

KARAKTERISASI KITOSAN DARI CANGKANG KERANG DARAH (*Anadara granosa*)

CHARACTERIZATION CHITOSAN FROM THE SHELLS OF BLOOD CLAMS (*Anadara granosa*)

Tiki Masindi* and Nuniek Herdyastuti

Departement of Chemistry, Faculty of Mathematics and Natural Sciences
State University of Surabaya
Jl. Ketintang Surabaya (60231), telp 031-8298761

*Corresponding author, email: tikimasindi08@gmail.com

Abstrak. Kitosan dapat diisolasi melalui tahap demineralisasi, deproteinasi, dan deasetilasi. Tujuan dari penelitian ini adalah mengetahui karakterisasi kitosan cangkang kerang darah yang menggunakan enzim papain pada proses deproteinasi. Pada tahap deproteinasi dilakukan variasi jumlah enzim dan waktu inkubasi untuk memperoleh kadar nitrogen terendah yang ditentukan melalui metode Kjeldahl. Karakterisasi kitosan yang dilakukan meliputi kadar air, kadar abu serta analisis gugus fungsi menggunakan spektroskopi FTIR. Hasil karakterisasi kitosan diperoleh kadar air sebesar 1,16%, kadar abu 1,25%, derajat deasetilasi 91,7% serta memiliki gugus fungsi kitosan yang spesifik yaitu $-OH$, $-NH$, $-CH$, $-CN$, and $-CO$.

Kata Kunci: Enzimatis, karakterisasi, kitosan.

Abstract. Chitosan can be isolated through the demineralization, deproteination and deacetylation. The aim of this experiment were to know the chitosan characterization from the shells of blood clams which used papain enzyme on deproteination phase. In the deproteination phase was done enzyme volume and incubation time variation to get the lower total nitrogen which using Kjeldahl method. Chitosan characterization through the involve water, ash content, and functional group using FTIR spectroscopy. The characterization result of chitosan was showed the involve water is 1,16%, ash content is 1,25%, deacetylation degrees is 91,7% and have the specific functional groups of chitosan is $-OH$, $-NH$, $-CH$, $-CN$, and $-CO$.

Key words: Enzymatically, characterization, chitosan.

PENDAHULUAN

Kerang darah dengan nama binomial *Anadara granosa* adalah salah satu jenis kerang yang mudah ditemukan dikawasan Asia Tenggara dan Asia Timur. Kerang ini dapat menghasilkan cairan merah yang berisi hemoglobin sehingga biasa disebut kerang darah [1]. Kerang darah memiliki potensi yang besar sehingga berdampak pada peningkatan limbah cangkang kerang darah yang dihasilkan. Limbah yang dibiarkan menumpuk tanpa adanya penanganan akan menimbulkan pencemaran serta menyebabkan estetika lingkungan terganggu. Cangkang kerang darah memiliki senyawa kimia seperti kitin, kalsium karbonat, kalsium hidrosiapatit dan kalsium fosfat [2]. Kandungan kitin menyebabkan cangkang kerang darah dapat diolah menjadi kitosan.

Kitosan merupakan suatu polimer yang terdiri dari monomer glukosamin dengan ikatan β -(1-4). Kitosan terbentuk ketika gugus asetil pada kitin tersubstitusi oleh hidrogen menjadi gugus amina [3]. Laboratorium Protan menyatakan bahwa standar mutu kitosan adalah ukuran partikel berupa butiran / serbuk, kadar air $\leq 10\%$, kadar abu $\leq 2\%$, DD $\geq 70\%$ [4].

Secara umum isolasi kitosan terdiri dari deproteinasi, demineralisasi dan deasetilasi. Demineralisasi merupakan proses untuk menghilangkan garam mineral pada cangkang dengan penambahan asam klorida. Deproteinasi merupakan proses untuk memisahkan ikatan antara kitin dengan protein (kitinoprotein). Deproteinasi secara kimiawi menggunakan basa natrium

hidroksida, sedangkan deproteinasi secara biologi dilakukan dengan penambahan enzim (enzimatis).

