

KITOOLOGOSAKARIDA MELALUI DEPOLIMERISASI KITOSAN DENGAN HIDROGEN PEROKSIDA UNTUK APLIKASI BIOPRESERVATIF PINDANG TRADISIONAL

Faqih Ali Ridho, Bambang Riyanto*, Uju

Departemen Teknologi Hasil Perairan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Institut Pertanian Bogor
Institut Pertanian Bogor, Kampus IPB Darmaga, Jalan Agatis, Bogor 16680 Jawa Barat
Telepon (0251) 8622909-8622906, Faks. (0251) 8622915.

*Korespondensi: bambangriyanto.ipb@gmail.com

Diterima: 23 Oktober 2017/ Disetujui: 17 Desember 2017

Cara sitasi: Ridho FA, Riyanto B, Uju. 2017. Kitooligosakarida melalui depolimerisasi kitosan dengan hidrogen peroksida untuk aplikasi biopreservatif pindang tradisional. *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*. 20(3): 536-548.

Abstrak

Kitosan memiliki fungsi yang telah banyak dikembangkan untuk produk pangan, pertanian, lingkungan, industri hingga medis, farmasi, dan kosmetik. Depolimerisasi menjadi kitooligosakarida (COS) menyebabkan kitosan mudah larut, sehingga memiliki fungsi antimikroba yang lebih baik. Tujuan penelitian ini yaitu memproduksi biopreservatif kitooligosakarida melalui depolimerisasi kitosan dengan hidrogen peroksida untuk aplikasi biopreservatif (antimikroba) pindang tradisional. Aktivitas penelitian meliputi depolimerisasi kitosan dengan hidrogen peroksida, karakterisasi COS, dan karakterisasi mutu pindang tradisional selama penyimpanan 4 hari. Kitooligosakarida terbaik diperoleh pada konsentrasi H₂O₂ 2% dan frekuensi ultrasonikasi 20 kHz. Perlakuan ini menghasilkan rendemen 93,27±0,9%, berat molekul 2,83±0,1 kDa, derajat polimerisasi 17±0,6, dan menunjukkan penghambatan sebesar 5,56±0,2 mm; 7,85±0,1 mm; dan 8,17±0,1 mm terhadap *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, dan *Bacillus cerus*. Perendaman dengan larutan COS 0,25% (b/v) menghasilkan mutu pindang terbaik.

Kata kunci: antimikroba, depolimerisasi, kitooligosakarida, pindang

Chito-oligosaccharide by Chitosan Depolymerization Induced with Hydrogen Peroxide for application as Bio-preservative on Traditional Fish Brine

Abstract

Chitosan has been developed for food product, agriculture, environment, and industry as medical, pharmaceutical, and cosmetics. The depolymerization of chitosan to chito-oligosaccharide was produce on soluble in water product and has better function as antimicrobial. The objective of this research was to produce COS with hydrogen peroxide depolymerization for preservatives of fish boiled. Research activities included chitosan depolymerization, characterization of COS, and characterization of traditional fish boiled quality for 4 days storage. The optimum concentration of chito-oligosaccharide was produced by 2% H₂O₂ with sonication at frequencies of 20kHz. The yield of this treatment was 93.27±0.9%, molecular weight 2.83±0.1kDa, polymerization degree 17±0.6, and it inhibited the growth of *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, and *Bacillus cereus*. The dipping of boiled fish with 0.25% COS produced the best fish boiled quality.

Keywords: Antimicrobial, chito-oligosaccharide, depolymerization, fish boiled

PENDAHULUAN

Antimikrobia merupakan segmen pasar pengawet makanan (*food preservatif*) dengan pertumbuhan tercepat, yang diproyeksikan mencapai 2,94 miliar dolar pada tahun 2021. Benzoat, sorbat, dan propionat merupakan

pengawet makanan sintetis yang paling banyak digunakan. Penggunaan aditif sintetis ini menyangkut masalah keamanan (*generally recognized as safe/GRAS*) dan mutu, serta memberikan penampilan yang lebih baik selain memberikan masa simpan yang lebih

lama. Pengawet sintetis merupakan pilihan terbaik dan paling layak untuk dijadikan pengawet makanan, mengingat biaya dan kegunaannya. Peran pengawet alami juga semakin meningkat, meskipun memiliki karakteristik yang sangat terbatas. Pengawet alami yang memiliki pasar terbesar dan terus dikembangkan, antara lain cengkeh, bawang putih (Aluyor dan Oboh 2014), teh hijau (Wrona *et al.* 2017), daun mint (Tassou *et al.* 2000), nisin (Khan dan Oh 2016) dan kitosan (Tiwari *et al.* 2009).

Kitosan merupakan konstituen penting produk pangan. Kitosan disintesis dari kitin dengan metode deasetilasi parsial (Du *et al.* 2014). Kitosan mempunyai berat molekul tinggi berkisar 100-1.200 kDa, sehingga dalam aplikasi praktisnya cenderung tidak larut pada pH di atas 6,3 (Je dan Kim 2012). Pembatasan ini mengurangi potensi penggunaan kitosan di bidang pangan, kesehatan, dan pertanian (Jung dan Park 2014). Aktivitas kitosan sebagai antimikroba merupakan salah satu sifat biologis yang sudah banyak dilakukan dengan pengujian terhadap beberapa strain bakteri. Liu *et al.* (2006) telah mengevaluasi sifat antimikroba pada kitosan dengan berat molekul 55 kDa sampai 155 kDa (derajat deasetilasi 80-90%) yang menunjukkan aktivitas antibakteri lebih dari 200 ppm terhadap strain bakteri *E. coli*.

Polimer kitosan berbentuk linear dengan struktur N-Asetil-D- Glukosamin (GlcNAc, Asetilasi Unit A) dan D-Glukosamin (GlcN, Deasetilasi Unit D) yang dihubungkan oleh ikatan β (1,4) glikosidik. Menurut Mourya *et al.* (2011) rantai ikatan kitosan β (1,4) glikosidik dapat dipotong melalui beberapa teknik misalnya degradasi kimiawi, enzimatis, dan perlakuan mekanik. Proses tersebut menghasilkan derivat kitosan yaitu kitooligosakarida (COS) dengan derajat polimerasi (DP) <20 dan berat molekul rata-rata hingga 3.900 Da (0,2-30 kDa). Gugus N-Asetil glukosamin telah diidentifikasi pula dan ternyata memiliki potensi sebagai konstituen penting dalam aplikasi nutrasetikal. Kitooligosakarida telah banyak diproduksi menggunakan metode depolimerisasi alternatif, karena penggunaan enzim yang umum digunakan memerlukan

biaya produksi yang sangat tinggi. Metode yang dapat digunakan yaitu degradasi oksidatif menggunakan H_2O_2 . Xia *et al.* (2013) menjelaskan hidrogen peroksida (H_2O_2) dapat digunakan untuk menghidrolisis polisakarida dengan mekanisme pemotongan pada ikatan β (1,4) glikosidik oleh radikal bebas. Proses tersebut menunjukkan hasil yang cukup baik, karena dapat menghasilkan persentase rendemen yang besar dengan derajat polimerasi kitooligosakarida yang cukup rendah.

