

**Karakteristik Fermentasi Kitin dari Kulit Udang Windu (*Penaeus monodon*)
dengan Kapang *Trichoderma virens***

**[Characteristics of Chitin Fermentation from Black Tiger Shrimp (*Penaeus monodon*)
using *Trichoderma virens*]**

Gerardo Kevin Liguna¹, Ratna Handayani^{1*}

¹Teknologi Pangan, Universitas Pelita Harapan, Jl. M.H. Thamrin Boulevard 1100
Lippo Village, Karawaci, Tangerang

*Korespondensi penulis: ratna.handayani@uph.edu

ABSTRACT

Black tiger shrimp (Penaeus monodon) is the most widely used shrimp in fisheries industries of Indonesia for export. This activity contribute to increase the amount of shrimp shell waste. Shrimp shell contains chitin at 15-20%. Chitin can be hydrolyzed using chitinase to produce N-acetylglucosamine. This research was conducted to determine profile of chitin fermentation yield from black tiger shrimp shell (Penaeus monodon) using Trichoderma virens. Chitin was made by demineralization and deproteination black tiger shrimp shell waste. The production of fermentation yield was using solid substrate fermentation. Duration of fermentation process was 8 days, incubation temperature was 30 °C and pH 4. Based on the results of fourier transform infrared (FT-IR) spectrophotometer and liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) analysis, it can be seen that crude N-acetylglucosamine oligosaccharides can be produced as the result of chitin fermentation besides N-acetylglucosamine. It can be determined from the presence of C-O-C groups and the molecular weight (10949,6230) which is a derivative molecule of GlcNAc-2-Man-3-GlcNAc-Fuc-GlcNAc and can be classified as N-glycans.

Keywords : Chitin; Oligo N-acetylglucosamine; N-glycans; *Trichoderma virens*

ABSTRAK

Udang windu (*Penaeus monodon*) merupakan jenis udang yang paling banyak diekspor oleh negara Indonesia. Kegiatan ini berkontribusi dalam peningkatan jumlah limbah kulit udang. Di dalam kulit udang, terkandung 15-20% kitin. Kitin dapat dihidrolisis menggunakan enzim kitinase untuk menghasilkan N-asetilglukosamin. Penelitian ini bertujuan mengetahui profil hasil fermentasi kitin dari kulit udang windu (*Penaeus monodon*) dengan kapang *Trichoderma virens*. Kitin dibuat dengan proses demineralisasi dan deproteinasi limbah kulit udang windu. Proses produksi hasil fermentasi kitin menggunakan proses fermentasi substrat padat. Proses fermentasi dilakukan selama 8 hari dengan suhu inkubasi 30 °C, and pH 4. Berdasarkan hasil analisis *fourier transform infrared (FT-IR) spectrophotometer* dan *liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS)* dapat diketahui bahwa selain dihasilkan N-asetilglukosamin dapat dihasilkan *crude* oligo N-asetilglukosamin merupakan hasil fermentasi kitin. Hal tersebut dapat diketahui dari adanya gugus C-O-C dan berat molekul (1094,6230) yang merupakan molekul turunan GlcNAc-2-Man-3-GlcNAc-Fuc-GlcNAc dan dapat digolongkan sebagai N-glikan.

Kata kunci : Kitin; N-asetilglukosamin; Oligo N-asetilglukosamin; N-glikan; *Trichoderma virens*

PENDAHULUAN

Udang merupakan salah satu komoditas unggulan sektor perikanan Indonesia yang memiliki nilai ekonomi yang tinggi, khususnya udang beku. Udang beku sebagai komoditi ekspor telah dipisahkan dari kepala dan kulitnya, sehingga hal tersebut yang menjadi sumber limbah yang dapat mencemari lingkungan. Limbah yang dihasilkan tersebut dapat mencapai angka 25% dari total produksi. Limbah tersebut yang dihasilkan saat ini digunakan sebagai bahan baku industri kerupuk, petis, terasi, pupuk dan pakan ternak dengan pemanfaatan hanya 30% dari limbah ekspor udang beku segar yang ada (Kementerian Kelautan dan Perikanan, 2016). Limbah ekspor udang beku segar sebagian besar adalah kulit udang yang memiliki kandungan kitin dan kitosan dengan nilai ekonomis tinggi (Ahing dan Wid, 2016).

