

Ekstraksi Enzimatik Kitin dan Kitosandari Limbah Udang

Kristina Novalina Nainggolan¹

¹Program Studi Teknologi Pengolahan Hasil Perikanan, Jurusan Ilmu Kelautan dan Perikanan, Politeknik Negeri Pontianak, Indonesia

*Email : nainggolankristina2@gmail.com

ARTICLE INFO

Article history:

Received : February 22, 2023

Revised : March 24, 2023

Accepted : April 16, 2023

Keywords:

Chitin, Chitosan, Extraction, Enzymatic, Shrimp shell

Kata Kunci:

Kitin, Kitosan, Ekstraksi Enzimatik, Kulit udang

ABSTRACT

Chitin is a biopolymer that compiles the shells of insects and crustaceans and the cell walls of fungi, diatoms, bacteria, and algae, while chitosan is chitin derivate. Both of the products have essential roles in various industrial fields. Chitin and chitosan are often produced chemically from shrimp waste (head and the shell). However, chemical residues and poor product characteristics are the weaknesses of this method. Another alternative method is to extract the products enzymatically. This review examines the effectiveness of chitin and chitosan extraction from shrimp waste based on research results of various related scientific articles. So far, microbial strains or enzyme and fermentation conditions that can extract shrimp waste into chitin with reasonable effectiveness have been found (demineralization value > 90% and deproteination > 80%). Deacetylation of shrimp shell chitin with *A. niger* capable of producing chitosan with a degree of deacetylation 86%. Moreover, the by-products of enzymatic extraction are rich in high-quality protein, carotenoids (especially astaxanthin), and minerals (especially calcium).

ABSTRAK

Kitin merupakan salah satu biopolimer penyusun cangkang serangga dan krustasea, serta dinding sel fungi, diatom, bakteri, dan alga, sedangkan kitosan merupakan turunan kitin. Kedua produk ini punya peran penting di berbagai bidang industri. Kitin dan kitosan sering diproduksi secara kimiawi dari limbah (kepala dan kulit) udang. Residu bahan kimia dan karakter produk yang kurang baik menjadi kelemahan dari metode ini. Metode alternatif lainnya adalah dengan mengekstraksi produk secara enzimatik. Review ini bertujuan mengkaji efektivitas ekstraksi kitin dan kitosan dari limbah udang berdasarkan hasil riset dari berbagai artikel ilmiah terkait. Sejauh ini telah ditemukan strain mikroba atau enzim, serta kondisi fermentasi yang mampu mengekstraksi limbah udang menjadi kitin dengan tingkat efektivitas yang baik (nilai demineralisasi >90% dan deproteinasi >80%). Deasetilasi kitin dari kulit udang dengan *A. niger* mampu menghasilkan kitosan dengan derajat deasetilasi 86%. Selain itu, hasil samping ekstraksi enzimatik kaya akan protein bermutu tinggi, karotenoid (khususnya astaxanthin), dan mineral (khususnya kalsium).

1. PENDAHULUAN

Kitin, salah satu biopolimer terbanyak di alam selain selulosa, merupakan polisakarida yang mengandung nitrogen dengan struktur kimia β -1,4-linked N-acetylglucosamine. Kitin ditemukan sebagai bahan penyusun cangkang atau rangka luar serangga dan krustasea, serta penyusun dinding sel fungi, diatom, bakteri dan alga (Bastiaens *et al.*, 2019). Karakter kitin yang kaku dan keras, serta keberadaannya sebagai bahan penyusun rangka luar atau dinding sel

beberapa jenis makhluk hidup diduga terkait peran kitin sebagai templat untuk biomineralisasi kalsium dan silika, dimana fase kalsifikasi dan silikifikasi berpusat pada area keberadaan kitin (Ehrlich, 2010). Produk turunan kitin yang punya peran penting di berbagai industri (kesehatan, pangan, kosmetik, agrokimia, pengolahan air, dan lainnya) adalah kitosan, yaitu senyawa kitin yang terdeasetilasi sehingga bersifat lebih mudah larut dalam air (Bastiaens *et al.*, 2019).

Secara umum ekstraksi kitin dan produk turunannya di industri menggunakan metode

kimiawi. Proses ekstraksi kitin dari kulit udang dilakukan menggunakan larutan asam kuat pekat (biasanya HCl) di suhu ruang untuk menghilangkan mineral, diikuti dengan penggunaan basa kuat (umumnya NaOH) di suhu sekitar 100°C untuk melepas protein dan pigmen warna. Hasilnya diperoleh serbuk kitin berwarna putih. Kitosan diperoleh melalui ekstraksi lebih lanjut α -kitin dengan larutan alkali (umumnya NaOH berkonsentrasi 40–50%) pada suhu proses 120–150°C sehingga terjadi deasetilasi (pemutusan gugus asetil) pada kitin (Kurita, 2006; Younes & Rinaudo, 2015).

Kelemahan dari ekstraksi secara kimiawi adalah polusi dari residu bahan kimia (khususnya residu asam-basa kuat), kebutuhan energi yang cukup besar dari penggunaan suhu tinggi, adanya efek negatif terhadap karakter produk akibat reaksi dari penggunaan asam-basa kuat, serta kesulitan mengambil senyawa-senyawa hasil samping lainnya (protein, mineral, lipid, atau senyawa pigmen) saat proses ekstraksi (Duan *et al.*, 2012; Kaur & Dhillon, 2015).

Penelitian menunjukkan ekstraksi kitin dan produk turunannya secara enzimatik menghasilkan produk yang lebih baik dan terkontrol (Hongkulsup *et al.*, 2016; Rao *et al.*, 2000). Selain itu, ekstraksi secara enzimatik bersifat ramah lingkungan, menggunakan suhu proses yang relatif rendah (umumnya mendekati suhu ruang), serta dimungkinkan mengekstraksi senyawa lain yang ada di substrat (Cahú *et al.*, 2012; Kaur & Dhillon, 2015; Rao *et al.*, 2000). Meski di sisi lain, waktu proses yang relatif lebih panjang dibanding ekstraksi kimiawi dan biaya produksi enzim yang cukup tinggi menjadi kelemahan dari ekstraksi enzimatik (Kaczmarek *et al.*, 2019). Salah satu solusi yang dilakukan untuk menekan biaya produksi enzim adalah penggunaan enzim dari limbah ikan atau udang, serta dari bakteri atau mikroba lain yang ada di

alam (Kaczmarek *et al.*, 2019; Younes *et al.*, 2014).

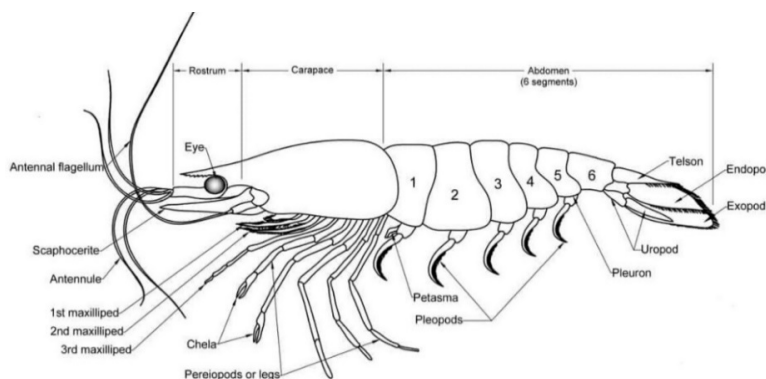
Limbah udang (kepala dan kulit) merupakan salah satu sumber bahan baku penghasil kitin yang mudah diperoleh dan berlimpah ketersediaannya di alam. Porsi tubuh udang yang tidak dapat dimakan (termasuk kepala, kulit, dan ekor) dapat mencapai 46% (Arancibia *et al.*, 2014), dengan nilai ekonomi yang sangat rendah. Kandungan kitin pada kulit udang berkisar 15-40%. Selain itu kulit udang juga mengandung protein sebesar 20-40% dan mineral 30-60% (Bastiaens *et al.*, 2019; Kurita, 2006). Adapun jenis kitin penyusun kulit udang adalah α -kitin, yaitu kitin dengan struktur kristalinitas yang sangat kuat dikarenakan adanya dua ikatan intramolekul dan antar(inter)molekul yang tersusun secara anti-paralel di tiap unit sel kitin yang memungkinkan terbentuknya ikatan hidrogen yang maksimum.

Hal ini membuat α -kitin memiliki karakter bahan yang lebih kaku dan stabil dibanding jenis kitin lainnya, bersifat tidak reaktif, dan tidak larut air (Bastiaens *et al.*, 2019; Kurita, 2006; Minke & Blackwell, 1978). Struktur kristal tersebut membuat perlu ada perlakuan khusus untuk mengekstrak kitin dari kulit udang. Namun, apakah metode enzimatik dapat secara efektif mengekstrak kitin dan kitosan dari limbah udang. *Review* ini berfokus mengkaji efektivitas ekstraksi kitin dan kitosan dari limbah udang secara enzimatik berdasarkan hasil riset dari berbagai artikel ilmiah terkait.

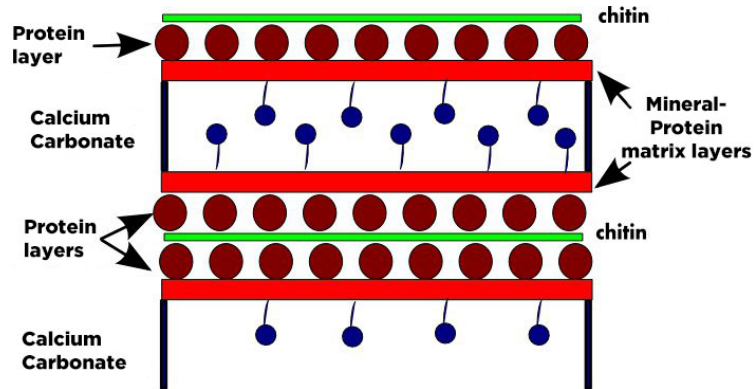
2. TINJAUAN PUSTAKA: KULIT UDANG, KITIN, DAN KITOSAN

2.1 Struktur dan Kandungan Kulit Udang

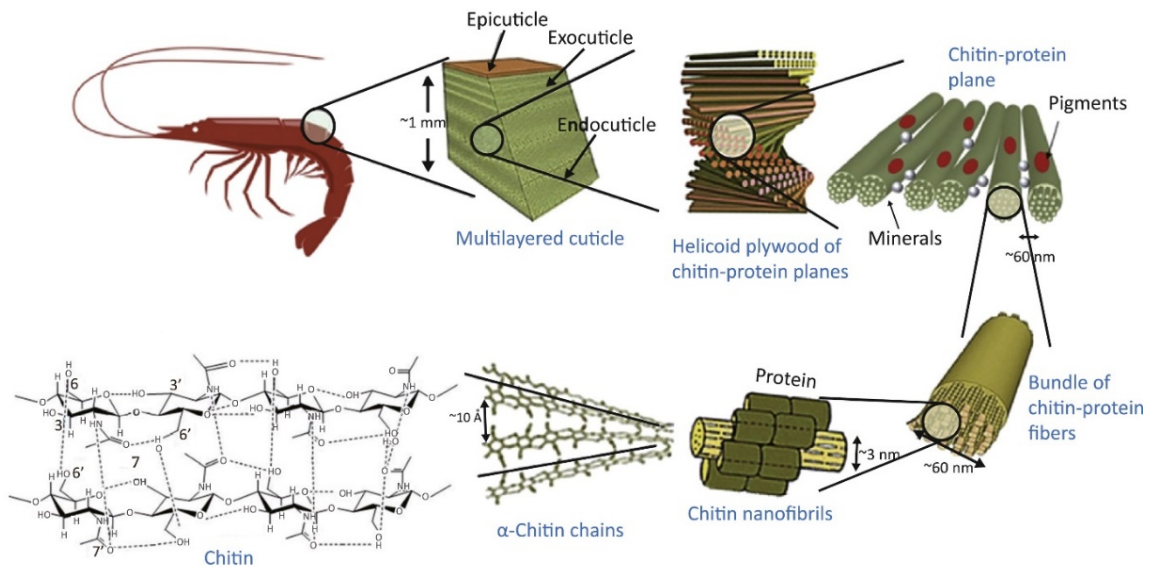
Udang merupakan bagian dari filum Arthropoda, dengan subfilum Crustacea.