Kemajuan dalam bidang industri dan bioteknologi memungkinkan dilakukannya proses enzimatis dalam pembuatan kitosan. Enzim bersifat spesifik terhadap substrat yang akan dikatalisisnya, serta memiliki daya katalitik yang besar [5]. Proses analisa dengan menggunakan enzim umumnya dengan cara mereaksikan substrat dengan enzim yang telah dilarutkan dalam air [6]. Proses enzimatis pada industri menggunakan golongan protease, dimana salah satunya adalah papain.

Enzim papain merupakan enzim protease yang didapatkan dari tanaman papaya. Semua bagian papaya dari batang, buah, daun hingga tangkai daun mengandung enzim papain dalam getahnya. Bagian buah papaya merupakan bagian yang paling banyak mengandung enzim papain. Papain memiliki residu sulfhidril pada sisi aktifnya sehingga dikatakan sebagai protease sulfhidril. Senyawa seperti logam berat, oksidator dan alkilator merupakan penghambat enzim papain. Daya tahan panas papain lebih tinggi dibandingkan enzim protease lainnya. Sifat enzim papain antara lain bekerja optimum pada suhu 50-60°C dengan pH 5-7, serta memiliki aktivitas proteolitik antara 70-100 unit/gram [7].

Pada proses deproteinasi diperlukan kondisi yang optimum agar menghasilkan kadar nitrogen total yang rendah. Rendahnya kadar nitrogen total menunjukkan banyaknya protein yang terhidrolisis. Hargono (2008), telah melakukan tahap deproteinasi kitosan dengan perbandingan pelarut 1:10 (b/v) selama 1 jam sedangkan Trisnawati (2013) melakukan deproteinasi dengan perbandingan pelarut 1:10 (b/v) selama 2 jam. Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui karakterisasi kitosan yang menggunakan enzim papain pada proses deproteinasi.

METODE PENELITIAN

Bahan

Beberapa bahan yang digunakan pada penelitian ini: cangkang kerang darah, NaOH p.a, HCl p.a, aquades, enzim papain, kitosan komersial.

Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain: alat-alat gelas yang umum digunakan dalam laboratorium, blender, ayakan 100 mesh, *Hot plate stirrer*, termometer, neraca analitik, penyaring *Buchner*, oven, tanur, seperangkat alat Kjeldhal (merk Butchi), Spektroskopi FTIR (merk PerkinElmer Version 10.03.06).

Prosedur Penelitian

Cangkang kerang darah yang telah dicuci bersih kemudian dikeringkan dibawah sinar matahari dan dihaluskan. Serbuk yang dihasilkan berukuran 100 mesh.

1. Pembuatan Kitosan

a. Demineralisasi (Arif, 2013)

Sebanyak 50 gram serbuk cangkang kerang darah ditambahkan HCl 1N dengan perbandingan 1:10 (b/v). Campuran ini kemudian diaduk menggunakan *magnetic stirrer* selama 1 jam pada dengan 75°C. Selanjutnya disaring menggunakan penyaring *Buchner* dan residu yang dihasilkan dicuci dengan aquades. Serbuk hasil demineralisasi dikeringkan dalam oven sampai kering.

b. Deproteinasi (Arif, 2013)

Tahap deproteinasi dilakukan dengan variasi jumlah enzim yaitu 1:5, 1:10, 1:15 dan 1:20, serta waktu inkubasi 1, 2, 3, dan 24 jam. Sampel hasil demineralisasi ditimbang sebanyak 3 gram kemudian dimasukkan kedalam masing – masing erlenmeyer. Serbuk hasil demineralisasi disaring, dicuci menggunakan aquades dan dikeringkan dalam oven sampai kering. Masing – masing serbuk hasil deproteinasi diuji kadar nitrogen totalnya menggunakan metode Kjeldahl.

c. Deasetilasi (Purwanti, 2014)

Serbuk hasil deproteinasi ditambah dengan NaOH 60% dengan perbandingan 1:10 (b/v) kemudian diaduk pada suhu 100°C selama 30 menit. Endapan yang diperoleh dicuci dan dikeringkan.