Kitin adalah polimer dari monomer β -(1-4)-N-asetil-D-glukosamin. Sintesis kitin di alam dibantu dengan enzim yang mampu menyebabkan transfer glikosil β -(1-4)-N-asetil-D-glukosamin dari uridinedifosfat-N-asetil-D-glukosamin menjadi kitodestrin yang kemudian membentuk polisakarida (Sitanggang *et al.*, 2012). Kitin dapat terdegradasi menjadi monomer N-asetil-D-glukosamin dan oligomer N-asetil-D-glukosamin yang

tersusun atas 2-10 monomer N-asetil-D-glukosamin yang kemudian disebut sebagai oligo N-asetilglukosamin (kitin oligosakarida) (Wang *et al.*, 2008). Glukosamin yang telah dipurifikasi memiliki manfaat sebagai *supplement*, untuk osteoarthritis dan *back pain* (Sashiwa *et al.*, 2003). Proses hidrolisis kitin dapat dilakukan secara enzimatik serta fisik dan kimia (Hargono dan Djaeni, 2008). Salah satu metode hidrolisis kitin yang terus mengalami perkembangan adalah metode enzimatik dengan menggunakan enzim kitinase yang dihasilkan mikroorganisme. Metode tersebut merupakan alternatif dari metode kimia dengan penggunaan bahan kimia yang banyak. Glukosamin dapat didegradasi dari kitin secara enzimatik dan kimiawi. Reaksi enzimatik merupakan metode yang sederhana untuk menghasilkan senyawa turunan dari kitin dan lebih ramah lingkungan dibandingkan dengan reaksi kimiawi (Krokeide, *et al.*, 2007). Menurut Lv *et al.* (2016), reaksi enzimatik secara mikrobiologis dalam proses fermentasi bersifat selektif. Enzim kitinase yang dihasilkan hanya akan bereaksi dengan substrat enzim tersebut yang merupakan kitin sehingga hasil fermentasi yang dihasilkan dapat bersifat spesifik.

Tujuan dari penelitian ini adalah mengetahui profil hasil fermentasi kitin

dari kulit udang windu (*Penaeus monodon*) dengan bantuan enzim kitinase dari kapang *Trichoderma virens*.

BAHAN DAN METODE

Bahan dan Alat

Bahan yang digunakan yaitu limbah kulit udang dari PT. Lola Mina di Muara Baru, kultur bakteri *Trichoderma virens* dari Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI), media *Potato Dextrose Agar* (PDA), akuades, NaOH 3,5%, HCl 1M, KH₂PO₄, MgSO₄.7H₂O, NaNO₃, KCl, butanol, asam asetat glasial, larutan buffer pH 4, larutan buffer pH 7, dye Coomassie Blue G-250, *bovine serum albumine* (BSA), standar N - Asetilglukosamin, dan Ninhydrin (0,8%).

Alat yang dipergunakan adalah *cabinet dryer*, oven, desikator, cawan petri, *erlenmeyer*, mikropipet, pemanas bunsen, *heater*, *magnetic stirrer*, *laminar air flow*, *autoclave*, *vortex*, inkubator, *centrifuge* (Hettich), *water bath* (Memmert), UV-Vis *spectrometer* (Hitachi), *quartz cuvette* (Hellma Analytics), cawan pengabuan, *muffle furnace* (Thermolyne), cawan penguapan, *rotary vapor*, tabung reaksi, rak tabung reaksi, kolom kromatografi (pyrex), *liquid chromaography - mass spectrometry* (LC-MS), dan *fourier transform infrared (FT-IR) spectrometer*.

Metode Penelitian

Penelitian dilakukan untuk menentukan profil hasil fermentasi kitin dengan kapang kapang *Trichoderma virens* dengan perlakuan fermentasi selama 8 hari pada suhu 30 °C dan pH4. Setelah proses fermentasi dilakukan pemisahan dengan kolom kromatografi dengan kombinasi pelarut yaitu butanol, asam asetat glasial, dan akuades (12:5:3). Setelah proses pemisahan, dilakukan analisis menggunakan *fourier transform infrared (FT-IR) spectrophotometer* dan *liquid chromatography-mass spectrometry* (LC-MS) untuk menentukan komponen yang terkandung pada hasil fermentasi kitin.