Gambar 1. Anatomi udang (Michael, 2023)



Gambar 2. Ilustrasi matriks protein-kitin-mineral (Chitosanlab, n.d.; Poulicek *et al.*, 1986)

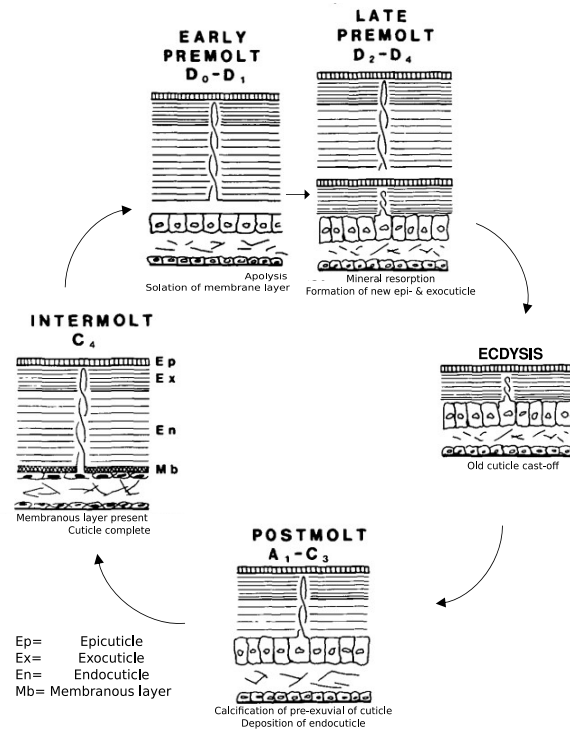


Gambar 3. Susunan kutikula kulit udang (Hülsey, 2018)

Kelompok udang dengan nilai ekonomis penting umumnya termasuk dalam keluarga Penaeidae, yang merupakan turunan dari kelas Malacostraca, ordo Decapoda, sub-ordo Dendrobranchiata (De Grave *et al.*, 2009; Kannupandi *et al.*, 2003). Secara morfologi, tubuh udang berbentuk memanjang yang terdiri atas kepala (toraks), perut dengan enam ruas, dan ekor. Segmen perut terakhir disebut telson. Toraks memiliki tulang belakang yang disebut mimbar, sepasang mata, dua pasang antena, tiga pasang rahang atas untuk makan, dan lima pasang kaki untuk berjalan. Setiap segmen perut kecuali telson memiliki pleopod, yaitu sepasang sirip yang berfungsi sebagai kaki renang (Evans, n.d.; Kannupandi *et*

al., 2003). Anatomi tubuh udang dapat dilihat pada Gambar 1.

Bagian paling luar tubuh udang dilapisi oleh kulit yang keras yang disebut kutikula. Susunan kutikula secara berurutan dari bagian paling luar ke dalam adalah epikutikula, eksokutikula, endokutikula, dan lapisan membran. Kutikula Crustacea disusun oleh 60% senyawa anorganik dan 40% senyawa organik. Senyawa anorganik tersebut adalah kalsium, klorida, tembaga, magnesium, mangan, fosfor, kalium, dan sulfur. Sedangkan senyawa organik penyusun kutikula Crustacea adalah lipid, glikoprotein, protein, glikosaminoglikan, mukopolisakarida, karbohidrat, dan kitin (Promwikorn *et al.*, 2005; Roer & Dillaman, 1984).



Gambar 4. Ilustrasi perubahan kutikula udang selama siklus molting (Roer & Dillaman, 1984)

Epikutikula merupakan lapisan tipis yang bersifat kedap air oleh adanya lapisan lipoprotein. Fungsi utama epikutikula sebagai pelindung tubuh Crustacea dari dunia luar, diantaranya mencegah penguapan air dan penghalang mekanis dari serangan mikroba (Grunenfelder *et al.*, 2014; Roer & Dillaman, 1984). Tidak seperti lapisan kutikula lainnya, epikutikula mengandung lipid serta tidak mengandung serat kolagen dan kitin (Promwikorn *et al.*, 2005). Eksokutikula dan endokutikula sama-sama disusun oleh molekul kitin terkristalisasi yang terbungkus protein membentuk agregat nanofibril kitin-protein yang matriksnya diisi oleh mineral. Molekul nanofibril ini tersusun dalam bentuk lembaran-lembaran planar yang terangkai menyerupai struktur Bouligand atau kayu lapis terpilin (Fabritius *et al.*, 2011; Grunenfelder *et al.*, 2014). Poulıcek *et al* menggambarkan struktur protein-kitin-mineral tersebut menyerupai roti lapis (*sandwich*) (lihat Gambar 2), hal ini khususnya untuk cangkang moluska (Poulıcek *et al.*, 1986). Lapisan membran terkadang dikenal dengan istilah hipodermis atau epitelium karena terletak diantara endokutikula dan epidermis. Lapisan kutikula ini juga kaya akan serat kolagen, protein, karbohidrat dan kalsium (Promwikorn *et al.*, 2005). Susunan kutikula kulit udang terilustrasikan pada Gambar 3.

Kutikula udang secara periodik akan terkelupas dan berganti dengan kulit baru setiap kali ukuran tubuh udang bertumbuh melebihi ukuran kulitnya. Proses tersebut disebut molting. Kutikula mengalami perubahan komposisi kimia seiring dengan tahapan molting. Siklus molting terdiri dari empat fase, yaitu: *premolt*, *molt* (*ecdysis*), *postmolt*, *intermolt*. Di fase *premolt* terjadi pembentukan dua lapisan kutikula baru, yaitu epikutikula dan eksokutikula. Kutikula baru yang terbentuk masih sangat lembut karena tidak mengandung kalsium, namun sebagian mineral dari kutikula lama diabsorpsi kembali untuk kepentingan pembentukan kutikula baru. Fase selanjutnya adalah fase *molt*, dimana terjadi pelepasan kulit udang (kutikula) lama. Fase tersebut diikuti dengan fase *postmolt*, yang mana lapisan kutikula lainnya, endokutikula dan lapisan membran, mulai terbentuk diikuti dengan proses kalsifikasi pada semua lapisan kutikula sehingga kutikula mulai mengeras oleh adanya pertumbuhan jaringan kalsium karbonat (CaCO₃). Kemudian, di fase *intermolt* kutikula sudah sepenuhnya terkalsifikasi. Kebanyakan Decapoda dewasa berada di fase *intermolt* (Dang *et al.*, 2018; Promwikorn *et al.*, 2005; Roer & Dillaman, 1984). Perubahan kulit udang selama siklus molting terilustrasikan pada Gambar 4.

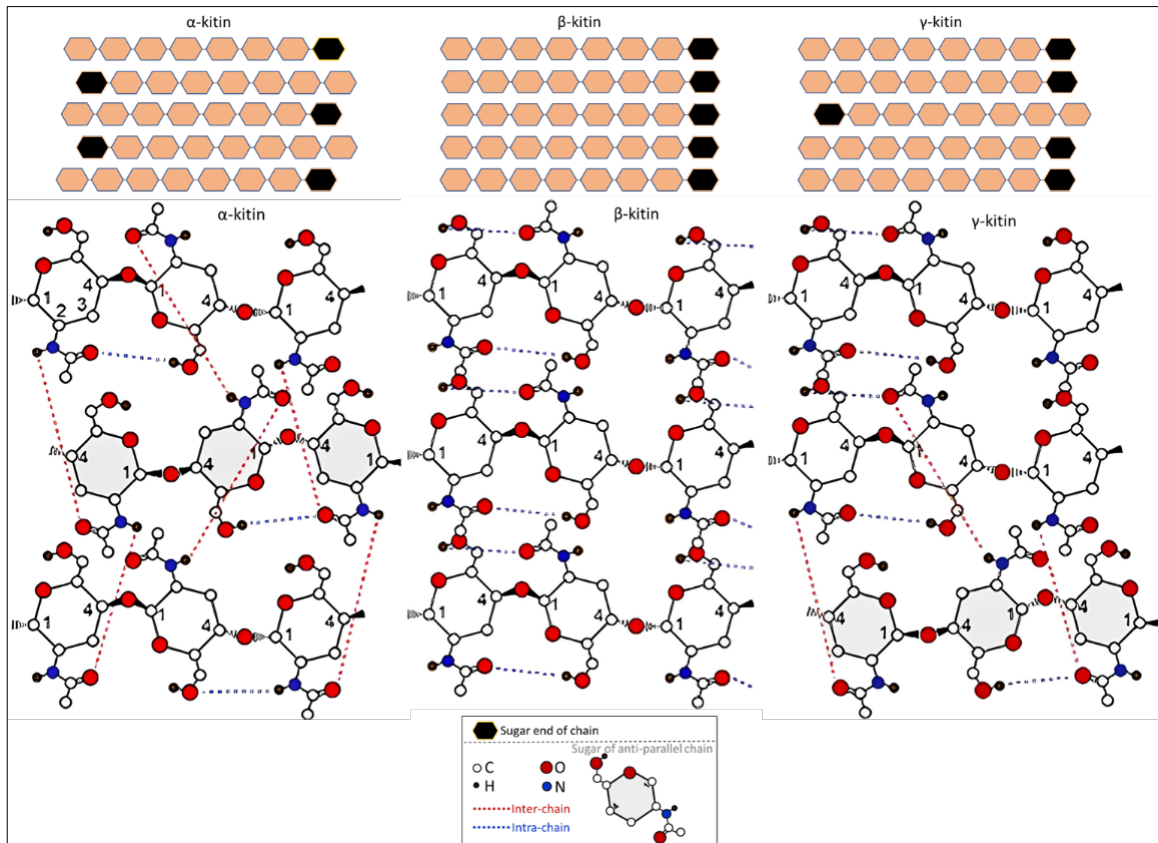
Tabel 1. Perbedaan α -, β -, dan γ -kitin

Jenis Kitin dan Sumber	Struktur Kristal
<p>α-kitin</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ Paling berlimpah di alam (Saito <i>et al.</i>, 1995). ▪ Sumber: dinding sel fungi, tendon kepiting dan lobster, kulit/cangkang udang dan kepiting (Saito <i>et al.</i>, 1995), kutikula serangga (Saito <i>et al.</i>, 2000), tombak (<i>harpoon</i>) siput kerucut (Rinaudo, 2006). 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Setiap unit selnya memiliki dua rantai yang rantai-rantainya dikepak secara berlawanan arah (anti-paralel) (Saito <i>et al.</i>, 1995) ▪ Memiliki struktur kristal paling stabil karena adanya ikatan hidrogen intra- dan intermolekul yang tersusun anti-paralel (Jang <i>et al.</i>, 2004). ▪ Ikatan hidrogen di α-kitin lebih pendek dibanding γ-kitin, yang membuat ikatan intermolekul α-kitin lebih kuat dibanding β- dan γ-kitin (Kaya <i>et al.</i>, 2017). ▪ Tiap unit sel kitin memiliki dua ikatan hidrogen intramolekul yang dihubungkan oleh C(3)—OH\cdotsO—C(5) dan C(6)—OH\cdotsO=C; dan dua ikatan hidrogen antarmolekul yang dihubungkan melalui NH\cdotsO=C dan dan C(6)—OH\cdotsOH—C(6) (Kameda <i>et al.</i>, 2005; Minke & Blackwell, 1978)
<p>β-kitin</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ Paling sedikit di alam (Saito <i>et al.</i>, 1995). ▪ Ditemukan pada cangkang dalam cumi (<i>squid pens</i>), tabung pogonophora dan vestimentifera (cacing tabung raksasa), seta (<i>chaetae</i>) <i>Aphrodite</i>, duri (<i>spine</i>) beberapa diatom (Saito <i>et al.</i>, 1995). 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Kristal β-kitin anhidrat memiliki sistem monoklinik (padatan kristal dengan 3 sumbu, dua pasang diantaranya tegak lurus, satu pasang lainnya tidak seperti pada prisma jajaran genjang) (Saito <i>et al.</i>, 1995). ▪ Tiap unit selnya mengandung satu rantai yang kristal mikrofibrilnya tersusun sejajar (paralel) (Saito <i>et al.</i>, 1995) ▪ Memiliki kestabilan struktur kristal paling rendah dibanding jenis kitin lainnya karena hanya memiliki ikatan hidrogen intramolekul (Jang <i>et al.</i>, 2004), yang dihubungkan oleh N—H\cdotsO=C grup amida (Gardner & Blackwell, 1975; Jang <i>et al.</i>, 2004). ▪ Penelitian lain menyatakan β-kitin anhidrat memiliki satu ikatan hidrogen intramolekul yang terhubung melalui O(3)—H\cdotsO(5), dan dua ikatan hidrogen antarmolekul yang terhubung melalui O(6)—H\cdotsO(7) dan N(2)—H\cdotsO(7) (Sawada <i>et al.</i>, 2012).
<p>γ-kitin</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ Ditemukan pada serat kepompong kumbang <i>Ptinus</i>, perut <i>Loligo</i> (Jang <i>et al.</i>, 2004), dan kepompong ngengat (<i>Orgyia dubia</i>) (Kaya <i>et al.</i>, 2017). 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Ada yang menganggap sebagai bentuk lain dari α-kitin (Rinaudo, 2006; Zargar <i>et al.</i>, 2015). ▪ Rantai-rantainya tersusun dengan pola dua rantai tersusun sejajar, dan satu rantai tersusun berlawanan arah (Jang <i>et al.</i>, 2004). ▪ Kestabilan struktur kristalnya lebih rendah dibanding α-kitin, namun lebih kuat dibanding β-kitin (Jang <i>et al.</i>, 2004). ▪ Memiliki ikatan hidrogen intramolekul yang terbentuk melalui CH₂OH---OH dan ikatan hidrogen antarmolekul melalui CH₂OH--- CH₂OH (Kaya <i>et al.</i>, 2017).

