

Depolimerisasi Kitosan dari Cangkang Udang dengan Enzim Papain dan Iradiasi Sinar Ultraviolet

Rizfi Fariz Pari*, Dewi Mayangsari, Safrina Dyah Hardiningtyas

Departemen Teknologi Hasil Perairan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, IPB University, Jalan Agatis, Kampus IPB Dramaga, Bogor, 16680, (0251) 8622915

Diterima: 13 Maret 2022/Disetujui: 13 April 2022

*Korespondensi rizfi-fp@apps.ipb.ac.id

Cara sitasi: Pari RF, Mayangsari D, Hardiningtyas SD. 2022. Depolimerisasi kitosan dari cangkang udang dengan enzim papain dan iradiasi sinar ultraviolet. *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*. 25(1): 118-131.

Abstrak

Kitosan merupakan polimer alami bermuatan positif yang dapat diaplikasikan pada bidang farmasi sebagai penghantar obat. Akan tetapi, kitosan komersial memiliki berat molekul besar dan derajat deasetilasi yang rendah, sehingga aplikasinya terbatas akibat kelarutannya yang rendah pada air. Penelitian ini bertujuan untuk menentukan pengaruh metode depolimerisasi dua kelas kitosan yang beredar di pasaran terhadap karakteristiknya. Jenis kitosan yang digunakan yaitu *pharmaceutical grade* dan *food grade* untuk menghasilkan oligokitosan. Metode depolimerisasi kitosan yang digunakan adalah iradiasi sinar UV-C (75 menit), hidrolisis enzim papain (15 g/L selama 16 jam, 40°C dan pH 5) serta kombinasi UV dan enzim. Hasil penelitian menunjukkan bahwa grade kitosan dan metode depolimerisasi memengaruhi karakteristik kitosan depolimerisasi yang dihasilkan. Ketiga metode yang digunakan pada kitosan *pharmaceutical grade* menghasilkan oligokitosan yang dapat larut langsung pada air dengan pH netral dengan rendemen >62%, derajat putih 99,33%, berat molekul <5,5 kDa, dan derajat deasetilasi >85%. Kitosan *food grade* yang melalui depolimerisasi dengan metode berbeda belum dapat larut dalam air dengan pH netral.

Kata kunci: *food grade*, kombinasi UV-enzim, oligokitosan, *pharmaceutical grade*

Depolymerization of Chitosan from Shrimp Shell Using Papain Enzyme and Ultraviolet Light Irradiation

Abstract

Chitosan is a natural polymer with a positive charge that is good for the pharmaceutical field as a drug carrier. However, commercial chitosan has a large molecular weight and a low degree of deacetylation, so the application is limited due to its low solubility in water. This study aims to determine the effect of the depolymerization method of two classes of chitosan on the market. The types of chitosan used to produce chitoooligosaccharides were pharmaceutical and food grade. The treatments were depolymerization using UV-C light irradiation (75 minutes), papain enzyme hydrolysis (15 g/L for 16 hours, 40°C and pH 5), and the combination of UV and enzymes. The results showed that the grade of chitosan and the depolymerization method affected the product characteristics. The three methods used in pharmaceutical grade chitosan produce chitoooligosaccharide that dissolved directly in water with a neutral pH. Chitoooligosaccharide yields were >62%, whiteness degree of 99.33%, molecular weight <5.5 kDa, and degree of deacetylation >85%. Food grade chitosan depolymerized using different methods was not dissolved in water with a neutral pH.

Keywords: chitoooligosaccharide, food grade, pharmaceutical grade, UV-enzyme combination

PENDAHULUAN –

Kitosan merupakan produk turunan kitin, limbah hasil samping dari industri perikanan yang memiliki nilai jual tinggi. Indonesia termasuk negara pengekspor produk perikanan terbesar di dunia, terutama ekspor udang yang limbahnya menjadi bahan baku kitosan. Produksi udang terus meningkat, begitu juga dengan limbah karapas udang sekitar 250.000 ton per tahun (Harjanti 2014). Limbah karapas udang mengandung protein 25-40%, kalsium karbonat (CaCO_3) 40-50%, dan kitin 20-36,61%. Tingginya kandungan kitin ini menjadikan limbah karapas udang sebagai bahan baku utama produksi kitosan. Terdapat tiga kelas kualitas kitosan di pasaran, yaitu kitosan *industrial grade*, *food grade* dan *pharmaceutical grade*. Perbedaan dari ketiganya terdapat pada metode pembuatan, derajat deasetilasi dan berat molekulnya.

Kitosan dihasilkan melalui proses depolimerisasi dari kitin dengan kelarutan dan fungsionalitas yang lebih baik. Secara kimiawi kitin merupakan polimer β -(1,4)-2-asetamida-2-dioksi-D-glukosa yang tidak dapat larut air dan asam lemah. Proses deasetilasi kitin menghasilkan polimer kitin yang 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 (Mourya *et al.* 2011). Kelarutan kitosan bergantung pada nilai derajat deasetilasi (DD) dan berat molekul (BM). Nilai DD kitosan yang >70% sudah dapat terlarut sebagian dalam pH netral, sedangkan kitosan yang dapat larut dengan baik dalam air memiliki derajat deasetilasi >85% (Pacheco-Torgal 2016). Derajat deasetilasi dari kualitas kitosan adalah *industrial grade* (DD \geq 70%), *food grade* (DD \geq 85%) dan *pharmaceutical grade* (DD \geq 90%) (Poeloengasih *et al.* 2008). Selain itu, BM juga berpengaruh terhadap kelarutan, semakin kecil maka semakin cepat terlarut (Du dan Vuong 2019). Ukuran BM kitosan bervariasi dari 200-1000 kDa (Lodhi *et al.* 2014).

Kualitas kitosan berpengaruh terhadap aplikasinya. Kitosan dari udang yang melalui proses depolimerisasi dapat digunakan pada pengobatan (obat, organ buatan, membran

dan serat), farmasi (fungisida dan penghantar obat) (Barbosa *et al.* 2019), sistem makanan (bahan pengawet, pelapis, agen antimikroba dan antioksidan) (Abdelmalek *et al.* 2017), dan kosmetik (krim tubuh, aditif rambut, dan losion) (Huang *et al.* 2020). Kitosan adalah polimer alami yang bermuatan positif, hal ini memungkinkan kitosan untuk diaplikasikan sebagai penghantar obat (Parhi 2020). Namun kitosan tanpa proses depolimerisasi, aplikasinya terbatas karena hanya dapat larut dalam kondisi asam, sehingga tidak memungkinkan untuk digunakan dalam aplikasi biomedis.

Depolimerisasi kitosan melalui pemutusan ikatan glikosidik menghasilkan oligokitosan yang dapat larut dalam air (pH netral), serta memiliki aplikasi luas (Sanria *et al.* 2017). Oligokitosan merupakan produk hasil depolimerisasi kitosan dengan struktur homo atau hetero-oligomer dari GlcN dan/atau GlcNAc yang dihubungkan oleh ikatan β (1,4) glikosidik (Yang dan Yu 2014). Oligokitosan pada umumnya memiliki derajat polimerisasi (DP) <20 dan berat molekul rata-rata hingga 3.900 Da (0,2-30 kDa) (Mourya *et al.* 2011). Oligokitosan termasuk produk bernilai tinggi dengan potensi besar di banyak bidang, termasuk pertanian, kosmetik, makanan fungsional, farmasi dan obat-obatan (Miguez *et al.* 2021). Depolimerisasi kitosan dapat dilakukan secara fisik dan enzimatis.