Ikan pindang diklasifikasikan sebagai produk tradisional perikanan Indonesia dengan masa simpan yang pendek. Pemandangan tradisional khas Indonesia dilakukan dengan berbagai cara, salah satunya adalah menyusun di atas keranjang atau rak bambu, kemudian ditaburi garam, dan aktivitas utama adalah pencelupan ke dalam air garam untuk direbus selama ± 60 menit (BSN 2009). Fatunni *et al.* (2014) melaporkan kerusakan ikan pindang disebabkan oleh aktivitas mikroba. Aditif makanan yang bersifat antimikroba dapat diaplikasikan untuk memperpanjang umur simpan makanan. Kitooligosakarida mempunyai keunggulan mudah larut di pH 7, perannya sebagai aditif makanan sama dengan kitosan yang mempunyai fungsi antimikroba. Berbagai bahan aditif pengawet untuk memperpanjang masa simpan pindang telah banyak diteliti seperti jahe, kunyit, kluwak, lengkuas (Estu 2015), asap cair (Hirmawati 2010), ganggang laut (Hidayat *et al.* 1996) dan protamin (Nitibaskara 1991), sebagai alternatif dikarenakan pengawet makanan sintetis yang diduga mempengaruhi keamanan pangan (Tajkarimi *et al.* 2010).

Kitooligosakarida bila dibandingkan dengan kitosan memiliki struktur polimer yang lebih pendek, sehingga memiliki berat molekul rendah dan tingkat kelarutan menjadi tinggi. Nilai kebaruan untuk pemanfaatan kitooligosakarida sebagai bahan pengawet makanan (antimikroba) terutama olahan tradisional seperti ikan pindang belum banyak dilakukan, sehingga penelitian ini penting untuk dikembangkan. Penelitian ini bertujuan memproduksi kitooligosakarida melalui depolimerisasi

kitosan menggunakan hidrogen peroksida untuk aplikasi biopreservatif (antimikroba) pindang tradisional.

BAHAN DAN METODE

Bahan dan Alat

Bahan yang digunakan meliputi ikan pindang tongkol higienis (UKM Cindy Grup, Parung, Bogor), kitosan (PT Biotech Surindo, Cirebon, Indonesia dengan BM~1582 kDa, DD~85%), asam asetat (CH_3COOH 1%), akuades, hidrogen peroksida (H_2O_2 30%), natrium hidroksida (NaOH 0,1 M), dan isopropil alkohol (IPA 95%). Alat yang digunakan meliputi hotplate (Biobase MS-H280-Pro), pH meter (Oakton WD-35614-30), *Spectrofotometer Fourier Transform Infra-Red* (BRUKER Tensor 37), viskometer Gilmont (Cole Palmer Gilmont GV-2300), *rotary evaporator* (Buchi Rotavapor R-210), dan probe ultrasonikasi (Cole Palmer Instrument CPX, 130 W).

Metode Penelitian

Depolimerisasi kitosan dengan penggunaan hidrogen peroksida (Xia *et al.* 2013)

Depolimerisasi kitosan dibagi menjadi dua tahapan yaitu degradasi larutan kitosan dan pemulihan larutan hasil degradasi (*recovery*). Degradasi dilakukan dengan melarutkan kitosan sebanyak 5 g ke dalam 500 mL asam asetat 1%, menggunakan magnetic stirrer selama 60 menit. Pemanasan larutan kitosan dilakukan sampai mencapai 50°C dan dipertahankan suhunya sampai proses degradasi selesai. Konsentrasi hidrogen peroksida yang ditambahkan meliputi 2%, serta dioperasikan alat probe ultrasonikasi (frekuensi 20 kHz, 130 W) selama 40 menit. Setelah itu dilakukan pendinginan menggunakan *ice bath* suhu 10°C selama 10 menit. *Recovery* dilakukan untuk menghilangkan alkali dan pelaksanaan proses presipitasi. Pemulihan (*recovery*) meliputi penambahan NaOH 1 M sampai larutan netral dan penguapan menggunakan rotary evaporator suhu 40°C selama 3 jam. Presipitasi larutan kitosan hasil depolimerisasi dilakukan dengan menggunakan larutan isopropil alkohol (IPA) sampai terbentuk endapan

putih. Filtrat dan residu kitosan dipisahkan menggunakan kertas saring ukuran 150 mm dengan bantuan pompa vakum. Endapan selanjutnya dicuci menggunakan isopropil alkohol (IPA), dan dikeringkan menggunakan oven pada suhu 50°C selama 12 jam.

Karakterisasi kitooligosakarida (COS) viskositas intrinsik

Viskositas intrinsik dimulai dengan membuat larutan konsentrasi 1% (w/v) menggunakan pelarut CH_3COOH 0,5 M- CH_3COONa 0,2 M. Larutan COS dibuat seri konsentrasi 0,1%; 0,2%; 0,3%; 0,4%; dan 0,5% (w/v) selanjutnya ditentukan waktu tempuh masing-masing konsentrasi menggunakan viskometer Gilmont. Nilai viskositas intrinsik COS ditentukan dengan menghitung nilai viskositas relatif, viskositas spesifik, dan viskositas reduksi. Nilai viskositas intrinsik dihitung dengan mengekstrapolasi data dari hubungan grafik antara viskositas reduksi (Y) dan konsentrasi COS (X) yang berbeda secara berurutan menggunakan metode *Least Square*. Perhitungan tersebut menggunakan persamaan berikut, Viskositas relatif

$$\eta_{\text{rel}} = \frac{\eta_{\text{larutan}}}{\eta_{\text{pelarut}}} \times 100\%$$

Viskositas spesifik

$$\eta_{\text{sp}} = \eta_{\text{rel}} - 1$$

Viskositas reduksi

$$\eta_{\text{red}} = \frac{\eta_{\text{sp}}}{C}$$

Keterangan:

- η_{rel} = Viskositas relatif
- η_{sp} = Viskositas spesifik
- η_{red} = Viskositas reduksi
- C = Konsentrasi
- η = Viskositas

Berat molekul

Bobot molekul COS ditentukan dari hasil perhitungan nilai viskositas intrinsik, selanjutnya dilakukan perhitungan dengan persamaan Mark-Khun Houwing (Wang *et al.* 2005). Perhitungan sudah disesuaikan dengan ketentuan Mark-Khun

Houwing untuk polimer kitosan. Perhitungan berat molekul kitosan disajikan pada persamaan berikut,

$$M = \frac{\text{antilog } ([\eta] - \log k)}{\alpha}$$

Keterangan:

M = Berat molekul

$[\eta]$ = Viskositas intrinsik

k = Konstanta Mark-Khun Houwing ($3,5 \times 10^{-4}$)

