

KOMBINASI PERENDAMAN DALAM NATRIUM HIDROKSIDA DAN APLIKASI KITIN DEASETILASE TERHADAP KITIN KULIT UDANG UNTUK MENGHASILKAN KITOSAN DENGAN BERAT MOLEKUL RENDAH

Combination of Soaking in Sodium Hydroxide and Chitin Deacetylase Application on Shrimp Chitin in Producing Low Molecular Weight Chitosan

Aswita Emmawati¹, Betty Sri Laksmi Jenie², Yusro Nuri Fawzya³

1) Laboratorium Mikrobiologi Prop-am Studi Teknologi Hasil Pertanian, Fakultas Pertanian Universitas Mulawarman, Jl. Tanah Grogot Gunung Kelua Samarinda 75123. 2) Fakultas Teknologi Pertanian Institut Pertanian Bogor, 3) Pusat Riset Pengolahan Produk dan Sosial Ekonomi Kelautan dan Perikanan Jakarta

Received 10 July 2007 accepted 27 July 2007

ABSTRACT

Thermostable chitin deacetylase produced by *Bacillus* K29-14 was used to produce chitosan from shrimp chitin. Chemical treatment before the enzyme application on chitin was conducted by soaking it in 60 % NaOH solution, which led chitin to swell and change the crystalline structure in order to allow the enzyme to penetrate and deacetylate it. The enzyme had performed high deacetylation degree (72-99 %) following soaking at 60-75 °C for 60-180 min. and then incubating with the enzyme at 55 °C for 24 hours. Deacetylation degree increased when soaking temperature in NaOH was increased or soaking time in NaOH was length, as well as by addition of enzyme. The chitosan had low molecular weight and viscosity, indicated that depolymerization was occurred, so that resulted oligomer chitosan.

Keywords: chitin, chitosan, ~~chitosan~~ oligosaccharide, chitin deacetylase

PENDAHULUAN

Kitin merupakan polimer terbanyak kedua di alam, setelah selulosa. Secara luas, kitin terdapat sebagai komponen eksoskeleton *Crustacea* (seperti udang dan kepiting), *Mollusca*, serangga, arthropoda, cacing, dan dinding sel fungi. Kitin bersifat tidak larut air dan hanya dapat larut pada asam pekat, sehingga sulit diaplikasikan untuk berbagai keperluan praktis.

Deasetilasi kitin akan menghasilkan kitosan, yang dapat larut dalam asam encer, dan dalam bentuk oligomernya, dapat larut air. Pemanfaatan kitosan sangat luas, sebagai antibakteri, *edible coating*, film yang mudah terurai (*biodegradable*), untuk penyulingan air, penjernihan dan deasidifikasi sari buah, peng-emulsi, pengental, penstabil, dan untuk enkapsulasi. Kitosan juga dapat berfungsi sebagai serat makanan, menurunkan kadar kolesterol dan absorpsi lipid serta sebagai prebiotik (Shahidi *et al.*, 1999).

Produksi kitosan dilakukan di industri secara termokimia menggunakan alkali kuat pada suhu tinggi. Hasil dari proses ini belum sepenuhnya memuaskan sebab kualitas kitosan yang dihasilkan masih beragam dalam berat molekul, viskositas dan derajat deasetilasi. Selain itu, proses termokimia juga membutuhkan energi dalam jumlah besar untuk menghasilkan dan mempertahankan suhu tinggi serta menghasilkan limbah dan produk samping berupa alkali dengan konsentrasi tinggi yang berpotensi toksik bagi lingkungan.

Sebagai alternatif, proses deasetilasi dapat dilakukan secara enzimatis menggunakan kitin deasetilase (CDA). Enzim ini ditemukan pada bakteri, kapang, kamir, cacing dan serangga yang mempunyai kandungan kitosan di dinding sel atau di eksoskeletonnya. Proses enzimatis diharapkan akan lebih mudah dikendalikan, lebih efisien, spesifik dan meminimalkan produk samping. Sejumlah penelitian telah dilakukan

untuk mengisolasi, mempurifikasi dan mengkarakterisasi kitin deasetilase dari sejumlah mikroba. Aplikasi enzim ini pada berbagai jenis dan kondisi substrat masih memberikan hasil yang beragam dengan parameter hasil yang belum memuaskan (Tsigos *et al.*, 2000).

