



PENENTUAN SUHU DAN pH HIDROLISIS KITOSAN DARI CANGKANG KEONG SAWAH (*Pila ampullacea*) TERHADAP BERAT MOLEKUL HIDROLISATNYA

[Determination of Chitosan Hydrolysis Temperature and pH from Rice Field Snail Shell (*Pila ampullacea*) to the Molecular Weight of the Hydrolyzate]

Nurhaeni¹, Angriani Sambali^{1*}, Pasjan Satrimafitrah¹, Jusman¹

¹⁾ Jurusan Kimia, Fakultas MIPA, Universitas Tadulako, Palu
Jl. Soekarno Hatta Km.9, Kampus Bumi Tadulako Tondo Palu, Telp. 0451- 422611

^{*})Corresponding author: angrianisambali09@gmail.com(082292 129005)

Diterima 13 Desember 2018, Disetujui 27 Februari 2019

ABSTRACT

Research has been carried out on determining the temperature and pH of hydrolysis of chitosan from rice field snail shell (*Pila ampullacea*) to the molecular weight of the hydrolyzate using the α -amylase enzyme. This study aims to determine the best hydrolysis temperature and pH that can produce chitosan hydrolyzates with low molecular weight. Temperature variations used to hydrolyze chitosan from rice field snail shell include 30 °C, 40 °C, 50 °C, 60 °C and 70 °C. Whereas the hydrolysis pH applied to hydrolyze chitosan were 4.5; 5.0; 5.5; 6.0 and 6.5. Measurement of chitosan hydrolyzate molecular weight was carried out by applying the Mark-Houwink method and the observed parameter was the molecular weight of chitosan hydrolyzate. The results showed that the chitosan hydrolysis temperature was 50 °C and were able to reduce molecular weight to 14.488 g/mol. Whereas the most effective hydrolysis pH was pH 5.5 which decreased the molecular weight to 12.850 g / mol.

Keywords: Chitosan hydrolysate, rice field snail shell, α -amylase enzyme.

ABSTRAK

Telah dilakukan penelitian tentang penentuan suhu dan pH hidrolisis kitosan dari cangkang keong sawah (*Pila ampullacea*) terhadap berat molekul hidrolisatnya dengan menggunakan enzim α -amilase. Penelitian ini bertujuan untuk menentukan suhu dan pH hidrolisis terbaik yang dapat menghasilkan hidrolisat kitosan dengan berat molekul yang rendah. Variasi suhu yang digunakan untuk menghidrolisis kitosan dari keong sawah antara lain 30°C, 40°C, 50°C, 60°C dan 70°C. Sedangkan pH hidrolisis yang diterapkan untuk menghidrolisis kitosan dari cangkang keong sawah antara lain 4,5; 5,0; 5,5; 6,0 dan 6,5. Pengujian berat molekul hidrolisat kitosan dilakukan dengan menerapkan metode Mark-Houwink dan parameter yang diamati adalah berat molekul hidrolisat kitosan. Hasil penelitian menunjukkan bahwa suhu optimum hidrolisis kitosan yaitu suhu 50°C dan menurunkan berat molekul menjadi 14.488 g/mol. Sedangkan untuk pH optimum hidrolisis adalah pH 5,5 dan menurunkan berat molekul 12.850 g/mol.

Kata Kunci : hidrolisat kitosan, cangkang keong sawah, enzim α -amilase

LATAR BELAKANG

Keong sawah (*Pila ampullacea*) merupakan siput air tawar yang mudah dijumpai di sawah dan danau. Keong sawah memiliki warna cangkang hijau hingga hitam dengan bentuk yang mirip dengan siput *murbai* (keong mas). Keong sawah mengandung protein yang cukup tinggi, tetapi pemanfaatan keong sawah masih sebatas konsumsi oleh masyarakat. Di Indonesia, khususnya di daerah Sulawesi Tengah, keong sawah banyak ditemukan di sawah yang pada umumnya menjadi hama karena memakan batang padi yang baru ditanam sehingga mengganggu pertumbuhan padi. Selain menjadi hama, keong sawah juga belum dimanfaatkan secara maksimal.

