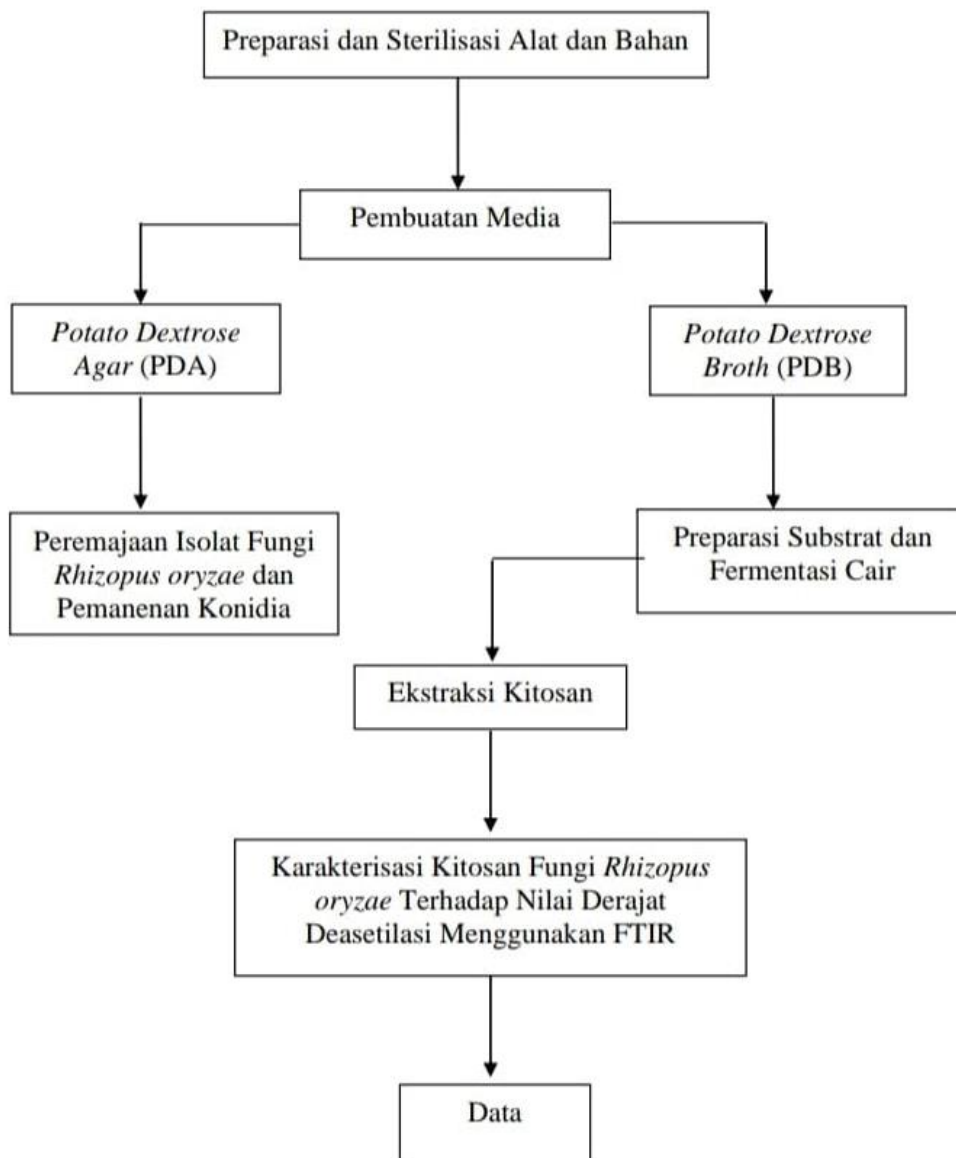
Lampiran 6. Hasil biomassa Kering Kitosan Jamur *Rhizopus oryzae*

Perlakuan	Ulangan			Total (mg/ml)	Rata-rata (mg/ml)
	1	2	3		
0%	8,2	10,2	15,3	33,7	11,2
60%	20,7	10,6	9,9	41,2	13,7
80%	11,2	24,1	19,6	54,9	18,3
100%	16	23,7	19	58,7	19,5