2. Karakterisasi Kitosan

a. Kadar Air (AOAC, 1995)

Sebanyak 0,5 gram kitosan dimasukkan kedalam cawan porselin yang diketahui berat kosongnya. Kitosan kemudian dioven pada suhu 105°C selama 2 jam, dimasukkan dalam desikator selama 30 menit lalu ditimbang. Perlakuan ini dilakukan hingga beratnya konstan. Kadar air dihitung menggunakan persamaan berikut :

$$\text{Kadar Air} = \frac{B1 - B2(g)}{Bs (g)} \times 100\%$$

Keterangan :

B1 = Berat awal (g)

B2 = Berat akhir setelah kering (g)

Bs = Berat sampel (g)

b. Kadar Abu (AOAC, 1995)

Sebanyak 0,5 gram kitosan dimasukkan kedalam cawan porselin yang telah diketahui berat kosongnya. Kitosan dipijarkan dalam tanur hingga 500°C selama 30-45 menit kemudian dinaikkan menjadi 900°C selama 60-90 menit. Kitosan yang

telah diabukan dimasukkan kedalam desikator hingga suhu ruang lalu ditimbang beratnya. Kadar abu dihitung menggunakan persamaan berikut :

$$\text{Kadar Abu} = \frac{B2-B1(g)}{Bs (g)} \times 100\%$$

Keterangan :

B1 = Berat cawan kosong (g)

B2 = Berat (sampel+cawan) setelah diabukan (g)

Bs = Berat sampel (g)

c. Analisis menggunakan Spektroskopi FTIR (Purwatiningsih, 2009)

Kitosan yang diperoleh diuji menggunakan spektroskopi FTIR, *peak* yang dihasilkan dibandingkan dengan *peak* kitosan komersial. Berdasarkan *peak* yang diperoleh, dihitung derajat deasetilasinya dengan membandingkan absorbansi panjang gelombang gugus amida ($1650-1500\text{ cm}^{-1}$ (A_{1655})) dengan absorbansi panjang gelombang gugus amina ($3750-3000\text{ cm}^{-1}$ (A_{3450})). Derajat deasetilasi kitosan dihitung menggunakan persamaan berikut :

$$DD = 1 - \left[\frac{A_{1655}}{A_{3450}} \times \frac{1}{1,33} \right]$$

HASIL DAN PEMBAHASAN

Cangkang kerang darah berpotensi untuk dijadikan kitosan karena memiliki kandungan kitin sebesar 14-35% [13]. Tahap awal dalam pembuatan kitosan adalah perisapan sampel yang meliputi pengeringan, penghalusan dan pengayakan. Tahap ini bertujuan untuk memperluas permukaan cangkang kerang darah seperti pada Gambar 1. Semakin luas permukaan, maka akan semakin mudah serbuk cangkang kerang darah untuk bereaksi saat proses isolasi berlangsung. Hal ini disebabkan laju reaksi yang semakin meningkat seiring bertambahnya luas permukaan.



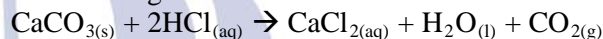
Gambar 1. (a) Cangkang kerang darah (b) Serbuk cangkang kerang darah.

1. Isolasi Kitosan

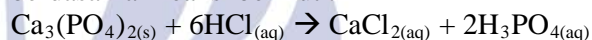
a. Demineralisasi

Cangkang kerang darah mengandung garam anorganik, sehingga proses demineralisasi dilakukan untuk menghilangkan garam anorganik atau mineral-mineral yang terkandung didalamnya. Mineral yang banyak terkandung pada cangkang kerang darah adalah $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2(s)$ dan $\text{CaCO}_3(s)$ [14]. Proses demineralisasi menghasilkan 23,7866 gram dari 50 gram sampel.