2.2 Sejarah Kitin dan Kitosan

Penyelidikan tentang kitin telah dimulai lebih dari dua ratus tahun lalu dimulai dari catatan Charles Hatchett, ahli kimia asal Inggris, di tahun 1799 mengenai suatu bahan yang dihasilkan dari proses dekalsifikasi cangkang kepiting, lobster, udang *prawn*, dan udang karang (*crayfish*) menggunakan sejumlah asam mineral. Hatchett melaporkan material tersebut tidak bereaksi (resistan) terhadap senyawa kimia biasa, berwarna putih kekuningan, dan seperti tulang

rawan (Crini, 2019). Di tahun 1811, Henri Braconnot, ahli kimia asal Perancis, mengekstrak sejumlah fungi menggunakan larutan alkali hangat dan memperoleh fraksi bahan yang bersifat tidak larut alkali serta mengandung nitrogen. Braconnot menamai bahan tersebut *fongine* (Crini, 2019; Muzzarelli *et al.*, 2012). Namun istilah kitin (tepatnya *chitine*) disebutkan pertama kali oleh Auguste Odier melalui publikasinya yang terbit di tahun 1823, guna merujuk pada fraksi bahan tidak larut alkali yang diisolasi dari kumbang *cockchafer* melalui



Gambar 5. Ilustrasi orientasi rantai (gambar atas) dan pola ikatan hidrogen (gambar bawah) pada α -, β -, dan γ -kitin (Fernando *et al.*, 2021). Arti simbol gambar terjabar pada kotak paling bawah

perlakuan dengan larutan kalium kaustik panas (Crini, 2019).

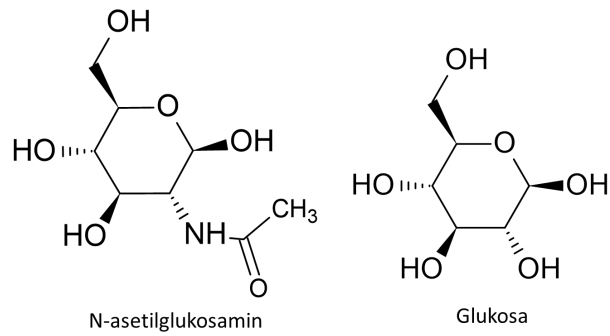
Penelitian tentang kitin terus bergulir, hingga di tahun 1956, Charles Rouget melaporkan tentang bahan yang dia beri nama "*chitine modifiée*" atau kitin termodifikasi yang bersifat larut dalam larutan encer asam organik, berbeda dengan kitin yang belum termodifikasi. Bahan ini juga menghasilkan warna yang berbeda dengan kitin ketika dilarutkan dalam larutan iodium asam. Fraksi bahan tersebut diperoleh melalui proses refluksi dengan mendidihkan kitin dalam larutan kalium hidroksida (KOH) pekat. Bahan tersebut kemudian dinamakan kitosan oleh Hoppe-Seyler di tahun 1894. Kitosan merupakan turunan utama dari kitin, dan penemuan kitosan membuka peluang pemanfaatan kitin lebih lanjut (Crini, 2019).

Penelitian tentang kitin semakin berkembang setelah semakin jelas struktur polisakaridanya, yang berbeda dengan selulosa, yang terungkap menggunakan analisa X-ray (sinar-X). Di tahun 1930an, mulai muncul paten berbahan dasar kitin dan kitosan, diantaranya film dan serat dari

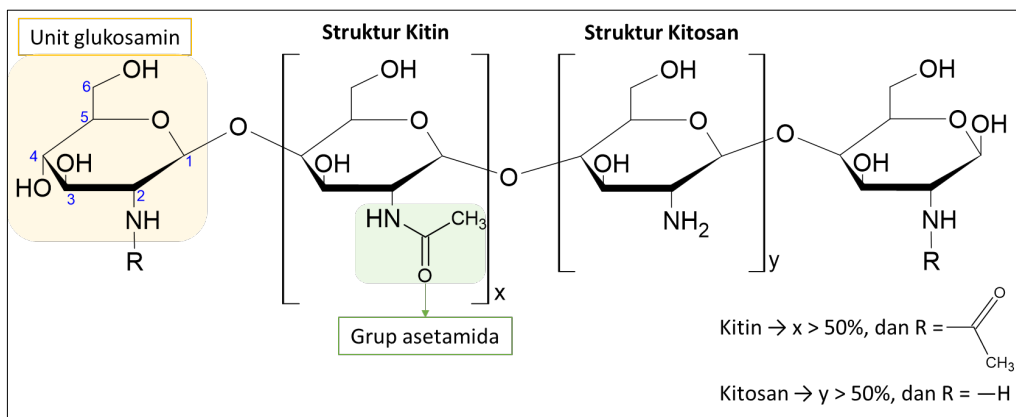
kitosan (dipatenkan oleh George W. Rigby di tahun 1936-1937), pemanfaatan kitin-kitosan untuk industri kertas, tekstil, fotografi, dan sebagai perekat (Crini, 2019).

2.3 Jenis Kitin

Di alam, kitin ditemui dalam tiga bentuk polimorfik kristal, yaitu α , β , dan γ (Jang *et al.*, 2004). Perbedaan struktur kristal tersebut terletak pada pola pengepakan dan polaritas rantai yang berdekatan. Sumber kitin diperoleh akan mempengaruhi jenis kitin yang dihasilkan menurut struktur kristalnya (Jang *et al.*, 2004; Minke & Blackwell, 1978). Perbedaan struktur kristal tersebut biasanya diidentifikasi menggunakan kristalografi sinar-X (Blackwell, 1982), yang diperjelas karakternya menggunakan Spektroskopi Inframerah Transformasi Fourier (*Fourier Transform Infrared Spectroscopy/FTIR*) dan NMR (*Nuclear Magnetic Resonance*) spektroskopi serta metode lainnya (Fernando *et al.*, 2021; Jang *et al.*, 2004).



Gambar 6. Struktur N-asetilglukosamin dan glukosa



Gambar 7. Struktur Kitin dan Kitosan (Zargar *et al.*, 2015)

Kestabilan struktur kristal tiap jenis kitin ditentukan oleh ikatan hidrogen intra- dan antarmolekul pada lembaran sel kitin yang umumnya dihubungkan melalui grup amida dan karbonil (Fernando *et al.*, 2021). Perbedaan α -, β -, dan γ -kitin terjabarkan pada Tabel 1. Sedangkan orientasi rantai dan pola ikatan hidrogen pada α -, β -, dan γ -kitin terilustrasikan pada Gambar 5.

2.4 Struktur Kitin dan Kitosan

Kitin merupakan polisakarida yang terdiri dari rangkaian residu (1 \rightarrow 4)-linked-2-acetamido-2-deoxy- β -D-glucopyranose (Zargar *et al.*, 2015). Nama tersebut menunjukkan bahwa kitin disusun oleh rangkaian unit D-glukopiranos, yaitu enansiomer D-glukosa berbentuk cincin piranos (*pyranose*) dengan enam atom penyusun utama (satu atom Oksigen dan lima atom Carbon), yang pada atom karbon nomor dua/C(2) terikat dengan grup asetamida (*acetamide*) menggantikan grup hidroksil (OH) pada glukosa secara umum. Unit-unit glukosamin tersebut terikat satu dengan yang lainnya di atom C(1) dan C(4) melalui ikatan β -

glukosa, yaitu bentuk ikatan yang sama dengan unit glukosa penyusun selulosa.

Grup asetamida (CH_3CONH_2) merupakan senyawa amida sederhana yang berasal dari asam asetat (CH_3COOH). Hal tersebut membuat struktur asetamida menyerupai asam asetat, namun gugus hidroksil ($-\text{OH}$) pada asam asetat tergantikan dengan gugus amina ($-\text{NH}_2$) di asetamida. Itu sebabnya unit glukosa penyusun kitin disebut juga N-asetilglukosamin (*N-acetyl-D-glucosamine*, GlcNAc).

Secara struktur, molekul kitin serupa dengan molekul selulosa, namun atom C(2) pada unit selulosa berikatan dengan hidroksil, sedangkan pada kitin berikatan dengan asetamida (Jang *et al.*, 2004; Zargar *et al.*, 2015). Perbedaan N-asetilglukosamin (monomer pada kitin) dan glukosa (monomer pada selulosa) dapat dilihat pada Gambar 6. Kitosan (GlcN, *Glucosamine*) merupakan polimer turunan kitin dengan struktur kimia yang serupa, hanya saja mayoritas residu glukopiranos-nya dalam bentuk terdeasetilasi (grup amida pada C(2) glukosamin tidak terikat dengan grup asetil atau tidak dalam bentuk

asetamida). Perlu diketahui, sangat jarang ditemui kitin yang keseluruhan molekulnya dalam bentuk N-asetilglukosamin, serta kitosan yang semua molekulnya merupakan glukosamin. Selain itu, di alam kitin selalu terikat dengan senyawa lain, seperti polisakarida, protein, atau mineral (Zargar *et al.*, 2015). Suatu polimer glukosamin dinyatakan sebagai kitin apabila lebih dari lebih dari 50% molekulnya dalam bentuk N-asetilglukosamin, namun jika lebih dari setengah molekul glukosamin terdeasetilasi maka disebut kitosan (Kasaai, 2009; Morin-Crini *et al.*, 2019; Zargar *et al.*, 2015). Struktur kitin dan kitosan dapat dilihat pada Gambar 7.

2.5 Karakteristik Kitin dan Kitosan

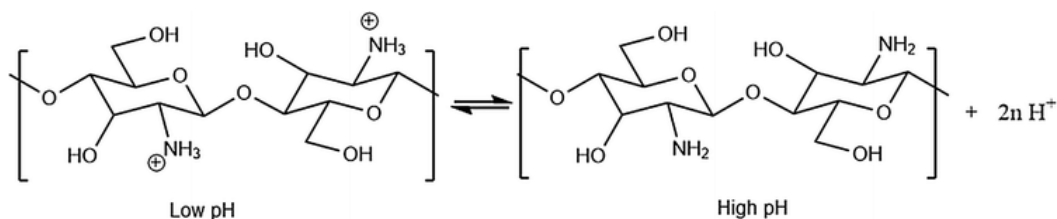
Perbedaan struktur kitin dan kitosan menghasilkan perbedaan karakter pada kedua biopolimer tersebut. Derajat asetilasi (*degree of acetylation/DA*) pada kitin atau derajat deasetilasi (*degree of deacetylation/DD*) pada kitosan merupakan salah satu karakteristik fisikokimia penting yang sangat mempengaruhi sifat fisik, kimia, dan biologi dari kitin dan kitosan (Chatelet *et al.*, 2001; Kasaai, 2009; Philibert *et al.*, 2017). Sifat kimia tersebut meliputi: kelarutan (*solubility*), fleksibilitas, konformasi polimer, viskositas, kristalinitas, luas permukaan yang tinggi (*high surface area*), porositas, kekuatan tarik (*tensile strength*), konduktivitas, fotoluminesensi. Sedangkan sifat biologi meliputi: biodegradabilitas, biokompatibilitas, mukoadhesif, hemostatik, analgesik, penguat adsorpsi (*adsorption enhancer*), antimikroba, antikolesterolemia, dan antioksidan (Philibert *et al.*, 2017).

Derajat asetilasi (DA) menunjukkan persentase N-asetilglukosamin (GlcNAc) pada biopolimer kitin (Chatelet *et al.*, 2001). Derajat deasetilasi (DD) menunjukkan hal sebaliknya, yaitu proporsi glukosamin (GlcN) pada biopolimer kitosan. Semakin tinggi DA atau semakin rendah DD, maka akan semakin stabil

biopolimer tersebut atau dengan kata lain semakin sulit bereaksi dengan senyawa lain, begitu pula sebaliknya. Itu sebabnya kitosan lebih reaktif dibanding kitin karena kitosan memiliki DD diatas 50%, sedangkan DD kitin dibawah 50%. Kitosan dianggap memiliki DD rendah jika memiliki persentase glukosamin (GlcN) berkisar 55–70%, DD sedang jika GlcN berkisar 70–85%, DD tinggi jika GlcN berkisar 85–95%, dan sangat tinggi jika GlcN berkisar 95–100% (He *et al.*, 2016; Rkhaila *et al.*, 2021).

Analisa DA atau DD kitin atau kitosan dapat dilakukan menggunakan tiga kelompok besar metode, yaitu spektroskopi (H NMR, C NMR, N NMR, IR, near-IR, dan UV); secara konvensional (berbagai prosedur menggunakan titrasi koloidal, titrasi konduktometri, titrasi potensiometri, and uji ninhidrin); dan secara destruktif (analisis unsur, hidrolisis dengan asam atau enzim yang diikuti oleh kolorimetri atau analisis HPLC, dan analisis termal menggunakan DSC). Waktu yang dibutuhkan untuk pengukuran DA menggunakan kelompok metode konvensional dan destruktif lebih lama dibandingkan menggunakan kelompok spektroskopi. Diantara semua, H NMR dan UV spektrometri dianggap paling cocok untuk analisa DA atau DD secara kuantitatif. H NMR mampu menghasilkan data yang akurat dengan tingkat variasi hasil yang rendah, sedangkan UV spektrometri dapat menganalisa sampel tanpa terpengaruh oleh adanya kontaminasi protein dan kelembaban (kadar air) pada sampel. Pada beberapa metode lain, adanya unsur-unsur lain (*impurities*) dalam sampel dapat menciptakan gangguan dan memberikan variasi yang besar pada hasil percobaan. Hal yang perlu diperhatikan pada analisa DA atau DD secara kuantitatif adalah: waktu pengukuran, ketepatan metode, dan keakuratan hasil (Kasaai, 2009).