Pemanfaatan keong terbatas pada konsumsi daging keong oleh sebagian masyarakat yang menyebabkan cangkangnya sangat melimpah dan mudah ditemukan. Hingga saat ini, limbah cangkang keong sawah lebih banyak diolah sebagai pakan ternak (unggas). Nasution *et al.* (2013) melaporkan bahwa cangkang keong sawah memiliki kandungan senyawa kitin yang selanjutnya dapat ditransformasi menjadi kitosan. Hasil penelitian Hendrawan (2011), menyatakan bahwa kitosan cangkang keong bakau (*Telescopium* sp) sekitar 8,5%.

Kitosan merupakan biopolymer yang memiliki sumber kitin yang melimpah di Indonesia. Kitosan banyak dimanfaatkan dalam berbagai bidang contohnya pangan dan medis. Kitosan memiliki berat molekul

cukup besar hingga mencapai 4×10^{40} g/mol, dengan berat molekul yang besar ini membuat kitosan terkendala dalam pengaplikasiannya. Diperlukan metode hidrolisis untuk menurunkan berat molekul kitosan. Metode untuk menurunkan berat molekul meliputi: depolimerisasi dengan hidrolisis asam atau oksidatif - reduktif menggunakan O_3 , $NaNO_2$ atau H_2O_2 sedangkan depolimerisasi fisik dengan menggunakan ultrasonik dan membutuhkan peralatan yang khusus dan ukuran berat molekul yang dihasilkan tidak bisa dikontrol (Lin *et al.*, 2003). Hidrolisis kimia memiliki banyak kelemahan, diantaranya menggunakan larutan kimia dengan konsentrasi tinggi yang residunya akan mencemari lingkungan, membutuhkan reaktor yang kompleks, yield yang rendah, ukuran berat molekulnya sulit dikontrol (Tsao *et al.*, 2011). Metode enzimatik menawarkan keuntungan seperti kondisi operasi ringan, reaksi mudah dikontrol, spesifisitas tinggi, yield tinggi serta ramah lingkungan (Roncal *et al.*, 2007).

Senyawa kitosan memiliki kelarutan yang cukup tinggi pada beberapa asam organik, tetapi tidak larut dalam air dan pelarut alkali, sehingga pada berat molekul yang tinggi, kitosan lebih sulit terserap secara *in vivo*. Oleh sebab itu, perlu dilakukan upaya untuk meningkatkan kelarutan kitosan. Kelarutan kitosan dapat ditingkatkan dengan cara menurunkan berat molekulnya. Salah satu cara menurunkan berat molekul kitosan adalah

dengan cara hidrolisis baik menggunakan asam maupun enzim. Metode ensimatik adalah langkah yang paling menguntungkan untuk dilakukan karena reaksinya ringan (mild) dan spesifikasi tinggi serta hasil hidrolisis dengan berat molekul rendah dapat diaplikasikan sebagai sistem pengantar DNA (Li *et al.*, 2005). Hasil hidrolisis kitosan disebut hidrolisat kitosan (Jeon dan Kim., 2000).

Hidrolisis kitosan secara enzimatik dapat menggunakan enzim spesifik (kitosanase), namun hingga saat ini ketersediaan enzim tersebut di pasaran masih sulit ditemukan dan harganya cukup mahal. Kemudian muncul penelitian-penelitian dengan enzim lain diantaranya enzim selulase (Lin, 2003), enzim pektinase (Kittu *et al.*, 2003), enzim pepsin (Roncal *et al.*, 2007), enzim protease (Li *et al.*, 2005), dan enzim lipase (Lee *et al.*, 2008). Enzim yang sering dijumpai di pasar Indonesia dan dipakai di Industri adalah enzim α -amilase.