Pembuatan Kitin (Arif *et al.* 2013)

Tahapan pembuatan kitin meliputi dua bagian yaitu tahapan demineralisasi dan deproteinasi. Demineralisasi dilakukan dengan perendaman kulit udang windu menggunakan HCl 1 M dengan rasio 1:10 (b/v), disertai pemanasan pada suhu 75°C yang disertai dengan pengadukan selama 2 jam. Tahap selanjutnya adalah penyaringan dan pencucian dengan akuader sampai didapatkan pH netral dan dilakukan pengeringan pada suhu 60 °C selama 20 jam.

Kitin yang dihasilkan dari proses demineralisasi selanjutnya dihilangkan proteinnya dengan perendaman dalam

NaOH 3,5% menggunakan rasio 1:10 (b/v) pada suhu 80 °C selama 2 jam. Selanjutnya dilakukan penyaringan dan pencucian dengan akuadest sampai pH netral, dan dilakukan proses pengeringan pada suhu 60 °C selama 20 jam.

Derajat Deasetilasi (Czechowska-Biskup *et al.*, 2012)

Kitin dilarutkan dalam potassium bromida (KBr) dengan rasio 1:100 (b/b). Potassium bromida yang digunakan sudah dikeringkan terlebih dahulu dengan oven (300 °C, 24 jam). Absorbansi sampel diukur dengan menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 400-4000 cm⁻¹ pada suhu ruang. Spektrum ditentukan dari rata-rata hasil 64 *scan* dengan resolusi sebesar 2 cm⁻¹.

Derajat deasetilasi dihitung dengan menggunakan rumus sebagai berikut:

$$\% \text{Derajat Deasetilasi} = \frac{A_{1655}}{A_{3450}} \times \frac{100}{1,33}$$

HASIL DAN PEMBAHASAN

Karakteristik Bubuk Kulit Udang dan Kitin

Analisis karakteristik bubuk kulit udang dilakukan melalui tiga uji yaitu uji kadar air, uji kadar abu, dan uji kadar protein. Hasil analisis bubuk kulit udang dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Hasil analisis karakteristik bubuk kulit udang dan kitin

Komponen	Bubuk Kulit Udang	Kitin
Kadar Air (%)	9,89 ± 0,39	4,59 ± 0,32
Kadar Abu (%)	49,72 ± 3,01	1,74 ± 0,07
Kadar Protein (%)	34,84 ± 1,30	0,46 ± 0,03

Rendemen Kitin

Rendemen kitin yang dihasilkan dalam penelitian ini sebesar 23,15%. Hasil penelitian yang dilakukan oleh Hossain dan Iqbal (2014) rendemen kitin yang didapat sebesar 13,12-17,36% sedangkan Arif *et al.* (2013) sebesar 19,38%. Berdasarkan hasil penelitian isolasi kitin yang dilakukan oleh Agustina *et al.* (2015) secara umum rendemen kitin yang dapat dihasilkan dari kulit udang lebih dari 20%. Rendemen kitin yang didapatkan dalam penelitian ini telah sesuai dalam rentang rendemen kitin berdasarkan literatur yang ada. Perbedaan rendemen kitin yang didapatkan dalam setiap penelitian dapat disebabkan oleh lama proses demineralisasi dan deproteinasi yang dilakukan. Semakin lama proses demineralisasi dan deproteinasi dilakukan maka kitin yang dihasilkan akan semakin banyak (Dompeipen *et al.*, 2016).