Penggunaan HCl dilakukan untuk melarutkan ion Ca^{2+} dalam bentuk $\text{CaCO}_3(s)$ sehingga menghasilkan $\text{CaCl}_{2(aq)}$ yang larut air dengan produk samping gas CO_2 dan air [15]. $\text{CaCO}_3(s)$ pada serbuk cangkang kerang darah akan bereaksi dengan HCl membentuk gelembung yang menandakan adanya gas CO_2 . Reaksi yang terjadi adalah sebagai berikut :



Sedangkan $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2(s)$ akan bereaksi dengan HCl berdasarkan reaksi berikut :



Pemanasan pada proses demineralisasi dilakukan untuk mempercepat proses rusaknya mineral [16]. Selain itu, pengadukan diperlukan untuk menghindari meluapnya gas CO_2 selama proses demineralisasi berlangsung. Pencucian dilakukan selain untuk menetralkan pH residu juga dilakukan untuk melarutkan $\text{CaCl}_{2(aq)}$ dan $\text{H}_3\text{PO}_{4(aq)}$ yang larut dalam air [17].

b. Deproteinasi

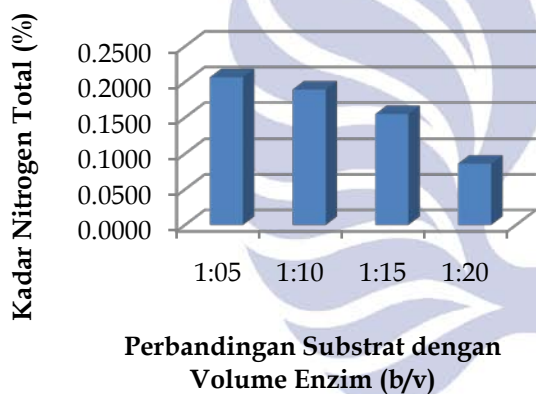
Deproteinasi dapat dilakukan dengan penambahan pereaksi kimia seperti natrium hidroksida atau secara enzimatik dengan penambahan enzim protease. Deproteinasi menggunakan pereaksi kimia menyebabkan pemutusan secara acak pada gugus asetil kitin sehingga menghasilkan derajat deasetilasi yang tinggi, namun pemutusan protein tidak berjalan maksimal. Deproteinasi secara enzimatik menyebabkan pemutusan protein berjalan dengan maksimal, karena enzim protease yang digunakan hanya akan memutus ikatan peptida dalam protein.

Deproteinasi dalam penelitian ini dilakukan dengan cara memutuskan ikatan antara kitin dengan protein secara enzimatik. Tahap deproteinasi dilakukan dengan variasi perbandingan volume enzim yaitu 1:5, 1:10, 1:15 dan 1:20 (b/v) serta perbedaan waktu inkubasi yaitu 1, 2, 3, dan 24 jam pada suhu 50°C . Hasil deproteinasi ini diperoleh kitin.

Inkubasi dilakukan pada suhu 50°C karena aktivitas relatif enzim protease berada pada suhu 50°C . Kenaikan suhu diatas suhu optimum akan menyebabkan aktivitas enzim menurun [18].

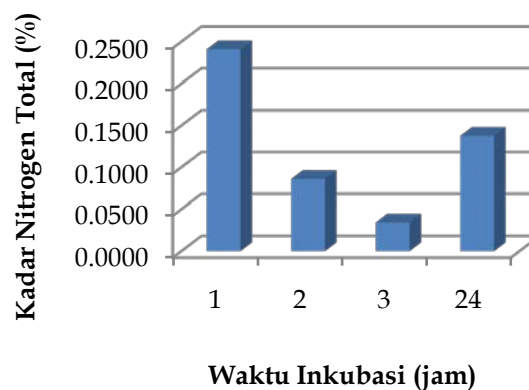
Tumbukan antara enzim dengan substrat menjadi efektif pada suhu yang optimum, sehingga kompleks enzim – substrat semakin mudah terbentuk dan menyebabkan peningkatan produk yang dihasilkan. Peningkatan suhu menyebabkan enzim terdenaturasi sehingga aktivitas enzim akan menurun [19].

Hasil uji kadar nitrogen total seperti pada Gambar 2 menunjukkan semakin banyak volume enzim yang digunakan, maka kadar nitrogen total akan semakin rendah. Semakin rendah kadar nitrogen total yang diperoleh, menunjukkan semakin banyak ikatan peptida yang terputus. Berdasarkan data yang diperoleh, dapat dikatakan bahwa konsentrasi enzim berbanding lurus dengan kecepatan reaksi. Semakin besar konsentrasi enzim maka semakin cepat pula reaksi berlangsung, sehingga kadar nitrogen total akan semakin rendah. Berdasarkan penelitian Wijayanti (2015), didapatkan konsentrasi optimum volume enzim yaitu 6% yang memiliki kadar nitrogen total terendah dibandingkan konsentrasi 4 dan 5%..