Pada kondisi asam (pH 3–6) gugus amino pada kitosan akan terprotonasi (pada pH 3 akan sepenuhnya terprotonasi; pKa 6,3), yang membuat rantai polimer, khususnya gugus amina, bermuatan positif (Gambar 8). Kondisi tersebut



Gambar 8. Protonasi dan deprotonasi gugus amino kitosan yang diinduksi oleh kondisi asam dan basa (Sampath *et al.*, 2017)

Tabel 2. Karakter umum kitin dan kitosan

Parameter	Kitin	Kitosan
Derajat Asetilasi (DA)	- DA di atas 50% (Kasaai, 2009; Morin-Crini <i>et al.</i> , 2019; Zargar <i>et al.</i> , 2015).	- DA dibawah 50%. - Produk komersial umumnya memiliki DA 10–20% (Gonçalves <i>et al.</i> , 2021; Mourya <i>et al.</i> , 2011). - Semakin rendah DA semakin baik interaksi kitosan terhadap sel (Chatelet <i>et al.</i> , 2001).
Berat Molekul (<i>Molecular Weight</i> /MW) (LMW: <i>Low</i> MW; HMW: <i>High</i> MW)	- MW 30–3000 kDa (1 kDa = 1000 g/mol) (Mourya <i>et al.</i> , 2011). - Umumnya MW kitin yang diekstrak kimiawi dari cangkang krustasea ≥ 1300 kDa (HMW kitin) (Zhang <i>et al.</i> , 2018). - MW kitin mempengaruhi kestabilan polimer, LMW kitin lebih mudah terurai (Zhang <i>et al.</i> , 2018). - LMW kitin memiliki aktivitas antitumor yang cukup kuat (Salah <i>et al.</i> , 2013).	- MW kebanyakan produk komersial 50–2000 kDa (Gonçalves <i>et al.</i> , 2021; Mourya <i>et al.</i> , 2011) - Dikelompokkan menjadi : LMW (< 50 kDa), medium MW (50–250 kDa), HMW (> 250 kDa) (Kumari & Kishor, 2020). - LMW Kitosan memiliki sifat antibakteri, antifungi, antitumor, dan mukoadhesif (Kumari & Kishor, 2020).
Kelarutan (<i>solubility</i>)	- Tidak larut pada semua jenis larutan umum (air, pelarut organik, larutan asam atau basa encer) (Mathur & Narang, 1990; Rinaudo, 2006). - Dapat larut dalam larutan asam mineral (asam inorganik) pekat (Kumari & Kishor, 2020; Mathur & Narang, 1990). - Pelarut umum untuk kitin adalah campuran DMAc (Dimetilasetamida) dengan LiCl (Litium Klorida) (Rinaudo, 2006). Metanol yang dijenuhkan dengan kalsium klorida dihidrat juga dapat melarutkan kitin (Kurita, 2006).	- Tidak larut dalam air dan senyawa organik umum (Kurita, 2006; Zargar <i>et al.</i> , 2015). - Larut dalam larutan asam organik (seperti asam asetat, asam format, asam laktat, asam piruvat, dan asam oksalat) dan asam inorganik (asam klorida dan asam nitrat) yang menghasilkan larutan kental (Kurita, 2006; Mathur & Narang, 1990; Zargar <i>et al.</i> , 2015).
Biodegradabilitas	- Kitin dan kitosan di alam dapat terurai secara alami oleh enzim kitinase pada bakteri, jamur, tanaman, dan saluran pencernaan di banyak hewan (Kurita, 2006). - Kitin dan kitosan tidak tercerna oleh saluran pencernaan mamalia (Rinaudo, 2006).	
Toksitasitas	- Kitin dan kitosan memiliki sifat toksisitas rendah (Kurita, 2006; Rinaudo, 2006).	

Catatan:

- Parameter yang paling mempengaruhi sifat fisik, kimia, dan biologi kitin dan kitosan adalah DA, derajat polimerisasi (DP; menunjukkan jumlah monomer dalam suatu polimer), dan MW (Basa *et al.*, 2020; Sreekumar *et al.*, 2022; Zargar *et al.*, 2015).
- DA, DP, dan MW kitin atau kitosan yang rendah dikorelasikan dengan reaktivitas biopolimer yang semakin baik.
- Ada hipotesa yang menyatakan pola asetilasi (*Pattern of Acetylation*/PA; pola kehomogenan atau keheterogenan distribusi asetil pada polimer kitin atau kitosan) mempengaruhi sifat fisikokimia dan biologi kitosan (Basa *et al.*, 2020; Sreekumar *et al.*, 2022), dan juga kitin.

memungkinkan kitosan membentuk kompleks seperti molekul sulfat, fosfat, polimer anionik, dengan molekul-molekul bermuatan negatif, polisakarida, protein, pewarna, lipid, enzim, sel

tumor, protein dinding sel bakteri, DNA dan RNA (Mathur & Narang, 1990; Philibert *et al.*, 2017; Roy *et al.*, 2017; Zargar *et al.*, 2015). Hal tersebut juga menjelaskan mengapa kitosan mampu larut pada senyawa asam organik. Kitosan juga mampu mengkelat (berikatan) dengan berbagai ion logam karena adanya gugus hidroksil dari residu D-glukosamin (Philibert *et al.*, 2017).

Kitin memiliki kestabilan yang tinggi dikarenakan adanya disposisi ekuatorial yang stabil dari semua substituen kitin. Selain itu kitin juga memiliki cincin piranosa yang terhubung melalui ikatan β glikosidik yang memungkinkan terbentuknya struktur rantai lurus berdekatan dengan ikatan hidrogen antar rantai yang kuat (Mathur & Narang, 1990). Grup asetamida pada N-asetilglukosamin berperan penting terhadap kestabilan ikatan hidrogen pada kitin (Rinaudo, 2006; Roy *et al.*, 2017).

Secara fisik, penampakan kitin dan kitosan terlihat sama, yaitu berupa serbuk kristal atau amorf tanpa pigmen warna (Mathur & Narang, 1990), yang berwarna putih atau putih kekuningan, dan tidak berbau (Amelia & Herdyastuti, 2017; Natalia *et al.*, 2021). Hanya, secara kimia dan biologi kitin dan kitosan memiliki karakter berbeda. Garis besar karakter umum kitin dan kitosan terjabar pada Tabel 2.

2.6 Pemanfaatan Kitin dan Kitosan

Kitin dan kitosan digunakan secara luas dalam berbagai industri. Philibert *et al.*, menyatakan ada lebih dari dua ribu bentuk pemanfaatan kitin dan turunannya dalam berbagai bidang industri, seperti bioteknologi, pertanian, kesehatan, pengolahan air, kosmetik, fotografi, oftalmologi (terkait kesehatan mata), dan pangan (Philibert *et al.*, 2017). Pemanfaatan kitin dan kitosan tidak lepas dari karakter biopolimer tersebut yang dipengaruhi oleh DA, DP, MW, dan mungkin juga PA. Sejauh ini kitosan lebih luas pemanfaatannya dikarenakan reaktivitasnya yang lebih baik dibanding kitin. Garis besar pemanfaatan kitin dan kitosan terjabar pada Tabel 3.

3. METODE

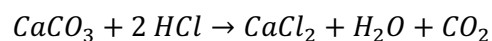
3.1 Ekstraksi kitin secara kimiawi

Secara umum tahapan ekstraksi (isolasi) kitin terdiri atas tiga tahapan utama, yaitu : pra-perlakuan (*pre-treatment*), demineralisasi, dan deproteinasi. Selanjutnya, untuk memperoleh

kitosan dilanjutkan dengan tahapan deasetilasi. Tahapan tersebut berlaku baik untuk proses ekstraksi secara kimiawi maupun enzimatis (Arnold *et al.*, 2020). Tahapan pra-perlakuan bertujuan untuk mempersiapkan bahan baku sehingga mempermudah proses ekstraksi. Khusus untuk bahan baku dari krustasea, tahapan pra-perlakuan dapat meliputi : pencucian, perebusan, pencacahan atau penggilingan untuk mengurangi ukuran partikel bahan baku, penyaringan ukuran partikel bahan baku, dan pengeringan. Tahapan ini tidak semuanya dilakukan di berbagai proses ekstraksi kitin atau kitosan. Ada yang hanya melakukan beberapa proses, seperti pencucian dan pengeringan (Bastiaens *et al.*, 2019).

Mengingat kitin pada krustasea tersusun berikatan dengan protein dan mineral (lihat gambar 2 dan 3) dengan jumlah komponen protein dan mineral yang cukup tinggi, maka perlu ada tahapan demineralisasi dan deproteinasi yang dilakukan secara berurutan. Kebanyakan isolasi kitin melalui proses demineralisasi terlebih dahulu, lalu dilanjutkan deproteinasi. Meski demikian, kedua tahap tersebut dapat ditukar urutannya (Bastiaens *et al.*, 2019).

Demineralisasi adalah tahapan penghilangan mineral seperti kalsium karbonat dan kalsium fosfat. Untuk proses demineralisasi secara kimia, pelarut yang umum digunakan adalah HCl, HNO₃, H₂SO₄, CH₃COOH, and HCOOH; namun diantara semua, HCl merupakan pelarut yang paling sering digunakan (Bastiaens *et al.*, 2019; Kumari & Kishor, 2020). Berikut reaksi demineralisasi kalsium karbonat menggunakan asam klorida (Kumari & Kishor, 2020) :

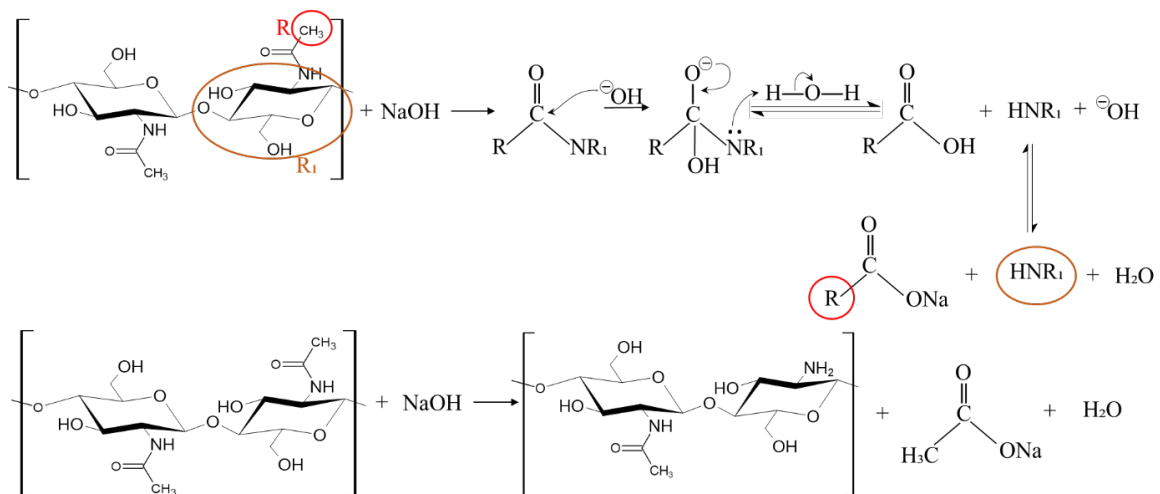


Proses demineralisasi matriks kitin dengan HCl akan menghasilkan garam kalsium larut air. Selanjutnya bahan yang telah mengalami demineralisasi tersebut disaring, dicuci dengan air distilasi hingga pH netral, dan dikeringkan. Proses demineralisasi akan berbeda-beda, tergantung pada jenis bahan baku, waktu ekstraksi, suhu, ukuran cangkang atau kulit, konsentrasi asam, dan rasio antara solut (zat terlarut) dan solven (pelarut). Namun perbandingan solut/solven sebaiknya didasarkan pada stoikiometri, misalnya 2 mol asam klorida untuk menguraikan 1 mol kalsium karbonat. Proses demineralisasi biasanya dilakukan pada suhu tinggi agar pelarut lebih mudah berdifusi ke dalam matriks kitin (Kumari & Kishor, 2020).