α = Konstanta Mark-Khun Houwing (0,76)

Derajat polimerasi

Derajat polimerisasi menunjukkan efisiensi depolimerisasi. Perhitungan DP berdasarkan data rata-rata unit deseasetilasi (161 unit) dan unit asetilasi (203 unit) pada polimer kitosan (Fiamingo *et al.* 2016). Perhitungan DP kitoologosakarida hasil depolimerisasi H₂O₂ didapat dengan persamaan berikut,

$$DP = \frac{BM \times 10^2}{(161 \times DD) + (203 \times DA)}$$

Analisis gugus fungsi (Robert 1997)

Analisis diawali dengan pembuatan pelet KBr sampel uji, pengukuran absorbansi, dan interpretasi hasil. Padatan COS hasil depolimerisasi dicampur dengan KBr nisbah 1:100, lalu dipadatkan pada tekanan beban 800 kg. Absorbansi diukur menggunakan spektrofotometer FTIR dengan kisaran scanning antara 400 cm⁻¹ hingga 4000 cm⁻¹. Spektrum gugus fungsi selanjutnya diinterpretasikan dengan mengacu pada tabel absorpsi inframerah spektroskopi.

Analisis Antimikroba

Mikroba yang digunakan adalah *B. cereus*, *S. aureus*, *E. coli*, dan *S. typhimur*. Peremajaan mikroba uji dilakukan dengan mengambil satu ose biakan mikroba untuk diinokulasikan ke dalam media NA miring, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Mikroba selanjutnya diinokulasi kembali pada media NB dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam. Kultur mikroba diukur kekeruhannya secara turbidimetri

menggunakan spektrometer UV-Vis pada panjang gelombang 600 nm hingga mencapai OD 0,5-0,8.

Kultur mikroba sebanyak 20 µL mikroba uji ditambahkan ke dalam media MHA steril. Media MHA yang mengandung mikroba uji dihomogenisasi menggunakan vortex kemudian dituang pada cawan petri steril secara aseptis. Media MHA tersebut didiamkan hingga memadat, selanjutnya dibuat lubang (sumur) secara aseptis dengan diameter 6 mm (seragam). Sediaan sampel COS masing-masing dibuat seri konsentrasi 0,25% dan 0,5%. Cawan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam dan dilakukan pengukuran zona hambat yang terbentuk menggunakan penggaris (mm). Masing-masing perlakuan konsentrasi larutan COS dilakukan uji sebanyak dua kali ulangan. Daya hambat zat antimikroba diukur dengan cara mengurangi diameter zona hambat yang terbentuk dengan diameter lubang (sumur). Hasil dinyatakan sebagai rata-rata ulangan yang disertai standar deviasi.

Karakterisasi total mikroba, pH, dan sensori pandang tradisional Total mikroba

Analisis total mikroba mengacu pada BAM (1998). Pindang tradisional sebanyak 25 g dimasukkan dalam labu erlenmeyer yang berisi 225 mL larutan *butterfield's phosphate-buffered*, selanjutnya dihomogenkan selama 2 menit. Campuran larutan diambil 10 mL dan dimasukkan ke dalam botol I berisi 90 mL larutan garam sehingga diperoleh larutan dengan pengenceran 10⁻². Pengenceran dilanjutkan sampai didapat pengenceran 10⁻⁶. Pemipetan dilakukan dari masing-masing tabung pengenceran sebanyak 1 mL dan dipindahkan ke dalam cawan petri steril secara duplo. Media agar dimasukkan ke dalam cawan petri sebanyak 12-15 mL sampai permukaan agar merata (metode tuang), kemudian didiamkan hingga mengeras. Inkubasi dilakukan pada suhu 35°C selama 48 jam.

Tingkat keasaman (pH)

Uji tingkat keasaman (pH) pada pindang dilakukan untuk mengetahui perubahan tingkat keasaman yang merupakan salah satu indikator pertumbuhan bakteri. Prosedur pengujian meliputi preparasi sampel uji, homogenisasi, dan pengujian menggunakan pH meter. Proses pengujian dilakukan dengan cara memasukkan sampel sebanyak 10 g ke dalam 90 mL akuades, selanjutnya dihomogenkan, dan diukur menggunakan pH meter.

Sensori

Metode uji menggunakan score sheet berdasarkan SNI 2717:2009 tentang pengujian sensoris ikan pindang (BSN 2009). Uji sensoris dilakukan pada periode tertentu yang sudah ditetapkan yaitu pada hari ke 0, 2, dan 4 dengan panelis semi terlatih sebanyak 30 orang.

Analisis Data

Analisis data dilakukan untuk mengetahui pengaruh dan perbedaan konsentrasi larutan kitooligosakarida (COS) terhadap karakteristik ikan pindang selama penyimpanan. Taraf perlakuan yang digunakan adalah konsentrasi kitooligosakarida 0%, 0,25%, dan 0,50% dengan tiga kali ulangan. Rancangan yang digunakan yaitu rancangan acak lengkap (RAL). Rancangan yang digunakan yaitu rancangan acak lengkap (RAL) (Steel dan Torrie 1991).

Data yang diperoleh dilakukan analisis ragam untuk melihat pengaruh terhadap perlakuan yang diberikan. Pemenuhan asumsi yang mendasari analisis ragam dilakukan dengan pengujian kenormalan dan homogenitas. Selanjutnya dilakukan uji Duncan *multiple range test* untuk melihat perbedaan dari perlakuan yang diberikan. Uji kenormalan (Kolmogorov-Smirnov) dilakukan untuk mengetahui sebaran atau distribusi galat/sisa, apabila nilai $p > (0,05)$ maka galat telah berdistribusi normal. Uji homogenitas (*Levene's Test*) dilakukan untuk mengetahui galat/sisa yang memiliki ragam

yang sama (homogen), apabila nilai $p > (0,05)$, maka data telah homogen.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Karakterisasi Kitooligosakarida

Karakterisasi kitooligosakarida meliputi kenampakan, rendemen, berat molekul, dan derajat polimerasi. Karakteristik kitooligosakarida dibandingkan dengan karakteristik kitosan awal. Karakteristik kitooligosakarida dapat dilihat pada Tabel 2.

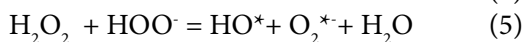
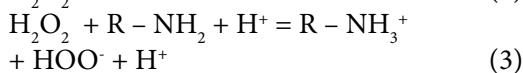
Kenampakan kitooligosakarida sesuai dengan karakteristik kitosan awal yaitu berbentuk serbuk dan berwarna putih. Depolimerisasi kitosan dengan hidrogen peroksida menghasilkan rendemen berkisar $92,40 \pm 0,9\%$ sampai dengan $93,27 \pm 0,9\%$, menunjukkan proses depolimerisasi kitosan menggunakan H_2O_2 cukup efektif menghasilkan kitooligosakarida. Berat molekul kitooligosakarida pada masing-masing perlakuan yaitu $7,63 \pm 0,3$ kDa (COS 1) dan $2,83 \pm 0,1$ kDa (COS 2), sedangkan berat molekul kitosan ~ 1580 kDa.