Perlakuan kontrol (PDB)		
Ulangan 1	Ulangan 2	Ulangan 3
		
U1: 8,2 (mg/ml)	U2: 10,2 (mg/ml)	U3: 15,3 (mg/ml)
Perlakuan 60%		
		
U1: 20,7 (mg/ml)	U2: 10,6 (mg/ml)	U3: 9,9 (mg/ml)
Perlakuan 80%		
		
U1: 11,2 (mg/ml)	U2: 24,1 (mg/ml)	U3: 19,6 (mg/ml)
Perlakuan 100%		











Lampiran 7. Alur Penelitian


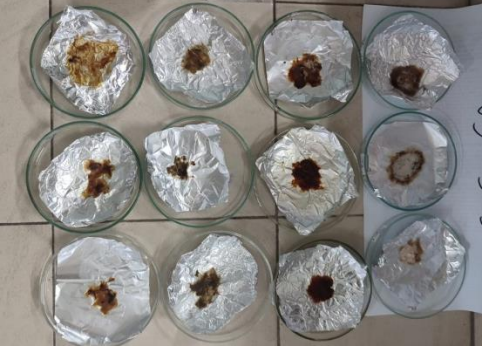
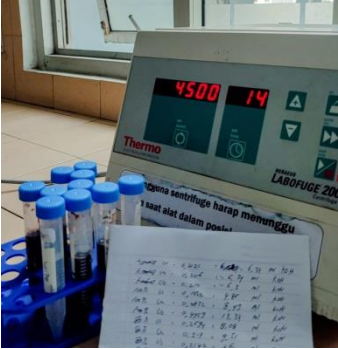



Lampiran 8. Kegiatan penelitian

Kegiatan	Keterangan
	<p>Pembuatan media PDA</p>
	<p>Pembuatan media PDB</p>
	<p>Peremajaan isolat jamur <i>Rhizopus oryzae</i></p>
	<p>Isolat jamur <i>Rhizopus oryzae</i> berumur 0 hari</p>

 A petri dish containing a white, fuzzy mold culture on a dark agar surface. A small white label with the handwritten text "8/19/15" is attached to the bottom edge of the dish.	<p>Isolat berumur 7 hari</p>
 A person wearing a light blue lab coat, a black face mask, and white gloves is working in a biosafety cabinet. They are using a pipette to transfer liquid into a small container.	<p>Pemanenan spora</p>
 A microscopic view of spores, showing several large, spherical spores with long, thin, hair-like structures (sterigmata) extending from them. The spores are arranged in a cluster.	<p>Penghitungan kerapatan spora</p>
 A collection of approximately ten green apples, some of which are heavily damaged and rotting, showing dark brown and black spots on their surfaces.	<p>Limbah buah apel manalagi</p>

	<p>Pembuatan sumber nitrogen</p>
	<p>Pembuatan sumber karbon dari limbah apel manalagi</p>
	<p>Inokulasi spora ke substrat sumber karbon ekstrak limbah apel manalagi</p>
	<p>Fermentasi cair selama 3 hari pada inkubator shaker</p>

 A photograph showing several petri dishes arranged in a grid. Each dish contains a circular piece of white paper with a small amount of brown, fuzzy fungal mycelium growing on it.	<p>Miselium jamur</p>
 A photograph showing several petri dishes arranged in a grid. Each dish contains a circular piece of white paper with a small amount of dark brown, dried fungal mycelium.	<p>Miselium jamur setelah di oven hingga berat kering konstan</p>
 A photograph showing a Thermo Scientific centrifuge machine. The digital display shows '4500' and '14'. In the foreground, there are several blue vials in a rack. A handwritten note is visible in front of the machine.	<p>Ekstraksi kitin dengan penambahan KOH dan asam asetat</p>
 A photograph showing four clear plastic bags containing a fine, light-colored powder. The bags are labeled with handwritten text: 'kontrol', '60%', '100%', and '80%'.	<p>Kitosan</p>

Lampiran 9. Perhitungan haemocytometer

Kotak 1 = 52

Kotak 2 = 34

Kotak 3 = 78

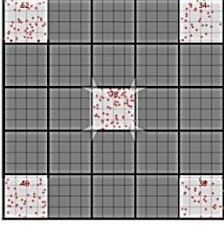
Kotak 4 = 46

Kotak 5 = 38

Jumlah sel = $248 \times 1000 \times 1 \times 0,05 \times 1000$

Jumlah sel = 12.400.000 ($1,240 \times 10^7$)

Neubauer yang Ditingkatkan

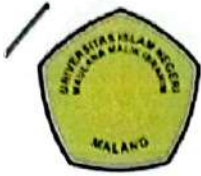


Nama Contoh _____

Faktor Pengenceran 1 _____

Kedalaman Ruang 100 μm

$1,240 \times 10^7$ sel/mL



KEMENTERIAN AGAMA
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM
MALANG

Jalan Gajayana Nomor 50, Telepon (0341)551354, Fax. (0341) 572533
Website: <http://www.uin-malang.ac.id> Email: info@uin-malang.ac.id

JURNAL BIMBINGAN SKRIPSI/TESIS/DISERTASI

IDENTITAS MAHASISWA

NIM : 19620082
Nama : Alif Putra Ardiansya
Fakultas : Sains dan Teknologi
Program Studi : Biologi
Dosen Pembimbing : Prilya Dewi Fitriasari, M.Sc
Dr. Umayyatus Syarifah, M.A
Judul Laporan : Optimalisasi Dan Karakterisasi Kitosan Jamur *Rhizopus Oryzae*
Menggunakan Substrat Limbah Apel Sebagai Sumber Karbon