Secara fisik, metode depolimerisasi radiasi sinar ultraviolet dengan waktu lama penyinaran terbaik 75 menit menghasilkan kitosan larut air dengan berat molekul $169,46 \pm 0,30$ kDa (Nuryadin *et al.* 2020). Kelebihan metode tersebut yaitu dapat menurunkan berat molekul kitosan secara eksponensial (Miguez *et al.* 2021). Depolimerisasi dengan sinar ultraviolet dapat memengaruhi produksi turunan dari radikal bebas oksidatif seperti superoksida yang dapat menghidrolisis ikatan glikosida pada kitosan. Selama proses depolimerisasi tersebut terjadi peningkatan absorpsi yang disebabkan oleh peningkatan gugus karbonil dan amino pada struktur oligokitosan (Najafabadi *et al.* 2018).

Depolimerisasi kitosan secara enzimatis umumnya menggunakan kitosanase, namun enzim tersebut memiliki biaya tinggi dan

ketersediaannya terbatas, memungkinkan penggunaan enzim non-spesifik dengan biaya lebih rendah dan ketersediaannya lebih luas, seperti enzim papain (Jung dan Park 2014). Enzim papain dapat memutuskan ikatan β (1,4) glikosidik pada kitosan. Kelebihan metode ini yaitu tidak menghasilkan produk samping yang berbahaya sehingga ramah lingkungan, serta beroperasi dalam kondisi suhu relatif rendah dan sedikit asam (Sheldon *et al.* 2018). Metode tersebut memiliki kemampuan dalam mengontrol reaksi, serta pembentukan produk melalui konsentrasi enzim, pH, suhu, dan waktu reaksi (Sinha *et al.* 2016). Depolimerisasi kitosan secara enzimatik dapat diterapkan, karena enzim bertindak secara spesifik di situs reaktif dengan memecah molekul menjadi oligomer, atau bekerja dari satu ujung melepaskan monomer atau dimer secara berurutan (Almanza *et al.* 2019). Penelitian terdahulu oleh Laokuldilok *et al.* (2017) menggunakan metode depolimerisasi enzim papain dengan konsentrasi enzim 0,003% dan suhu 40°C, serta waktu hidrolisis terbaik selama 16 jam menghasilkan oligokitosan dengan bobot molekul 4,3 kDa.

Kombinasi antara depolimerisasi kitosan secara fisik dan enzimatik diharapkan dapat menjadi pilihan untuk menghasilkan oligokitosan. Depolimerisasi kitosan yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode enzimatik dan/atau fisik yaitu dengan menggunakan enzim papain dan/atau radiasi sinar ultraviolet. Sejauh ini penelitian tentang kombinasi cara depolimerisasi kitosan dengan enzim papain dan radiasi sinar ultraviolet belum banyak dikaji. Selain metode tersebut, pada penelitian ini digunakan metode gabungan enzim papain dan radiasi sinar ultraviolet. Penelitian ini bertujuan untuk menentukan pengaruh metode depolimerisasi dua kelas kitosan yang beredar dipasaran terhadap karakteristiknya.

BAHAN DAN METODE

Bahan dan Alat –

Alat yang digunakan meliputi alat gelas, termometer, timbangan analitik, *stopwatch*, *color reader* RGB-1002, tabung erlenmeyer, lemari pendingin, pengaduk magnet, *Fourier*

Transform Infrared Spectroscopy (FTIR *Spectroscopy*) (Merk PerkinElmer), lampu ultraviolet (UV-C 2220 volt), *brookfield digital viscometer* (Model LV Brookfield, Inggris) dengan spindle SC2, serta kain nilon 400 mesh. Bahan yang digunakan meliputi kitosan karapas udang *food grade* dan *pharmaceutical grade* diperoleh dari CV. ChiMultiguna, Cirebon, enzim papain (Merck), asam asetat (CH₃COOH 1%), akuades, KBr, Isopropil Alkohol (IPA 99%), dan NaOH 0,1 N (Merck).

Metode Penelitian

Metode yang digunakan merupakan modifikasi dari (Laokuldilok *et al.* 2017). Larutan kitosan 2% (b/v) diperoleh dengan cara melarutkan kitosan sebanyak 2 g ke dalam 100 mL CH₃COOH 1%, kemudian diaduk hingga homogen menggunakan pengaduk magnet dengan suhu 50°C selama 60 menit mengacu pada Ridho *et al.* (2018). Larutan kitosan kemudian melalui proses hidrolisis secara fisik dan/atau enzimatik. Hidrolisis secara fisik menggunakan paparan sinar ultraviolet (lampu UV-C 220 volt) selama 75 menit (Nuryadin *et al.* 2020). Hidrolisis enzimatik menggunakan enzim papain sebanyak 15 g/L selama 16 jam, 40°C dan pH 5, kemudian reaksi dihentikan dengan pemanasan dalam air mendidih selama 10 menit. Perlakuan kombinasi diawali dengan hidrolisis secara fisik, dilanjutkan dengan hidrolisis secara enzimatik. Sampel yang sudah dihidrolisis distabilkan selama 10 menit, kemudian dinetralkan menggunakan isopropil alkohol (IPA 99%) dengan perbandingan 1:2 dan difiltrasi menggunakan kain nilon 400 mesh sampai pH 6. Sampel dikeringkan pada suhu 18°C selama 4–5 jam, kemudian ditimbang sehingga dari persentasenya didapat rendemen oligokitosan.

Prosedur Analisis

Derajat putih oligokitosan

Derajat putih oligokitosan diukur menggunakan *color reader* RGB-1002. Pengukuran tersebut dilakukan dengan cara sampel diletakkan di wadah berlatar belakang putih, kemudian ujung reseptor *color analyzer* ditempelkan ke sampel hingga lampu sensor pada alat menyala. Hasil nilai R, G, B akan

terlihat pada alat, kemudian dikonversi dalam bentuk L, a, b yang akan menghasilkan nilai derajat putih oligokitosan (MRC 2013).

Viskositas oligokitosan

Viskositas diukur menggunakan *brookfield dial viscometer operating instructions* (Atma *et al.* 2018). Persiapan uji diawali dengan melarutkan kitosan pada pelarut sesuai dengan kelarutannya. Kitosan *pharmaceutical grade* dilarutkan dalam air dan kitosan *food grade* dilarutkan dalam 0,5% CH₃COOH dengan persentase kitosan dalam pelarut 2% (b/v), untuk sampel sebelum dan sesudah perlakuan. Sebelumnya, telah dicoba untuk melarutkan kitosan *food grade* dalam air namun tidak dapat larut. Viskometer *Brookfield* sebelum digunakan, dikalibrasi terlebih dahulu dengan mengukur viskositas akuades dan mengatur kecepatan putaran *spindle*, serta nomor *spindel* yang digunakan. Hasil pengukuran viskositas *brookfield* disebut viskositas spesifik (Wardhani *et al.* 2013). Oligokitosan diukur nilai viskositasnya atau kekentalan (cP) dengan dengan *brookfield digital viscometer* (Model LV Brookfield, Inggris) menggunakan *spindle 2* kecepatan 100 rpm pada suhu 27°C dan %torque antara 10%-100%, untuk mencegah turbulensi dan eror. Larutan kitosan dan oligokitosan masing-masing dimasukkan ke dalam gelas piala sebanyak 200 mL, kemudian *spindle* diturunkan hingga tercelup ke dalam sampel. Angka viskositas akan muncul pada alat viskometer.