Mekanisme depolimerisasi kitosan menggunakan H_2O_2 yaitu adanya penurunan polidispersitas larutan akibat proses degradasi oksidatif yang menunjukkan adanya penurunan distribusi ukuran partikel, atau dapat disimpulkan bahwa adanya penurunan berat molekul dan penyempitan distribusihingga terbentuk struktur kitosan baru dengan molekul yang lebih kecil akibat adanya pemotongan ikatan β -1,4 glikosidik oleh radikal bebas (Qin *et al.* 2002). Panas pada proses degradasi akan meningkatkan dekomposisi H_2O_2 membentuk ion hidrogen dan hidroksil anion yang akan beraksi dengan H_2O_2 membentuk hidroksil yang sangat reaktif (HO^*), sesuai dengan persamaan (4) dan (5). Radikal hidroksil tersebut akan bereaksi dengan karbohidrat dengan sangat cepat melalui penguraian atom H yang berikatan dengan atom C, sesuai dengan persamaan (6). Reaksi kimia yang terjadi pada proses depolimerisasi kitosan menggunakan H_2O_2 (Tian *et al.* 2004) sebagai berikut:

Tabel 1 Karakteristik kitooligosakarida (COS)

Parameter	H ₂ O ₂ 2% (COS A)	H ₂ O ₂ 2% Ultrasonikasi 20 kHz (COS B)	Standar Kitosan
Kenampakan			
Bentuk	Bubuk	Bubuk	Bubuk - Serpihan
Warna	Putih	Putih	Putih
Ukuran	12,47 - 13,58 mm	6,12 - 8,79 mm	-
Rendemen (%)	92,40±0,9	93,27±0,9	-
Berat Molekul (kDa)	7,63±0,3	2,83±0,1	~ 1580
Derajat Polimerisasi	46±2,0	17±0,6	< 20*

Keterangan: *Mourya *et al.* 2011



Depolimerisasi kitooligosakarida menggunakan H₂O₂ 2% tanpa ultrasonikasi menghasilkan derajat polimerisasi (DP) 46±2,0 tidak sesuai dengan standar derajat polimerisasi kitooligosakarida (COS), sedangkan perlakuan H₂O₂ 2% ultrasonikasi 20 kHz menghasilkan kitooligosakarida dengan DP<20. Namun nilai DP tersebut masih lebih tinggi, bila dibandingkan dengan penelitian Xia *et al.* (2012) yang menghasilkan kitooligosakarida dengan DP<7. Faktor yang berpengaruh yaitu derajat deasetilasi kitosan awal (Tian *et al.* 2004), konsentrasi, suhu, waktu reaksi (Qin *et al.* 2002), dan pengaruh ultrasonikasi (Wu *et al.* 2008).

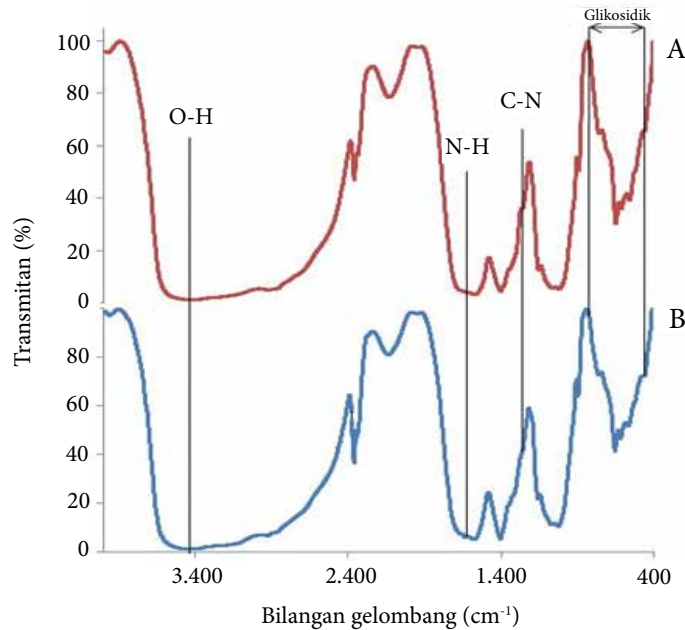
Gugus Fungsi Kitooligosakarida

Spektrum gugus fungsi FTIR COS A dan COS B menunjukkan pita serapan tidak berbeda nyata dengan derajat deasetilasi masing-masing yaitu 84,69% dan 85,14%. Menurut Liu *et al.* (2001) struktur kimia COS mirip dengan kitosan kecuali derajat polimerisasinya dan tidak ada perbedaan yang signifikan antara residu kitosan sebelum dan sesudah hidrolisis. Spektrum gugus fungsi FTIR COS dapat dilihat pada Gambar 1.

Spektrum FTIR kitooligosakarida sampel COS A dan COS B menunjukkan adanya pita

serapan pada daerah gelombang 1406,20 cm⁻¹ dan 1403,54 cm⁻¹. Brugnerotto *et al.* (2001) menjelaskan serapan sekitar 1429 cm⁻¹ pada polisakarida dikaitkan dengan gugus -CH₂- dan kelompok hidroksil, namun pada kitooligosakarida daerah gelombang dibawah (1410 cm⁻¹) ini diduga karena beberapa penyesuaian akibat penurunan kadar asetil yang mempengaruhi jaringan ikatan hidrogen. Intensitas serapan yang lebih tinggi pada rentang 750-500 cm⁻¹ juga dapat dikaitkan adanya penurunan kristalinitas kitosan akibat ikatan hidrogen antarmolekul dan intramolekul kitosan melemah, atau dapat disimpulkan adanya pemotongan ikatan β (1,4) glikosidik (Prashanth *et al.* 2002). Hasil tersebut sesuai dengan data penelitian yang menunjukkan adanya pembentukan direntang serapan 750-500 cm⁻¹ yaitu 652 cm⁻¹, 618 cm⁻¹, 563 cm⁻¹.

Karakterisasi gugus fungsi COS hasil depolimerisasi dengan H₂O₂ menunjukkan adanya pita serapan khas kitosan meliputi amida II (N-H) pada 1574,92 cm⁻¹ dan 1572,7 cm⁻¹; amida III (C-N) pada 1221,13 cm⁻¹ dan 1223,3 cm⁻¹; serta terdapat serapan pada 1024,57 cm⁻¹ (C-O) yang menunjukkan serapan khas struktur sakarida. Menurut Prashanth *et al.* (2002) pita serapan khas kitosan meliputi peregangan C-O-C pada 1000-1200 cm⁻¹ yang menunjukkan kitosan masuk kedalam struktur sakarida. Serapan lain yaitu pada 1600-1650 cm⁻¹ yang menunjukkan amida I (C=O), ~1550 cm⁻¹ menunjukkan amida II (N-H) dan adanya gugus fungsi amida III (C-N). Karakteristik gugus fungsi pada sampel kitooligosakarida dapat dilihat pada Tabel 2.