Untuk memperbaiki kualitas kitosan yang dihasilkan melalui proses enzimatik, dilakukan pemberian perlakuan awal terhadap substrat agar enzim dapat lebih mudah berpenetrasi dan beraksi pada substrat. Beberapa perlakuan awal yang telah dibenarkan adalah berupa inkubasi awal dengan alkali atau asam kuat dalam waktu lama, yang menyerupai proses termokimia secara komersial, atau perlakuan fisik seperti pemaparan pada suhu tinggi, tekanan tinggi, atau proses penggilingan. Perlakuan awal terhadap substrat secara kimia dapat menghasilkan kitosan berkualitas lebih baik dengan derajat deasetilasi yang lebih tinggi, demikian pula perlakuan awal dengan suhu dan tekanan tinggi, sementara pengurangan ukuran seperti penggi-lingan sejauh ini tidak memberikan hasil yang memuaskan (Kolo-dziejska *et al.*, 2000; Mukherjee, 2002).

BAHAN DAN METODE

Kultur dan Media

Produksi enzim dilakukan dengan menggunakan kultur *Bacillus* K29-14 yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi dan Biokimia, Pusat Penelitian Bioteknologi IPB, yang memproduksi enzim secara optimal pada suhu 55 °C, pH 8,0 (Rahayu, 2000). Media produksi enzim mengacu pada komposisi media dari Sakai (1998), yaitu (NH₄)₂SO₄ 0,7 %, K₂HPO₄ 0,1 %, NaCl 0,1 %, MgSO₄.7H₂O 0,01 %, ekstrak khamir 0,05 %, bacto trypton 0,1 %, koloidal khitin 0,5 %, ditambah dengan 1 % kitin dari kulit punggung udang.

Substrat

Kitin kulit udang diperoleh dari Dinas Perikanan Cirebon, Jawa Barat. Koloidal kitin dibuat dari kitin *practical grade* (Sigma Chemical Co) dengan metode Arnold dan Solomon (1986). Glikol kitin dibuat dari glikol kitosan (Sigma Chemical Co) dengan metode Trudel dan Asselin (1989).

Pereaksi Kimia

Standar *Bovine Serum Albumin* (BSA), glikol kitosan dan standar glukosamin diperoleh dari Sigma Chemical Co. Indol, HCl dan bahan-bahan kimia lain yang digunakan dalam produksi dan penentuan aktivitas enzim diperoleh dari Merck.

Produksi Kitin Deasetilase

Kultur bakteri difermentasi dalam media produksi enzim selama 2 hari pada 55 °C. Enzim dipanen dengan cara sentrifugasi pada 8000 rpm selama 15 menit pada suhu 4 °C untuk memisahkan dari sel bakteri dan sisa media. Ke dalam supernatan ditambahkan amonium sulfat sampai kejenuhan 80 % sambil distirrer. Campuran diendapkan semalam pada suhu 4 °C lalu disentrifugasi pada 8000 rpm selama 15 menit. Filtrat dilarutkan dalam 0,02 M buffer borat pH 8 dan disimpan pada suhu 4 °C. Kadar protein enzim diuji dengan metode Lowry (Cope-land, 2000) menggunakan standar BSA dan aktivitas enzim ditentukan dengan metode Tokuyasu (1996).

Perendaman dalam NaOH 60 %

Tepung kitin direndam dalam NaOH 60 % (1:10 w/w) pada berbagai suhu dan waktu. Perendaman dilakukan pada suhu 60 dan 75 °C. Pada suhu 60 °C, waktu perendaman kitin adalah 60, 90, 120 dan 180 menit sedangkan pada suhu 75 °C, waktu perendaman adalah 30 dan 60 menit. Kitin yang telah direndam dibilas dengan air sampai pH netral dan dikeringkan pada suhu 60 °C selama 1 malam kemudian ditentukan derajat deasetilasinya.