Bobot molekul oligokitosan

Nilai viskositas intrinsik dihitung untuk memperoleh nilai berat molekul oligokitosan (Wardhani *et al.* 2013). Viskositas intrinsik diperoleh dari viskositas spesifik (hasil pengukuran viskometer) menggunakan persamaan Huggins:

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

Keterangan:

η_{sp} = viskositas spesifik (cP); C = konsentrasi larutan (g/L); kH = konstanta Huggins (0,3); $[\eta]$ = viskositas intrinsik (dL/g)

Hubungan antara berat molekul dengan viskositas pada oligokitosan mengikuti persamaan Mark Houwink. Nilai eksponen a dan konstanta k_{MH} tergantung pada jenis polimer dan pelarut yang digunakan. Perhitungan sudah sesuai dengan ketentuan Mark Houwink untuk polimer kitosan. Nilai eksponen a dan konstanta k_{MH} dalam perhitungan ini berdasarkan Chen dan Tsaih (1998); Jonathan *et al.* (1998):

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

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

Keterangan:

$[\eta]$ = viskositas intrinsik (dL/g); k_{MH} = asam asetat $4,74 \times 10^{-4}$ dan air $3,10 \times 10^{-2}$; a = asam asetat 0,723 dan air 2,03; M = berat molekul (Da)

Analisis spektrum gugus fungsi

Analisis spektrum gugus fungsi FTIR dilakukan pada sampel kitosan komersial dan oligokitosan hasil depolimerisasi enzimatis. Prosedur analisis meliputi beberapa tahapan yaitu pembuatan pelet KBr sampel uji, pengukuran absorbansi, dan interpretasi hasil. Sampel yang telah di vakum dihaluskan terlebih dahulu, kemudian diambil 5 mg dan dicampur dengan 1.000 mg KBr untuk dibuat pelet dengan pencetak vakum. Kepingan hasil pengepresan diukur absorbansinya menggunakan instrumen spektrofotometer FTIR dengan jangkauan bilangan gelombang antara 400–4.000 cm⁻¹. Data spektrum gugus fungsi FTIR kitosan komersial dan oligokitosan selanjutnya diinterpretasikan dengan mengacu pada tabel absorpsi inframerah spektroskopi (Amin *et al.* 2019).

Analisis derajat deasetilasi dengan metode FTIR

Analisis derajat deasetilasi (DD) ditentukan menggunakan hasil dari analisis FTIR yang mengacu pada penelitian Domszy dan Robert (1985). Puncak tertinggi (P_0) dan puncak terendah (P) dicatat dan diukur dengan garis dasar yang dipilih. Derajat

deasetilasi ditentukan dengan persamaan (1) dan (2):

$$A = \log \frac{P_0}{P} \dots \dots \dots (1)$$

Keterangan:

P_0 = Jarak antara garis dasar dengan garis singgung antara dua puncak tertinggi dengan panjang gelombang 1.655 cm^{-1} atau 3.450 cm^{-1}
 P = Jarak antara garis dasar dengan lembah terendah dengan panjang gelombang 1.655 cm^{-1} atau 3.450 cm^{-1}

$$\% DD = [1 - (\frac{A_{1655}}{A_{3450}} \times \frac{1}{1,33})] \times 100\% \dots \dots \dots (2)$$

Keterangan:

$A_{1,655}$ = Absorbansi pada panjang gelombang 1.655 cm^{-1} (serapan pita amida)
 $A_{3,450}$ = Absorbansi pada panjang gelombang 3.450 cm^{-1} (serapan gugus hidroksil)
 1,33 = Konstanta untuk derajat deasetilasi

Analisis Data

Analisis data dilakukan untuk mengetahui pengaruh kombinasi perlakuan enzim papain dan/atau radiasi sinar ultraviolet terhadap karakteristik oligokitosan yang dihasilkan. Taraf perlakuan yang digunakan adalah radiasi sinar ultraviolet tanpa penambahan enzim papain, enzim papain tanpa radiasi sinar ultraviolet, serta kombinasi radiasi sinar ultraviolet dan enzim papain dengan tiga kali ulangan. Rancangan percobaan yang digunakan pada penelitian ini yaitu Rancangan Acak Lengkap Faktorial *Univariate* dengan perlakuan perbedaan metode depolimerisasi kitosan dan jenis kitosan. Data yang diperoleh dianalisis menggunakan ANOVA dengan selang kepercayaan 95% dan dilanjutkan

dengan uji Duncan apabila hasil yang diperoleh berpengaruh nyata menggunakan perangkat lunak *Statistical Product and Service Solutions* (SPSS) versi 25.0 (Walpole 1992).

HASIL DAN PEMBAHASAN Rendemen

Rendemen merupakan perbandingan berat kering produk yang dihasilkan dengan berat bahan dan termasuk suatu nilai penting dalam pembuatan produk (Dewatisari *et al.* 2017). Dari dua gram kitosan yang diberi perlakuan, >61% produk dihasilkan. Interaksi antara jenis kitosan dan metode yang digunakan berpengaruh secara signifikan terhadap rendemen yang dihasilkan ($p < 0.05$). Persentase rendemen oligokitosan hasil depolimerisasi dapat dilihat pada *Table 1*.

Rendemen kitosan setelah mendapatkan perlakuan, proses pengendapan, penyaringan dan pengeringan dengan suhu rendah. Rendemen tertinggi didapat dari perlakuan kombinasi UV dan enzim papain dan diikuti oleh perlakuan enzim papain saja, yaitu 84,83% dan 83,5%. Rendemen dengan perlakuan lainnya tidak berbeda nyata ($p < 0,05$). Perbedaan rendemen ini dapat disebabkan oleh tahapan proses yang dilakukan. Hasil rendemen oligokitosan sesuai dengan penelitian Jian dan Shen (2002) yang menyatakan bahwa kitosan dengan berat molekul yang rendah dapat menghasilkan rendemen sebesar 60–85%. Chamidah *et al.* (2019) menyatakan bahwa proses depolimerisasi dapat mengakibatkan partikel-partikel kitosan terlarut dalam air dan menjadi lebih halus akibat penurunan berat molekul. Proses filtrasi menggunakan isopropil alkohol (IPA) dengan kondisi dua

Table 1 Percent yield of depolymerized chitosan treated by UV light irradiation, enzyme and the combination method

Material Treatment	Food Grade (%)	Pharmaceutical Grade (%)
Without Treatment	-	-
UV	61.67±0.76 ^a	62.50±2.18 ^a
Enzyme	83.50±1.32 ^b	64.33±3.55 ^a
UV+Enzyme	84.83±1.04 ^b	66.00±1.80 ^a

Values are mean±SD. Different letter indicates significant difference between groups ($p < 0.05$)



Figure 1 Appearance of chitosan (1) food grade, (2) pharmaceutical grade with treatment (a) without treatment; (b) UV; (c) Enzyme; (d) UV+Enzyme

kali dari volume awalnya dapat menghasilkan rendemen yang optimal (Hidayah *et al.* 2014).

Derajat Putih

Derajat putih merupakan kemampuan suatu bahan untuk memantulkan cahaya yang mengenai permukaan bahan tersebut (Putri *et al.* 2018). Penampakan kitosan setelah perlakuan dapat dilihat pada *Figure 1*. Depolimerisasi menggunakan variasi metode menunjukkan pengaruh signifikan terhadap derajat putih oligokitosan ($p < 0,05$).