Handayani *et al.* (2013), melaporkan bahwa enzim α -Amilase (perbandingan enzim : substrat terbaik 0,025%) dapat digunakan untuk menghidrolisis kitosan komersial dengan waktu hidrolisis 2 jam dan mampu menurunkan berat molekul dari 1680-1750 kDa menjadi 144,18 kDa. Sedangkan hasil penelitian Rokhati *et al.* (2015), melaporkan bahwa hidrolisis kitosan menggunakan kombinasi enzim endo-glucanase dan cellobiohydrolase dengan waktu hidrolisis 1 jam dapat

menurunkan berat molekul dari 1280 kDa menjadi 435 kDa.

Hingga saat ini, belum ditemukan publikasi mengenai hidrolisis kitosan menggunakan enzim α -amilase (E-2248). Dengan pertimbangan demikian, maka peneliti memilih melakukan penelitian tentang hidrolisis kitosan dari cangkang keong sawah (*Pila Ampullacea*) untuk menurunkan berat molekul dengan menggunakan enzim α -amilase (E-2248).

METODE PENELITIAN

Bahan dan Peralatan

Bahan dasar yang digunakan dalam penelitian ini adalah kitosan cangkang keong sawah diperoleh dari isolasi kitin yang dilakukan oleh Toman (2018), bahan pembantu yang terdiri dari enzim α -amilase, CH_3COOH , NaOH 10 N dan aquadest.

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini mencakup neraca analitik, shaker inkubator, lemari pendingin, viscometer Ostwald, hotplate, thermometer, waterbath, statif dan klem, buret, pipet tetes dan alat-alat gelas yang umumnya digunakan dalam laboratorium kimia.

Prosedur Penelitian

Pembuatan larutan kitosan pH 4,5 (Handayani *et al.* 2013)

Kitosan cangkang keong sawah dengan berat molekul awal 251,432 g/mol (Toman, 2018) sebanyak 10 g dilarutkan ke dalam larutan buffer asetat pH 4,5 hingga volume mencapai 1000 mL.

Hidrolisis enzimatis kitosan (Handayani et al., 2013).

1. Perlakuan suhu hidrolisis kitosan

Larutan kitosan pH 4,5 sebanyak 100 mL dimasukkan ke dalam erlenmeyer 250 mL kemudian dilakukan penambahan enzim α -amilase dengan konsentrasi 0,1 % b/v. Selanjutnya diinkubasi pada inkubator bergoyang selama 5 jam dengan variasi suhu 30°C, 40°C, 50°C, 60°C dan 70°C. Hidrolisis dihentikan dengan mendidihkan larutan selama 15 menit. Hasil hidrolisis kemudian ditambahkan NaOH 10 N tetes demi tetes sampai terbentuk gel kitosan hidrolisat. Gel kemudian dicuci dengan air sampai netral dan kemudian disaring. Residu selanjutnya di oven selama 24 jam pada suhu 40 °C. Kitosan hidrolisat digerus dan diayak dengan ayakan 60 mesh. Parameter yang diukur adalah berat molekul hidrolisat cangkang keong sawah. Perlakuan suhu terbaik dilanjutkan untuk perlakuan pH hidrolisis enzimatis. Masing-masing taraf perlakuan dilakukan sebanyak 3 kali sehingga terdapat 15 unit percobaan.

2. Perlakuan pH hidrolisis kitosan

Larutan kitosan pH 4,5 sebanyak 100 mL dimasukkan ke dalam erlenmeyer 250 mL, ditambahkan enzim α -amilase dengan konsentrasi 0,1 % b/v. Selanjutnya diinkubasi pada inkubator bergoyang selama 5 jam dengan suhu terbaik 50 °C pada variasi pH 4,5; 5,0; 5,5; 6,0 dan 6,5. Hidrolisis dihentikan dengan mendidihkan larutan selama 15 menit.

