

CHITOSAN OLIGOMER PRODUCTION FROM WASTE TIGER SHRIMP (*Panaeus monodon*) USING ENZYMES CHITOSANASE OF BACTERIAL ISOLATES *Klebsiella sp*

Produksi Oligomer Kitosan dari Limbah Udang Windu (*Panaeus monodon*) Menggunakan Enzim Kitosanase dari Isolat Bakteri *Klebsiella sp*

Sarni¹, Hasnah Natsir², Seniwati Dali²

¹*Midwifery Academic of National Healing Fondation, Jl. Palagimata, Baubau-Indonesia*

²*Department of Chemistry, Faculty of Mathematics and Natural Sciences, University of Hasanuddin, Jl. Perintis Kemerdekaan 90245, Makassar-Indonesia*

**Corresponding author, Email: sarni_malik@yahoo.com*

Received: Dec 2015 Published: Jan 2016

ABSTRACT

Chitosan is a biopolymer that is the main content of D-glucosamine and several parts of N-acetyl-D-glucosamine bound to β - (1-4) glucoside. Chitosan receive special attention as functional biopolymers for applications in various fields. Chitosan is more effectively absorbed into the human body when it gets converted into chitosan oligomer form. Chitosan oligomer is a mixture of oligomers of D-glucosamine are formed through a process of severing ties depolymerization of chitosan with β -glycosidic. This study aims to produce chitosan oligomer of waste tiger shrimp (*Panaeus monodon*) using enzyme kitosanase of bacteria *Klebsiella sp*. Chitosan oligomer produced by using the enzyme chitosanase at a temperature of 40 °C and pH 8 with the activity of 0.309 U/mL (5,235 U/mg) obtained in the form of a mixture of monomer to octamer, which soluble in acetic acid 0.25% to 0.5%, having intrinsic viscosity decreases with increasing time of incubation is 0.195 (1 hour incubation); 0.9 (incubation 2 hours) and 0.7 (incubation 3 hours) with molecular weight range of 4103.12 g/mol (incubation 1 hour) ; 1483.48 g/mol (incubation 2 hours) and 1065.79 g/mol (incubation 3 hours).

Keywords: *Waste Tiger Shrimp, chitosan, chitosanase, chitosan oligomer.*

PENDAHULUAN

Indonesia memiliki potensi sumber daya alam laut yang sangat melimpah, salah satu diantaranya adalah budidaya udang. Udang merupakan komoditas sektor perikanan yang mempunyai nilai ekonomis tinggi dan menjadi salah satu komoditas ekspor unggulan (Arif, 2013). Data statistik Dirjen Perikanan Budidaya Kementerian Kelautan dan Perikanan, produksi total udang nasional tahun 2014 mencapai 592.219 ton dan jumlah ekspor udang dalam bentuk beku tanpa kepala dan kulit tahun 2014 mencapai 250.000 ton ke pasar dunia (DJPB-KKP.htm, 2015). Hasil samping proses pembekuan sekitar 40 – 50% dari berat udang menjadi limbah (kulit dan kepala) yang saat ini masyarakat hanya menggunakan sebagai bahan perasa pada pembuatan kerupuk dan terasi (Natsir dkk., 2004). Kulit udang yang hanya menjadi limbah mengandung senyawa kimia

yang berpotensi menjadi bahan yang sangat bermanfaat yaitu kitin dan kitosan. Oleh sebab itu untuk mengatasi masalah lingkungan dari limbah ini diperlukan penanganan yang serius agar limbah tersebut dapat memiliki nilai ekonomis.

Kitosan merupakan suatu poli-(2-amino-2-deoksi- β -(1-4)-D-glukopiranos) dengan rumus molekul $(C_6 H_{11} NO_4)_n$ (Arief, 2013) yang dapat diperoleh dari deasetilasi sempurna atau parsial kitin. Kitosan adalah biopolymer yang kandungan utamanya D-glukosamin dan beberapa bagian N-asetil-D-glukosamin yang berikatan pada β -(1-4) glukosida (Mahae dkk., 2011). Kitosan dapat dihidrolisis menjadi bentuk oligomernya yang dikenal dengan oligomer kitosan.