Gambar 1 Spektrum FTIR kitooligosakarida, (A) kitooligosakarida hasil depolimerisasi H_2O_2 2% (w/v)/COS A, (B) kitooligosakarida hasil depolimerisasi H_2O_2 2% (w/v) ultrasonikasi 20 kHz /COS B.

Tabel 2 Karakteristik gugus fungsi kitooligosakarida depolimerisasi hidrogen peroksida

Daerah serapan	Panjang gelombang (cm^{-1})		
	COS A	COS B	Wilayah serapan*
O-H <i>Stretching</i>	3432,65	3435,18	3100 - 3650
N-H <i>Stretching</i>			3500 - 3400
O-H <i>Bending</i>	1406,20	1403,54	1440 - 1395
C-N <i>Stretching</i>	1221,13	1223,3	1250 - 1020
N-H <i>Bending</i>	1574,92	1572,71	1640 - 1550
C-O <i>Stretching</i>	1024,57	1025,25	1075 - 1020

Keterangan: *www.ochemonline.com, COS A = kitooligosakarida hasil depolimerisasi H_2O_2 2% tanpa ultrasonikasi, COS B = kitooligosakarida hasil depolimerisasi H_2O_2 2% *probe* ultrasonikasi 20 kHz.

Aktivitas Antimikroba Kitooligosakarida

Larutan COS A dan COS B masing-masing dibuat seri konsentrasi 0,25% (b/v) dan 0,5% (b/v) menggunakan pelarut asam asetat 0,5%, untuk mengetahui aktivitas antimikroba terhadap strain bakteri *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, dan *Salmonella typhimurium*. Pelarut asam asetat 0,5% juga dilakukan uji aktivitas antimikroba sebagai kontrol. Diameter zona hambat larutan kitooligosakarida pada beberapa strain bakteri disajikan pada Tabel 3.

Larutan COS B (0,5%) menghasilkan diameter zona hambat terbesar pada strain

bakteri *E. coli* yaitu $5,56 \pm 0,2$ mm, berbeda signifikan dengan perlakuan larutan COS B (0,25%), COS A (0,5%), COS A (0,25%), dan COS-P0 dengan diameter zona hambat masing-masing $5,07 \pm 0,0$ mm, $4,52 \pm 0,0$ mm, $4,37 \pm 0,0$ mm, dan $4,26 \pm 0,0$ mm. Diameter zona hambat larutan COS B (0,5%) pada bakteri *S. aureus* sebesar $7,85 \pm 0,1$ mm, berbeda signifikan dengan perlakuan larutan COS A (0,5%), COS B (0,25%), COS A (0,25%), dan COS-P0 dengan zona hambat masing-masing $6,58 \pm 0,0$ mm, $6,39 \pm 0,0$ mm, $6,26 \pm 0,1$ mm, dan $5,58 \pm 0,1$ mm. Diameter zona hambat larutan COS B (0,5%) pada strain bakteri *B. cereus* juga menghasilkan

penghambatan terbesar yaitu $8,17 \pm 0,1$ mm. berbeda nyata dengan diameter zona hambat pada larutan COS B (0,25%) dan sangat berbeda nyata dengan diameter zona hambat pada larutan COS A (0,5%), COS A (0,25%), dan COS-P0. Hasil tersebut menunjukkan COS B dengan karakteristik berat molekul (BM) rendah mempunyai efektivitas penghambatan yang lebih tinggi terhadap strain bakteri yang di ujikan, terutama golongan bakteri Gram positif (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*). No *et al.* (2002) juga menunjukkan chitooligosaccharide dengan berat molekul rendah (2-4 kDa) mempunyai aktivitas antimikroba yang lebih tinggi terhadap bakteri Gram positif.

Larutan COS A dan Larutan COS B menunjukkan penghambatan terhadap strain bakteri *E. coli*, *S. aureus*, dan *B. cereus*. Liu *et al.* (2001) menjelaskan bahwa mekanisme penghambatan mikroba pada COS karena kemampuan untuk merusak atau memblokir fungsi membran pada sel bakteri, sehingga menyebabkan kebocoran pada komponen intraseluler. Kitooligosakarida juga mampu membentuk polielektrolit kompleks dengan polimer yang bersifat asam pada permukaan sel bakteri. Larutan COS-P0 (asam asetat 0,5%) juga menunjukkan penghambatan pada strain bakteri *E. coli*, *S. aureus*, dan *B. cereus*. Hal tersebut sesuai dengan No *et al.* (2002) yang menunjukkan golongan asam organik misalnya asam asetat mempunyai efek penghambatan terhadap bakteri.

Zona hambat pada pengujian terhadap bakteri Gram positif (*Staphylococcus aureus*,

Bacillus cereus) menghasilkan diameter yang lebih besar, dibandingkan pada strain Gram negatif (*Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*). Menurut Fernandes *et al.* (2008) aktivitas antimikroba pada polimer kitosan tergantung pada mikroorganisme target yang berkaitan dengan perbedaan struktur intrinsik dari dinding sel bakteri. Bakteri Gram positif mempunyai dinding yang terdiri dari peptidoglikan yang tebal dan penyusun lain berupa asam teikoat, sedangkan Gram negatif mempunyai karakteristik dinding sel yang lebih kompleks. Dinding sel bakteri Gram negatif meliputi membran semipermeabel terdiri dari lemak, protein dan lipoprotein, melapisi peptidoglikan yang berada didalam dan diluar dinding sel (Cooper dan Hausman 2007). Zona hambat bakteri pada larutan COS B konsentrasi 0,25% dan 0,5% menghasilkan diameter penghambatan terbesar, berbeda signifikan dibandingkan dengan pelarutan asam asetat 0,5% (COS-P0) dan larutan COS A (0,25%) dan COS A (0,5%). Oleh karena itu, larutan COS B dipilih untuk diaplikasikan sebagai aditif makanan yang bersifat antimikroba pada pindang tradisional.