Derajat Deasetilasi

Perubahan kitin menjadi kitosan dapat terjadi karena adanya gugus hidroksil (OH⁻) dari NaOH yang

digunakan dalam proses deproteinasi. Gugus OH⁻ masuk ke atmon C karbonil karena adanya efek induksi sehingga elektron pada atom C mengarah ke atom O yang menyebabkan C karbonil bersifat elektropositif sehingga ikatan rangkap pada C=O karbonil akan terputus. Atom O pada gugus OH⁻ menarik electron pada H sehingga menyebabkan pembentukan proton. Atom N yang memiliki satu pasang elektron bebas dapat menerima proton sehingga membentuk ammonium. Agar atom N stabil maka dilakukan pemutusan ikatan N-C yang diikuti dengan pembentukan ikatan C=O sehingga terbentuk kitosan (Wahyuni *et al.*, 2016).

Hasil analisis menunjukkan nilai derajat asetilasi kitin sebesar 28,08%. Nilai derajat asetilasi kitin yang didapat sudah sesuai dengan standar Protan *Laboratories* dalam Arif *et al.* (2013) yang menyatakan bahwa derajat deasetilasi kitin berada pada rentang 15-70%. Puspawati dan Simpen (2010) menyatakan bahwa kitin merupakan senyawa polimer N-asetilglukosamin yang dengan rentang lebih besar dari 25% dan lebih kecil dari 70%. Brugnerotto dalam Duarte *et al.* (2002), menyatakan bahwa kitin terdeasetilasi memiliki nilai persentase kurang dari 50%. Derajat deasetilasi sebesar 28,08% menyatakan bahwa 28 unit N-asetilglukosamin telah terdeasetilasi dari 100 unit N-asetilglukosamin.

Fraksinasi dengan *Liquid Chromatography-Mass Spectrometry*

Sampel yang dipilih untuk dianalisis dengan *liquid chromatography-mass spectrometry* (LC-MS) merupakan sampel absorbansi *peak* tertinggi yang berada dalam rentang nilai absorbansi N-asetilglukosamin standar (0.518 A dan 0.590 A) yang dapat dikatakan bahwa pada sampel tersebut mengandung N-asetilglukosamin yang optimum. Namun, belum diketahui keberadaan ikatan antar masing-masing molekul yang terbentuk antar setiap molekul N-asetilglukosamin pada sampel tersebut.

Analisis data hasil fraksinasi dilakukan dengan menggunakan perangkat lunak MassLynx untuk melihat kromatogram dan spektrum masing-masing *peak*. Dari analisis hasil fraksinasi dengan LC-MS, pada kromatogram dinyatakan nilai *retention time* yang diartikan sebagai waktu yang diperlukan untuk suatu senyawa atau molekul dalam sampel untuk melewati kolom hingga mencapai *peak* tertentu. Dalam analisis LC-MS yang dilakukan dalam penelitian ini didapatkan kromatogram dengan 3 *peak* tertinggi secara berurutan pada *retention time* 10,35; 10,72; dan 11,01. Analisis lebih lanjut dilakukan untuk melihat spektrum masing-masing *peak* kromatogram dan ditemukan bahwa pada *retention time* 10,35 spektrum molekul

tertinggi dengan berat molekul 1094,6230 (44,48%). Pada *retention time* 10,72 spektrum molekul tertinggi dengan berat molekul 1094,6230 (57,77%) sedangkan pada *retention time* 10,60 spektrum molekul tertinggi dengan berat molekul 612,4084 (11,98%).

Dari analisis berdasarkan berat molekul dapat diketahui bahwa Sebagian besar hasil fermentasi adalah oligoglukosamin (kitin oligosakarida) yang dalam penelitian ini disebut sebagai sebagai oligo N-asetilglukosamin. Hal ini menunjukkan bahwa proses fermentasi yang dilakukan dapat berjalan dengan baik. Enzim kitinase yang dihasilkan oleh kapang *Trichoderma virens* dapat mendegradasi kitin menjadi produk turunan secara spesifik yaitu N-asetilglukosamin dan oligo N-asetilglukosamin. Menurut Lv *et al.* (2016), reaksi enzimatis secara mikrobiologis dalam proses fermentasi bersifat selektif. Enzim kitinase yang dihasilkan hanya akan bereaksi dengan substrat enzim tersebut yang merupakan kitin sehingga hasil fermentasi yang dihasilkan dapat bersifat spesifik.