Deasetilasi enzimatik

Kitin hasil perendaman dengan NaOH 60 % dilarutkan dalam asam asetat 0,1M. Sejumlah 10 mL larutan diinkubasi dengan 10, 20 dan 30 mU ekstrak enzim selama 24 jam. Kitin yang tidak larut disaring dan ditimbang. Kitosan yang dihasilkan dianalisis derajat deasetilasi, viskositas dan berat molekul. Derajat deasetilasi ditentukan dengan *First Derivative UV* (FDUV) *Absorbance* (Muzzarelli, 1997) menggunakan spektrometer Perkin Elmer Lambda 25 UV/VIS. Viskositas ditentukan dengan *Ubbelohde dilution viscometer* dengan pelarut asam asetat 0,1 M / sodium asetat 0,25 M dan berat

molekul ditentukan dari viskositas intrinsik dengan persamaan Mark-Houwink (Hwang, 1997).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Deasetilasi Kimia

Perendaman dalam larutan NaOH bertujuan untuk mengubah konformasi kristalin kitin yang rapat sehingga enzim lebih mudah berpenetrasi untuk mendeasetilasi polimer kitin (Martinou *et al.*, 1995). Akan tetapi perendaman dalam NaOH akan meningkatkan derajat deasetilasi dan mengakibatkan terjadinya depolimerisasi. Oleh karena itu perendaman dilakukan pada suhu yang tidak terlalu tinggi dan waktu yang singkat.

Konsentrasi NaOH yang digunakan adalah 60 %. Konsentrasi NaOH akan mempengaruhi laju deasetilasi. Semakin tinggi konsentrasi NaOH yang digunakan, laju deasetilasi akan semakin cepat. Akan tetapi konsentrasi NaOH yang tinggi juga akan meningkatkan laju depolimerisasi (No dan Meyer, 1997). Chang *et al.* (1997) menemukan bahwa laju deasetilasi optimum akan diperoleh jika konsentrasi NaOH yang digunakan sebesar 60 %. Konsentrasi 60 % juga menghasilkan deasetilasi lebih baik jika deasetilasi akan dilakukan pada suhu yang rendah.

Perendaman dalam alkali dilakukan terhadap sampel kitin dalam bentuk tepung. Penepungan dilakukan agar proses deasetilasi dapat berlangsung lebih cepat dan sempurna, karena semakin luasnya permukaan yang dapat diakses oleh larutan alkali (No dan Meyers, 1997). Deasetilasi akan berlangsung mulai dari permukaan kitin, lalu memasuki wilayah amorf dari kitin dan secara bertahap deasetilasi terjadi sampai ke wilayah kristalin kitin (Chang *et al.*, 1997).

Rasio larutan NaOH terhadap kitin yang digunakan adalah sebesar 1:10 b/v. Menurut No dan Meyer (1997), rasio 1:10 menghasilkan peningkatan laju deasetilasi lebih cepat, akan tetapi Chang *et al.* (1997) menyatakan bahwa pengaruh rasio larutan NaOH terhadap kitin tidak signifikan pada laju deasetilasi.

Derajat deasetilasi menunjukkan peningkatan dengan meningkatnya suhu dan waktu perendaman (Tabel 1). Peningkatan

derajat deasetilasi yang signifikan terjadi setelah perendaman selama 180 menit pada 60 °C (97,0 %) dan 60 menit pada 75 °C (96,0 %). Hasil serupa juga diperoleh oleh Kolodziejska *et al.* (2000) yang menyatakan derajat deasetilasi produk kitosannya yang direndam dengan NaOH 50 % pada suhu 60 °C selama 90 menit adalah 68 % dan 76 % untuk perendaman selama 180 menit. Perbedaan ini mungkin karena konsentrasi NaOH yang digunakan lebih rendah (50 %) dan metode pengukuran yang berbeda, yaitu menggunakan titrasi potensiometri. Kondisi awal kitin, seperti derajat deasetilasi awalnya, juga berpengaruh terhadap perbedaan derajat deasetilasi akhir. Dalam hal ini, tidak disebutkan kondisi awal kitin yang digunakan, sementara dalam penelitian ini, digunakan kitin dengan derajat deasetilasi awal sudah cukup besar, yaitu 42,2 %.

Deasetilasi Enzimatis

Setelah dicuci dan dikeringkan, kitosan pasca perlakuan kimia dilarutkan dalam asam asetat dengan konsentrasi 1 % kitosan dalam 0,1 M asam asetat. Nilai pH larutan kitosan ini dibuat menjadi 6 dengan penambahan 0,25 M sodium asetat. Selanjutnya larutan inilah yang akan diinkubasi bersama enzim.