Hasil hidrolisis kemudian ditambahkan NaOH 10 N tetes demi tetes pada larutan sampai terbentuk gel kitosan hidrolisat. Gel kemudian dicuci dengan air sampai netral dan kemudian disaring dan dikeringkan. Kitosan hidrolisat digerus dan diayak dengan ayakan 60 mesh. Masing-masing taraf perlakuan dilakukan sebanyak 3 kali sehingga terdapat 15 unit percobaan.

Penentuan nilai berat molekul kitosan (Rokhati et al., 2015)

Penentuan berat molekul dilakukan dengan menggunakan alat viskometer ostwald. Dipipet sebanyak 3 mL asam asetat lalu dimasukkan ke dalam Viskometer Ostwald, waktu laju alirnya dicatat. Kemudian sampel larutan kitosan hasil hidrolisis dimasukkan ke dalam Viskometer Ostwald. waktu laju alir sampel diukur. Nilai viskosimeter dihitung dengan persamaan Mark-Houwink:

$$\text{Viskositas spesifik } \eta_{sp} = \frac{t-t_0}{t_0}$$

Keterangan :

η_{sp} = viskositas spesifik

t = waktu laju alir sampel

t_0 = waktu laju alir aquadest

Viskositas intrinsik dapat ditentukan dengan mengukur viskositas spesifik pada beberapa konsentrasi yaitu 0,02; 0,04; 0,06; 0,08 dan 0,1 (b/v) dan mengekstrapolasi grafik η_{sp}/c versus c pada konsentrasi sama dengan nol.

$$\eta_{sp}/c = [\eta] + K' [\eta]^2 C$$

Setelah mengetahui viskositas intrinsik, maka berat molekul kitosan dapat dihitung menggunakan persamaan:

$$\text{Bobot molekul viskositas } \eta = K[M]^\alpha$$

dimana:

- η_{sp} = Viskositas Spesifik (detik)
- η = Viskositas zat
- M = Berat molekul zat g/mol
- t = Waktu laju alir sampel (detik)
- t_0 = Waktu laju alir solvent (detik)
- K = $3,5 \times 10^{-4}$ ml/g
- α = 0,76

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil hidrolisis enzimatis kitosan

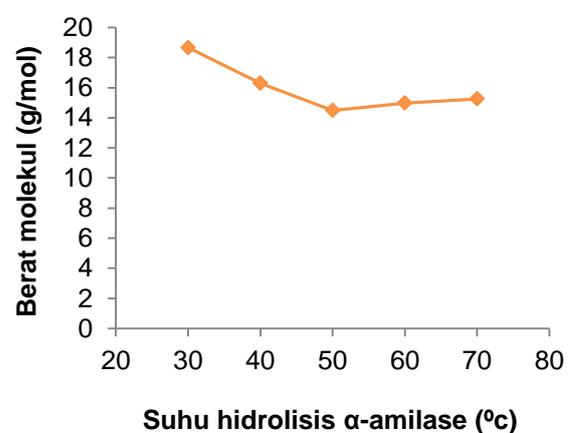
Hidrolisis enzimatis kitosan dilakukan dengan dua tahap perlakuan (perlakuan suhu dan pH hidrolisis). Kitosan awal yang digunakan untuk pembuatan hidrolisat memiliki berat molekul sebesar 251.432 g/mol diperoleh dari isolasi kitin yang dilakukan oleh Toman (2018). Enzim yang digunakan yaitu enzim α -amilase (E-2248).

Suhu hidrolisis enzim

Hidrolisis kitosan cangkang keong sawah dilakukan dengan variasi suhu hidrolisis enzim 30°C, 40°C, 50°C, 60°C dan 70°C. Berat molekul hidrolisat kitosan terhadap variasi suhu enzim diperoleh masing-masing secara berturut-turut yaitu 18.654; 16.291; 14.488; 14,979 dan 15.257 g/mol.