Kitosan mendapat perhatian khusus sebagai biopolimer fungsional untuk aplikasi diberbagai bidang. Penelitian dan pemanfaatan kitosan dan

oligomernya mengalami peningkatan yang signifikan di berbagai bidang terutama dalam bidang farmasi, kesehatan dan industri makanan. Kitosan lebih efektif terserap kedalam tubuh manusia bila dikonversi dulu dalam bentuk oligomer kitosan (Qin Caiqin dkk., 2002).

Oligomer kitosan merupakan campuran oligomer dari D-glukosamin yang terbentuk melalui proses depolimerisasi kitosan dengan memutus ikatan β -glikosidik. Kitoooligomer merupakan kitosan yang telah terdepolimerisasi sehingga memiliki ukuran dan bobot molekul yang lebih kecil. Berkurangnya bobot molekul dari kitosan ini menjadikan sifatnya lebih mudah larut di dalam air dibanding sebelum terdepolimerisasi (Srijanto dkk., 2006; Julianti dkk., 2012).

Pengembangan aplikasi oligomer kitosan pada saat ini dikarenakan sifatnya yang dapat larut dalam air dan ramah lingkungan sehingga penggunaannya relatif aman. Kitoooligomer saat ini di terapkan secara luas dalam bidang kesehatan karena memiliki bioaktivitas sebagai anti bakteri, anti jamur, anti virus, suplement makanan untuk meningkatkan sistem imun terhadap penyakit, anti koagulasi darah dan hipokolesterolemik, anti kanker, anti diabetes dan lain-lain (Srijanto dkk., 2006). Aktivitas biologi dari kitoooligosakarida diketahui bergantung pada struktur kimia yang dimilikinya (Cabrera dkk., 2013).

Oligomer kitosan dapat dihasilkan dengan iradiasi sonik, hidrolisis secara kimiawi dan hidrolisis secara enzimatis. Hidrolisis secara kimiawi dan iradiasi sonik bersifat acak, tidak terkontrol, efisiensi yang rendah dan menghasilkan oligomer dengan derajat polimerisasi (DP) yang rendah dengan lebih banyak monomer D-glukosamin. Sedangkan, hidrolisis secara enzimatis bersifat spesifik, terkontrol, menghasilkan oligomer kitosan dengan DP yang lebih tinggi dan sedikit glukosamin yang dihasilkan serta ramah lingkungan (Jeon dkk., 2000; Meidina dkk., 2005; Wahyuni dkk., 2006; Liu dkk., 2007; Chasanah, 2010), sehingga cara enzimatis ini lebih baik dan umumnya digunakan dalam memproduksi kitoooligosakarida. Salah satu enzim yang dapat digunakan untuk menghidrolisis kitosan adalah enzim kitosanase (Choi dkk., 2004).

Kitoooligosakarida dari limbah senyawa berkitin yang belakangan ini telah menarik

perhatian industri karena manfaatnya untuk pangan dan medis menunjukkan nilai ekonomis yang cukup tinggi. Pasar dunia untuk produk turunan kitin menunjukkan bahwa kitoooligomer adalah produk yang termahal, misalnya kitobiose (Sigma) mencapai 952 USG 10 mg. Oleh karena itu kajian dan penelitian tentang aplikasi kitosan dan oligomernya dipandang sangat penting untuk usaha produksi senyawa bioaktif yang dapat diaplikasikan sebagai pangan fungsional dan nutraceutical (Wahyuni dkk., 2006).

Beberapa penelitian melaporkan potensi oligomer kitosan dari bahan berkitin, misalnya Pae (2001) melaporkan terjadinya induksi granulositik pada sel *promyelocytic leukemia* (HL-60) oleh *water-soluble chitosan oligomer* (WSCO). Caiqin Qin dkk (2002) melaporkan kitosan larut dalam air secara enzimatis dan aktivitasnya sebagai anti tumor. Sri Wahyuni dkk (2006) melaporkan aktivitas anti kanker senyawa-senyawa kitoooligomer. Qingsong Xu dkk (2007) melaporkan kitoooligosakarida dapat menginduksi apoptosis cell kanker *hepatocellular* pada manusia. Sanaa T. El-Sayed dkk (2012) melaporkan kitoooligosakarida yang dihasilkan dengan kitosanase dari *Capsicum annum* efektif dalam menghambat sel karsinoma *hepatocellular* (HEP-G2), sel kanker usus dan sel kanker payudara (MCF7) pada konsentrasi yang berbeda.