Penambahan 0,25 M sodium asetat diperlukan untuk peningkatan pH larutan. Larutan kitosan dalam 0,1 M asam asetat akan memiliki pH di sekitar 4, sementara kebanyakan protein akan mengendap pada pH 4, demikian juga CDA yang digunakan dalam penelitian ini. Peningkatan pH juga diperlukan agar enzim dapat bekerja lebih aktif. Peningkatan pH hanya diusahakan sampai pH 6 walaupun CDA yang digunakan bekerja optimum pada pH 8, karena pH 6 merupakan pH optimum kelarutan kitosan. Pada pH yang lebih tinggi, kitosan yang telah dilarutkan akan mengendap kembali. Penambahan sodium asetat diketahui tidak menghambat aktivitas CDA dari *Bacillus* K29-14 dan pada pH 6, CDA dari *Bacillus* K29-14 masih cukup aktif (Rahayu, 2000).

Deasetilasi enzimatis dilakukan terhadap larutan kitosan bukan tepung kitosan. Dalam bentuk larutan, deasetilasi akan berlangsung lebih mudah, reaksi akan terjadi lebih homogen di setiap bagian larutan

karena kelarutan yang seragam. Kolodziejaska et al. (2000) yang melakukan deasetilasi enzimatis terhadap kitin/kitosan dalam bentuk larutan dapat mencapai derajat deasetilasi 88-99 %. Sebaliknya, deasetilasi enzimatis terhadap kitin dalam bentuk kristalin dan amorf hanya sedikit meningkatkan derajat deasetilasi, yaitu masing-masing 0,5 dan 9,5 % dengan CDA asal *M. rouxii* (Martinou et al., 1995) serta 0,5 dan 4,5 % dengan ϵ DA asal *C. lindemuthianum* (Tsigos dan Bouriotis, 1995). Bentuk kristalin lebih rapat sehingga sulit bagi enzim untuk dapat berpenetrasi ke dalam kitin. Bentuk s.m.o.d yang lebih renggang lebih memungkinkan untuk reaksi enzim tetapi kenaikan derajat deasetilasinya juga masih rendah.

Enzim CDA yang digunakan merupakan hasil pengendapan sulfat. Jumlah yang ditambahkan adalah 10, 20 dan 30 mU per 10 ml 1 % larutan kitosan. Kolodziejaska et al. (2000) menggunakan 40 mU per 1 mL larutan kitosan, yang masih berupa ekstrak kasar.

Proses deasetilasi enzimatis meningkatkan derajat deasetilasi 5-30 %, tergantung pada derajat deasetilasi awal (Tabel 1). Semakin tinggi derajat deasetilasi awal, semakin kecil peningkatan derajat deasetilasi yang terjadi. Derajat deasetilasi di atas 90 % hanya dapat dicapai pada sampel dengan derajat deasetilasi awal di atas 75 %. Diduga

bahwa semakin lama perlakuan awal secara kimia yang diberikan pada sampel, konformasi sampel akan semakin merenggang sehingga enzim dapat lebih mudah mendeasetilasi.

Derajat deasetilasi awal yang rendah juga menunjukkan masih banyaknya jumlah residu asetil yang belum terpotong. Lebih banyak residu asetil menunjukkan lebih banyak substrat yang tersedia untuk reaksi enzim. Sesuai dengan kinetika enzim, semakin banyak substrat yang tersedia, laju reaksi akan semakin cepat dan akan menurun jika jumlah substrat berkurang. Diduga hal inilah yang menyebabkan peningkatan derajat deasetilasi setelah deasetilasi enzimatis terjadi lebih tinggi pada kitosan dengan derajat deasetilasi awal lebih rendah daripada kitosan dengan derajat deasetilasi awal relatif lebih tinggi.

Peningkatan jumlah enzim yang ditambahkan akan meningkatkan derajat deasetilasi kecuali untuk kitosan hasil perendaman pada 75 °C selama 60 menit dalam NaOH. Meningkatnya jumlah enzim yang ditambahkan akan meningkatkan aktivitasnya sehingga derajat deasetilasi hasil enzimatis akan lebih tinggi. Peningkatan yang kecil ini mungkin disebabkan oleh kisaran penambahan enzim yang kecil (10, 20 dan 30 mU) sehingga pengaruhnya tidak terlalu terlihat.