Analisis Hasil Fraksinasi dengan Fourier Transform Infrared (FT-IR) Spectrophotometer

Sampel yang dipilih untuk dianalisis dengan *fourier transform infrared* (FT-IR) *spectrophotometer* adalah

sampel dengan nilai absorbansi yang berada dalam rentang nilai absorbansi N-asetilglukosamin standar yaitu sample ke-4 (0,259 A), sample ke-5 & 6 yang sudah dicampur (0.518 A dan 0.590 A), dan sample ke-7 dan 8 (0,276 A dan 0,283 A).

Tabel 2. Perbandingan jejak vibrasi Menurut Kova'cs *et al* (2008) dengan hasil analisis FT-IR

Jejak vibrasi	Literatur (cm ⁻¹)	Sampel ke-4 (cm ⁻¹)	Sampel ke-5&6 (cm ⁻¹)	Sampel ke-7&8 (cm ⁻¹)
OH	3200-3400	3399,98	3401,58	3403,70
N-H	1550	1463,92	1463,87	1463,93
C-H	2875	2875,88	2875,84	2875,93
C=O	1711	1715,26	1715,31	1715,46
CH ₃	1452	1463,92	1463,87	1463,93
C-O-C	1024	1029,55	1029,66	1029,59

Hasil analisis sampel yang didapatkan dibandingkan dengan jejak vibrasi N-asetilglukosamin. Pada Tabel 2 dapat diketahui jejak vibrasi setiap gugus fungsi yang tidak memiliki perbedaan jauh dengan hasil penelitian yang dilakukan oleh Kova'cs *et al* (2008) sehingga dapat dikatakan bahwa pada setiap sampel terdapat kandungan N-asetilglukosamin. Hal tersebut dapat terjadi karena proses fermentasi dan ekstraksi yang dilakukan mengacu pada optimasi produksi N-asetilglukosamin. Namun, dari hasil analisis lebih lanjut menggunakan FT-IR dapat diketahui bahwa selain dihasilkan N-asetilglukosamin dapat dihasilkan senyawa turunan lain seperti oligo N-

asetilglukosamin (kitin oligosakarida). Hal ini dapat dilihat dari adanya ikatan antar gugus karbon dan oksigen yang membentuk ikatan C-O-C secara berurutan nilai serapan jejak vibrasi sampel pada ikatan C-O-C adalah 1029,55, 1029,66, dan 1029,59. Ikatan tersebut terbentuk dari ikatan antar molekul N-asetilglukosamin Oligo N-asetilglukosamin yang terbentuk dapat disebabkan oleh reaksi enzimatik dari enzim kitinase yang dihasilkan oleh kapang *Trichoderma virens*. Hasil analisis membuktikan bahwa terdapat kandungan oligoglukosamin (kitin oligosakarida) sebagai salah satu hasil dari proses fermentasi kitin yang dilakukan dalam penelitian ini.

Hasil dalam penelitian ini hasil monomer N-asetilglukosamin yang lebih rendah dibandingkan dengan oligo N-asetilglukosamin. Hal tersebut dapat dipengaruhi oleh bentuk substrat kitin yang tidak diberi perlakuan. Pada penelitian yang dilakukan oleh Herdyastuti dan Cahyaningrum (2017) substrat yang digunakan adalah kitin amorf. Wang *et al.* (2006) dan Dahiya *et al.* (2005) menyatakan jika kitin yang digunakan dalam bentuk kitin koloidal yang kemudian diberikan perlakuan asam maka akan secara langsung dapat terhidrolisis sehingga memudahkan enzim kitinase yang didapatkan untuk bereaksi dengan oligomer yang tersisa dandiapatkan hasil

monomer N-asetilglukosamin yang lebih besar dibandingkan dengan hasil akhir oligo N-asetilglukosamin.

Selain itu hal ini dapat disebabkan karena perbedaan rasio endokitinase, eksokitinase, dan N-asetilglukosaminidase. Enzim N-asetilglukosaminidase pada enzim kitinase yang dihasilkan oleh kapang *Trichoderma virens* lebih rendah jika dibandingkan dengan enzim eksokitinase. Meskipun enzim eksokitinase dapat bereaksi dan membentuk monomer namun substrat kitin harus terlebih dahulu dalam bentuk oligomer. Bentuk rantai oligomer akan terbentuk dengan reaksi enzim endokitinase terlebih dahulu sedangkan enzim N-asetilglukosaminidase dapat secara langsung memotong rantai panjang menjadi monomer N-asetilglukosamin (Aziz *et al.*, 2008).