Pada Gambar 1 menunjukkan pengaruh suhu hidrolisis terhadap penurunan berat molekul hidrolisat kitosan, yang semakin tinggi dengan

bertambahnya suhu hidrolisis yang digunakan, maka semakin kecil berat molekul kitooligosakarida yang dihasilkan, namun pada suhu 50°C berat molekul kitooligosakarida yang dihasilkan mencapai titik minimum. Penurunan berat molekul kitosan setelah hidrolisis enzimatis terjadi karena adanya pemutusan ikatan pada rantai polimer kitosan menjadi lebih pendek dan berat molekul kitosan menjadi lebih rendah (Susilowati.*et al.*, 2015). Kitooligosakarida dengan berat molekul rendah dilaporkan memiliki banyak aktivitas biologi seperti antimikroba, antikanker, antioksidan, dan efek imunostimulan yang tergantung pada sifat fisiko-kimianya (Qin *et al*, 2002).



Gambar 1 Grafik hubungan berat molekul hidrolisat kitosan pada berbagai suhu

Dari hasil penelitian diperoleh suhu hidrolisis terbaik adalah 50°C sebesar 14.488 g/mol yang merupakan variasi suhu yang menghasilkan berat molekul minimum, karena peranan enzim dalam mendegradasi rantai polisakarida yang memotong ikatan glikosidik pada ujung

rantai sehingga menghasilkan penurunan berat molekul. Dari hasil penelitian Lee *et al* (2008), dengan menggunakan enzim lipase dengan suhu hidrolisis 55°C diperoleh rendemen kitooligomer sebesar 94%. Sementara itu, Kumar dan Tharanathan (2004), menyatakan bahwa penggunaan protease pada hidrolisis kitosan pada suhu 45°C selama 1-5 jam mampu menghasilkan berat molekul hidrolisat kitosan 5-10 kDa dengan rendemen 78 - 84%. Peningkatan suhu dapat meningkatkan kecepatan reaksi arena molekul atom mempunyai energi yang lebih besar dan mempunyai kecenderungan untuk berpindah (Lee, 1992). Menurut Holum (1968) menyatakan bahwa peningkatan suhu reaksi sebesar 10°C akan meningkatkan aktivitas enzim 50-100%. Penggunaan suhu lebih dari 70°C mengakibatkan aktivitas enzim α -amilase menurun, karena terjadi denaturasi protein enzim sehingga menjadi inaktif. Ketika reaksi di jalankan pada titik didih maka semua enzim akan rusak (Tranggono dan Setiadji, 1989).

Peranan enzim dalam mendegradasi rantai polisakarida dapat dibedakan berdasarkan cara enzim tersebut mendepolimerisasi rantai polisakarida dengan memotong ikatan glikosidik. Tipe pertama bersifat endo-aksi dengan memotong ikatan glikosidik secara acak. Akibatnya polisakarida terurai menjadi bentuk yang lebih kecil dengan ukuran acak. Pada tipe ini berat molekul dari polimer turun secara cepat. Sedangkan

tipe kedua adalah ekso-aksi yang lebih suka memotong ikatan glikosidik pada ujung rantai sehingga menghasilkan bentuk monomer. Umumnya berat molekul polimer kitosan turun secara konstan dan lambat pada tipe ekso-aksi (Li *et al* dalam Nazaruddin, M, 2010). Berdasarkan kedua tipe tersebut dalam mendegradasi polimer, enzim α -amilase dapat digolongkan dalam tipe endo-aksi. Hal tersebut dapat dilihat dari pola penurunan nilai berat molekul yang secara signifikan.