Persentase nilai derajat putih sebelum dan sesudah perlakuan dapat dilihat pada *Figure 2*. Depolimerisasi menggunakan variasi metode dan jenis kitosan, serta interaksinya menunjukkan pengaruh signifikan terhadap derajat putih oligokitosan ($p < 0,05$). Perbedaan signifikan terjadi pada kitosan yang telah diberi perlakuan, yaitu derajat putih pada kitosan *pharmaceutical grade* meningkat setelah perlakuan sedangkan kitosan *food grade* menurun. Pengolahan karapas udang menjadi kitosan melalui proses

demineralisasi, deproteinasi dan deasetilasi, proses demineralisasi memengaruhi warna kitin sebagai bahan baku pembuatan kitosan (Purwanti *et al.* 2014). Warna lebih cerah tanpa proses demineralisasi karena proses demineralisasi meningkatkan kandungan nitrogen, sedangkan proses deproteinasi menurunkan kandungan nitrogen, sehingga dibutuhkan kombinasi proses demineralisasi dan deproteinasi yang tepat untuk menghasilkan warna putih (Poeloengasih *et al.* 2008). Selain itu, kitosan *pharmaceutical grade* melalui proses penghilangan warna dengan menggunakan etanol atau eter, sehingga warnanya menjadi lebih putih (Qian dan Glanville 2005). Lee *et al.* (2005) melaporkan bahwa proses depolimerisasi akan menghasilkan warna putih pada oligokitosan. Hidayah *et al.* (2014) menyatakan bahwa semakin tinggi konsentrasi IPA, maka warna yang dihasilkan semakin cerah karena kemampuannya untuk mendegradasi pigmen. Hasil derajat putih juga dapat dipengaruhi oleh lama waktu

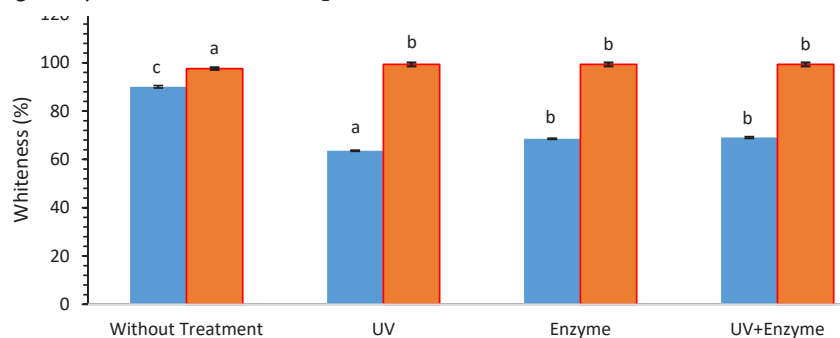


Figure 2 The degree of whiteness from food grade (blue) and pharmaceutical grade (red) treated by UV light irradiation, papain enzyme, and the combination of UV-enzyme. Values with different letter indicates significant difference between groups ($p < 0,05$)

depolimerisasi. Hal tersebut disebabkan karena terjadinya oksidasi pada beberapa gugus amino yang tidak bermuatan positif, sehingga menurunnya jumlah asam amino (Yu *et al.* 2009).

Kelarutan oligokitosan

Kelarutan merupakan sebagian jumlah maksimum zat terlarut (solut) yang dapat dilarutkan pada pelarut tertentu membentuk larutan homogen (Pal *et al.* 2020). Kitosan tidak dapat larut dalam air dengan pH netral, tetapi dapat larut dalam pelarut asam (Lodhi *et al.* 2014). Sedangkan, oligokitosan memiliki kelarutan yang baik dalam air dengan pH netral. Kelarutan ini menjadi parameter kunci untuk membedakan antara kitosan dan oligokitosan. Kitosan yang digunakan pada penelitian ini, baik *food grade* ataupun *pharmaceutical grade* diketahui tidak dapat larut dalam air, kitosan tersebut dapat larut pada larutan asam asetat 1%. Kenampakan kelarutan kitosan sebelum dan setelah dilakukan depolimerisasi dengan metode berbeda dapat dilihat pada *Figure 3*.

Depolimerisasi yang dilakukan pada penelitian ini dapat memberikan pengaruh terhadap kelarutan kitosan yang dihasilkan (*Figure 3*). Kitosan *pharmaceutical grade* yang telah didepolimerisasi dengan tiga metode berbeda diketahui dapat larut secara sempurna dalam air dengan pH netral. Sedangkan, hasil depolimerisasi dari kitosan

food grade tidak dapat larut dalam air dengan pH netral, namun dapat larut pada larutan asam asetat 0,5%. Hal ini diduga bahwa pengaruh metode depolimerisasi pada jenis kitosan menghasilkan karakteristik yang berbeda. Kelarutan kitosan dipengaruhi oleh derajat depolimerisasi dan bobot molekulnya. Semakin kecil nilai parameter tersebut maka kitosan tersebut dapat larut dalam pH netral. Menurut Du *et al.* (2009), berat molekul yang tinggi menyebabkan rendahnya kelarutan kitosan dalam air. Semakin sedikit gugus asetil kitosan berarti interaksi antara ion dan ikatan hidrogen kitosan akan semakin kuat. Oleh karena itu, kelarutan zat akan meningkat karena rantai yang lebih pendek (Shahidi *et al.* 1999).

Viskositas dan Berat Molekul

Pemotongan rantai kitosan dengan sinar ultraviolet dan/atau enzim papain yang digunakan pada proses depolimerisasi dapat menurunkan nilai viskositas dan berat molekul kitosan. Kitosan yang belum melalui depolimerisasi dilarutkan dalam larutan asam asetat 1%. Preparasi sampel hasil depolimerisasi sebelum analisis viskositas merujuk pada sifat kelarutan (*Figure 3*). Interaksi antara jenis kitosan dan metode yang digunakan berpengaruh secara signifikan terhadap viskositas dan berat molekul yang dihasilkan ($p < 0.05$). Hasil depolimerisasi kitosan *pharmaceutical grade* dilarutkan dalam

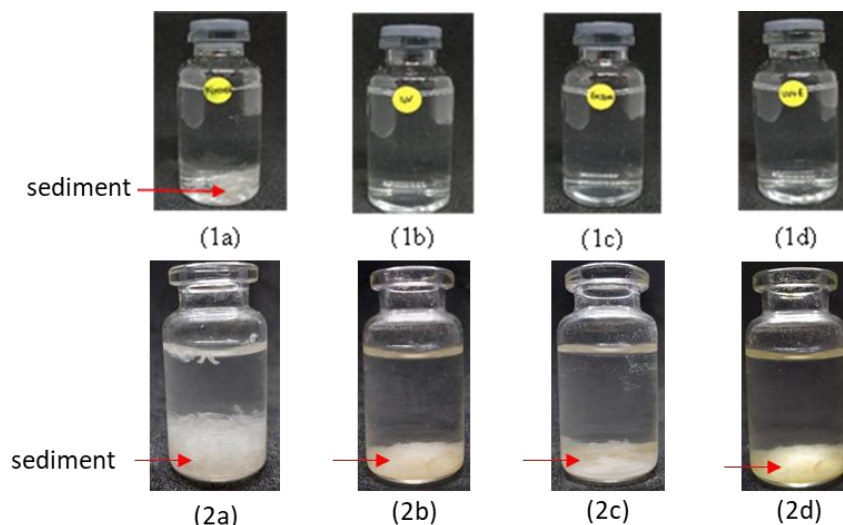


Figure 3 The appearance of solubility chitosan (1) pharmaceutical grade and (2) food grade with treatment (a) without treatment; (b) UV; (c) Enzyme; (d) UV+Enzyme in water

Table 2 Viscosity and molecular weight of chitosan food grade and pharmaceutical grade treated by UV light irradiation, papain enzyme, and the combination of UV-enzyme.