KESIMPULAN

Kulit udang windu dapat dimanfaatkan sebagai bahan dasar dalam pembuatan kitin yang dapat difermentasi oleh kapang *Trichoderma virens* untuk menghasilkan glukosamin. Kandungan yang terdapat pada bubuk kulit udang meliputi air, abu, dan protein adalah 9,89%, 49,27%, dan 35,83% sedangkan pada kitin yang dihasilkan dalam penelitian ini adalah 4,59%, 0,46%, dan 1,74%. Rendemen kitin yang dihasilkan

sebesar 23,15% dengan derajat asetilasi sebesar 28,08%.

Proses fermentasi kitin dengan kapang *Trichoderma virens* pada suhu 30 °C dan pH 4 selama 8 hari terbukti dapat menghasilkan hasil fermentasi yang bervariasi selain N-asetilglukosamin. Berdasarkan hasil analisis LC-MS dan FT-IR yang dilakukan dapat diketahui bahwa selain dihasilkan N-asetilglukosamin, proses fermentasi yang dilakukan dapat menghasilkan *crude* oligoglukosamin (kitin oligosakarida) yang secara spesifik dari analisis LC-MS diketahui molekul berkisar pada 1094,6230 (44,48% pada *retention time* 10,35 dan 57,55% pada *retention time* 10,72) yang merupakan molekul turunan GlcNAc-2-Man-3-GlcNAc-Fuc-GlcNAc. Hasil analisis tersebut dapat digolongkan N-glikan. Hasil analisis FT-IR menunjukkan adanya gugus C-O-C yang menandakan bahwa disamping teridentifikasi kandungan N-asetilglukosamin yang tinggi. Hasil analisis membuktikan bahwa terdapat kandungan *crude* oligoglukosamin (kitin oligosakarida) sebagai salah satu hasil dari proses fermentasi kitin yang dilakukan dalam penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

Agustina, S., Swantara, I. M. D., dan Suartha, I. N. 2015. Isolasi kitin, karakterisasi, dan sintesis kitosan

dari kulit udang. *Jurnal Kimia* 9 (2): 271-278.

Ahing, F.A. dan Newati Wid. (2016) Extraction and Characterization of Chitosan from Shrimp Shell Waste in Sabah. *Transactions on Science and Technology*, 3 (1-2): 227-237.

Arif, A.R., Ischaidar, Natsir, Hasnah., Dali, Seniwati (2013) Isolasi kitin dari limbah udang putih (*Penaeus merguensis*) secara enzimatis. Seminar Nasional Kimia: Peran Sains dan Teknologi Dalam mendukung Ketahanan Pangan dan Energi Nasional. Universitas Hasanuddin, Makassar: 10-16.

Aziz, Suraini Abd., Teoh Lay Sin, Noorjahan Alitheen, Neelam Shahab, dan Kamarulzaman Kamaruddin. 2008. Microbial Degradation of Chitin Materials by *Trichoderma virens* UKM1. *Journal of Biological Sciences* 8 (1): 52-59. <https://doi.org/10.3923/jbs.2008.52.59>

Czechowska-Biskup, R., Jarosisńska, U., Rokita, B., Ulański, P., Rosiak, J. M. (2012) Determination of degree of deacetylation of chitosan-comparison of methods. *Progress on Chemistry and Application of Chitin*. Volume XVII, 2012. Lodz University of Technology, Poland.