Berdasarkan latar belakang dan mengacu pada data-data penelitian sebelumnya tentang pemanfaatan limbah udang dengan mengeksplorasi potensi kitosan dan oligomernya dari limbah berkitin, sehingga pada penelitian ini bertujuan untuk produksi oligomer kitosan dari limbah kulit udang windu (*Panaeus monodon*) di dengan menggunakan enzim kitosanase dari bakteri *Klebsiella sp*.

METODOLOGI

Bahan

Bahan yang digunakan diantaranya serbuk kulit udang windu (*Panaeus monodon*), isolate bakteri *Klebsiella sp* (koleksi laboratorium biokimia Jurusan kimia UNHAS), kitosan DD 85 % (Sigma), yeast ekstrak, bakto pepton, glukosamin (Sigma), n-Propanol p.a (Merck), Amoniak p.a (Merck), Ninhidrin p.a (Merck), HCl 37 % p.a (Merck), NaOH p.a (Merck), NaOCl 0,5 %, CH₃COOH glasial p.a (Merck), NaCl (Merck), CaCl₂ (Merck), K₂HPO₄ (Merck), MgSO₄.7H₂O (Merck).

Alat

Alat yang digunakan adalah hotplate stirer Velp, neraca analitik, inkubator, *autoclave*, lemari pendingin, magnetic stirer, *wrist action shaker*, vortex mixer, *shaker inkubator*, sentrifus dingin, oven (Eyela NDO-400, Jepang), penyaring Buchner, *Freezedryer*, kertas saring *whatman*, penangas, pinset, *waterbath shaker*, pompa vakum, spektronik 20D+, *Fourier Transform Infra Red (FTIR) Spectroscopy* (Shimadzu), Kromatografi Lapis Tipis (KLT), viscometer *Oswald* serta beberapa peralatan gelas (*pyrex*).

Prosedur Kerja

A. Isolasi Kitosan dari Kulit Udang Windu (*Panaeus monodon*)

Proses isolasi kitosan dari limbah kulit udang dilakukan secara kimiawi yang diawali dengan isolasi kitin dari kulit udang windu (*Panaeus monodon*) terdiri dari tiga tahap antara lain demineralisasi, dekolorisasi, deproteinasi. Selanjutnya kitosan dihasilkan dengan deasetilasi kitin secara kimiawi menggunakan NaOH 50 % pada suhu 80 °C selama 90 – 100 menit dengan perbandingan 1 : 10 untuk kitin dan larutan NaOH (Manurung, 2011).

B. Karakterisasi Kitosan dari Kulit Udang Windu (*Panaeus monodon*)

Karakterisasi kitosan yang diperoleh meliputi kadar air, kadar abu, kadar N-total, berat molekul, derajat deasetilasi dan analisis gugus fungsi menggunakan FTIR.

C. Produksi Enzim Kitosanase

Produksi enzim kitosanase dimulai dengan pembuatan medium inokulum untuk starter yang mengandung 0,5% koloidal kitosan, kemudian bakteri *Klebsiella sp* yang diremajakan sebelumnya diinokulasikan dalam media starter dan diinkubasi pada shaker incubator pada suhu 37 °C, 180 – 200 rpm selama 24 jam. Medium starter sebanyak 10% (v/v) diinokulasikan ke dalam medium produksi kemudian diinkubasi selama 60 jam pada suhu 40 °C dan kecepatan yang sama untuk medium starter. Enzim yang dihasilkan disentrifugasi dingin pada 4 °C 3500 rpm selama 30 menit yang diikuti dengan mengukur aktivitas kitosanase serta ditentukan kadar proteinnya dengan metode Lowry, dimana

BSA (*Bovine Serum Albumin*) sebagai larutan standar (Chasanah, 2009 ; Sarni dkk, 2015).