Treatment	Viscosity (cP)	Molecular Weight (kDa)
Food Grade		
Without Treatment	331.60±2.00 ^d	2,213.85±4.90 ^d
UV	187.73±0.61 ^c	1,765.01±2.49 ^c
Enzyme	98.80±0.40 ^b	1,293.25±2.85 ^b
UV+Enzyme	61.07±0.61 ^a	966.64±6.54 ^a
Pharma Grade		
Without Treatment	261.20±1.60 ^d	51.05±0.18 ^c
UV	131.33±1.40 ^c	5.44±0.01 ^b
Enzyme	103.60±0.80 ^b	5.10±0.02 ^a
UV+Enzyme	92.13±0.61 ^a	4.94±0.02 ^a

Note: values are mean±SD, different letter indicates significant difference between groups ($p < 0.05$)

air pH netral, sedangkan hasil depolimerisasi kitosan *food grade* dilarutkan dalam larutan asam asetat 0,5%. Nilai viskositas kitosan dan oligokitosan dapat dilihat pada *Table 2*.

Nilai viskositas yang dihasilkan sesuai dengan penelitian GRAS (2012) yang menyatakan bahwa kitosan dan oligokitosan memiliki rentang nilai viskositas sebesar 25–5000 cP. Depolimerisasi menggunakan variasi metode menunjukkan pengaruh signifikan terhadap viskositas oligokitosan ($p < 0,05$). Nilai viskositas kitosan dari *pharmaceutical grade* dan *food grade* menurun dengan perlakuan yang diberikan. Viskositas terendah pada kitosan yang diberi perlakuan kombinasi UV dan enzim. Akan tetapi, ada perbedaan pelarut yang digunakan. Untuk kitosan *pharmaceutical grade*, kitosan dilarutkan menggunakan air, sedangkan *food grade* dilarutkan dalam asam asetat 0,5-1%. Setelah perlakuan, kitosan *food grade* tetap tidak dapat larut dalam air. Hal ini dipengaruhi oleh berat molekul kitosan.

Kitosan dapat dikelompokkan berdasarkan berat molekulnya, antara lain berat molekul rendah (<100 kDa), berat molekul sedang (100–1.000 kDa), dan berat molekul tinggi (>1.000 kDa) (Kim 2018). Berat molekul kitosan *pharmaceutical grade* awal sebesar 51,05 kDa, nilai tersebut sesuai dengan penelitian Kim (2018) dengan kategori berat

molekul rendah. Berat molekul kitosan *food grade* awal 2.213,85 kDa, sehingga tergolong berat molekul tinggi. Depolimerisasi pada kitosan *pharmaceutical grade* sesuai dengan kriteria oligokitosan dengan rentang nilai berat molekul oligokitosan berkisar <3 kDa dan <5,5 kDa (Renuka *et al.* 2021). Hasil berat molekul dari kitosan *pharmaceutical grade* sesuai dengan kriteria oligokitosan (*Table 2*). Depolimerisasi menggunakan variasi metode menunjukkan pengaruh signifikan terhadap berat molekul oligokitosan ($p < 0,05$).

Depolimerisasi dengan irradiasi sinar ultraviolet dan/atau enzim papain dapat menurunkan nilai viskositas dan berat molekul kitosan. Radiasi sinar ultraviolet dapat membentuk radikal bebas seperti radikal hidroksil atau radikal oksigen. Radikal bebas yang terbentuk memiliki kandungan energi yang besar untuk memecah ikatan glikosidik kitosan menjadi kitosan dengan rantai molekul lebih pendek tanpa mengubah struktur kimianya (Najafabadi *et al.* 2018). Enzim papain dalam proses depolimerisasi dapat menurunkan nilai viskositas dan berat molekul kitosan dengan aksi hidrolisis endo-enzim. Enzim papain dapat memutuskan ikatan glikosidik sehingga rantai molekul kitosan lebih pendek. Nilai viskositas kitosan sebanding dengan berat molekulnya (Dong *et al.* 2015). Metode depolimerisasi

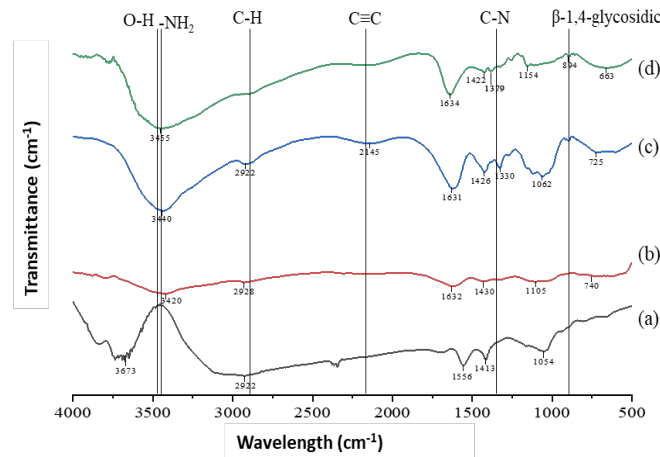


Figure 4 FTIR functional groups of food grade chitosan: (a) without treatment, (b) UV, (c) enzyme, and (d) UV + enzyme treatment

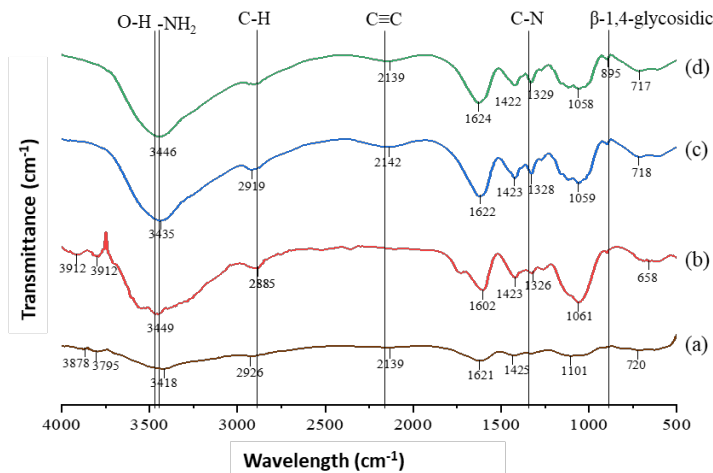


Figure 5 FTIR functional groups of pharmaceutical grade chitosan: (a) without treatment, (b) enzyme, and (d) UV + enzyme treatment

dengan kombinasi (sinar ultraviolet dan enzim papain) memperoleh nilai viskositas dan berat molekul lebih rendah karena adanya pemutusan ikatan glikosidik dua tahap, dengan sinar ultraviolet dan enzim papain.

