

9_Optimasi_kitooligosaskarida_ rajungan.pdf

by

Submission date: 06-Apr-2023 10:38AM (UTC+0700)

Submission ID: 2057216948

File name: 9_Optimasi_kitooligosaskarida_rajungan.pdf (660.83K)

Word count: 5555

Character count: 34495

OPTIMASI KITOOLIGOSAKARIDA CANGKANG RAJUNGAN (*Portunus pelagicus*) MENGUNAKAN ENZIM KITOSANASE DARI *Bacillus* sp.

*Optimization of Chitooligosaccharides of Crab Shell (Portunus pelagicus) Using
Chitosanase Enzyme from Bacillus sp.*

Septi Lilik Yuliana^{1)*}, Dedin Finatsiyatull Rosida^{1)*}, Andre Yusuf Trisna Putra¹⁾

¹⁾Program Studi Teknologi Pangan, Fakultas Teknik, Universitas Pembangunan Nasional “Veteran”
Jawa Timur

Jalan Rungkut Madya No. 1 Surabaya, 60294, Jawa Timur, Indonesia

*Korespondensi Penulis: septililikyuliana04@gmail.com; dedin.tp@upnjatim.ac.id

ABSTRACT

Chitooligosaccharides (COS) are glycoprotein complex compounds derived from chitosan linked by 1,4 glucosidic bonds with chain lengths of 20 or less. Crab shell is a crustacean waste that contains 20-30% chitin as the basic material for making chitooligosaccharides. Chitooligosaccharide hydrolysis can be carried out enzymatically. Enzymatic hydrolysis is specific and controlled. Enzymes that can be used to hydrolyze chitosan into chitooligosaccharides are chitosanase enzymes. Chitosanase enzyme is a glycosyl hydrolase enzyme that catalyzes the hydrolysis of 1,4 glycosidic bonds of chitosan to produce low molecular weight chitooligosaccharides. One of the bacteria that produces chitosanase enzymes, namely *Bacillus* sp. The purpose of this study was to optimize the production of chitooligosaccharides by treating the enzyme concentration, hydrolysis time, and hydrolysis temperature. This research was conducted using a completely randomized design (CRD) with the following factors: enzyme concentration (0.5%, 1%, 1.5%, 2%, 2.5%) and hydrolysis temperature (30°C, 40°C, 50°C, 60°C, 70°C, 80°C) and time of hydrolysis (1 hour, 2 hours, 3 hours, 4 hours, 5 hours, 6 hours, 7 hours and 8 hours). This enzyme works optimally at pH 4.5. The results showed that this chitosanase enzyme had optimum activity at a concentration of 2% (w/w) chitosan, a temperature of 50°C, and a hydrolysis time of 5 hours. The chitooligosaccharide has a reducing sugar content of 8.49 ± 0.38 mg/mL, a viscosity of 19.08 ± 0.01 cPs, and a molecular weight of 4.51 kDa.

Keywords: chitooligosaccharides, crab shells, chitosanase enzyme, hydrolysis

PENDAHULUAN

Kitoooligosakarida (*chitooligosaccharides*/COS) adalah potongan kitin dan kitosan senyawa kompleks golongan glikoprotein yang memiliki rantai 20 atau kurang dengan ikatan 1,4 glukosamin. Kitoooligosakarida merupakan kitosan yang larut dalam air. COS dihasilkan oleh depolimerisasi kitin atau kitosan menggunakan hidrolisis asam, hidrolisis

oleh metode fisik, dan degradasi enzimatik (Aam *et al.*, 2010).

Rantai ikatan kitosan β (1,4) glikosidik dapat dipotong dengan menggunakan enzim *chitoosanase* (Mourya *et al.*, 2011). Enzim kitosanase merupakan salah satu enzim kitinolitik yang menghidrolisis ikatan (1,4)-β glikosidik pada kitosan atau ikatan 2-amino-2-deoksi-β-D-glukosida pada polimer kitosan yang menghasilkan

serangkaian kitoooligosakarida atau oligomer kitosan (kitoooligomer) dengan derajat polimerisasi yang tinggi (Chasanah ² *et al.*, 2009). Enzim kitosanase diproduksi oleh bakteri, fungi, dan tanaman sebagai enzim ekstraseluler atau intraseluler. Sebagian besar bakteri dan fungi menghasilkan kitosanase ekstraseluler, sedangkan pada tanaman dan fungi *zygomycetes* menghasilkan kitosanase intraseluler (Choi *et al.*, 2004).