Tabel 3. Pemanfaatan kitin dan kitosan

Industri	Bentuk Pemanfaatan
Pangan dan minuman	<ul style="list-style-type: none"> - <i>Food and Drug Administration</i> (FDA) menyetujui penggunaan kitosan sebagai komponen bahan tambahan makanan (<i>food additives</i>), serat makanan (yang memiliki efek hipokolesterolemia), dan bahan makanan fungsional. Jepang dan Korea telah menyetujui penggunaan kitosan untuk bahan tambahan makanan sejak 1990an (Morin-Crini <i>et al.</i>, 2019). Kitosan mampu menurunkan kolesterol dengan menghalangi penyerapan lemak dan kolesterol makanan (Philibert <i>et al.</i>, 2017). - Kitosan dan turunannya bersifat antimikroba, merupakan <i>edible film</i> dengan sifat mekanik yang baik, dapat digabungkan dengan zat fungsional lain seperti vitamin, serta memiliki sifat permeabilitas selektif terhadap gas, sehingga cocok menjadi bahan pengemas makanan yang memiliki fungsi pengawetan sekaligus nutrasetikal (Hamed <i>et al.</i>, 2016; Morin-Crini <i>et al.</i>, 2019). Meski demikian, sifat hidropilik kitosan menjadi kekurangan yang perlu diatasi (Morin-Crini <i>et al.</i>, 2019). - Kitosan memiliki sifat nutrasetikal seperti: antibakteri, anti-inflamasi, antioksidan, anti-karsinogenik, antiulcer (mengurangi/menghambat produksi asam lambung), serta sebagai serat pangan (Morin-Crini <i>et al.</i>, 2019). - Pada produksi anggur, kitosan dapat dimanfaatkan sebagai bahan penjernih; de-asidifikasi (pengurangan tingkat keasaman anggur); stabilisasi; pembersih ochratoxin A (mikotoksin dari spesies <i>Aspergillus</i> dan <i>Penicillium</i>), enzim, logam, pestisida, atau zat-zat tidak diinginkan lainnya. Kitosan juga digunakan sebagai koagulan ramah lingkungan pada penjernihan markisa, dan flokulan alami untuk penjernihan bir (Morin-Crini <i>et al.</i>, 2019).
Kesehatan	<ul style="list-style-type: none"> - Sifat biodegradabilitas, biokompatibilitas, biodistribusi, dan nontoksisitas kitin dan kitosan membuatnya digunakan secara luas di bidang kesehatan seperti onkoterapi (terapi/pengobatan kanker) (Ding & Guo, 2022). Kitosan khususnya, merupakan polimer bermuatan positif yang mampu berikatan dengan kebanyakan jaringan hidup yang bermuatan negatif, seperti: permukaan luar sel sebagian mikroba, jaringan kulit, tulang, dan rambut. Kemampuan mengikat (<i>binding capacity</i>) kitosan tersebut menjadi karakter penting untuk penerapannya di bidang biomedis (Kumari & Kishor, 2020). - Onkoterapi: kitosan cocok digunakan sebagai nanocarrier obat kemoterapi (<i>chemotherapeutic drugs-delivery</i>), gen terapi, terapi fotodinamik, atau terapi lainnya. Kitosan juga digunakan sebagai adjuvan vaksin (bahan yang ditambahkan ke dalam vaksin untuk meningkatkan imunogenesitas) untuk mengatur lingkungan mikro tumor (<i>tumor microenvironment/TME</i>). Penelitian menunjukkan kitosan dapat mengaktifkan sel dendritik (DC) untuk memperkuat aktivitas antitumor dari sel <i>natural killer</i> (NK) dengan meningkatkan produksi IFN-γ (sitokin yang berperan penting dalam menginduksi dan memodulasi berbagai respon imun). Kitosan juga dapat menginduksi apoptosis (program kematian sel) dari sel abnormal melalui beberapa mekanisme (Ding & Guo, 2022). - Farmasi: kitosan cocok digunakan sebagai bahan pembawa obat (<i>drug delivery</i>) baik dalam bentuk implant maupun injeksi, untuk bahan penyembuh luka, <i>buccal</i> (terkait area pipi dan mulut) karena sifat mukoadhesif-nya, dan vaksin. Film dan serat kitin dan kitosan cocok digunakan untuk kepentingan rekayasa jaringan organ (<i>tissue engineering</i>) dan penyembuhan luka. Bahan pembalut luka berbasis kitosan sudah banyak beredar secara komersial (Morin-Crini <i>et al.</i>, 2019). - Kedokteran gigi: kitosan mampu menghalangi penetrasi asam ke enamel dan mencegah kehilangan mineral enamel yang membuatnya berperan penting pada kedokteran gigi preventif. Kitosan merupakan salah satu komponen pembuat pasta gigi, obat kumur, dan permen karet. Kitosan berbentuk gel/hidrogel dapat digunakan untuk pengobatan periodontitis (infeksi gusi) kronis dan sariawan (Morin-Crini <i>et al.</i>, 2019).

- Kosmetik - Kitin, kitosan, dan turunannya banyak digunakan dalam kosmetik terutama karena memiliki fungsi antioksidan, pembersihan, perlindungan, humektan (zat higroskopis untuk menjaga kelembaban), dan antioksidan (Casadidio *et al.*, 2019).
 - Kitosan telah digunakan sebagai komponen produk perawatan rambut, sampo, produk pewarna, *hairspray*, krim dan losion (wajah, tangan, dan tubuh), pewarna kosmetik (makeup, cat kuku, *eye shadow*, dan lipstik), produk deodoran, dan mikro-enkapsulasi zat aktif produk kosmetik (Morin-Crini *et al.*, 2019).
- Pertanian Sifat chelating kitosan sangat baik sebagai bahan anti-fungi. Kitosan juga bersifat bakterisidal (membunuh bakteri) dan bakteriostatik (menghambat pertumbuhan bakteri). Kitosan mampu mengaktifkan respon pertahanan tanaman dan berfungsi sebagai elisitor (pemicu terbentuknya metabolit sekunder sebagai fungsi pertahanan diri), sehingga sering digunakan dalam pengendalian penyakit tanaman. Fungsi tersebut membuat kitosan sering digunakan sebagai komponen biosida dan biopestisida. Kitosan juga digunakan sebagai pelapis benih, buah, sayuran; dan pupuk hayati (*bio fertilizer*) (Morin-Crini *et al.*, 2019).
- Industri tekstil Kitosan digunakan sebagai bahan pengikat pewarna, laminasi atau pelapis komponen tekstil, agen pengikat bahan non-tenun, modifikasi permukaan tekstil, komponen pencetak tekstil, bahan pengawet dan deodoran tekstil, serat non-alergi, pemberi sifat anti-mikroba, dan benang bedah (Morin-Crini *et al.*, 2019).
- Lingkungan Kitosan mampu mengikat polutan dengan selektivitas sangat baik sehingga sering digunakan sebagai biosorben (bahan biologis pasif penghilang polutan larutan), matriks polimer adsorben penghilang pewarna, agen koagulasi dan flokulasi untuk penjernihan/pemurnian air dan pengolahan limbah cair (Morin-Crini *et al.*, 2019).
- Bioteknologi - Kitin dan kitosan cocok digunakan sebagai bahan pendukung (*support*) untuk imobilisasi enzim (Krajewska, 2004; Verma *et al.*, 2020).
 - Bead dari kitosan dapat dibuat menjadi berbagai ukuran dan porositas sehingga cocok sebagai bahan imobilisasi enzim (Kumari & Kishor, 2020).
 - Kitin dan kitosan cocok digunakan sebagai biosensor. Nanokomposit kitosan dan *Graphene Oxide* mampu secara sensitif dan cepat mendeteksi adanya tifus melalui pendeteksian DNA (Moura *et al.*, 2016).
 - Imunosensor elektrokimia berbasis kitosan telah digunakan sebagai biomarker untuk mendeteksi hepatitis B, berbagai kanker, kehamilan, kandungan besi darah, ochratoxin A, dan bakteri *Shigella flexneri* pemicu diare (Suginta *et al.*, 2013).
 - Kitosan juga digunakan untuk komponen instrumen analisa di laboratorium, seperti untuk pemisahan protein, matrix untuk afinitas dan permeasi gel, dan kromatografi (Morin-Crini *et al.*, 2019)



Gambar 9. Mekanisme deasetilasi kitin dalam larutan alkali (contoh: NaOH) (Bastiaens *et al.*, 2019; Novikov *et al.*, 2023; Vicente *et al.*, 2021)

Tahap deproteinasi bertujuan untuk melepaskan komponen protein dari kitin. Proses deproteinasi cukup sulit mengingat protein terikat dengan kitin melalui beberapa bentuk ikatan hidrogen, termasuk ikatan kovalen. Deproteinasi kimiawi umumnya dilakukan menggunakan pelarut alkali seperti NaOH, Na₂CO₃, NaHCO₃, KOH, K₂CO₃, Ca(OH)₂, Na₂SO₃, NaHSO₃, CaHSO₃, Na₃PO₄, dan Na₂S, dengan NaOH sebagai pilihan utama. Efektifitas deproteinasi kimiawi tersebut dipengaruhi oleh suhu proses, konsentrasi alkali, dan rasio solut/solven. KOH atau NaOH punya kecenderungan memecah rantai polimer (depolimerisasi). Selain itu, deproteinasi kimiawi dapat menyebabkan deasetilasi pada sebagian unit rantai kitin di krustasea. Bahan yang telah mengalami deproteinasi biasanya dicuci hingga pH netral dan dikeringkan (Bastiaens *et al.*, 2019; Kumari & Kishor, 2020).

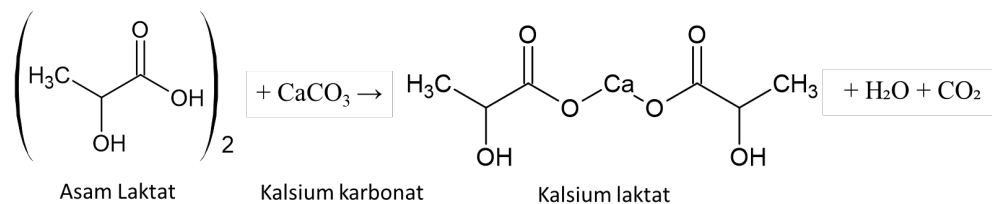
Proses demineralisasi dan deproteinasi akan menghasilkan kitin mentah. Kitosan dapat diperoleh dengan memproses lebih lanjut kitin mentah menggunakan alkali guna memutuskan ikatan asetil pada grup asetamida kitin (deasetilasi). Deasetilasi merupakan reaksi substitusi nukleofilik dua langkah. Langkah pertama, terjadi penambahan nukleofilik hidroksida (OH⁻) pada gugus karboksi (C=O). Langkah kedua, amina terbentuk (GlcNAc menjadi GlcN) ketika asetat (CH₃COO⁻) dipisahkan. Reaksi mengikuti kinetika pseudo-orde pertama selama periode awal ketika konsentrasi basa tinggi (Bastiaens *et al.*, 2019).

Mekanisme deasetilasi kitin terilustrasikan melalui Gambar 9.

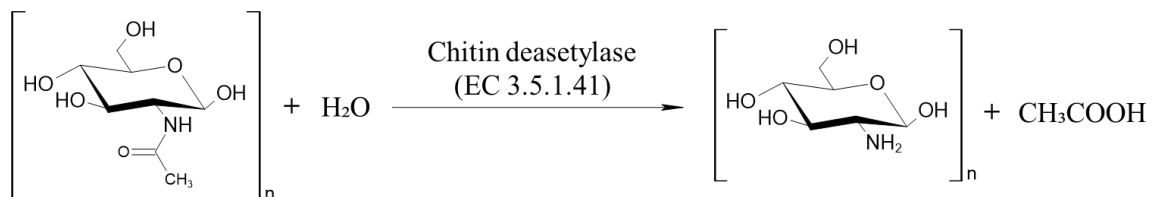
Dari sudut pandang kimia, pelarut asam ataupun basa dapat digunakan untuk memutus grup asetil pada kitin. Namun mengingat ikatan glikosidik sangat rentan terhadap asam, membuat proses deasetilasi lebih sering dilakukan menggunakan larutan alkali (Younes & Rinaudo, 2015), khususnya NaOH atau KOH. Di industri, proses deasetilasi umumnya dilakukan menggunakan alkali berkonsentrasi 40–50% (w/v) pada suhu tinggi (100–160°C). Hasilnya adalah deasetilasi heterogen, yaitu gugus asetil terdistribusi secara heterogen pada rantai polimer, diantaranya membentuk pola blok deasetil pada polimer kitosan (Bastiaens *et al.*, 2019).

3.2 Ekstraksi kitin dari kulit udang secara enzimatik

Pada ekstraksi secara enzimatik, proses demineralisasi dan deproteinasi kulit udang dilakukan melalui proses fermentasi. Proses demineralisasi enzimatik umumnya dilakukan menggunakan bakteri asam laktat seperti *Lactobacillus spp.* (Khanafari *et al.*, 2008; Sixto-Berrocal *et al.*, 2023; Xu *et al.*, 2008). Hal ini mengingat hasil utama metabolisme bakteri asam laktat adalah senyawa asam laktat yang dapat bereaksi dengan kalsium (mineral dominan pada kulit udang) membentuk kalsium laktat (lihat gambar 10) (Sixto-Berrocal *et al.*, 2023; Xu *et al.*, 2008).