Gugus fungsi FTIR dan derajat deasetilasi

Analisis gugus fungsi FTIR dilakukan pada delapan sampel. Hasil analisis FTIR pada kitosan *food grade* terlihat bahwa pada setiap perlakuan yaitu UV, enzim, serta UV dan enzim menghasilkan *peak* gugus fungsi yang semakin dalam (Figure 4). *Peak* tersebut menunjukkan keberadaan gugus fungsi yang dihasilkan lebih banyak dari kontrol (kitosan). Gugus C-N, β-1,4-glikosidik, dan -NH₂ dari awalnya sedikit pada struktur kitosan tanpa perlakuan menjadi lebih banyak di struktur

kitosan dengan perlakuan.

Gugus fungsi β-1,4-glikosidik berdasarkan spektrum FTIR tersebut sudah mengalami pemutusan pada rentang serapan 800–700 cm⁻¹. Perbedaan struktur kitosan dan oligokitosan dapat dilihat pada Figure 5. Kondisi awal kitosan *pharmaceutical grade* sudah lebih menunjukkan keberadaan gugus fungsi amida sebagai penanda kitosan. Hasil FTIR setelah perlakuan yang menghasilkan oligokitosan menunjukkan *peak* yang lebih jelas pada panjang gelombang 3.450, 2.885, 2.120, 1.655, 1.326, dan 800-700 cm⁻¹.

Spektrum gugus fungsi FTIR oligokitosan pada setiap perlakuan memiliki gugus fungsi yang sama seperti pada kitosan. Liu *et al.* (2006) menyatakan bahwa struktur kimia oligokitosan mirip dengan kitosan dan tidak ada perbedaan yang signifikan

antara residu kitosan sebelum dan sesudah depolimerisasi. Proses depolimerisasi menyebabkan terjadinya pemutusan ikatan kovalen dan glikosida antar molekul kitosan sehingga menghasilkan rantai polimer lebih pendek tetapi tidak merubah struktur molekul kitosan (Yulina *et al.* 2014). Santoso *et al.* (2020) menyatakan bahwa pemutusan ikatan β -1,4-glikosidik pada rantai kitosan juga dapat disebabkan karena CH_3COOH yang digunakan pada saat depolimerisasi untuk membantu proses radiasi sinar ultraviolet dan enzimatis dengan enzim papain. Dompeipen (2017) melaporkan bahwa ikatan glikosidik sangat rentan mengalami proses pemutusan apabila terkena larutan asam.

Derajat deasetilasi merupakan suatu parameter lepasnya gugus asetil dari kitosan (Ghofari *et al.* 2020). Kitosan *pharmaceutical grade* dan *food grade* pada penelitian ini memiliki derajat deasetilasi sebesar 78,70% dan 54,91%. Peningkatan derajat deasetilasi kitosan terjadi setelah proses depolimerisasi pada masing-masing perlakuan yaitu sinar ultraviolet, enzim, serta sinar ultraviolet dan enzim menjadi 72,88%, 75,29%, dan 78,76% pada kitosan *food grade*, serta 84,63%, 88,97%, dan 90,40% pada kitosan *pharmaceutical grade*. Radiasi sinar ultraviolet dapat membentuk radikal bebas. Radikal bebas yang terbentuk memiliki kandungan energi yang besar untuk memecah ikatan glikosidik kitosan menjadi kitosan dengan rantai molekul lebih pendek tanpa mengubah struktur kimianya (Najafabadi *et al.* 2018). Enzim papain dapat meningkatkan nilai derajat deasetilasi oligokitosan dengan memecah ikatan β -1,4-glikosidik dari GlcN-GlcN dan GlcN-GlcNAc pada kitosan (Pan *et al.* 2015). Peningkatan nilai derajat deasetilasi oligokitosan disebabkan karena semakin banyaknya gugus asetil yang terlepas dan semakin banyaknya gugus aktif amida bebas ($-\text{NH}_2$) yang terbentuk, serta munculnya pita kecil pada spektrum FTIR oligokitosan (Renuka *et al.* 2021).

Penggunaan UV dan enzim papain berpengaruh nyata pada kitosan. Kitosan *food grade* dan *pharmaceutical grade* meningkat derajat deasetilasinya dan menurun berat molekulnya sebagai respon dari perlakuan yang

dilakukan. Depolimerisasi kitosan dengan kombinasi UV dan enzim papain pada kitosan *food grade* menghasilkan kitosan derajat deasetilasi 78,7%, sama dengan kualitas awal kitosan *pharmaceutical grade*. Depolimerisasi pada kitosan *pharmaceutical grade* dengan UV, enzim maupun kombinasinya menghasilkan kitosan dengan kualitas yang identik. Dari penelitian ini, terbukti bahwa oligokitosan dapat dihasilkan dengan metode UV, enzim maupun kombinasinya.

KESIMPULAN

Oligokitosan dapat dihasilkan dari kitosan *pharmaceutical grade* dengan menggunakan metode UV, enzim maupun kombinasi UV dan enzim. Karakteristik oligokitosan dapat dilihat dari rendemen, warna, berat molekul, dan derajat deasetilasi. Ketiga metode menghasilkan oligokitosan dengan rendemen >62%, derajat putih 99,33%, berat molekul <5,5 KDa, dan derajat deasetilasi >85%. Depolimerisasi kitosan *food grade* belum menghasilkan oligokitosan.

DAFTAR PUSTAKA

- Abdelmalek, BE, Sila A, Haddar A, Bougatef A, Ayadi MA. 2017. β -Chitin and chitosan from squid gladius: Biological activities of chitosan and its application as clarifying agent for apple juice. *International journal of biological macromolecules*. 104:953-962
- Almanza EA, Delgado RS, Galarza ZV, Hernandez EG, Cocolletzi HH. 2019. Enzymatic depolymerization of chitosan for the preparation of functional membranes. *Journal of Chemistry*. 1-8.
- Amin A, Khairi N, Allo EK. 2019. Sintesis dan karakterisasi kitosan dari limbah cangkang udang sebagai stabilizer terhadap Ag nanopartikel. *Fullerene Journal of Chemistry*. 4(2):86-91.
- Atma Y, Ramdhani H, Mustopa AZ, Pertiwi M, Maisarah R. 2018. Karakteristik fisikokimia gelatin tulang ikan patin (*Pangasius sutchi*) hasil ekstraksi menggunakan limbah buah nanas. *Agritech*. 38(1):56-63.
- Aziz N, Gufran MFFB, Pitoyo WU, Suhandi. 2017. Pemanfaatan ekstrak kitosan dari limbah sisik ikan bandeng di Selat