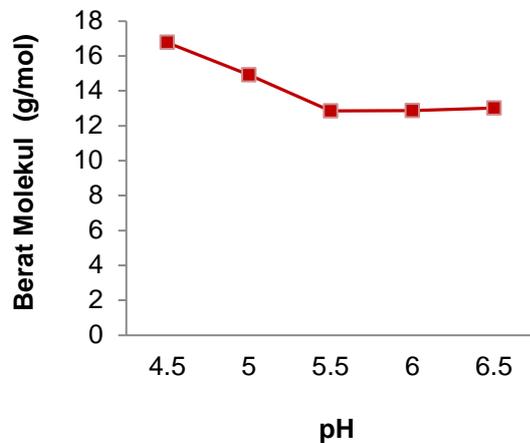
Berdasarkan hasil analisis statistik menunjukkan bahwa perlakuan suhu hidrolisis berpengaruh sangat nyata terhadap penurunan berat molekul hidrolisat kitosan. Hasil analisis lanjut dengan uji Duncan ($\alpha = 0,05$) menunjukkan bahwa suhu berat molekul hidrolisat berpengaruh nyata pada suhu hidrolisis 30°C, 40°C, 50°C, 60°C dan 70°C. Sehingga dapat disimpulkan bahwa berat molekul menurun secara signifikan pada suhu hidrolisis.

pH hidrolisis

Hidrolisis kitosan cangkang keong sawah dilakukan dengan variasi pH hidrolisis enzim 4,5; 5,0; 5,5; 6,0 dan 6,5. Berat molekul kitosan hidrolisat terhadap variasi suhu enzim diperoleh masing-masing secara berturut-turut yaitu 16.776; 14.919; 12.850; 12.867 dan 13.014 g/mol.

Pada Gambar 2 menunjukkan pengaruh pH hidrolisis terhadap penurunan berat molekul kitooligosakarida, yang dimana semakin

tinggi pH hidrolisis hidrolisat yang digunakan maka semakin kecil berat molekul.



Gambar 2 Grafik hubungan berat molekul hidrolisat kitosan pada berbagai pH hidrolisis

Dari hasil penelitian diperoleh pH hidrolisis terbaik adalah 5,5 sebesar 12.850 g/mol, yang merupakan variasi pH yang menghasilkan berat molekul minimum karena kitosan terlarut dengan baik dan enzim α -amilase bekerja secara optimal, dimana semakin banyak pemutusan rantai polimer menjadi molekul yang sederhana. Hal tersebut ditandai dengan meningkatnya viskositas kelarutan dari hidrolisat kitosan tersebut. Sehingga pada penelitian ini hidrolisis pH optimum terjadi pada pH 5,5 karena pada variasi pH selanjutnya menghasilkan berat molekul yang konstan.

Shengjun Wu (2011) melaporkan bahwa enzim α -amilase jenis mesofilik memiliki pH optimum 5. Pada penelitian Handayani *et al.* (2013), menyatakan bahwa hidrolisis enzimatis menggunakan α -amilase termofilik pada pH 5 mampu

menurunkan berat molekul dari 1.680-1.750 kDa menjadi 144,18 kDa. Dan pada hasil penelitian Rokhati *Et al.* (2015), menyatakan bahwa hidrolisis menggunakan enzim endo-glucanase pada pH 5 mengakibatkan penurunan berat molekul yang besar yaitu dari 1.280 kDa menjadi 392 kDa. Menurut Taylor (2004) apabila enzim α -amilase digunakan pH yang terlalu asam (protonasi) maka aktivitas enzim akan berkurang, sedangkan pada pH basa terjadi deprotonasi sehingga aktivitasnya cenderung menurun.

Menurut Lee *et al* dalam Nazaruddin, M (2010), enzim non-spesifik dapat mengkatalis dua reaksi yang berbeda karena memiliki dua sisi aktif pada molekul enzim atau satu sisi aktif yang dwifungsional. Pada kitosan jumlah dari gugus N-asetil, sebaran gugus N-asetil dalam rantai linear, serta berat molekul atau sebaran rantai panjangnya akan mempengaruhi kemampuan enzim tersebut dalam mendegradasi kitosan.