Gambar 10. Reaksi asam laktat dengan kalsium karbonat menghasilkan kalsium laktat



Gambar 11. Deasetilasi kitin menjadi kitosan dengan enzim kitin deasetilase (Tsigos *et al.*, 2000)

Proses deproteinasi limbah udang secara enzimatis dilakukan dengan bakteri proteolitik dari berbagai sumber seperti : daging giling (Xu *et al.*, 2008), *Bacillus spp* (Ghorbel-Bellaaj *et al.*, 2013; Manni *et al.*, 2010; Pachapur *et al.*, 2016; Younes *et al.*, 2012, 2014a), *Lactobacillus spp* (Rao *et al.*, 2000), *Paenibacillus woosongensis* (Paul *et al.*, 2015), *Micromonospora chaiyaohumensis* (Mhamdi *et al.*, 2017), *Exiguobacterium profundum* (Xin *et al.*, 2020), *Bifidobacterium* (Sixto-Berrocal *et al.*, 2023). Selain itu, deproteinasi juga dilakukan menggunakan enzim dari berbagai sumber, seperti: isi perut ikan (Nasri *et al.*, 2011; Sila *et al.*, 2014), enzim udang itu sendiri (*indigenous enzyme*) (Arancibia *et al.*, 2014; Cahú *et al.*, 2012), enzim papain (Gartner *et al.*, 2010; Gopalakannan *et al.*, 2000; Pérez *et al.*, 2022), enzim bromelain (Pérez *et al.*, 2022), enzim tripsin dan ficin (Marzieh *et al.*, 2019), dan protease aspartat (proteases A, B, papain, rNpl, alcalase) (Deng *et al.*, 2020; Synowiecki & Al-Khateeb, 2000).

3.3 Deasetilasi kitin menjadi kitosan secara enzimatis

Deasetilasi kitin secara enzimatis untuk mendapatkan kitosan dilakukan menggunakan enzim atau strain mikroba penghasil kitin deasetilase (EC 3.5.1.41). Enzim ini menghidrolisis grup asetamida pada kitin dan menghasilkan unit glukosamin (GlcN) dan asam asetat (lihat gambar 11). Enzim tersebut merupakan salah satu anggota keluarga karbohidrat esterase 4 (CE-4s). Disebutkan enzim ini berperan terhadap sintesa dinding sel dengan mengubah kitin menjadi kitosan. Organisme penghasil kitin deasetilase adalah fungi (diantaranya: *Mucor rouxii*, *Absidia coerulea*, *Rhizopus circinans*, *Rhizopus nigricans*, *Colletotrichum lindemuthianum*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus fumigatus*, *Saccharomyces cerevisiae*); serangga (diantaranya: *Anopheles gambiae*, *Apis mellifera*, *Drosophila melanogaster*, *Helicoverpa armigera*, *Mamestra configurata*, *Tribolium castaneum*, *Trichoplusia ni*); dan bakteri laut (Vibrionaceae: *Vibrio cholera* dan *Photobacterium*). Sebagian besar enzim kitin deasetilase ekstraseluler memiliki pH optimum di area netral atau basa (pH 7–12), sedangkan kitin deasetilase intraseluler ber-pH optimum di kisaran 4,5–6. Suhu optimum enzim ini adalah 50–60°C (Zhao *et al.*, 2010).

4. HASIL DAN PEMBAHASAN

Penelitian menunjukkan kitin dari limbah udang dapat diisolasi sepenuhnya secara enzimatis. Hal ini terlihat dari nilai demineralisasi yang mencapai 88–99% dan deproteinasi 81–88% setelah proses fermentasi. Pada metode-metode tersebut bahan kimia hanya digunakan untuk mengatur pH fermentasi. Review metode dan hasil riset tersebut dapat dilihat pada Tabel 4.

Di sisi lain, proses isolasi kitin secara enzimatis dari limbah udang yang dilakukan secara parsial, khususnya di tahap deproteinasi dapat menurunkan jumlah protein limbah udang hingga >80%–94% (Xu *et al.*, 2008; Rao *et al.*, 2000; Ghorbel-Bellaaj *et al.*, 2013; Pachapur *et al.*, 2016; Younes *et al.*, 2012; Mhamdi *et al.*, 2017; Xin *et al.*, 2020; Sixto-Berrocal *et al.*, 2023; Marzieh *et al.*, 2019; Deng *et al.*, 2020). Enzim papain berhasil menarik protein di kulit udang antara 70–82%, sedangkan bromelain menurunkan 74–87% protein kulit udang tergantung ukuran partikel kulit yang digunakan (Pérez *et al.*, 2022). Deproteinasi limbah udang dengan enzim *indigenous* mampu menurunkan lebih dari 80% protein limbah udang, namun fermentasi selama 24 jam menghasilkan produk berbau busuk kuat (Rao *et al.*, 2000).

Penelitian mengenai deasetilasi kitin, khususnya dari limbah udang, dengan enzim kitin deasetilasi tidak banyak. Hal ini mungkin terkait rendahnya kitin yang terdeasetilasi menggunakan enzim ini. Harmsen *et al* melaporkan bahwa hanya sekitar 10% grup asetil dari kitin, baik jenis α maupun β , yang terlepas ketika deasetilasi dilakukan menggunakan enzim kitin deasetilasi. Penelitian tersebut dilakukan untuk proses fermentasi selama 10 hari (suhu 37°C, substrat 5 mg/mL, enzim 5 μ M, pH 8,0, kecepatan pengadukan 800 rpm). Lebih lanjut disebutkan, di alam kitin terdegradasi oleh enzim glikosida hidrolase dan litik polisakarida monooksigenase (Harmsen *et al.*, 2019). Sixto-Berrocal *et al* berhasil mengekstraksi kitosan dari kulit udang secara enzimatis menggunakan enzim koktail dari *A. niger* dengan derajat deasetilasi (DD) 86%, yang termasuk kategori DD tinggi. Meski demikian, kitosan tersebut hanya memiliki nilai kelarutan 25% dalam larutan asam asetat 1,0 N (Sixto-Berrocal *et al.*, 2023).

Penelitian terkait ekstraksi kitin dan kitosan dari limbah udang secara enzimatis telah banyak dilakukan. Ada yang mencoba melakukan proses enzimatis hanya di tahap demineralisasi (Khanafari *et al.*, 2008). Sebagian besar memilih

Tabel 4. Metode dan hasil ekstraksi kitin dari limbah udang secara enzimatik

Referensi dan Bahan baku	Metode	Hasil
(Rao <i>et al.</i> , 2000) Limbah kepala dan kulit udang	Fermentasi dengan <i>Lactobacillus plantarum</i> (kondisi inkubasi optimum: glukosa 5% w/w; inoculum 10% v/w; pH awal 6,0 disesuaikan dengan asam sitrat; suhu 30°C; waktu 12–24 jam).	Nilai deproteinisasi 88% dan demineralisasi 91%, namun larutan substrat menjadi seperti bubur kental dan setelah 24 jam ada tanda pembusukan.
(Xu <i>et al.</i> , 2008) Kulit <i>Penaeus monodon</i> dan <i>Crangon crangon</i>	- Deproteinasi dengan bakteri proteolitik dari daging giling (kondisi inkubasi: 15 g serbuk kulit, 250 mL larutan inoculum 3–5×10 ⁶ koloni/mL, suhu 37°C, kecepatan pengadukan 110 rpm, waktu 68 jam untuk <i>P. monodon</i> dan 50 jam untuk <i>C. crangon</i>) - Demineralisasi dengan <i>Lactobacillus casei</i> yang diisolasi dari yogurt komersial (kondisi inkubasi: inoculum 5,74×10 ⁷ koloni/mL, suhu 37°C, kecepatan pengadukan 110 rpm, waktu 47 jam untuk <i>P. monodon</i> dan 46 jam untuk <i>C. crangon</i>)	- Deproteinisasi kulit <i>Penaeus monodon</i> 81%, <i>Crangon crangon</i> 33% (kandungan protein <i>P. monodon</i> tiga kali lebih tinggi dibanding <i>C. crangon</i>) - Demineralisasi kulit <i>Penaeus monodon</i> 97%, <i>Crangon crangon</i> 98% (kandungan kalsium <i>P. monodon</i> lebih rendah dari <i>C. crangon</i>)
(Ghorbel-Bellaaj <i>et al.</i> , 2013) Kulit <i>Metapenaeus monoceros</i>	Fermentasi dengan <i>Bacillus pumilus</i> (kondisi inkubasi: 100 mL larutan fermentasi, komposisi 70 g/l kulit udang; 50 g/l glukosa; pH 5,0; inoculum 0.225 OD pada 600 nm; suhu 35°C; 6 hari).	- Nilai deproteinisasi 94% dan demineralisasi 88% - Rendemen kitin 27%
(Pachapur <i>et al.</i> , 2016) Campuran kulit kepiting, lobster, dan udang-udangan (<i>shrimp</i> , <i>prawn</i> , dan <i>krill</i>)	- Fermentasi dengan <i>Bacillus licheniformis</i> dan <i>Bacillus subtilis</i> (kondisi inkubasi: air laut berisi 8 g/L limbah kulit; 10 g/L glukosa; 0,1% ekstrak ragi; 10% v/v inoculum; pH awal 7,0); - Dilakukan pula ekstraksi kitin secara kimia	- Nilai deproteinisasi <i>B. subtilis</i> 84% dan <i>B. licheniformis</i> 74% (inkubasi 24 jam; E/S=2 U/mg) - Nilai demineralisasi 54,5–62,5% (inkubasi 5–15 hari). - Ekstraksi kimiawi: nilai deproteinisasi <80% dan demineralisasi 98% (dengan air tawar) dan 93% (dengan air laut)
(Sixto-Berrocal <i>et al.</i> , 2023) Kulit <i>Litopenaeus vannamei</i>	- Fermentasi dengan <i>Lactobacillus delbrueckii</i> dan <i>Bifidobacterium lactis</i> (kondisi inkubasi optimum: 100 g/L potongan kulit udang, 50 g/L glukosa, demineralisasi 24 jam dengan <i>L. delbrueckii</i> , lalu ditambah 35 g/L glukosa (<i>pulse</i>), di jam ke-48 ditambah <i>B. lactis</i> , pH awal 7,2 dan dijaga minimal 6,0 dengan NaOH 6 M, suhu 40°C, 200 rpm, total 72 jam) - Deasetilasi kitin (membuat kitosan) dengan <i>crude</i> enzim koktail deasetilases dari <i>Aspergillus niger</i> (1 g <i>crude</i> kitin pH 5,0 dengan buffer asetat, 10 mL enzim-35 U/ml, suhu 40°C, 200 rpm, 24 jam)	- Nilai deproteinisasi 87% dan demineralisasi 99% - Derajat deasetilasi (DD) kitosan 86%

perlakukan enzimatis untuk memperoleh kitin (Deng *et al.*, 2020; Gopalakannan *et al.*, 2000; Manni *et al.*, 2010; Marzieh *et al.*, 2019; Mhamdi *et al.*, 2017; Nasri *et al.*, 2011; Paul *et al.*, 2015; Pérez *et al.*, 2022; Sila *et al.*, 2014; Xin *et al.*, 2020; Younes *et al.*, 2012, 2014b). Ada pula yang sepenuhnya mengisolasi kitin dan kitosan secara enzimatis (Tabel 4). Sangat disayangkan penelitian-penelitian tersebut menunjukkan bahwa dibanding secara kimiawi, nilai deproteinasi limbah udang yang diproses secara fermentasi lebih rendah dengan rendemen dan derajat deasetilasi kitin yang juga lebih rendah.

Guna memperoleh hasil ekstraksi yang optimum, beberapa penelitian tersebut mencoba mengawinkan deproteinasi enzimatis dengan *mild*-demineralisasi menggunakan bahan kimia yang lebih ramah lingkungan (asam asetat, asam sitrat, asam laktat) dan suhu proses cukup rendah (suhu ruang hingga maksimal 60°C) (Marzieh *et al.*, 2019; Pérez *et al.*, 2022; Rao *et al.*, 2000). Ada pula yang memperkuat proses deproteinasi menggunakan strain bakteri penghasil protease termutasi (Xin *et al.*, 2020), atau menggunakan strain bakteri protease yang termostabil (Mhamdi *et al.*, 2017). Semua upaya tersebut mampu menurunkan nilai protein dan mineral dalam limbah udang antara 88–98%. Namun waktu inkubasi yang cukup lama atau perlu adanya tahap persiapan strain bakteri sebelum digunakan menjadi hal yang perlu dipertimbangkan.

Hingga kini, proses ekstraksi kitin dan kitosan skala industri masih dilakukan secara kimiawi. Waktu proses yang pendek (dari 30 menit hingga maksimal 6 jam), sistem ekstraksi standar yang mudah diatur dan disesuaikan, dengan hasil yang optimum (umumnya nilai demineralisasi dan deproteinasi >85%; rendemen dan DD kitin yang tinggi) merupakan kelebihan dari proses kimiawi tersebut. Terlebih bahan kimia utama yang umumnya digunakan hanyalah NaOH dan HCl, yang tentu membuat proses kimiawi cukup ekonomis. Ini berbeda dengan kitin dan kitosan yang diekstraksi secara enzimatis karena membutuhkan waktu fermentasi yang cukup panjang (umumnya minimal 6 jam hingga beberapa hari), jumlah enzim yang cukup banyak (rasio E/S ≥ 5 U/mg protein), dengan juga harus mempertimbangkan kondisi optimum kerja enzim (pH, suhu dan waktu inkubasi, rasio E/S, serta faktor penghambat kerja enzim) dan metode *recovery* enzim. Terlebih jika proses fermentasi dilakukan menggunakan strain mikroba hidup, maka perlu diperhatikan asupan karbon serta

masa keberlangsungan hidup mikroba tersebut. Bahkan deasetilasi kitin secara enzimatis menjadi kitosan sejauh ini belum membuahkan hasil berarti karena tingkat keberhasilannya yang boleh dibilang masih rendah.