D. Uji Aktivitas Enzim Kitosanase

Uji aktivitas kitosanase dilakukan dengan menggunakan metode *Schales* yang digunakan oleh Yoon dkk (2001), Jo dkk (2003) dan Chasanah dkk (2009). Aktivitas enzim ditentukan berdasarkan jumlah glukosamin yang dibebaskan selama hidrolisis substrat kitosan. Satu unit aktivitas enzim didefinisikan sebagai jumlah enzim yang dibutuhkan untuk menghasilkan μmol residu glukosamin per menit setelah diinkubasi dengan larutan kitosan

E. Produksi Oligomer Kitosan dengan Enzim Kitosanase

Kitosan terlarut 1% dipersiapkan sebagai substrat. Oligomer kitosan dihasilkan dengan mereaksikan enzim dan substrat pada perbandingan volume 1 : 1 dilakukan pada pH dan suhu optimum enzim dan diinkubasi pada inkubator goyang selama 1, 2, dan 3 jam. Reaksi hidrolisis enzimatis untuk tiap waktu inkubasi dihentikan dengan membekukan campuran reaksi selama 15 menit, kemudian panaskan pada penangas air suhu 100 °C selama 10 menit. Larutan kitooligosakarida kemudian dikeringkan dengan *freeze drying* (Choi dkk., 2004; Assis dkk., 2010). Hidrolisat diidentifikasi dengan Kromatografi Lapis Tipis berdasarkan metode yang digunakan oleh Choi dkk (2004) dan Mourya dkk (2011). Oligomer kitosan yang diperoleh tiap waktu inkubasi juga ditentukan berat molekulnya dengan metode viskometri yang digunakan oleh Mourya dkk (2011) dan Julianti dkk (2012).

HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Isolasi dan Karakterisasi Kitin dan Kitosan dari Kulit Udang Windu (*Panaeus monodon*)

Proses sintesis kitosan diawali dengan isolasi kitin dari kulit udang windu yang telah dihaluskan dengan ukuran 60 hingga 80 mesh. Kitin yang diperoleh pada tahap ini sebesar 20,25%. Hasil ini sesuai dengan teori yang mengatakan kadar kitin dalam kulit udang sebesar 15 – 20% (Purwatiningsih, 2009).

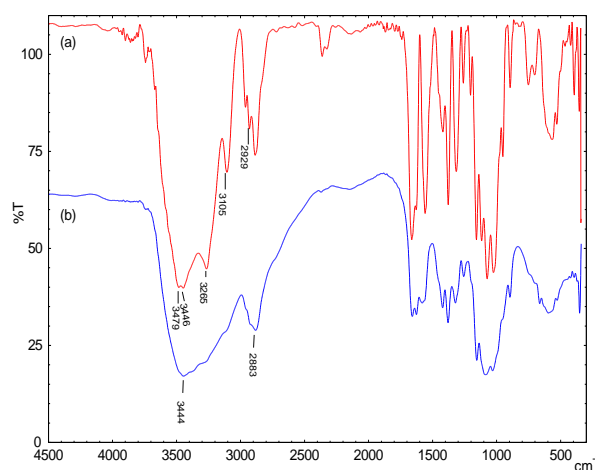
Hasil karakterisasi kitin yang diperoleh pada Tabel 1 menunjukkan bahwa kitin yang

dihasilkan memiliki standard mutu yang baik berdasarkan standard laboratorium.

Tabel 1. Perbandingan karakteristik kitin hasil isolasi dari limbah udang windu (*Penaeus monodon*) dengan kitin standar (Menurut Protan Laboratories)

Jenis Sampel	Kadar Air (%)	Kadar Abu (%)	N-Total (%)	Derajat deasetilasi (%)
Kitin Udang Windu	4,5	0,45	5,3	41,42
Kitin standar (Protan Lab.)*	≤ 10	≤ 2	6 - 7	15 - 70

* nilai karakteristik kitin dari pustaka



Gambar 1. Spektrum FTIR (a) kitin dan (b) kitosan hasil isolasi dari limbah udang windu (*Penaeus monodon*)

Hasil analisis FTIR kitin dari limbah udang windu diperoleh spektrum seperti pada Gambar 1 dan identifikasi puncak serapan spektrum infra merah diperoleh interpretasi gugus fungsi yang menyerap pada senyawa kitin hasil isolasi dapat dilihat pada Table 2.