Dahiya, N., R. Tewari, R.P. Tiwari dan G.S. Hoondal. (2005) Chitinase from *Enterobacter* sp. NRG4: Its purification, characterization and reaction pattern. *Eur. J. Biotechnol.*, 8 (2): 134-145. <https://doi.org/10.2225/vol8-issue2-fulltext-6>

Duarte, M., Ferreira, M., Marvão, M., Rocha, J. (2002) An optimized method to determine the degree of acetylation of chitin and chitosan by FTIR spectroscopy. *Int J Biol Macromol* 31: 1-8. [https://doi.org/10.1016/S0141-8130\(02\)00039-9](https://doi.org/10.1016/S0141-8130(02)00039-9)

- Hargono, Abdullah, dan Sumantri I. (2008) Pembuatan kitosan dari limbah cangkang udang serta aplikasinya dalam mereduksi kolesterol lemak kambing *Reaktor* 12(1):53-57. <https://doi.org/10.14710/reaktor.12.1.53-57>
- Herdyausti, N., Raharjo, T.J., Mudasir, dan Matsjeh, S. (2009) Kitinase dan Mikroorganisme kitinolitik: Isolasi, Karakterisasi, dan Manfaatnya. Yogyakarta: Department of Chemistry, Gadjah Mada University. <https://doi.org/10.22146/ijc.21580>
- Hossain, M. S., dan Iqbal, A. (2014) "Production and Characterization of Chitosan from Shrimp Waste". Bangladesh Agricultural University, India. *J. Bangladesh Agril. Univ.* 12 (1): 153-160, 2014. ISSN 1810-3030. <https://doi.org/10.3329/jbau.v12i1.21405>
- Kementerian Kelautan dan Perikanan. 2016. MEA Centre. Sektor Kelautan dan Perikanan. KKP.
- Kova'cs, A., Bala'zs Nyerges, dan Vladislav Izvekov. (2008) Vibrational analysis of N-Acetyl-Alpha-D-glucosamine and Beta-D-Glucuronic Acid. *J. Phys. Chem. B* 112: 5728-5735. <https://doi.org/10.1021/jp710432d>
- Krokeide, I. M., Synstad, B., Gaseidnes, S., Horn, S. J., Eijnsink, V. G., dan Sorlie. (2007) Natural substrate assay for chitinases using high-performance liquid chromatography: A comparison with existing assays. *Anal Biochem* 363: 128-134. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2006.12.044>
- Lv, Y.M., P. Laborda, K. Huang, Z.P. Cai, M. Wang, A.M. Lu, C. Doherty, L. Liu, S.L. Flitsch, dan J. Voglmeir. (2017) Highly efficient and selective biocatalytic production of glucosamine from chitin. *Green Chem* 19: 527-535. <https://doi.org/10.1039/C6GC02910H>
- Puspawati, N.M., dan Simpen, I.N. (2010) Optimasi deasetilasi kitin dari kulit udang dan cangkang kepiting limbah restoran *seafood* menjadi kitosan melalui variasi konsentrasi NaOH. Universitas Udayana, Bukit Jimbaran. *Jurnal Kimia* 4 (1), Januari 2010: 79-90.
- Sashiwa, H., Fujishima, S., Yamano N., Kawasaki N., Nakayama A., Muraki E., Hiraga K., Sukwattanasinitt M., Pickyangkura R., and Aiba S. (2003) Enzymatic production of N-acetyl-D glucosamine from chitin. *Carbohydrate Polymers Elsevier* 51 (4): 391-395. [https://doi.org/10.1016/S0144-8617\(02\)00192-3](https://doi.org/10.1016/S0144-8617(02)00192-3)
- Wahyuni, Ahmad Ridhay, dan Nurakhirawati. (2016) Pengaruh waktu proses deasetilasi kitin dari cangkang bekicot (*Achatina fulica*) terhadap derajat deasetilasi. *Kovalen* 2 (1): 1-7. [10.22487/j24775398.2016.v2.i1.6039](https://doi.org/10.22487/j24775398.2016.v2.i1.6039)
- Wang, S. L., Lin, H. T., Liang, T. W., Chen, Y. J., dan Yen, Y. H. (2006) Bioconversion of shellfish chitin wastes for the production of *Bacillus subtilis* W-118 chitinase. *Carbohydrate Res.*, 341: 2507-2515. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2006.06.027>
- Wang, S. L., Lin, H. T., Liang, T. W., Chen, Y. J., Yen, Y. H., & Guo, S. P. 2008. Reclamation of chitinous materials by bromelain for the preparation of antitumor and antifungal materials. *Bioresource Technology* 99: 4386-4393. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.08.035>