Di sisi lain, keuntungan dari proses ekstraksi secara enzimatis adalah dapat menghasilkan produk sesuai kondisi alaminya (Deng *et al.*, 2020), dengan proses yang lebih ramah lingkungan. Selain itu, senyawa-senyawa di substrat yang menjadi hasil samping proses ekstraksi dapat diisolasi dan dimanfaatkan lebih lanjut. Beberapa penelitian menunjukkan bahwa proses fermentasi limbah udang menghasilkan larutan yang kaya akan protein, karotenoid (khususnya astaxanthin), mineral (khususnya kalsium), dan lemak. Protein hasil fermentasi tersebut juga kaya akan asam amino esensial (Arancibia *et al.*, 2014; Armenta-López *et al.*, 2002; Deng *et al.*, 2020). Hal tersebut menunjukkan proses ekstraksi limbah udang secara enzimatis tidak hanya menghasilkan produk utama, yaitu kitin dan kitosan, namun juga produk-produk lain yang tak kalah manfaat dan nilainya dibanding produk utama, yaitu protein bermutu tinggi, karotenoid, kalsium, dan mungkin saja lemak bermutu tinggi (yang kaya akan asam lemak tak jenuh). Produk-produk tersebut dapat dimanfaatkan lebih lanjut untuk produksi pakan atau pangan bermutu tinggi, pangan fungsional, atau untuk kepentingan terkait dunia kesehatan. Hal yang juga perlu diapresiasi adalah penelitian yang ada sejauh ini sudah cukup berhasil menemukan strain mikroba atau enzim, serta kondisi yang diperlukan guna secara efektif mengekstraksi kitin dari kulit udang. Di sisi lain, meski deasetilasi kitin menjadi kitosan masih perlu eksplorasi lebih, namun penelitian menunjukkan modifikasi kitin atau kitosan secara enzimatis akan menghasilkan produk yang jelas strukturnya, khususnya dari sisi pola asetilasi (PA) polimer atau oligomer. Hal tersebut tidak dapat diperoleh melalui proses kimiawi. Lebih lanjut disebutkan, PA mempengaruhi aktivitas biologi kitosan. Dan proses enzimatis memungkinkan untuk mendapatkan kitosan dengan PA tertentu dengan aktivitas yang sangat baik (Basa *et al.*, 2020; Hamer *et al.*, 2015).

Meski demikian, ekstraksi kitin dan kitosan secara enzimatis masih memiliki tantangan tersendiri yang masih harus diselesaikan sehingga prosesnya layak digunakan di ranah industri. Diantaranya, berupaya memperpendek masa fermentasi dengan hasil optimum. Lalu mencoba

mengaplikasikan hasil di laboratorium ke skala yang lebih besar untuk melihat kemungkinan penerapannya di ranah industri serta memperoleh protocol standar yang efisien dan efektif. Tentu saja, upaya menemukan strain mikroba atau enzim baru yang termostabil dengan aktivitas enzim yang kuat untuk proses demineralisasi dan deproteinasi substrat, yang juga mampu bekerja baik dalam berbagai rentang pH tetap perlu dilakukan untuk memperluas kemungkinan hasil yang lebih baik. Untuk proses deasetilasi kitin secara enzimatik, ada baiknya mempertimbangkan penggunaan enzim glikosida hidrolase atau litik polisakarida monooksigenase selain enzim kitin deasetilasi untuk memperoleh hasil yang lebih optimal.

5. KESIMPULAN

Sejauh ini telah ditemukan strain mikroba atau enzim, serta kondisi fermentasi yang mampu mengekstraksi limbah udang menjadi kitin dengan tingkat efektifitas yang baik (nilai demineralisasi >90% dan deproteinasi >80%). Meski deasetilasi kitin menggunakan *A. niger* dilaporkan mampu menghasilkan kitosan dengan derajat deasetilasi 86%, namun tingkat kelarutan biopolimer ini hanya 25%. Lebih lanjut, hasil samping ekstraksi enzimatik limbah udang kaya akan protein bermutu tinggi, karotenoid (khususnya astaxanthin), dan mineral (khususnya kalsium) yang berpotensi dimanfaatkan lebih lanjut untuk kepentingan berbagai industri. Memperpendek masa fermentasi dengan hasil optimum, meneruskan hasil di laboratorium ke skala yang lebih besar, mencoba enzim lain untuk kepentingan deasetilasi kitin menjadi langkah lanjutan yang perlu dilakukan.

DAFTAR PUSTAKA

Amelia, I., & Herdyastuti, N. 2017. Kitin Dari Cangkang Rajungan Yang Diperoleh Secara Enzimatik Pada Tahap Deproteinasi. *UNESA Journal of Chemistry*. 6(2): 81–85.

Arancibia, M. Y., Alemán, A., Calvo, M. M., López-Caballero, M. E., Montero, P., & Gómez-Guillén, M. C. 2014. Antimicrobial and antioxidant chitosan solutions enriched with active shrimp (*Litopenaeus vannamei*) waste materials. *Food Hydrocolloids*. 35: 710–717.

Armenta-López, R., Guerrero, L. I., & Huerta, S. 2002. Astaxanthin extraction from shrimp

waste by lactic fermentation and enzymatic hydrolysis of the carotenoprotein complex. *Journal of Food Science*. 67(3): 1002–1006

- Arnold, N. D., Brück, W. M., Garbe, D., & Brück, T. B. 2020. Enzymatic modification of native chitin and conversion to specialty chemical products. *Marine Drugs*. 18(2): 1–27.
- Basa, S., Nampally, M., Honorato, T., Das, S. N., Podile, A. R., El Gueddari, N. E., & Moerschbacher, B. M. 2020. The Pattern of Acetylation Defines the Priming Activity of Chitosan Tetramers. *Journal of the American Chemical Society*. 142(4): 1975–1986.
- Bastiaens, L., Soetemans, L., D’Hondt, E., & Elst, K. 2019. Sources of chitin and chitosan and their isolation. In *Chitin and Chitosan: Properties and Applications*. pp. 1–34.
- Blackwell, J. 1982. *Macromolecular organization of cellulose and chitin*. 403–428. In: Brown, R.M. (eds) *Cellulose and Other Natural Polymer Systems*. Springer, Boston, MA
- Cahú, T. B., Santos, S. D., Mendes, A., Córdula, C. R., Chavante, S. F., Carvalho, L. B., Nader, H. B., & Bezerra, R. S. 2012. Recovery of protein, chitin, carotenoids and glycosaminoglycans from Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) processing waste. *Process Biochemistry*. 47(4): 570–577.
- Casadidio, C., Peregrina, D. V., Gigliobianco, M. R., Deng, S., Censi, R., & Di Martino, P. 2019. Chitin and chitosans: Characteristics, eco-friendly processes, and applications in cosmetic science. *Marine Drugs* 17(6).
- Chatelet, C., Damour, O., & Domard, A. 2001. Influence of the degree of acetylation on some biological properties of chitosan films. *Biomaterials*. 22(3): 261–268.
- Chitosanlab. (n.d.). *Chitin*. [ONLINE]. From: <https://chitosanlab.com/en/chitin/>. [Diakses pada 23 Maret 2023].
- Crini, G. 2019. Historical review on chitin and chitosan biopolymers. *Environmental Chemistry Letters*. 17(4): 1623–1643.
- Dang, T. T., Gringer, N., Jessen, F., Olsen, K., Bøknæs, N., Nielsen, P. L., & Orlien, V. 2018. Emerging and potential technologies

- for facilitating shrimp peeling: A review. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. 45: 228–240.
- De Grave, S., Pentcheff, D., Ahyong, S. T., Chan, T.-Y., Crandall, K. A., Dworschak, P. C., Felder, D. L., Feldmann, R. M., Fransen, C. H. J. M., Goulding, La. Y. D., Lemaitre, R., Low, M. E. Y., Martin, J. W., Ng, P. K. L., Schweitzer, C. E., Tan, S. H., Tshudy, D., & Wetzer, R. 2009. A classification of living and fossil genera of decapod crustaceans. *Raffles Bulletin of Zoology*. 21: 1–109.
- Deng, J. J., Mao, H. H., Fang, W., Li, Z. Q., Shi, D., Li, Z. W., Zhou, T., & Luo, X. C. 2020. Enzymatic conversion and recovery of protein, chitin, and astaxanthin from shrimp shell waste. *Journal of Cleaner Production*, 271, 122655.
- Ding, J., & Guo, Y. 2022. Recent Advances in Chitosan and its Derivatives in Cancer Treatment. *Frontiers in Pharmacology*, 13(April). 1–13.
- Evans, L. (n.d.). *Indian white prawn (Fenneropenaeus indicus Edwards, 1837)*. In Aquaculture Feed and Fertilizer Resources Information System (AFFRIS), Food and Agriculture Organization of the United Nations. [ONLINE]. From: [https://www.fao.org/fishery/affris/species-profiles/indian-white-prawn/indian-white-prawn-home/en/#:~:text=Morphological characteristics&text=Shrimp have a head \(thorax, five pairs of walking legs. \[Diakses pada 27 Februari 2023\].](https://www.fao.org/fishery/affris/species-profiles/indian-white-prawn/indian-white-prawn-home/en/#:~:text=Morphological characteristics&text=Shrimp have a head (thorax, five pairs of walking legs. [Diakses pada 27 Februari 2023].)
- Fernando, L. D., Dickwella Widanage, M. C., Penfield, J., Lipton, A. S., Washton, N., Latgé, J. P., Wang, P., Zhang, L., & Wang, T. 2021. Structural Polymorphism of Chitin and Chitosan in Fungal Cell Walls From Solid-State NMR and Principal Component Analysis. *Frontiers in Molecular Biosciences*. 8: 1–12.
- Gardner, K. H., & Blackwell, J. 1975. Refinement of the structure of β -chitin. *Biopolymers*. 14(8): 1581–1595.
- Gartner, C., Peláez, C. A., & López, B. L. 2010. Characterization of chitin and chitosan extracted from shrimp shells by two methods. *E-Polymers*. 069: 1–16.
- Ghorbel-Bellaaj, O., Hajji, S., Younes, I., Chaabouni, M., Nasri, M., & Jellouli, K. 2013. Optimization of chitin extraction from shrimp waste with *Bacillus pumilus* A1 using response surface methodology. *International Journal of Biological Macromolecules*. 61: 243–250.
- Gonçalves, C., Ferreira, N., & Lourenço, L. 2021. Production of low molecular weight chitosan and chitooligosaccharides (COS): A review. *Polymers*. 13(15): 1–23. <https://doi.org/10.3390/polym13152466>
- Gopalakannan, A., Indra Jasmine, G., Shanmugam, S. A., & Sugumar, G. 2000. Application of proteolytic enzyme, papain for the production of chitin and chitosan from shrimp waste. *J. Mar. Biol. Ass. India*, 42(2): 167–172.
- Hamed, I., Özogul, F., & Regenstein, J. M. 2016. Industrial applications of crustacean by-products (chitin, chitosan, and chitooligosaccharides): A review. *Trends in Food Science and Technology*. 48: 40–50.
- Hamer, S. N., Cord-Landwehr, S., Biarnés, X., Planas, A., Waegeman, H., Moerschbacher, B. M., & Kolkenbrock, S. 2015. Enzymatic production of defined chitosan oligomers with a specific pattern of acetylation using a combination of chitin oligosaccharide deacetylases. *Scientific Reports*. 5: 1–9.
- Harmsen, R. A. G., Tuveng, T. R., Antonsen, S. G., Eijsink, V. G. H., & Sørli, M. 2019. Can we make Chitosan by Enzymatic Deacetylation of Chitin? *Molecules*. 24(21). <https://doi.org/10.3390/molecules24213862>
- He, X., Li, K., Xing, R., Liu, S., Hu, L., & Li, P. 2016. The production of fully deacetylated chitosan by compression method. *Egyptian Journal of Aquatic Research*. 42(1): 75–81.
- Hülsey, M. J. 2018. Shell biorefinery: A comprehensive introduction. *Green Energy and Environment*. 3(4): 318–327.
- Jang, M. K., Kong, B. G., Jeong, Y. Il, Lee, C. H., & Nah, J. W. 2004. Physicochemical characterization of α -chitin, β -chitin, and γ -chitin separated from natural resources. In *Journal of Polymer Science, Part A: Polymer Chemistry*. 42(14) : 3423–3432.
- Kameda, T., Miyazawa, M., Ono, H., & Yoshida, M. 2005. Hydrogen bonding structure and stability of α -chitin studied by ^{13}C solid-