Tabel 2. Spektra FTIR kitin hasil isolasi dari limbah udang windu (*Penaeus monodon*)

Gugus Fungsi	Frekuensi (cm ⁻¹)
N-H stretch	3479,3446
O-H stretch	3265
C-H stretch alifatik	2929
C=O (amida I)	1658, 1625
N-H bend (amida II)	1554
CH ₃ sym	1377
C-N stretch	1317
C-O-C dlm siklik	1203, 1259
C-O-C stretch pada dialkil	1157, 1116
C-OH stretch	1072

Setelah kitin diperoleh tahap selanjutnya adalah proses deasetilasi untuk menghasilkan

kitosan sebagai turunan kitin. Proses deasetilasi bertujuan untuk menghilangkan gugus asetil pada kitin sehingga menghasilkan derajat kereaktifan kimia dari gugus amino yang tinggi. Kitosan yang dihasilkan pada proses ini sebesar 16,1 gram dari bobot awal (sampel kulit udang) dengan kadar 16,1%. Terjadi penyusutan sebanyak 4,15% setelah proses deasetilasi.

Hasil karakterisasi kitosan dari limbah udang windu (*Penaeus monodon*) dapat dilihat pada Tabel 3. Dari Tabel 3 menunjukkan bahwa kitosan yang dihasilkan secara kimiawi pada penelitian ini ditinjau dari parameter kadar air dan kadar abu telah memenuhi standar, namun kadar N-total dan derajat deasetilasinya belum memenuhi standar ideal kitosan, jika dibandingkan dengan kitosan protan laboratories. Dimana kadar N-total yang diperoleh hanya 6,4%, sedangkan kitosan standar yang ditetapkan memiliki kadar N-total 7–8%. Derajat deasetilasi kitosan yang diperoleh pada penelitian ini hanya sebesar 65,6% dan idealnya menurut standar protan laboratories adalah diatas 70%.

Tabel 3. Karakteristik kitosan dari limbah udang windu (*Penaeus monodon*) secara kimiawi

Parameter	Nilai
Kadar air (%)	4,5
Kadar Abu (%)	0,45
Kadar N-Total (%)	6,4
Berat Molekul (g/mol)	25.410
Derajat Deasetilasi (%)	65,6

Tabel 4. Spektra FTIR kitosan hasil isolasi dari limbah udang windu (*Penaeus monodon*) secara kimiawi

Gugus Fungsi	Frekuensi (cm ⁻¹)
N-H stretch	3444
C-H stretch alifatik	2883
C=O (amida I)	1658
N-H bend (amida II)	1579
CH ₃ sym	1379
C-N stretch	1421
C-O-C dlm siklik	1257
C-O-C stretch pada dialkil	1155
C-OH stretch	1031

Namun menurut Muzzareli (1985) dalam Manurung (2011) mengatakan bahwa kadar minimal derajat deasetilasi supaya dikategorikan kitosan secara umum ialah diatas 50%. Oleh karena itu, hasil yang diperoleh pada proses

deasetilasi dalam penelitian ini tergolong kitosan, namun belum kitosan ideal artinya masih berupa campuran kitin-kitosan.

Hasil analisis FTIR kitosan dari limbah udang windu diperoleh spektrum seperti pada Gambar 1 dan identifikasi puncak serapan spektrum infra merah diperoleh interpretasi gugus fungsi yang menyerap pada senyawa kitosan hasil isolasi dapat dilihat pada Table 4.

B. Produksi dan Uji Aktivitas Enzim Kitosanase

Enzim kitosanase diawali dengan menumbuhkan *klebsiella sp* pada medium fermentasi yang mengandung koloidal kitosan sebagai substratnya untuk mengetahui kondisi optimal produksi. Waktu yang optimal untuk memproduksi enzim kitosanase dari *Klebsiella sp* dalam medium yang mengandung 0,5% kitosan adalah selama 60 jam dengan nilai aktivitas 0,309 U/mL.