Gambar 2. Kadar Nitrogen Total pada perbandingan volume enzim.

Perbedaan waktu inkubasi dilakukan pada 1, 2, 3, dan 24 jam. Hasil uji kadar nitrogen total seperti pada Gambar 3 menunjukkan semakin lama waktu inkubasi maka kadar nitrogen akan menurun karena akan semakin banyak ikatan peptida pada protein yang terhidrolisis. Pada waktu 24 jam, kadar nitrogen total meningkat, hal ini disebabkan enzim papain telah terinaktivasi sehingga hidrolisis protein menjadi tidak maksimal. Arif (2013) didapatkan waktu inkubasi optimum yaitu 2 jam yang memiliki kadar total nitrogen terendah dibandingkan dengan waktu inkubasi 1, 3, dan 4 jam.

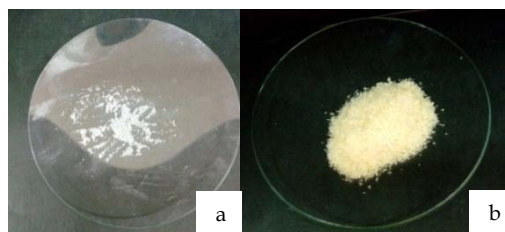


Gambar 3. Kadar Nitrogen Total pada perbedaan waktu inkubasi.

c. Deasetilasi

Pemutusan gugus asetil pada kitin cangkang kerang darah dilakukan melalui proses deasetilasi dengan menggunakan NaOH 60% pada suhu 100°C selama 30 menit. Kitosan cangkang kerang darah yang dihasilkan berupa serbuk berwarna putih keabuan sedangkan kitosan komersial berbentuk pipih kekuningan seperti pada Gambar 4.

Konsentrasi NaOH dan suhu tinggi yang digunakan pada proses deasetilasi dapat menyebabkan derajat deasetilasi kitosan semakin tinggi. Konsentrasi NaOH yang tinggi menyebabkan reaksi substitusi gugus asetil menjadi optimum. Suhu yang tinggi menyebabkan gugus asetil terlepas dari struktur kitin sehingga menyisakan gugus amina bebas yang akan berikatan dengan hidrogen [17]. Proses pengadukan bertujuan untuk mengoptimalkan proses deasetilasi [20]. Reaksi yang terjadi ditunjukkan pada Gambar 5. Reaksi adisi terjadi ketika gugus -OH masuk ke dalam gugus NHCOCH_3 , kemudian terjadi reaksi eliminasi pada gugus CH_3COOH sehingga menghasilkan gugus amina serta garam natrium asetat sebagai hasil samping. Perubahan gugus asetil pada kitin menjadi gugus amina disebut kitosan.



Gambar 4. (a) Kitosan cangkang kerang darah (b) Kitosan komersial.



Gambar 5. Mekanisme reaksi perubahan kitin menjadi kitosan.

2. Karakterisasi Kitosan

a. Kadar Air dan Kadar Abu

Kadar air dan kadar abu merupakan parameter yang dijadikan standar mutu kitosan. Kadar air yang tinggi menyebabkan kesegaran dan daya simpan kitosan menjadi lebih pendek. Kadar abu menunjukkan tingkat keberhasilan demineralisasi, sehingga rendahnya kadar abu menunjukkan kemurnian suatu kitosan.

Standar mutu kadar air dan kadar abu kitosan menurut Laboratorium Protan masing – masing $\leq 10\%$ dan $\leq 2\%$. Berdasarkan Tabel 1 dapat diketahui bahwa kitosan yang dihasilkan memiliki kadar air dan kadar abu dibawah standar mutu. Hasil kadar air yang diperoleh lebih besar dibandingkan Sinardi (2013) yaitu 0,4% dan lebih kecil dibandingkan Agustina (2015) yaitu 1,55%. Kadar abu yang diperoleh dari penelitian ini lebih besar dari Kurniasih (2013) yaitu 0,17%. Hal ini dapat disebabkan oleh proses demineralisasi yang kurang sempurna.