Table 1. Deacetylation degree of chitosan after chemical deacetylation in sodium hydroxide of 60 % followed by enzymatic deacetylation by chitin deacetylase from *Bacillus* K-29-14

Soaking in NaOH 60 %		Deacetylation degree (%)			
Temp.(°C)	Time (min.)	After soaking	After incubation in enzyme solution for 24 h		
			10 mU	20 mU	30 mU
60	60	53.4	78.3	85.0	91.1
	90	80.3	88.5	89.9	91.8
	120	87.8	91.7	91.4	92.0
	180	97.0	98.2	98.6	99.9
75	30	56.8	72.8	73.9	77.7
	60	96.0	99.1	98.1	97.5

Viskositas dan Berat Molekul

Nilai viskositas dinyatakan dalam viskositas spesifik, kinematik dan intrinsik. Viskositas spesifik ditentukan dengan membandingkan secara langsung kecepatan aliran

suatu larutan dengan pelarutnya. Viskositas kinematik diperoleh dengan memperhitungkan densitas larutan. Baik viskositas spesifik maupun kinematik dipengaruhi oleh konsentrasi larutan.

Nilai viskositas intrinsik dapat menunjukkan secara lebih jelas pengaruh perlakuan kimia dan enzimatis daripada viskositas spesifik dan kinematik. Viskositas intrinsik menunjukkan kemampuan polimer untuk meningkatkan viskositas larutan. Viskositas intrinsik diperoleh dari kurva η_{sp}/C yang diekstrapolasi hingga C mendekati 0, sehingga meniadakan pengaruh konsentrasi (Hwang *et al.*, 1997). Nilai konsentrasi larutan kitosan yang sangat mempengaruhi viskositas spesifik dan kinematik tidak berpengaruh pada viskositas intrinsik.

Untuk mengamati hubungan antara perlakuan perendaman dengan NaOH terhadap viskositas dan berat molekul, dipilih dua sampel yaitu kitosan hasil perendaman pada suhu 60 °C dengan waktu 90 dan 180 menit. Kedua sampel dipilih karena derajat deasetilasi yang tinggi (di atas 80 %) dan adanya perbedaan yang signifikan antara keduanya dalam hal derajat deasetilasi dan kelarutan.

Nilai viskositas intrinsik akan meningkat dengan semakin tingginya derajat deasetilasi (Tabel 2). Nilai viskositas intrinsik dipengaruhi oleh derajat deasetilasi, konsentrasi, berat molekul, kekuatan ion, pH dan suhu saat pengukuran (Dunn *et al.*,

1997). Wang (1991) menunjukkan bahwa pada kitosan dengan berat molekul sama, viskositas intrinsik akan meningkat dengan meningkatnya derajat deasetilasi. Diduga hal ini berhubungan dengan efek kitosan yang bersifat sebagai polielektrolit dalam larutan. Kitosan merupakan polikation yang di dalam larutan akan bertindak sebagai polielektrolit. Muatan positif kitosan berasal dari residu aminanya. Semakin tinggi derajat deasetilasi, residu amina semakin banyak, muatan positif kitosan juga akan semakin banyak. Di dalam larutan, tingginya muatan positif akan menghasilkan gaya tolak menolak, yang akan membuat polimer kitosan yang sebelumnya berbentuk gulungan, membuka menjadi rantai lurus. Sebagai akibatnya, viskositas larutan akan meningkat.

Viskositas intrinsik akan meningkat dengan meningkatnya berat molekul (Tabel 2). Berat molekul berhubungan dengan derajat polimerisasi. Polimer rantai lurus seperti kitosan akan menunjukkan peningkatan densitas jika derajat polimerisasi bertambah. Dengan demikian, viskositas intrinsik juga akan meningkat. Wang *et al.* (1991) menunjukkan hubungan linier antara nilai log viskositas intrinsik dengan nilai log berat molekul, untuk larutan kitosan dengan derajat deasetilasi sama.