Selain pengukuran terhadap nilai aktivitas enzim, pengukuran kadar protein juga diperlukan untuk mengetahui nilai aktivitas spesifik suatu enzim. Pengukuran kadar protein yang terbentuk selama masa produksi enzim menggunakan metode *Lowry*. Kadar protein enzim kitosanase pada aktivitas optimum pada penelitian ini adalah 0,059 mg/mL, sehingga aktivitas spesifik enzim yang diperoleh sebesar 5,235 U/mg (Tabel 5).

Tabel 5. Kadar protein, aktivitas dan aktivititas spesifik *crude* enzim kitosanase dari *Klebsiella sp*.

Sampel	Kadar protein (mg/mL)	Aktivitas (U/mL)	Aktivitas spesifik (U/mg)
Kitosanase	0,059	0,309	5,235

C. Produksi dan Identifikasi Oligomer Kitosan Enzimatis

Pada penelitian ini produksi oligomer kitosan dilakukan secara enzimatik yaitu dengan menggunakan enzim kitosanase dari isolat bakteri *Klebsiella sp* yang telah diproduksi. Enzim kitosanase dapat menghidrolisis kitosan dan kitin, namun yang paling baik adalah dalam bentuk *soluble* kitosan.

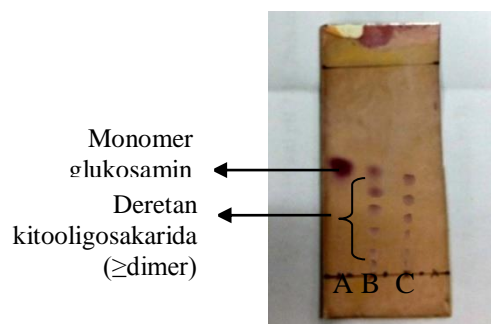
Hidrolisis kitosan menjadi oligomer kitosan secara enzimatik dipengaruhi oleh konsentrasi kitosan, suhu dan pH serta agitasi pada saat reaksi. Oligomer kitosan diproduksi

menggunakan *soluble* kitosan 1% yang direaksikan dengan enzim kitosanase pada suhu 40 °C dan pH 8 selama 1, 2 dan 3 jam dalam inkubator bergoyang. Hal ini dilakukan agar tiap variasi waktu memiliki kondisi awal yang sama. Sehingga diharapkan dapat menghasilkan oligomer-oligomer dengan derajat polimerisasi yang berbeda-beda. Oligomer kitosan kering yang diperoleh setelah dikeringkan dengan *freezedryer* memiliki kadar 57% dan larut dalam asam asetat 0,25% hingga 0,5%.

Tabel 6. Data nilai viskositas Intrinsik oligomer kitosan tiap waktu inkubasi

Jenis Sampel	Viskositas Intrinsik [η]	Berat Molekul (g/mol)
Oligomer kitosan 1 jam	0,195	4.103,12
Oligomer kitosan 2 jam	0,09	1.483,48
Oligomer kitosan 3 jam	0,07	1.065,79

Berdasarkan pengamatan hasil KLT (Gambar 2), produk hasil hidrolisis kitosan dengan enzim kitosanase dari isolate bakteri *Klebsiella sp* terdiri dari monomer hingga oktamer khususnya oligomer kitosan pada waktu 2 dan 3 jam inkubasi. Sedangkan pada 1 jam inkubasi tidak terpisah dengan baik karena rantai monomernya masih lebih panjang. Hasil pemotongan oligomer yang kurang spesifik dan beragam ini, dipengaruhi oleh larutan enzim yang digunakan berupa ekstrak kasar dan substratnya adalah kitosan dengan derajat deasetilasi yang rendah.