Tabel 1. Hasil Uji Kadar Air dan Kadar Abu

Sampel Kitosan	Kadar Air (%)	Kadar Abu (%)
Cangkang Kerang Darah	1,16	1,25
Komersial	0,48	0,38

b. Analisis Gugus Fungsi

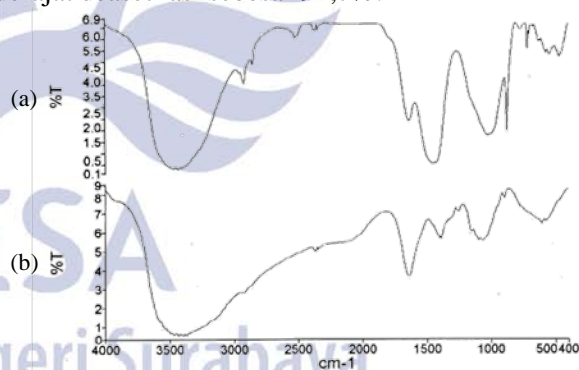
Identifikasi gugus fungsi pada suatu molekul dapat ditentukan dengan mengukur serapan infra merah. spektra hasil uji kitosan cangkang kerang darah tidak menunjukkan adanya perbedaan dengan spectra pada kitosan komersial yang ditunjukkan pada Tabel 2. Tidak adanya perbedaan tersebut dapat diartikan bahwa kitosan cangkang kerang darah dengan kitosan komersial memiliki struktur yang

sama karena bilangan gelombang berada pada kisaran yang sama.

Tabel 2. Penentuan Gugus Fungsi dari Kitosan Komersial dan Kitosan Hasil Isolasi

Sampel	Bilangan gelombang (cm^{-1})	Gugus fungsi	Rentang bilangan gelombang (cm^{-1}) (Creswell, 1982)
Kitosan komersial	3434,84	O-H	3750-3000
	3434,84	N-H	3750-3000
	893,96	C-H	900-690
	1150,22	C-N	1200-1020
Kitosan hasil isolasi	1251,18	C-O	1500-1000
	3435,31	O-H	3750-3000
	3435,31	N-H	3750-3000
	873,27	C-H	900-690
	1019,06	C-N	1200-1020
	1449,04	C-O	1500-1000

Standar mutu derajat deasetilasi menurut Laboratorium Protan adalah $\geq 70\%$. Berdasarkan hasil analisis FTIR pada Gambar 6 dapat diketahui kitosan hasil isolasi cangkang kerang darah memiliki derajat deasetilasi sebesar 91,7%.



Gambar 6. Hasil FTIR (a) Kitosan cangkang kerang darah (b) Kitosan komersial

KESIMPULAN

Kitosan cangkang kerang darah yang dihasilkan memiliki kadar air $\leq 10\%$, kadar abu $\leq 2\%$, derajat deasetilasi $\geq 70\%$ serta memiliki gugus fungsi spesifik yang menunjukkan gugus fungsi kitosan.