- Makassar pada pembuatan bioplastik ramah lingkungan. *Hasanuddin Student Journal*. 1(1):56–61.
- Azizati Z. 2019. Pembuatan dan karakteristik kitosan kulit udang galah. *Walisongo Journal of Chemistry*. 2(1):10–16.
- Barbosa AI, Coutinho AJ, Costa Lima SA, Reis S. 2019. Marine polysaccharides in pharmaceutical applications: fucoidan and chitosan as key players in the drug delivery match field. *Marine Drugs*. 17(12):654
- Chamidah A, Widiyanti CN, Febiyani NN. 2019. Pemanfaatan kitosan larut air sebagai *hand sanitizer* antiseptik. *Jurnal Perikanan*. 21(1):9–16.
- Chen RH, Tsaih ML. 1998. Effect of temperature on the intrinsic viscosity and conformation of chitosans in dilute HCl solution. *Biological Macromolecules*. 23(2):135–141.
- Dewatisari WF, Rumiyantri L, Rakhmawati I. 2017. Rendemen dan skrining fitokimia pada ekstrak daun *Sansevieria* sp.. *Jurnal Penelitian Pertanian Terapan*. 17(3):197–202.
- Dompeipen EJ. 2017. Isolasi dan identifikasi kitin dan kitosan dari kulit udang windu (*Penaeus monodon*) dengan spektroskopi infrared. *Majalah Biam*. 13(1):31–41.
- Domszy JG, Robert GAF. 1985. Evaluation of infrared spectroscopic techniques for analyzing chitosan. *Makromolekul Chemical*. 186(1):1671–1677.
- Dong H, Wang Y, Zhao L, Zhou J, Xia Q, Qiu Y. 2015. Key technologies of enzymatic preparation for DP 6–8 chitooligosaccharides. *Journal of Food Process Engineering*. 38(4):336–344.
- Du XD, Vuong BX. 2019. Study on preparation of water-soluble chitosan with varying molecular weights and its antioxidant activity. *Advances in Materials Science and Engineering Hindawi*. 1687–8434
- Du Y, Zhao Y, Dai S, Yang B. 2009. Preparation of water-soluble chitosan from shrimp shell and its antibacterial activity. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. 10:103–107.
- Fawzya YN, Rahmawati A, Patantis G. 2018. Physicochemical properties of chitooligosaccharide prepared by using chitosanase from *Stenotrophomonas maltophilia* KPU 2123. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*. 139:1–8.
- Flory PJ. 1953. *Principles of Polymer Chemistry*. New York (NY): Cornell University Press.
- Ghofari MA, Ridlo A, Pramesti R. 2020. Isolasi glukosamin dari limbah cangkang rajungan *Portunus pelagicus* (Linnaeus,1758) (Malacostraca:Portunidae) dengan hidrolisis asam klorida. *Journal of Marine Research*. 9(2):151–158.
- [GRAS] *General Recognition of Safety*. 2012. *Chitoclear® Shrimp-Derived Chitosan: Food Usage Conditions for General Recognition of Safety*. Iceland (IL): GRAS.
- Guan G, Azad MAK, Lin Y, Kim SW, Tian Y, Liu G, Wang H. 2019. Biological effects and applications of chitosan and chitooligosaccharides. *Frontiers in Physiology*. 10(516):1–10.
- Guo Ji X, Lin Chang K, Chen M, Liang ZL, Osman A, Yin H, Ming ZL. 2021. In vitro fermentation of chitooligosaccharides and their effects on human fecal microbial community structure and metabolites. *LWT-Food Science and Technology*. 144:111224.
- Harjanti RS. 2014. Kitosan dari limbah udang sebagai bahan pengawet ayam goreng. *Jurnal Rekayasa Proses*. 8(1): 12–19.
- Hayes M. 2012. Chitin, Chitosan and their derivatives from marine rest raw materials: potential food and pharmaceutical applications. *Marine Bioactive Compounds: Sources, Characterization and Applications*. 115–128.
- Hidayah N, Widyastuti S, Rosmilawati, Saptono W, Handito D. 2014. Pengaruh konsentrasi isopropil alkohol terhadap sifat mikrobiologis dan organoleptik karaginan *Eucheuma cottonii*. *Jurnal Agroteksos*. 24(3): 153–158.
- Huang J, Yin Z, Wu J. 2020. Covalent attachment of chitosan to graphene via click chemistry for superior antibacterial activity. *Material Advances*. (1): 579–583.
- Ibrahim HM, El-Zairy EMR. 2015. *Chitosan as a Biomaterial–Structure, Properties,*

- and Electrospun Nanofibers*. Concepts, Compounds and The Alternatives of Antibacterial: Intech. 81–101.
- Je JY, Kim SK. 2012. Chitosan as a potential marine nutraceutical. *Advances in Food and Nutrition Research*. 65:121-137.
- Jia Z, Shen H. 2004. Effect of reaction temperature and reaction time on the preparation of low-molecular weight chitosan using phosphoric acid. *Carbohydrate Polymers*. 49(4):393–396.
- Jung WJ, Park RD. 2014. Bioproduction of chitooligosaccharides: present and perspectives. *Marine Drugs*. 12:5328–5356.
- Jonathan ZK, Mohammad RK, Tam Bui, Katherine AC. 1998. Characterization of deacetylated chitosan and chitosan molecular weight review. *Canadian Journal of Chemistry*. 76(11):1699-1706.
- Kaczmarek MB, Swita KS, Li X, Antczak MS, Daroch M. 2019. Enzymatic modifications of chitin, chitosan, and chitooligosaccharides. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*.
- Kim SK. 2018. *Healthcare Using Marine Organisms*. United States of America (USA): CRC Press.
- [KKP] Kementerian Kelautan dan Perikanan. 2021. Ekspor produk perikanan naik 6,6 persen di 2021.
- Kumar MY, Ravi A. 2017. Extraction and characterization of chitosan from shrimp waste for application in the feed industry. *International Journal of Science, Environment and Technology*. 6(4):2548–2557.
- Lalenoh BA, Cahyono E. 2018. Karakterisasi kitosan dari limbah rajungan (*Portunus pelagicus*). *Jurnal Ilmiah Tindalung*. 4(1): 30–33.
- Laokuldilok T, Potivas T, Kanha N, Surawang S, Seesuriyachan P, Wangtueai S, Phimolsiripol Y, Regenstein JM. 2017. Physicochemical, antioxidant, and antimicrobial properties of chitooligosaccharides produced using three different enzyme treatments. *Food Bioscience*. 18:28–33.
- Lee LF, Lee WK, Maskat MY, Ilias RMD, Aziz SA, Kamarulzaman K, Osman H. 2005. Partial depolymerization of chitosan with the aid of bromelain. *Pakistan Journal of Biological Sciences*. 8(1): 3–77.
- Li B, Wang L, Xu F, Gang X, Demirci U, Wei D, *et al.* 2015. Hydrosoluble, UV-crosslinkable and injectable chitosan for patterned cell-laden microgel and rapid transdermal curing hydrogel in vivo. *Acta Biomaterialia*. 22:59–69.
- Liu S, Li K, Xing R, Li P. 2006. Advances in preparation, analysis and biological activities of single chitooligosaccharide. *Carbohydrate Polymers*. 139:178–190.
- Lodhi G, Kim YS, Hwang JW, Kim SK, Jeon YJ, Je JY, Ahn CB, Moon SH, Jeon BT, Park PJ. 2014. Chitooligosaccharide and its derivatives: Preparation and biological applications. *BioMed Research International*. 1–13.
- Miguez N, Kidibule P, Moriano PS, Ballesteros AO, Lobato MF, Plou FJ. 2021. Enzymatic synthesis and characterization of different families of chitooligosaccharides and their bioactive properties. *Applied Sciences*. 11(3212):1–14.
- Montilla A, Ruiz-Matute AI, Corzo N, Giacomini C, Irazoqui G. 2013. Enzymatic generation of chitooligosaccharides from chitosan using soluble and immobilized glycosyltransferase (*Branchzyme*). *Journal Agricultural and Food Chemistry*. 61:10360–10367.
- Mourya VK, Inamdar NN, Choudhari YM. 2011. Chitooligosaccharides: synthesis, characterization and applications. *Polymer science*. 53(7):583–612.
- [MRC] Medical Research Council. 2013. Color Meter: RGB-1002, Color Analyzer, R, G, B, Hue, Saturation, Luminance.
- Najafabadi SAA, Honarkae H, Moghadam M, Mirkhani V, Tahriri M, Tayebi L. 2018. UV irradiation-H₂O₂ system as an effective combined depolymerization technique to produce oligosaccharides from chitosan. *Bio-Design And Manufacturing*. 1(1):62–68.
- Nasution Z, Agusnar H, Alfian Z, Wirjosentono B. 2013. Pengaruh viskositas kitosan dari berbagai berat molekul terhadap pembuatan kitosan nanopartikel menggunakan *ultrasonic bath*. *Jurnal*