Aktivitas suatu enzim dapat mencapai optimum pada pH lingkungan yang sesuai. Saat pH enzim tidak berada pada pH optimumnya, maka aktivitas enzim akan menurun akibat perubahan ionisasi enzim, substrat, atau kompleks enzim dengan substrat, sehingga. Beberapa jenis enzim yang dapat menghidrolisis kitin memiliki aktivitas optimum pada kisaran pH asam hingga netral. Akan tetapi, pada pH netral, kitosan berberat molekul tinggi lebih sulit larut

dalam air (Ilyina *et al.*, 1999). Umumnya kitosan pada pH rendah dapat tersuspensi hingga terlarut pada pelarut asam organik (Peniston, 1980), sehingga semakin tinggi keasaman pelarut akan meningkatkan kelarutan kitosan. Suhartono (1989) menyatakan bahwa α -amilase umumnya stabil pada pH 5,5 – 8,0 dan aktivitas optimum pada pH 4,8 – 6,5. Pada penelitian yang dilakukan pH hidrolisis terbaik diperoleh pada pH 5,5.

Mekanisme kerja α -amilase dalam menghidrolisis kitosan dapat diduga sama dengan mekanisme hidrolisis amilosa. Enzim α -amilase menghidrolisis amilosa melalui dua tahap, yaitu degradasi menjadi dekstrin yang terjadi secara acak yang berlangsung sangat cepat diikuti dengan menurunnya viskositas dengan cepat., sehingga amilosa terurai menjadi bentuk yang lebih kecil dengan ukuran acak. Pada tahap kedua relatif sangat lambat dengan pembentukan glukosa dan maltosa sebagai hasil akhir (Hom dan Eijsink, 2003). Pembentukan gula reduksi menunjukkan aktifitas enzim yang memotong ikatan glikosida pada kitosan. Semakin tinggi aktivitas enzim maka semakin tinggi pula gula reduksi yang dihasilkan. Penentuan kadar gula reduksi dapat digunakan untuk mengetahui peningkatan jumlah rantai kitosan yang terputus dari waktu ke waktu. Oleh karena itu semakin rendah berat molekul kitosan maka semakin tinggi kadar gula reduksi.

Berdasarkan hasil analisis statistik menunjukkan bahwa perlakuan pH hidrolisis berpengaruh sangat nyata terhadap penurunan berat molekul hidrolisat kitosan. Hasil analisis lanjut dengan uji Duncan ($\alpha = 0,05$) menunjukkan bahwa suhu berat molekul hidrolisat berpengaruh nyata pada pH hidrolisis 4,5; 5,0; 5,5; 6,0 dan 6,5. Sehingga dapat disimpulkan bahwa berat molekul menurun secara signifikan pada pH hidrolisis.

KESIMPULAN

Suhu hidrolisis kitosan terbaik adalah 50°C dengan berat molekul yang didapatkan sebesar 14,488 g/mol sedangkan pH hidrolisis terbaik adalah 5,5 dengan jumlah penurunan berat molekul 12,850 g/mol

DAFTAR PUSTAKA

- Handayani, H., Siwi, P., Rokhati, N. 2013. Depolimerisasi kitosan dengan hidrolisa enzimatik menggunakan enzim α -Amilase. *Jurnal Teknologi Kimia dan Industri* 2(4): 55-64.
- Hendrawan & Rachmawani, D. 2011. Studi kandungan kitosan pada keong (*Telescopium sp*) di kawasan konservasi mangrove kelurahan pamusian kota tarakan. *Jurnal Harpodon Borneo* 4(2).
- Holum, J. R dan Brendy, J.E. 1968. *Chemistry*. New York: Jhon Wiley dan Son. pp.681.702
- Hom, S.J. and Eijsink, V.G.H. 2003. A reliable reducing sugar end assay for chito- oligosaccharides, *Carbohydrate Polymers*, 56: 35-39.