DAFTAR PUSTAKA

1. Muhammad, Hadi. 2013. Kerang Darah. (*Online*), (<http://bariqly.blogspot.co.id/2013/09/kerang-g-darah-kerang-darah-anadara.html>, diakses 23 Juli 2016).
2. Afranita, G., S. Anita dan T. A. Hanifah. 2013. Potensi Abu Cangkang Kerang Darah (*Anadara granosa*) sebagai Adsorben Ion Timah Putih. Pekanbaru: Universitas Riau.
3. Fernandez-Saiz, P., Lagaron, J. M., Hernandez Munoz, P., dan Ocio, M. J. 2008. Characterization of Antimicrobial Properties on The Growth of *S. aureus* of Novel Renewable Blends of Gliadins and Chitosan of Interest in Food Packaging and Coating Applications. *International Journal of Food Microbiology*, 124(1): 13-20.
4. Arif, Abdur Rahman. 2013. Isolasi Kitin dari Limbah Udang Putih (*Penaeus merguensis*) Secara Enzimatis. Makassar: Jurusan Kimia Fakultas MIPA Universitas Hasanuddin.
5. Pamungkas, Khrisna Stefanus. 2011. Kitosan Sebagai Matriks Pendukung Amobilisasi Papain. Surabaya: Institut Teknologi Sepuluh Nopember.
6. Cahyaningrum, Sari Edi., Rudiana Agustini., Nuniek Herdyastuti. 2007. Pemakaian Kitosan Limbah Udang Windu sebagai Matriks Pendukung pada Imobilisasi Papain. Dalam *Akta Kimindo* Vol. 2 No. 2 April 2007 : 93-98.
7. Yuniwati, M, dkk. 2008. Pemanfaatan Enzim Papain sebagai Penggumpal dalam Pembuatan Keju. *Jurnal. Sains dan Teknologi*
8. Hargono, Abdullah., Indro Sumantri. 2008. Pembuatan Kitosan dari Limbah Cangkang Udang serta Aplikasinya dalam Mereduksi Kolesterol Lemak Kambing. *Jurnal Raktor* Vol. 12 No. 1/ Juni 2008 (53-57) .
9. Trisnawati, Elin., Dewid Andesti, Abdullah Saleh. 2013. Pembuatan Kitosan dari Limbah Cangkang Kepiting sebagai Bahan Pengawet Buah Duku dengan Variasi Lama Pengawetan. *Jurnal Teknik Kimia* Vol.19 No.2/ April 2013.
10. Purwanti, Ani. 2014. Evaluasi Proses Pengolahan Limbah Kulit Udang untuk Meningkatkan Mutu Kitosan yang Dihasilkan. Yogyakarta: Institut Sains & Teknologi AKPRIND
11. Association of Official Analytical Chemist [AOAC]. 1995. Official Method of Analysis of the Association of Official Analytical Chemist. Arlington: Virginia USA Association of Official Analytical Chemist Inc.
12. Purwatiningsih, S., Wukirsari, T. Sjahriza, A., dan Wahyono, D. 2009. Kitosan Sumber Biomaterial Masa Depan. IPB Press. Bogor.
13. Sinardi., Prayatni Soewondo, Suprihanto Notodarmojo. 2013. Pembuatan. Karakterisasi dan Aplikasi Kitosan dari Cangkang Kerang Hijau (*Mytulus Viridis Linneaus*) sebagai Koagulan Penjernih Air. Bandung: ITB.
14. Rachmania, Desie. (2011). Karakteristik Nano Kitosan Cangkang Udang Vannamei (*Litopenaeus vannamei*) dengan Metode Gelasi Ionik. Skripsi. Bogor: IPB
15. Johnson, A.H. dan M.S. Peterson.(1974). *Encyclopedia of Food Technology* Vol. II. The AVI Publishing Co., Inc., Connecticut.
16. Peter, Martin G. (1995). Application and Environmental Aspects of Chitin and Chitosan. *Journal of Pure and Appl. Chem.* Marcel Dekker, Inc., Germany (629-639).
17. Mekawati, Fachriyah, E. dan Sumardjo, D. (2000). Aplikasi Kitosan Hasil tranformasi Kitin Limbah Udang (*Penaeus merguensis*) untuk Adsorpsi Ion Logam Timbal. *Jurnal Sains and Matematika, FMIPA Undip, Semarang*, Vol. 8 No. 2 (51-54).
18. Whitaker, J.R. 1994. *Principle of Enzymology for The Food Science*, Second Edition. New York: Marcel Decker
19. Kosim, M., Surya, R.P. 2010. Pengaruh Suhu pada Protease dari *Bacillus subtilis*. Surabaya: ITS
20. Puspawati, N. M dan I. N. Simpen. (2010). Optimasi Deasetilasi Khitin dari Kulit Udang dan Cangkang Kepiting Limbah Restoran Seafood Menjadi Khitosan Melalui Variasi Konsentrasi NaOH. *Jurnal Kimia* Vol 4 hal 79 – 90.
21. Agustina, S., Swantara I Made dan Suartha, I Nyoman. 2015. Isolasi Kitin, Karakterisasi dan Sintesis Kitsoan dari Kulit Udang. *Jurnal ISSN 1970 – 9850*. Hal 271 – 278.