Tabl 2. Characteristic of chitosan produced by combination of chemical and enzymatic deacetylation

Condition	Chemical deacetylation			After enzymatic deacetylation following chemical deacetylation		
	Deacetylation degree	Intrinsic viscosity	Mol. Weight ($\times 10^3$ Da)	Deacetylation degree (%)	Intrinsic viscosity	Mot. Weight ($\times 10^3$ Da)
Soaking in NaOH of 60 % at 60 °C for 90 min.	80.3%	31.7 mL g ⁻¹	45.26	88.5 %	3.6 mL g ⁻¹	4.25
Soaking in NaOH of 60 % at 60 °C for 180 min.	97.0%	355.6 mL g ⁻¹	615.73	98.2%	11.4 mL g ⁻¹	15.09

Note: Enzymatic deacetylation by 10 mU of chitin deacetylase for 24 h

Deasetilasi enzimatis meningkatkan derajat deasetilasi kitosan tetapi menurunkan viskositas intrinsik (Tabel 2). Penurunan viskositas hanya mungkin terjadi jika selama inkubasi dengan enzim terjadi degradasi rantai polimer atau depolimerisasi. Dugaan ini dikonfirmasi oleh nilai berat molekul

yang juga menurun selama deasetilasi enzimatis.

Penurunan viskositas setelah deasetilasi enzimatis juga dilaporkan oleh Kolodziejska *et al.* (2000). Viskositas larutan kitosan menurun sebesar satu log setelah inkubasi dengan enzim selama 16 jam. Akan tetapi Kolodziejska *et al.* (2000) tidak

melakukan penentuan berat molekul sehingga tidak dapat dilakukan perbandingan. Depolimerisasi diduga karena adanya enzim-enzim pendegradasi kitin dan kitosan yang lain di dalam ekstrak enzim CDA dari *Bacillus* K29-14. Rahayu (2000) telah mengisolasi kitinase dari *Bacillus* K29-14 selain CDA dan mungkin juga terdapat kitosanase.

Penggunaan enzim yang telah dimurnikan sehingga hanya berisi CDA akan dapat meminimalkan terjadinya depolimerisasi dan menghasilkan kitosan dengan viskositas dan berat molekul lebih tinggi. Penelitian ini hanya melakukan pemurnian CDA dengan pengendapan menggunakan amonium sulfat. Dalam proses ini yang terjadi adalah pengendapan protein, sehingga semua enzim dan komponen protein lain yang terdapat dalam ekstrak kasar enzim akan terendapkan. Untuk memisahkan CDA dari enzim-enzim yang lain, harus dilakukan langkah pemurnian lebih lanjut, seperti dengan kromatografi atau dengan elektroforesis. Fraksi yang mempunyai aktivitas CDA tertinggi dapat diaplikasikan untuk deasetilasi enzimatis kitin.

Variasi waktu dan lama perendaman alkali terhadap kitin dapat menghasilkan kitosan dengan derajat deasetilasi yang berbeda-beda. Proses yang dipilih akan tergantung pada tujuan aplikasi kitosan. Masing-masing bentuk aplikasi membutuhkan kitosan dengan karakteristik yang berbeda-beda. Kitosan dengan derajat deasetilasi tinggi, lebih dari 85 %, dan berat molekul rendah dibutuhkan sebagai antibakteri, antifungi, antioksidan, antitumor dan *immunoenhancing*. Untuk aplikasi sebagai membran dan pengemas dibutuhkan kitosan dengan derajat deasetilasi sekitar 70 % dan berat molekul tinggi.

Penelitian ini menghasilkan kitosan dengan berat molekul rendah. Beberapa penelitian menunjukkan bahwa kitosan dengan berat molekul rendah mempunyai potensi lebih besar sebagai antibakteri, antifungi, antidiabetes, hipokolesterolemik antioksidan atau antitumor, dengan demikian akan mempunyai manfaat lebih besar untuk diaplikasikan dalam pengolahan pangan hasil pertanian.