- Ilyina, A V., Tatarinova, N Y., Varlamov, V P. 1999. The Preparation of Low-molecular weight Chitosan Using chitinolytic Complex from *Streptomyces kurssanovii*. *Process Biochemistry* 34(9): 875-878.
- Jeon YJ, Kim SK. 2000. Production of chitooligosaccharides using an ultrafiltration membrane reactor and their antibacterial activity. *J Carbohydrate Polymer* 41:133-141.
- Kumar, A.B.V., Varadaraj, M.C., Gowda, L.R., and Tharanathan, R.N., 2004. Low molecular weight chitosans—preparation with the aid of pronase, characterization and their bactericidal activity towards *Bacillus cereus* and *Escherichia coli*, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1770: 495-505.
- Lee DX, Xia WS, Zhang JL. 2008. Enzymatic preparation of chitooligosaccharides by commercial lipase. *Food chem.* 111:291-295
- Lee, M. Nah, Kwn Y, Koh JJ, Ko KS, Kim SW. 1992. Purification and Characteristic of Chitonase from *Bacillus* sp. HW-002 *Journal of Microbiology and Biotechnology* 6: 19-25.
- Li J, Du Y, Yang J, Feng T, Li A, Chen P. 2005. Preparation and characterisation of low molecular weight chitosan and chito-oligomers by a commercial enzyme. *Polym Degradation and Stability* 87: 441-448.
- Lin, Q. and Ma, K.L. 2003. Study of Catalytic Hydrolysis of Chitosan by Cellulase, *China Surfactant Detergent and Cosmetics* 33: 22-25.
- Nasution, P., Sumiati, S., Wardhana, I W. 2013. Studi penurunan TSS, Turbidity dan COD dengan menggunakan kitosan dari limbah cangkang keong sawah (*Pila ampullacea*) sebagai biokoagulan dalam pengolahan limbah cair PT. Sido muncul TBK Semarang. *Jurnal Teknik Lingkungan* 4(1): 1-10.
- Peniston, Q. P & Jhonson, E. 1980. *Process of the manufacture of chitosan*. US patent
- Qin, C. Du, Y.M dan Xiao, L. 2002. Effect of Hydrogen Peroxide Treatment on the Molecular Weight and Structure of Chitosan. *Polym Degradation And Stability* 76:211-218.
- Rokhati, N., A. Prasetyaningrum, D. Ikhsan dan T. D. Kusworo. 2015. Peningkatan Mutu Simpan Buah dengan Coating Film Komposit Tapioka-Kitosan. *Prosiding Seminar Nasional Teknik Kimia "Kejuangan Pengembangan Teknologi Kimia untuk Pengolahan Sumber Daya Alam Indonesia*, 18 Maret 2015. Yogyakarta, hal. 1-7.
- Roncal, T., Oviedo, A., Armentia, I.I.D., Fernandez, L., Villarian, M. 2007. High Yield Production Of Monomer-Free Chitosan Oligosaccharides By Pepsin Catalyzed Hydrolysis Of A High Deacetylation Degree Chitosan. *Carbohydrate Research* 342(18): 2750-2756.
- Suhartono, M.T. 1989. *Enzim dan Bioteknologi*. Bogor: PAU IPB.
- Taylor. 2004. Electrospinning of chitosan solution in acetic acid with poly(ethylene oxide). *Journal of Biomaterials Science* 15(6).
- Tranggono dan Sutardi. 1989. *Biokimia dan Teknologi Pasca Panen*. Yogyakarta: Pusat Antar Universitas Pangan Dan Gizi, Gadjah Mada University Press, 142 hal

Tsao, C.T., Chang, C.H., Lin, Y.Y., Wu, M.F., Han, J.L., and Hsieh, K.H. 2011. Kinetic study of acid depolymerization of chitosan and effects of low molecular weight chitosan on erythrocyte rouleaux formation. *Carbohydrate Research*, 346(1): 94-102.