- state NMR. *Macromolecular Bioscience*. 5(2) : 103–106.
- Kannupandi, T., Soundarapandian, P., & Rajendran, N. 2003. *Prawns and Shrimps* (Issue June 2003, pp. 308–320). UNESCO International Training Course on Coastal Biodiversity in Mangrove Ecosystem. https://www.researchgate.net/publication/283302406_Prawns_and_Shrimps/citations
- Kasaai, M. R. 2009. Various methods for determination of the degree of N-acetylation of chitin and chitosan: A review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 57(5): 1667–1676.
- Kaya, M., Mujtaba, M., Ehrlich, H., Salaberria, A. M., Baran, T., Amemiya, C. T., Galli, R., Akyuz, L., Sargin, I., & Labidi, J. 2017. On chemistry of γ -chitin. *Carbohydrate Polymers*. 176: 177–186.
- Khanafari, A., Marandi, R., & Sanatei, S. 2008. Recovery of chitin and chitosan from shrimp waste by chemical and microbial methods. *Iranian Journal of Environmental Health Science and Engineering*. 5(1): 19–24.
- Krajewska, B. 2004. Application of chitin- and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: A review. *Enzyme and Microbial Technology*. 35(2–3): 126–139.
- Kumari, S., & Kishor, R. 2020. Chitin and chitosan: origin, properties, and applications. In *Handbook of Chitin and Chitosan: Volume 1: Preparation and Properties*. INC. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817970-3.00001-8>
- Kurita, K. 2006. Chitin and chitosan: Functional biopolymers from marine crustaceans. *Marine Biotechnology*. 8(3): 203–226.
- Manni, L., Ghorbel-Bellaaj, O., Jellouli, K., Younes, I., & Nasri, M. 2010. Extraction and characterization of chitin, chitosan, and protein hydrolysates prepared from shrimp waste by treatment with crude protease from bacillus cereus SV1. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 162(2): 345–357.
- Marzieh, M. N., Zahra, F., Tahereh, E., & Sara, K. N. 2019. Comparison of the physicochemical and structural characteristics of enzymatic produced chitin and commercial chitin. *International Journal of Biological Macromolecules*. 139: 270–276.
- Mathur, N. K., & Narang, C. K. 1990. Chitin and chitosan, versatile polysaccharides from marine animals. *Journal Of Chemical Education*. 67(11): 938–942.
- Mhamdi, S., Ktari, N., Hajji, S., Nasri, M., & Sellami Kamoun, A. 2017. Alkaline proteases from a newly isolated *Micromonospora chaiyaphumensis* S103: Characterization and application as a detergent additive and for chitin extraction from shrimp shell waste. *International Journal of Biological Macromolecules*. 94: 415–422.
- Michael. 2023. *Dwarf Shrimp External Anatomy*. Shrimp and Snail Breeder. [ONLINE]. From: <https://aquariumbreeder.com/dwarf-shrimp-external-anatomy/>. [Diakses pada 25 Februari 2023].
- Minke, R., & Blackwell, J. 1978. The structure of alpha-chitin. *Journal of Molecular Biology*. 120(2): 167–181.
- Morin-Crini, N., Lichtfouse, E., Torri, G., & Crini, G. 2019. *Fundamentals and Applications of Chitosan*. https://doi.org/10.1007/978-3-030-16538-3_2
- Moura, D., Mano, J. F., Paiva, M. C., & Alves, N. M. 2016. Chitosan nanocomposites based on distinct inorganic fillers for biomedical applications. *Science and Technology of Advanced Materials*. 17(1): 626–643.
- Mourya, V. K., Inamdar, N. N., & Choudhari, Y. M. 2011. Chitooligosaccharides: Synthesis, characterization and applications. *Polymer Science - Series A*. 53(7): 583–612.
- Muzzarelli, R. A. A., Boudrant, J., Meyer, D., Manno, N., Demarchis, M., & Paoletti, M. G. 2012. Current views on fungal chitin/chitosan, human chitinases, food preservation, glucans, pectins and inulin: A tribute to Henri Braconnot, precursor of the carbohydrate polymers science, on the chitin bicentennial. *Carbohydrate Polymers*, 87(2): 995–1012.
- Nasri, R., Younes, I., Lassoued, I., Ghorbel, S., Ghorbel-Bellaaj, O., & Nasri, M. 2011. Digestive Alkaline Proteases from *Zosterisessor ophiocephalus*, *Raja clavata*,

- and Scorpaena scrofa: Characteristics and Application in Chitin Extraction. *Journal of Amino Acids*, 2011, 1–9. <https://doi.org/10.4061/2011/913616>
- Natalia, D. A., Dharmayanti, N., & Roswita Dewi, F. 2021. Produksi Kitosan dari Cangkang Rajungan (*Portunus* sp.) pada Suhu Ruang. *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*. 24(3): 301–309.
- Novikov, V. Y., Derkach, S. R., Konovalova, I. N., Dolgopyatova, N. V, & Kuchina, Y. A. 2023. Mechanism of Heterogeneous Alkaline Deacetylation of Chitin: A Review. *Polymers*. 15(7): 1–23.
- Pachapur, V. L., Guemiza, K., Rouissi, T., Sarma, S. J., & Brar, S. K. 2016. Novel biological and chemical methods of chitin extraction from crustacean waste using saline water. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. 91(8): 2331–2339.
- Paul, T., Halder, S. K., Das, A., Ghosh, K., Mandal, A., Payra, P., Barman, P., Das Mohapatra, P. K., Pati, B. R., & Mondal, K. C. 2015. Production of chitin and bioactive materials from Black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) shell waste by the treatment of bacterial protease cocktail. *3 Biotech*. 5(4): 483–493.
- Pérez, W. A., Marín, J. A., López, J. N., Burgos, M. A., & Rios, L. A. 2022. Development of a Pilot-ecofriendly Process for Chitosan Production from Waste Shrimp Shells. *Environmental Processes*. 9(3): 1–25.
- Philibert, T., Lee, B. H., & Fabien, N. 2017. Current Status and New Perspectives on Chitin and Chitosan as Functional Biopolymers. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 181(4): 1314–1337.
- Poulicek, M., Voss-Foucart, M. F., & Jeuniaux, C. 1986. Chitinoproteic Complexes and Mineralization in Mollusk Skeletal Structures. In *Chitin in Nature and Technology*. 8: 7–12.
- Promwikorn, W., Boonyoung, P., & Kirirat, P. 2005. Histological characterization of cuticular depositions throughout the molting cycle of the black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *Songklanakarinn J. Sci. Technol*. 27(3): 500–509.
- Rao, M. S., Muñoz, J., & Stevens, W. F. 2000. Critical factors in chitin production by fermentation of shrimp biowaste. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 54(6): 808–813.
- Rinaudo, M. (2006). Chitin and chitosan: Properties and applications. *Progress in Polymer Science (Oxford)*. 31(7): 603–632.
- Rkhaila, A., Chtouki, T., Erguig, H., Haloui, N. El, & Ounine, K. 2021. Chemical proprieties of biopolymers (Chitin/chitosan) and their synergic effects with endophytic *Bacillus* species: Unlimited applications in agriculture. *Molecules*. 26(4). <https://doi.org/10.3390/molecules26041117>
- Roer, R., & Dillaman, R. 1984. The structure and calcification of the crustacean cuticle. *Integrative and Comparative Biology*. 24(4): 893–909.
- Roy, J. C., Salaün, F., Giraud, S., Ferri, A., Chen, G., & Guan, J. 2017. Solubility of Chitin: Solvents, Solution Behaviors and Their Related Mechanisms. *Solubility of Polysaccharides*. <https://doi.org/10.5772/intechopen.71385>
- Saito, Y., Okano, T., Chanzy, H., & Sugiyama, J. 1995. Structural study of α chitin from the grasping spines of the arrow worm (*Sagitta* spp.). In *Journal of Structural Biology*. (114)3: 218–228).
- Saito, Y., Okano, T., Gaill, F., Chanzy, H., & Putaux, J. L. 2000. Structural data on the intra-crystalline swelling of β -chitin. *International Journal of Biological Macromolecules*. 28(1): 81–88.
- Salah, R., Michaud, P., Mati, F., Harrat, Z., Lounici, H., Abdi, N., Drouiche, N., & Mameri, N. 2013. Anticancer activity of chemically prepared shrimp low molecular weight chitin evaluation with the human monocyte leukaemia cell line, THP-1. *International Journal of Biological Macromolecules*. 52(1): 333–339.
- Sampath, U. G. T. M., Ching, Y. C., Chuah, C. H., Singh, R., & Lin, P. C. 2017. Preparation and characterization of nanocellulose reinforced semi-interpenetrating polymer network of chitosan hydrogel. *Cellulose*. 24(5): 2215–2228.
- Sawada, D., Nishiyama, Y., Langan, P., Forsyth, V. T., Kimura, S., & Wada, M. 2012. Direct

- determination of the hydrogen bonding arrangement in anhydrous β -chitin by neutron fiber diffraction. *Biomacromolecules* 13(1): 288–291.
- Sila, A., Mlaik, N., Sayari, N., Balti, R., & Bougatef, A. 2014. Chitin and Chitosan Extracted from Shrimp Waste Using Fish Proteases Aided Process: Efficiency of Chitosan in the Treatment of Unhairing Effluents. *Journal of Polymers and the Environment*. 22(1): 78–87.
- Sixto-Berrocal, A. M., Vázquez-Aldana, M., Miranda-Castro, S. P., Martínez-Trujillo, M. A., & Cruz-Díaz, M. R. 2023. Chitin/chitosan extraction from shrimp shell waste by a completely biotechnological process. *International Journal of Biological Macromolecules*. 230 (October 2022). <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.123204>
- Sreekumar, S., Wattjes, J., Niehues, A., Mengoni, T., Mendes, A. C., Morris, E. R., Goycoolea, F. M., & Moerschbacher, B. M. 2022. Biotechnologically produced chitosans with nonrandom acetylation patterns differ from conventional chitosans in properties and activities. *Nature Communications*. 13(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-022-34483-3>
- Suginta, W., Khunkaewla, P., & Schulte, A. 2013. Electrochemical biosensor applications of polysaccharides chitin and chitosan. In *Chemical Reviews*. 13(7): 5458–5479.
- Synowiecki, J., & Al-Khateeb, N. A. A. Q. 2000. The recovery of protein hydrolysate during enzymatic isolation of chitin from shrimp Crangon crangon processing discards. *Food Chemistry*. 68(2): 147–152.
- Tsigos, I., Martinou, A., Kafetzopoulos, D., & Bouriotis, V. 2000. Chitin deacetylases: new , versatile tools in. *TibTech*, 18(1999): 129–135.
- Verma, M. L., Kumar, S., Das, A., Randhawa, J. S., & Chamundeswari, M. 2020. Chitin and chitosan-based support materials for enzyme immobilization and biotechnological applications. *Environmental Chemistry Letters*. 18(2): 315–323.
- Vicente, F. A., Huš, M., Likozar, B., & Novak, U. 2021. Chitin Deacetylation Using Deep Eutectic Solvents: Ab Initio-Supported Process Optimization. *ACS Sustainable Chemistry and Engineering*. 9(10): 3874–3886.
- Xin, R., Xie, W., Xu, Z., Che, H., Zheng, Z., & Yang, X. 2020. Efficient extraction of chitin from shrimp waste by mutagenized strain fermentation using atmospheric and room-temperature plasma. *International Journal of Biological Macromolecules*. 155: 1561–1568.
- Xu, Y., Gallert, C., & Winter, J. 2008. Chitin purification from shrimp wastes by microbial deproteinization and decalcification. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 79(4): 687–697.
- Younes, I., Ghorbel-Bellaaj, O., Nasri, R., Chaabouni, M., Rinaudo, M., & Nasri, M. 2012. Chitin and chitosan preparation from shrimp shells using optimized enzymatic deproteinization. *Process Biochemistry*. 47(12): 2032–2039.
- Younes, I., Hajji, S., Frachet, V., Rinaudo, M., Jellouli, K., & Nasri, M. 2014a. Chitin extraction from shrimp shell using enzymatic treatment. Antitumor, antioxidant and antimicrobial activities of chitosan. *International Journal of Biological Macromolecules*. 69: 489–498.
- Younes, I., Hajji, S., Frachet, V., Rinaudo, M., Jellouli, K., & Nasri, M. 2014b. Chitin extraction from shrimp shell using enzymatic treatment. Antitumor, antioxidant and antimicrobial activities of chitosan. *International Journal of Biological Macromolecules*. 69: 489–498.
- Younes, I., & Rinaudo, M. 2015. Chitin and chitosan preparation from marine sources. Structure, properties and applications. *Marine Drugs*. 13(3): 1133–1174.
- Zargar, V., Asghari, M., & Dashti, A. 2015. *A Review on Chitin and Chitosan Polymers : Structure , Chemistry, Solubility, Derivatives, and Applications*. 00: 1–24.
- Zhang, J., Feng, M., Lu, X., Shi, C., Li, X., Xin, J., Yue, G., & Zhang, S. 2018. Base-free preparation of low molecular weight chitin from crab shell. *Carbohydrate Polymers*. 190: 148–155.
- Zhao, Y., Park, R. D., & Muzzarelli, R. A. A.

2010. Chitin deacetylases: Properties and applications. *Marine Drugs*. 8(1): 24–46.