KESIMPULAN

Kombinasi deasetilasi kimia dan enzimatis akan meningkatkan derajat deasetilasi kitosan lebih tinggi daripada perlakuan kitin saja. Deasetilasi kimia meningkatkan derajat deasetilasi sebesar 6-55 %. Kombinasi deasetilasi kimia dan enzimatis akan meningkatkan derajat deasetilasi 16-58 %. Produk kitosan yang dihasilkan mempunyai derajat deasetilasi 77-99 %, viskositas intrinsik 3,6-11,4 mL g⁻¹ dan berat molekul 4,2x10³-11,1x10³ Da.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih disampaikan kepada Pusat Riset Pengolahan Produk dan Sosial Ekonomi Kelautan dan Perikanan Jakarta atas bantuan dana dan fasilitas selama penelitian.

DAFTAR PUSTAKA

- Arnold LD, Solomon NA (1986) Manual of Industrial Microbiology dan Biotechnology. Am Society for Microbiol.
- Chang KLB, Tsai G, Lee J, Fu W (1997) Heterogenous N-deacetylation of chitin in alkaline solution. Carbohydr Res 303: 327-332.
- Copeland RA (2000) Methods for Protein Analysis: A Practical Guide to Laboratory Protocols. Chapman and Hall, New York.
- Dunn ET, Grandmaison EW, Goosen MFA (1997) Applications and properties of chitosan. Dalam: Goosen MFA (ed) Applications of Chitin and Chitosan. Technomic Publ Co Inc, Basel.
- Hwang J, Hong S, Kim C (1997) Effect of molecular weight and NaCl concentration on dilute solution properties of chitosan. J Food Sci Nutr, 2: 1-5.
- Kolodziejaska I, Wojtasz-Pajak A, Ogonowska G, Sikorski ZE (2000) Deacetylation of chitin in a two-stage chemical and enzymatic process. Bul Sea Fisheries Inst 2(150): 15-24.

- Martinou A, Kafetzopoulos D, Bouriotis V (1995) Chitin deacetylation by enzymatic means: monitoring of deacetylation processes. *Carbohydr Res* 273: 235-242.
- Mukherjee DP (2002) Method for Producing Chitin or Chitosan. US Patent Application no 20020055629.9 May 2002.
- Muzzarelli RAA, Rochetti R, Stanic V, Weckx M (1997) Methods for the determination of the degree of acetylation of chitin and chitosan. *Dalam*: Muzzarelli RAA, Peter MG (ed) Chitin Handbook. European Chitin Soc, Grottamare.
- No HK, Meyers SP (1997) Preparation of chitin and chitosan. *Dalam*: Muzzarelli RAA, Peter MG (ed) Chitin Handbook. European Chitin Soc, Grottamare.
- Rahayu S (2000) Karakterisasi dan pemurnian enzim kitinase dan kitin deasetilase termostabil dari *Bacillus* sp. K29-14 asal Kawah Kamojang, Jawa Barat. Tesis Sekolah Pascasarjana IPB.
- Roberts GAF (1997) Determination of the degree of N-acetylation of chitin and chitosan. *Di Dalam* Muzzarelli RAA, Peter MG (ed) Chitin Handbook. European Chitin Soc, Grottamare.
- Sakai K, Yokota A, Kurokawa H, Wakayama M, Moriguchi M (1998) Purification and characterization of three thermostable endochitinase. *Appl Environ Microbiol* 64: 3397-3340.
- Shahidi F, Arachchi JKV, Jeon YJ (1999) Food applications of chitin and chitosans. *Trends in Food Sci Technol* 10:37-51.
- Tokuyasu, K, Ohnishi-Kameyama M, Hayashi K (1996) Purification and characterization of extracellular chitin deacetylation from *Colletotrichum lindemuthianum* Biosci Biotech Biochem 60: 1598-1603
- Trudel J, Asselin A (1989) Detection of chitinase activity with polyacrylamide gel electrophoresis. *Analytical Biochem*, 178: 362-366.
- Tsigos I, Bouriotis V (1995) Purification and characterization of chitin deacetylase from *Colletotrichum lindemuthianum*. *J Biol Chem*, 270: 26286-26291.
- Tsigos I, Martinou A, Kafetzopoulos D, Bouriotis V (2000) Chitin deacetylases: new, versatile tools in biotechnology. *TIBTECH* 18: 305-312.
- Wang W, Bo S, Li S, Qin W (1991) Determination of the Mark-Houwink equation for chitosans with different degrees of deacetylation. *Int J Biol Macromol* 13: 281-285.