Gambar 2. Hasil KLT hidrolisis kitosan dengan kitosanase dari *Klebsiella sp* pada kondisi 40 °C, pH 8,0 selama 3 jam inkubasi (B), 2 jam inkubasi (C) dengan standar monomer glukosamin (A)

Oligomer kitosan yang telah diperoleh tiap waktu inkubasi diukur viskositasnya sehingga kisaran berat molekul kitooligomer yang diperoleh dapat ditentukan dengan menggunakan persamaan Mark-Kun-Houwink. Dari pengukuran viskositas pada Tabel 6, diperoleh viskositas intrinsik kitooligosakarida pada inkubasi 1 jam, 2 jam dan 3 jam berturut-turut yaitu 0,195; 0,09 dan 0,07. Dalam hal ini telah terjadi penurunan nilai viskositas intrinsik dari kitosan setelah inkubasi selama 1 jam (75 %), 2 jam (88,5%) dan 3 jam (95%). Oleh karena viskositas intrinsik berbanding lurus dengan berat molekul, sehingga dengan menurunnya viskositas intrinsik dari oligomer kitosan maka terjadi pula penurunan berat molekulnya, dimana persentasi penurunan berat molekul dari berat kitosan awal setelah inkubasi 1 hingga 3 jam berturut-turut sekitar 84%; 94,2%, 95,8% . Hal ini mengindikasikan bahwa telah terjadi pemutusan ikatan rantai panjang pada kitosan, tepatnya pada ikatan $\beta(1-4)$ glukosida membentuk rantai kitosan yang lebih pendek.

KESIMPULAN

Hasil penelitian menunjukkan oligomer kitosan yang diperoleh berupa campuran antara monomer hingga oktamer yang dapat larut dalam asam asetat 0,25% hingga 0,5%, memiliki viskositas intrinsik yang semakin menurun dengan bertambahnya waktu inkubasi yaitu 0,195 (inkubasi 1jam); 0,9 (inkubasi 2 jam) dan 0,7 (inkubasi 3 jam) dengan kisaran berat molekul 4103,12 g/mol (inkubasi 1 jam); 1483,48 g/mol (inkubasi 2 jam) dan 1065,79 g/mol (inkubasi 3 jam).

DAFTAR PUSTAKA

- Arif, R.A., 2013. *Potensi Kitin Deasetilase dari Bacillus licheniformis HSA3-1A Untuk Produksi Kitosan dari Limbah Udang Putih (Penaeus merguensis) Sebagai Bahan Pengawet Bakso Ikan*. Tesis tidak Diterbitkan. Program Pascasarjana Universitas Hasanuddin, Makassar.
- Assis, C.F., Araújo, N.K., Pagnoncelli, M.G.B., Pedrini, M.R.S., Macedo, G.R., Santos, E.S., 2010. Chitooligosaccharides Enzymatic Production by *Metharhizium anisoliae*. *Bioprocess Biosyst. Eng.* DOI 10.1007/s00449-010-0412
- Cabrera J.C. & Cutsem P.V., 2005. Preparation of Chitooligosaccharides with Degree of Polymerization Higher than 6 By Acid or Enzymatic degradation of Chitosan. *Laboratorio de Oligosacarinas Departamento de Fisiologia Y Bioquimica vegetal, INCA, Cuba. Biochem. Eng. J.* 25 :165 – 172
- Chasanah E., Zilda, S.D., dan Uria A.R., 2009. Screening and Characterization of Bacterial Chitosanase From Marine Environment. *J. Coastal Development*. Vol. 12 (2) : 64-72.
- Chasanah E., 2010. Pengembangan Produk Kitooligosakarida dari Limbah Industri Perikanan Udang Secara Enzimatis Prospek dan Kendala. Balai Besar Riset Pengolahan Produk dan Bioteknologi Kelautan dan Perikanan. *J. Squalen* Vol 5 (2).
- Choi J.Y., Kim E.J., Piao Z., Yun Y.C., Shin Y.C., 2004. Purification and Characterization of Chitosanase from *Bacillus* sp. Strain KCTC 0377BP and Its Application for the Production of Chitosan Oligosaccharides. *American Society for Microbiology, Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 70 (8) : 4522-4531
- El-Sayat, S., El-Sayat, M., Shousha, W.G., Shehata, A.N., Omar, N.I., 2012. Production of Novel Antitumor Chitooligosaccharides by Using Purified Chitosanases from *Capsium annuum* Leaves. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 6(4):1-15
- Jeon Y.J. & Kim S.K., 2000. Production of Chitooligosaccharides Using Ultrafiltration Membran Reactor and Their Antibacterial Activity. *Carb. Polymer* 41: 133-141.
- Jo Yu-Young, Jo K.J., Jin Y.L., Kuk J.H., Kim K.Y., Kim T.H., Park R.D., 2003. Characterization of Endochitosanases Producing *Bacillus cereus* P16. *J.Microbiol.Biotechnol* 13 (6) : 960-968
- Julianti S., Agusnar H., Alfian z., 2012. Pembuatan Kitosan Oligomer Melalui Metode Degradasi Oksidatif dan Pengaruhnya Terhadap Viskositas dan Berat Molekul. Universitas Sumatera Utara, Medan, *J. Saintia Kimia* Vol.1(1)
- Liu B. , Wan-Shun Liu, Bao-Qin Han, Yu-Ying Sun, 2007. Anti diabetic effects of chitooligosaccharides on pancreatic islet cells in streptozotocin-induced diabetic