Karakteristik Total Mikroba, pH dan Sensori Pindang selama Penyimpanan Total Mikroba

Total mikroba pindang dengan perendaman larutan kitooligosakarida selama penyimpan disesuaikan dengan SNI 2717:2009 tentang persyaratan total mikroba pindang. Standar total mikroba pindang yaitu

Tabel 3 Diameter zona hambat larutan kitooligosakarida hasil depolimerisasi hidrogen peroksida dan ultrasonikasi

Sampel	Konsentrasi (%)	Zona hambat (mm)			
		<i>S. typhimurium</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>B. cereus</i>
COS P0	0,5	Tidak terdeteksi	$4,26 \pm 0,0^a$	$5,58 \pm 0,1^a$	$5,42 \pm 0,0^a$
COS A	0,25	Tidak terdeteksi	$4,37 \pm 0,0^b$	$6,26 \pm 0,1^b$	$5,91 \pm 0,1^a$
	0,5	Tidak terdeteksi	$4,52 \pm 0,0^c$	$6,58 \pm 0,0^c$	$5,48 \pm 0,0^a$
COS B	0,25	Tidak terdeteksi	$5,07 \pm 0,0^d$	$6,39 \pm 0,0^{bc}$	$6,86 \pm 0,7^b$
	0,5	Tidak terdeteksi	$5,56 \pm 0,2^e$	$7,85 \pm 0,1^d$	$8,17 \pm 0,1^c$

Keterangan: COS P0 = pelarut asam asetat 0,5%, COS A = kitooligosakarida hasil depolimerisasi H_2O_2 2% tanpa ultrasonikasi, COS B = kitooligosakarida hasil depolimerisasi H_2O_2 2% probe ultrasonikasi 20 kHz.

$<5 \times 10^5$ CFU/g (BSN 2009). Total mikoba pindang selama penyimpanan disajikan pada Gambar 2.

Hasil analisis ragam menunjukkan bahwa pindang dengan perbedaan konsentrasi larutan kitoooligosakarida memberikan pengaruh yang nyata terhadap karakteristik total mikoba pindang selama penyimpanan ($p < 0,05$). Uji lanjut menggunakan Duncan *multiple range test* menunjukkan pindang dengan larutan COS 0,25% dan 0,5% tidak berbeda nyata, sedangkan dengan kontrol berbeda nyata.

Total mikoba pindang dengan larutan COS 0,25% yaitu 1×10^5 CFU/g dan pada pindang dengan larutan COS 0,5% yaitu 2×10^5 CFU/g, sedangkan pindang kontrol 8×10^5 CFU/g. Jumlah mikoba pindang pada pengamatan jam ke-48 menunjukkan peningkatan signifikan yaitu 3×10^8 CFU/g (kontrol), 2×10^7 CFU/g (larutan COS 0,25%) dan 5×10^7 CFU/g (larutan COS 0,5%), lebih besar bila dibandingkan dengan persyaratan standar total mikoba pindang yaitu $<5 \times 10^5$ CFU/g (BSN 2009). Peningkatan jumlah mikoba terbesar pada pengamatan jam ke-96 yaitu $4,3 \times 10^9$ CFU/g (kontrol), $2,8 \times 10^9$ CFU/g (larutan COS 0,25%), dan $1,7 \times 10^9$ CFU/g (larutan COS 0,5%). Peningkatan total mikoba menunjukkan bahwa pindang mengalami kemunduran mutu selama penyimpanan. Tajkarimi *et al.* (2010) menunjukkan senyawa antimikroba

dapat mengontrol proses pembusukan dan mencegah pertumbuhan mikroorganisme.

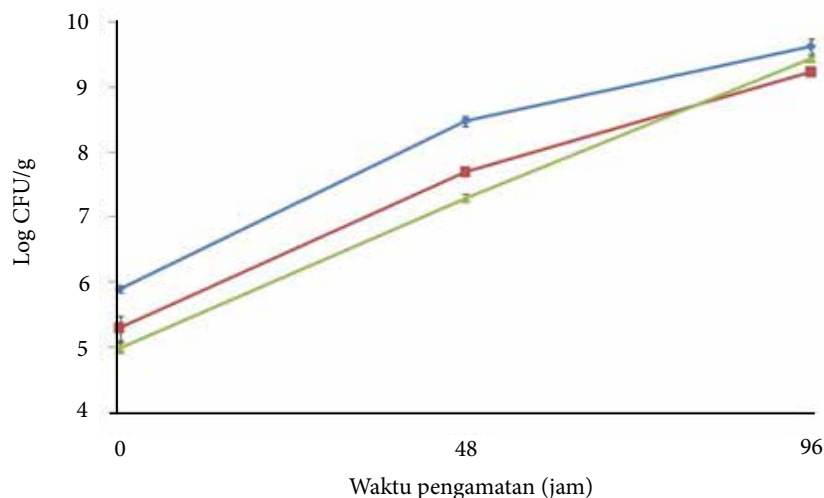
Total mikoba pindang dengan larutan COS 0,25% dan 0,5% mengalami peningkatan jumlah mikoba yang lebih rendah, dibandingkan kontrol. Hasil tersebut menunjukkan bahwa larutan kitoooligosakarida mampu menghambat pertumbuhan bakteri pada pindang selama penyimpanan, namun peningkatan konsentrasi menjadi 0,5%, tidak memberikan pengaruh yang nyata dengan penggunaan larutan COS 0,25%.

Tingkat Keasaman (pH)

Nilai pH dapat dijadikan sebagai parameter kebusukan ikan. Tingkat keasaman (pH) pindang berkisar antara $5,71 \pm 0,1$ sampai dengan $7,75 \pm 0,3$. Nilai pH pindang dengan larutan COS selama penyimpanan dapat dilihat pada Gambar 3.

Analisis ragam menunjukkan bahwa pindang dengan perbedaan konsentrasi kitoooligosakarida (COS) memberikan pengaruh yang nyata terhadap karakteristik pH pindang selama penyimpanan ($p < 0,05$). Uji lanjut menggunakan Duncan *multiple range test* menunjukkan pindang dengan larutan COS 0,25% dan COS 0,5% tidak berbeda nyata, sedangkan dengan pindang kontrol berbeda nyata.

Nilai pH pindang pada pengamatan jam ke-0 dalam kondisi asam, terus mengalami peningkatan yang signifikan pada pengamatan



Gambar 2 Total mikoba pindang dengan larutan COS selama penyimpanan (◆) pindang kontrol, (■) pindang dengan larutan COS B 0,25%, (▲) pindang dengan larutan COS B 0,5%.

jam ke-48 dan kembali mengalami peningkatan signifikan menjadi basa pada pengamatan jam ke-96. Peningkatan pH pindang selama penyimpanan diduga proses pembusukan akibat reaksi secara enzimatik dan aktivitas bakteri pembusuk. Menurut Jiang *et al.* (2012) nilai pH pada periode tertentu akan mengalami peningkatan karena terjadi akumulasi basa-basa volatile, akibat penguraian protein oleh bakteri menjadi senyawa amoniak yang bersifat basa.