- Teknologi Kimia Unimal*. 2(2):68–79.
- Nurhikmawati F, Manurung M, Laksmiwati AAIAM. 2014. Penggunaan kitosan dari limbah kulit udang sebagai inhibitor keasaman tuak. *Jurnal Kimia*. 8(2):191–197.
- Nuryadin DFE, Setyaningsih I, Hadiningtyas SD. 2020. Depolimerisasi kitosan menggunakan sinar ultraviolet dan katalis asam klorida. *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*. 23(3):412–422.
- Qin Z, Zhao L. 2019. The History of Chito/Chitin Oligosaccharides and Its Monomer. In: Zhao L (eds) *Oligosaccharides of Chitin and Chitosan*. Springer (SGP): 3–14.
- Pacheco-Torgal F. 2016. Biopolymer and biotech admixtures for eco-efficient construction materials: introduction to biopolymers and biotech admixtures for eco-efficient construction materials. *Biopolymer and Biotech admixtures for eco-efficient construction*. 1-10
- Pal A, Narinder, Ajeet. 2020. Solubility: An overview. *International Journal of Pharmaceutical Chemistry and Analysis*. 7(4):166–171.
- Pan AD, Zeng HY, Alain GBFC, Li YQ. 2015. Enzymolysis of chitosan by papain and its kinetics. *Carbohydrate Polymers*. 135: 199–206.
- Parhi R. 2020. Drug delivery applications of chitin and chitosan: a review. *Environmental Chemistry Letters*. 18:577–594
- Poeloengasih CD, Hernawan, Angwar M. 2008. Isolation and characterization of chitin and chitosan prepared under various processing times. *Indonesian Journal of Chemistry*. 8(2): 189–192.
- Purwanti A, Yusuf M. 2014. Evaluasi proses pengolahan limbah kulit udang untuk meningkatkan mutu kitosan yang dihasilkan. *Jurnal Teknologi*. 7(1):83–90.
- Putri NA, Herlina H, Subagio A. 2018. Karakteristik mocaf (*Modified Cassava Flour*) berdasarkan metode penggilingan dan lama fermentasi. *Jurnal Agroteknologi*. 12(1):79–89.
- Renuka V, Ravishankar CNR, Krishnamoorthy E, Zynudheen AA. 2021. Comparison of depolymerization of chitosan into chitooligosaccharides from the shrimp shell waste of *Parapeneopsis stylifera* by non-specific enzymes. *Research Square*. 1–21.
- Ridho FA, Riyanto B, Uju. Kitoooligosakarida melalui depolimerisasi kitosan dengan hidrogen peroksida untuk aplikasi biopreservatif pindang tradisional. *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*. 20(3): 536–548.
- Sanchez A, Mengibar M, Rivera-Rodriguez G, Moerchbacher B, Acosta N, Heras A. 2017. The effect of preparation processes on the physicochemical characteristics and antibacterial activity of chitooligosaccharides. *Carbohydrate Polymers*. 157:251–257.
- Sanria N, Uju, Suptijah P. 2017. Depolimerisasi kappa karaginan dengan menggunakan peracetic acid. *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*. 20(3):524–535.
- Santoso J, Adiputra KC, Soedirga LC, Tarman K. 2020. Effect of acetic acid hydrolysis on the characteristics of water soluble chitosan. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*. 414(1):1–8.
- Shahidi F, Arachchi JKV, Jeon YJ. Food applications of chitin and chitosans. 1999. *Trends in Food Science and Technology* 10:37–51.
- Sheldon RA, Woodley JM, 2018. Role of Biocatalysis in sustainable chemistry. *Chemical Reviews*. 118: 801–838.
- Shon J, Eo JH, Hwang SJ, Eun JB. 2011. Effect of processing condition on functional properties of collagen powder from skate (*Raja kenoei*) skin. *Food Science and Biotechnology*. 20(1):99–106.
- Singh RV, Sambyal K, Negi A, Sonwani S, Mahajan R. 2021. Chitinases production: A robust enzyme and its industrial applications. *Biocatal Biotransform*. 39:161–189.
- Sinha S, Chand S, Tripathi P. 2016. Recent progress in chitosanase production of monomer-free chitooligosaccharides: bioprocess strategies and future applications. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 180(5):1–17.
- Sionkowska A, Planecka A, Lewandowska

- K, Kaczmarek B, Szarszewska P. 2013. Influence of uv-irradiation on molecular weight of chitosan. *Progress on Chemistry and Application of Chitin and its Derivatives*. 18:21–28.
- Sugiyanti D, Darmadji P, Anggrahini S, Anwar C, Santoso U. 2018. Preparation and characterization of chitosan from Indonesian Tambak Lorok Shrimp shell waste and crab shell waste. *Pakistan Journal of Nutrition*. 17(9):446–453.
- Tabassum N, Ahmed S, Ali MA. 2021. Review: Chitooligosaccharides and their structural-functional effect on hydrogels. *Carbohydrate Polymers*. 261:117882.
- Venkatachalapathy R, Packirisamy ASB, Ramachandran ACI, Udhyasooriyan LP, Peter MJ, Senthilnathan K, Basheer VA, Muthusamy S. 2020. Assessing the effect of chitosan on pesticide removal in grape juice during clarification by gas chromatography with tandem mass spectrometry. *Process Biochemistry*. 94:305–312.
- Wahyuni, Ridhay A, Nurakhirawati. 2015. Pengaruh waktu proses deasetilasi kitin dari cangkang bekicot (*Achatina fulica*) terhadap derajat deasetilasi. *Kovalen*. 2(1):1–7.
- Walpole RE. 1992. *Pengantar Statistika Edisi Ke-3*. Jakarta(ID):PT Gramedia Pustaka Utama. 515 hlm.
- Wang SM, Huang QZ, Wang QS. 2005. Study on the synergetic degradation of chitosan with ultraviolet light and hydrogen peroxide. *Carbohydr Research*. 340(1):1143-1147.
- Wardhani IK, Badres S, Prasetyaningrum. 2013. Kinetika reaksi depolimerisasi karaginan pada suhu dan pH optimum dengan katalisator asam sulfat. *Jurnal Teknologi Kimia dan Industri*. 2(4):177–183.
- Yang Y, Yu B. 2014. Recent advances in the synthesis of chitooligosaccharides and congeners. *Tetrahedron*. 70(5):1023–1046.
- Yue W, Yao P, Wei Y. 2009. Influence of ultraviolet-irradiated oxygen on depolymerization of chitosan. *Polymer Degradation and Stability*. 94(5): 851–858.
- Yulina R, Winiati W, Kaspiah C, Septiani W, Mulyawan AS, Wahyudi T. 2014. Pengaruh berat molekul kitosan terhadap fiksasi kitosan pada kain kapas sebagai antibakteri. *Arena Tekstil*. 29(2):81–90.
- Xia Z, Wu S, Chen J. 2013. Preparation of water soluble chitosan by hydrolysis using hydrogen peroxide. *International Journal of Biological Macromolecules*. 59: 242–245.