- rats. *World J. Gastroenterol* 13 (5): 725–731.
- Mahae N., Chalut C., Muhammad P., 2011. Antioxidant and antimicrobial Properties of Chitosan Sugar Complex. *Int. Food Research J.* 18(4): 1543 – 1551.
- Manurung, M., 2011. Potensi Kitin/Kitosan dari Kulit Udang sebagai Biokoagulan Penjernih Air. *J. Kimia* 5(2): 182 - 188
- Meidina, 2005. *Aktivitas Antibakteri Oligomer Kitosan yang Diproduksi menggunakan Kitosanase dari Isolat B. Licheniformis MB-2*, Tesis tidak Diterbitkan. Pasca Sarjana, Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Mourya, V.K., Inamdar, N.N., Choudari, Y.M., 2011. Chitooligosaccharides : Synthesis, Characterization and Applications. Government Pharmacy Collage, Osmanpura, Aurangabad, India. *Polimer Science. Ser. A* 53 (7): 583 – 612.
- Natsir, H., Noor, A., Asfari, N., 2004. Konversi Kitin dari Kulit Kepiting (*Scylla serrata*) menjadi Kitosan dengan Enzim Kitin Deasetilase. *Marine Chimica Acta* 6 (1), 6–9.
- Pae, Ho, 2001. Introduction of Granulocytic Differentiation in Acute Promyelocytic Leukemia Cell (HL-60) by Water-Soluble chitosan oligomer. *Leukemia Res.* 25: 339 – 346.
- Purwatiningsih, S., Wukirsari, T., Sjahriza, A., Wahyono, D. 2009. *Sumber Biomaterial Masa Depan*. IPB Press. Bogor.
- Qin Caiqin, Du Yumin, Xiao Ling, Li Zhan, Gao Xiao hai, 2002. Enzymic Preparation Of Water-Soluble Chitosan and Their Antitumor Activity. Wuhan University, China. *Int. J. Biological Macromolecules* 31(2002):111-117.
- Sarni, Natsir, H., Dali, S., 2015. Produksi dan Karakterisasi Enzim Kitosanase dari Isolat Bakteri *Klebsiella sp.* *Jurnal Techno* Vol. 04 No. 02
- Srijanto B., Paryanto I., Masduki, Purwatiningsih, 2006. Pengaruh Derajat Deasetilasi Bahan Baku Pada Depolimersasi Kitosan. Pusat Pengkajian dan Penerapan Teknologi Farmasi dan Medika-BPPT, Bogor, *Akta Kimia Indonesia* Vol.1 (2) : 67-72.
- Wahyuni S., Zakaria F., Witarto A.B., Syah D., Suhartono M.T., 2006. Aktivitas Anti Kanker Senyawa-Senyawa Kitoooligomer. *J. Teknologi dan Industri Pangan* Vol XVII (1).
- Xu, Q., Dou, J., Wei, P., Tan, C., Yun, X., Wu, Y., Bai, X., Ma, X., Du, Y., 2007. Chitooligosaccharides Induce Apoptosis of Human Hepatocellular Carcinoma Cell via Up-regulation of Bax. Elsevier Science Direct. *Carbohydrat Polimers* 71