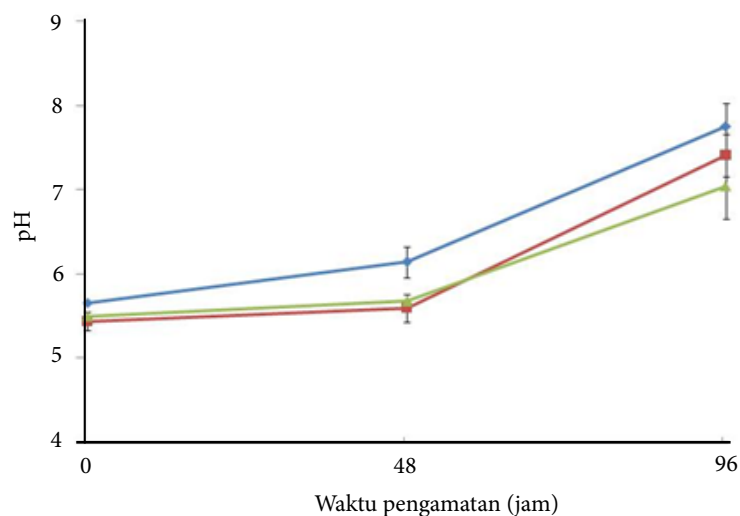
Nilai pH pindang dengan larutan COS 0,25% dan 0,5% pada pengamatan jam ke-0 masing-masing yaitu $5,48 \pm 0,1$ dan $5,43 \pm 0,1$, sedangkan pindang kontrol $5,71 \pm 0,1$. Nilai pH pindang kontrol kurang dari 7, yang menunjukkan pindang sudah mengalami kemunduran mutu. Perendaman dengan larutan COS juga mempengaruhi nilai pH pindang menjadi asam, karena pengaruh dari asam asetat yang digunakan sebagai pelarut. Nilai pH pindang kontrol pengamatan jam ke-48 yaitu $6,14 \pm 0,2$ dan mengalami peningkatan cepat menjadi $7,75 \pm 0,3$, sedangkan nilai pH pindang dengan perendaman larutan COS 0,25% dan 0,5% masing-masing $7,40 \pm 0,3$ dan $7,04 \pm 0,4$. Peningkatan yang signifikan pada pindang kontrol diduga karena mengalami kemunduran mutu yang lebih cepat dibandingkan dengan perlakuan lain. Tajkarimi *et al.* (2010) menunjukkan selama proses kemunduran mutu akan meningkatkan nilai pH, disebabkan penguraian protein dan

komponen selain protein yang mengandung nitrogen.

Sensori

Penilaian secara sensori disesuaikan dengan SNI 2717:2009 tentang persyaratan mutu ikan pindang. Nilai sensori ikan pindang yang sesuai standar SNI 2717:2009 yaitu >7 (BSN 2009). Nilai sensori pindang dengan perbedaan konsentrasi larutan kitoooligosakarida (COS) tidak berbeda nyata. Hasil tersebut menunjukkan penggunaan larutan COS dengan perbedaan konsentrasi 0%, 0,25% dan 0,5% tidak mempengaruhi parameter sensori pindang meliputi parameter kenampakan, lendir, rasa, tekstur, dan bau. Nilai sensori pindang dengan larutan COS selama penyimpanan dapat dilihat pada Tabel 4.

Nilai sensori pindang pada hari ke-0 lebih >7 yang menunjukkan pada semua perlakuan mempunyai mutu yang baik. Nilai sensori pindang pada hari ke-2 menunjukkan pindang kontrol tidak sesuai standar, sedangkan pindang dengan larutan COS 0,25% dan 0,5% masih di atas ambang batas persyaratan mutu yaitu >7 (BSN 2009). Menurut Estu (2015) kerusakan mutu pindang disebabkan oleh mikroorganisme akibat proses enzimatik dan oksidasi melalui dekomposisi protein dan lemak. Perendaman pindang menggunakan larutan kitoooligosakarida dapat mempertahankan mutu pindang, karena bersifat antimikroba.



Gambar 3 Nilai pH pindang dengan larutan COS selama penyimpanan (◆) pindang kontrol, (■) pindang dengan larutan COS B 0,25%, (▲) pindang dengan larutan COS B 0,5%.

Tabel 4 Nilai sensori pindang dengan larutan COS selama penyimpanan

Perlakuan	Parameter					
	Kenampakan	Bau	Rasa	Tekstur	Lendir	
Hari ke- 0	COS 0%	7,21±0,7 ^a	7,66±0,5 ^a	7,54±0,4 ^a	7,54±0,4 ^a	8,26±0,3 ^a
	COS 0,25%	7,14±0,7 ^a	7,47±0,5 ^a	7,40±0,5 ^a	7,40±0,5 ^a	8,29±0,4 ^a
	COS 0,5%	7,41±0,7 ^a	7,78±0,5 ^a	7,61±0,7 ^a	7,61±0,7 ^a	8,28±0,6 ^a
Hari ke-2	COS 0%	6,41±0,6 ^b	6,32±0,6 ^b	6,70±0,7 ^b	6,70±0,7 ^b	7,30±0,8 ^b
	COS 0,25%	7,20±0,6 ^b	7,09±0,8 ^b	7,09±0,8 ^b	7,09±0,8 ^b	7,99±0,6 ^b
	COS 0,5%	7,27±0,9 ^b	7,28±0,8 ^b	7,49±0,7 ^b	7,49±0,7 ^b	7,78±0,8 ^b
Hari ke-4	COS 0%	4,34±1,2 ^c	2,61±1,0 ^c	-	3,97±1,3 ^c	2,97±0,8 ^c
	COS 0,25%	4,15±1,2 ^c	3,36±1,3 ^c	-	4,17±1,0 ^c	3,17±1,0 ^c
	COS 0,5%	4,00±1,0 ^c	3,33±1,3 ^c	-	3,69±0,7 ^c	3,50±1,0 ^c

Pindang pada penyimpanan 4 hari tidak dalam keadaan mutu yang baik, dengan karakteristik meliputi kenampakan tidak rapih dan kusam, bau agak basi, tekstur lembek dan berair, serta terbentuk lendir kental dan asam, oleh karena itu tidak dilakukan uji rasa. Mutu pindang cepat mengalami kemunduran diduga karena pengaruh perendaman, sehingga menghasilkan pindang dengan kadar air tinggi.

Perendaman dengan larutan COS 0,25% dan 0,5% dapat mempertahankan mutu pindang dengan nilai sensori yang sesuai standar SNI 2717:2009 selama 2 hari, sedangkan pindang kontrol yang diberi perlakuan perendaman menggunakan akuades hanya bertahan 1 hari. Larutan COS B konsentrasi 0,25% dan 0,5 % belum cukup baik mempertahankan mutu pindang. Penggunaan zat aditif alami lain untuk pengawet pindang *di antaranya* penggunaan larutan ekstrak jahe 30%, ekstrak kunyit 30%, ekstrak kluwak 30%, dan ekstrak lengkuas 30%, dengan hasil masing-masing dapat menambah masa simpan pindang sampai 3 hari (Estu 2015). Penggunaan ekstrak ganggang laut (*Sargassum* sp.) pada pegawetan pindang juga menunjukkan indikator mutu yang lebih baik (Hidayat *et al.* 1996).