IDENTITAS BIMBINGAN

No.	Tanggal	Nama Pembimbing	Deskripsi Konsultasi	Tahun Akademik	Status
1.	05 September 2022	PRILYA DEWI FITRIASARI, M.Sc	Penentuan Judul Skripsi	2022/2023 Ganjil	Sudah Dikoreksi
2.	23 September 2022	PRILYA DEWI FITRIASARI, M.Sc	Penentuan judul skripsi sementara: Penentuan rumusan masalah	2022/2023 Ganjil	Sudah Dikoreksi
3.	11 November 2022	PRILYA DEWI FITRIASARI, M.Sc	Perubahan tema skripsi menjadi karakterisasi dan optimalisasi jamur kitosan	2023/2024 Genap	Sudah Dikoreksi
4.	12 Januari 2023	PRILYA DEWI FITRIASARI, M.Sc	-Penentuan judul skripsi "Karakterisasi dan Optimalisasi Kitosan Jamur <i>Aspergillus niger</i> dan <i>Rhizopus oryzae</i> Menggunakan Ekstrak Limbah Ampas Apel - Konsultasi BAB 1,2 , dan 3	2023/2024 Ganjil	Sudah Dikoreksi
5.	21 Maret 2023	PRILYA DEWI FITRIASARI, M.Sc	Konsultasi BAB 1, 2, dan 3 dan ACC	2023/2024 Genap	Sudah Dikoreksi



KEMENTERIAN AGAMA
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM
MALANG

Jalan Gajayana Nomor 50, Telepon (0341)551354, Fax. (0341) 572533
Website: <http://www.uin-malang.ac.id> Email: info@uin-malang.ac.id

6.	28 Maret 2023	Dr. UMAIYATUS SYARIFAH, MA	Bimbingan ayat integrasi Al-Quran bab 1	2023/2024 Genap	Sudah Dikoreksi
7.	29 Maret 2023	Dr. UMAIYATUS SYARIFAH, MA	Konsultasi ayat dan hadis integrasi di bab 1 dan 2	2023/2024 Genap	Sudah Dikoreksi
8.	04 April 2023	Dr. UMAIYATUS SYARIFAH, MA	Revisi Ayat bab 1 dan bab 2	2023/2024 Genap	Sudah Dikoreksi
9.	06 April 2023	Dr. UMAIYATUS SYARIFAH, MA	ACC integrasi ayat di bab 1 dan bab 2	2023/2024 Genap	Sudah Dikoreksi
10.	04 September 2023	PRILYA DEWI FITRIASARI, M.Sc	Bimbingan Hasil Penelitian	2023/2024 Ganjil	Sudah Dikoreksi
11.	29 September 2023	Dr. UMAIYATUS SYARIFAH, MA	Konsultasi Integrasi ayat Bab I, II, dan IV	2023/2024 Ganjil	Sudah Dikoreksi
12.	02 Oktober 2023	PRILYA DEWI FITRIASARI, M.Sc	Konsultasi Bab IV	2023/2024 Ganjil	Sudah Dikoreksi
13.	02 Oktober 2023	Dr. UMAIYATUS SYARIFAH, MA	acc integrasi Bab I, II, dan IV	2023/2024 Ganjil	Sudah Dikoreksi

Tekah disetujui
Untuk mengajukan ujian Skripsi

Malang, 16 Oktober 2023

Dosen Pembimbing I

Prilya Dewi Fitriasari, M.Sc
NIP. 19900428 202321 2 037

Dosen Pembimbing II

Dr. Umayatus Syarifah, MA
NIP. 19820925 200901 2 005



Ketua Program Studi Biologi

Dr. Evika Sandi Savitri, M.P
NIP. 19741018 200312 2 002



KEMENTERIAN AGAMA
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM MALANG
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
PROGRAM STUDI BIOLOGI

Jl. Gajayana No. 50 Malang 65144 Telp./ Faks. (0341) 558933
Website: <http://biologi.uin-malang.ac.id> Email: biologi@uin-malang.ac.id

Form Checklist Plagiasi

Nama : Alif Putra Ardiansya
NIM : 19620082
Judul : Optimalisasi dan Karakterisasi Kitosan Jamur *Rhizopus oryzae*
Menggunakan Substrat Limbah Apel Sebagai Sumber Karbon

No	Tim Check plagiasi	Skor Plagiasi	TTD
1	Azizatur Rohmah, M.Sc		
2	Berry Fakhry Hanifa, M.Sc		
3	Bayu Agung Prahardika, M.Si	246	
4	Tyas Nyonita Punjungsari, M.Sc		
5	Maharani Retna Duhita, M.Sc., PhD.Med.Sc		

Mengetahui,
Ketua Program Studi Biologi

Evika Sandi Savitri, M.P
NIP. 19741018 200312 2 002