KESIMPULAN

Kitooligosakarida (COS) dapat diproduksi melalui depolimerisasi kitosan menggunakan hidrogen peroksida, dengan hasil terbaik pada konsentrasi H₂O₂ 2%

frekuensi probe ultrasonikasi 20 kHz. Fungsinya sebagai antimikroba menunjukkan penghambatan pada strain bakteri *E. coli*, *S. aureus*, *B. cereus*. Aplikasi COS sebagai biopreservatif (antimikroba) belum terlihat secara nyata dapat menambah umur simpan pindang tradisional.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada PT. Indofood Sukses Makmur Tbk yang telah memberikan dukungan finansial terhadap penelitian ini melalui program Indofood Riset Nugraha (IRN) periode 2016-2017.

DAFTAR PUSTAKA

- Aluyor EO, Oboh IO. 2014. Preservative: traditional preservatives – vegetable oils. *Food science*. 137-140.
- Brugnerotto J, J Lizardi, FM Goycoolea, W Arguëlles-Monal, J DesbrieÁres. M Rinaudo. 2001. An infrared investigation in relation with chitin and chitosan characterization. *Polymer*. 42 : 3569-3580
- [BSN] Badan Standarisasi Nasional. 2009. Ikan Pindang: Bagian 1 Spesifikasi. Jakarta (ID): Standar Nasional Indonesia.
- [BSN] Badan Standarisasi Nasional. 2009. Ikan Pindang: Bagian 2 Penanganan dan pengolahan. Jakarta (ID) : Standar Nasional Indonesia.
- [FDA] Food and Drug Administration. 1998. Bacteriological Analytical Manual: Chapter 3 Aerobic Plate Count.

- Washington (US): Food and Drug Administration.
- Cooper GM, Hausman RE. 2007. *The Cell: A Molecular Approach*. 4th ed. Sunderland: Sinauer Associates, Inc.
- Du WL, Niu SS, Xu YL, Xu ZR, Fan CL. Antibacterial activity of chitosan tripolyphosphate nanoparticles loaded with various metal ions. *Carbohydrate Polymers*. 75(3) : 385-389.
- Estu RIS. 2015. Identifikasi bakteri pada pindang tongkol (*Euthynus affinis*) produksi weleri, Jawa Tengah dan pindang tongkol yang direndam ekstrak rempah (jahe, lengkuas, kunyit, dan kluwak) sebagai pengawet *al.ami*. [Skripsi]. Semarang (ID) : Universitas Katolik Soegijapranata.
- Fatunni YS, Suwandi R, Jaecob AM. 2014. Identifikasi kadar histamin dan bakteri pembentuk histamin dari pindang badeng tongkol. *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*. 17(2) : 112-118.
- Fernandes JC, Tavarria Fk, Soares JC, Ramo OS, Monteiro MJ, Pintado ME, Malcata X. 2008. Antimicrobial effects of chitosans and chitooligosaccharides, upon *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*, in food model systems. [Makalah]. Portugal (PT): Universidade Cato'lica Portuguesa.
- Fiamingo A, Delezuk J, Trombotto S, David L, Campana-Filho SP. 2016. Extensively deacetylated high molecular weight chitosan from the multistep ultrasound-assisted deacetylation of beta-chitin. *Ultrasonics Sonochemistry*. 32: 79-85.
- Hidayat A, Heru S, Joko S. 1998. Memperpanjang daya awet pindang dengan menggunakan ganggang laut. Bogor (ID) : Institut Pertanian Bogor.
- Je JY, Kim SK. 2012. Chitosan as potential marine nutraceutical. *Advances in Food and Nutrition Research*. 65 :121-137.
- Jiang L, Wang F, Prinyawiwatkul W, No HK, Ge B. 2012. Evaluation of diffusion and dilution methods to determine the antimicrobial activity of water-soluble chitosan derivatives. *Journal of Applied Microbiology*. 114 : 956-963.
- Jung WJ, Park RD. 2014. Bioproduction of chitooligosaccharides: present and perspectives. *Marine Drugs*. 12 : 5328-5356.
- Khan I, Oh D. 2016. Integration of nisin into nanoparticles for application in foods. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. 34 : 376-384.
- Liu S, Li K, Xing R, Li P. 2006. Advances in preparation, analysis and biological activities of single chitooligosaccharide. *Carbohydrate Polymers*. 139: 178-190.
- Liu XF, Guan YL, Yang DZ, Li Z, Yao K. 2001. Antibacterial action of chitosan and carboxymethylated chitosan. *Journal of Applied Polymer Science*. 79: 1324 - 1335.
- Mourya VK, Inamdar NN, Choudhari YM. 2011. Chitooligosaccharides: synthesis, characterization and applications. *Polymer Science*. 53(7): 583-612.
- No HK, Na YP, Lee SH, Meyers SP. 2002. Antibacterial activity of chitosans and chitosan oligomers with different molecular weights. *International Journal of Food Microbiology*. 74 : 65- 72
- Prashanth KV, Kittur FS, Tharanathan RN. 2002. Solid state structure of chitosan prepared under defferent N-deacetylating conditions. *Carbohydrate Polymers*. 50: 27-33.
- Qin CQ, Du YM, Xia L. 2002. Effect of hydrogen peroxide treatment on the molecular weight and structure of chitosan. *Polymer Degradation and Stability*. 76: 211-218
- Steel RGD, Torrie JH. 1991. Principles and Procedures of Statistics Index. Sumantri B, Penerjemah. Jakarta (ID): PT Gramedia Pustaka Utama.
- Tajkarimi MM, Ibrahim SA, Cliver DO. 2010. Antimicrobial herb and spice compounds in food. *Food Control*. 21: 1199-1218.
- Tassou CC, Koutsoumanis K, Nychas GJE. 2000. Inhibition of *Salmonella enteritidis* and *Staphylococcus aureus* in nutrient broth by mint essential oil. *Food Research International*. 33 : 273-280.
- Tian F, Liu Y, Hu K, Zhao B. 2004. Study of the depolymerization behavior of chitosan by hydrogen peroxide. *Carbohydrate Polymers* 57 : 31-37.
- Tiwari BK, Valdramidis VP, Donell CPO,

- Muthukuarappan K, Bourke P, Cullen PJ. 2009. Application of natural antimicrobials for food preservation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 57(4): 5987–6000.
- Wang S, Huang Q, Wang Q. 2005. Study on the synergetic degradation of chitosan with ultraviolet light and hydrogen peroxide. *Carbohydrate Research*. 340 : 1143–1147.
- Wrona M, Cran MJ, Nerin C, Bigger SJ. 2017. Development and characterisation of HPMC films containing PLAnanoparticles loaded with green tea extract for food packaging application. *Carbohydrate Polymers*. 156: 108–117.
- Wu T, Zivanovic S, Hayes DG, Weiss J. 2008. Efficient reduction of chitosan molecular weight by high-intensity ultrasound: underlying mechanism and effect of process parameters. *Jurnal Agricultural and Food Chemistry*. 56: 5112-2119.
- Xia Z, Wu S, Chen J. g F. 2013. Preparation of water soluble chitosan by hydrolysis using hydrogen peroxide. *International Journal of Biological Macromolecules*. 59: 242–245.