Hidrolisis ³ kitosan menggunakan enzim kitosanase menghasilkan oligomer kitosan dengan derajat polimerisasi yang lebih tinggi dan sedikit glukosamin yang dihasilkan serta ramah lingkungan (Sarni *et al.*, 2016). Setiap enzim kitosanase memiliki kondisi optimum yang berbeda. Beberapa penelitian tentang kitosanase pernah dilakukan ² oleh beberapa peneliti. Choi *et al.* (2004) meneliti bahwa kitosanase dari *Bacillus* sp. galur KCTC 0377 BP memiliki pH optimum 4,5 pada temperatur 30°C dan digunakan untuk produksi oligomer kitosan. Pagnoncelli *et al.* (2010) memproduksi enzim kitosanase dari *Paenibacillus ehimensis* dan diaplikasikan untuk menghidrolisis kitosan pada suhu optimum 55°C ² dan pH optimum 4,5. Wangtueai *et al.* (2007) memproduksi dan melakukan karakterisasi enzim kitosanase dari *Bacillus cereus* TP 12.24 yang memiliki pH 4,5,5 dan suhu optimum 55°C. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui kondisi optimum hidrolisis kitoooligosakarida dari cangkang rajungan menggunakan enzim kitosanase untuk menghasilkan kadar gula reduksi, ¹⁰ kositas, dan berat molekul optimal. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui kondisi optimum pembuatan kitoooligosakarida dari cangkang rajungan.

METODE PENELITIAN

Alat dan Bahan

Alat yang digunakan untuk membuat produk yaitu *shaker waterbath* (merk Biobasa), *magnetic stirrer*, vortex, sentrifus (merk Oregon) neraca analitik, pH meter, oven, kertas saring, *beaker glass* 2 L, pemanas *hotplate*. Alat untuk analisis yaitu spektrofotometer UV-Vis (merk Shimadzu), desikator, viskometer (merk NDJ-8s *Digital Viscometer*), mikropipet, tabung reaksi, pipet ukur, rak tabung reaksi, corong, pemanas *hotplate*, *beaker glass* 250 mL, dan erlenmeyer.

Bahan yang digunakan meliputi cangkang rajungan yang diperoleh dari limbah perusahaan Kelola Mina Laut Gresik, enzim kitosanase dari *Bacillus* sp. (Sigma, Korea), akuades, *buffer* asetat 0,05 M pH 4,5 (Merck), larutan nelson A (Nitra Kimia), larutan nelson B (Nitra Kimia), larutan arsenomolibdad (Merck), larutan HCl 0,5 M (Merck), dan larutan NaOH 50% (Merck).

Tahapan Penelitian

Isolasi Kitosan dari Cangkang Rajungan (Butarbutar, 2018 Dimodifikasi)

Proses isolasi kitosan dari limbah cangkang rajungan dilakukan secara kimiawi dengan diawali proses isolasi kitin yaitu proses demineralisasi cangkang rajungan dengan menambahkan 1,5 L HCl 1,5 M ke dalam 100 g cangkang serbuk dan dipanaskan pada *hot plate* selama 4 jam pada suhu 70°C, kemudian redisu disaring dan dicuci menggunakan akuades hingga pH-nya netral. Residu yang diperoleh dioven selama 3 jam pada suhu 70°C. Selanjutnya proses deproteinasi dilakukan dengan cara 50 g serbuk hasil

demineralisasi ditambah 0,5 L NaOH 3,5%; selanjutnya dipanaskan selama 4 jam pada suhu 70°C kemudian redisu disaring dan dicuci menggunakan akuades hingga pH netral. Residu yang diperoleh dioven selama 3 jam pada suhu 70°C sehingga dihasilkan kitin. Proses selanjutnya deasetilasi yakni 40 g kitin ditambah 0,4 L NaOH 50%, selanjutnya dipanaskan selama 4 jam dan suhu dijaga 100°C kemudian disaring dan residu yang tertinggal dicuci dengan akuades hingga pH netral. Residu dioven selama 3 jam pada suhu 70°C dan diperoleh kitosan kering.

Optimasi Konsentrasi Enzim Kitosanase Terhadap Kitoooligosakarida (Fawzya et al., 2009 Dimodifikasi)

Kitoooligosakarida diproduksi menurut metode Fawzya et al. (2009). Persiapan larutan kitosan 1% dilakukan dengan cara melarutkan kitosan ke dalam larutan buffer asetat pH 4,5 kemudian enzim kitosanase direaksikan dengan variasi konsentrasi 0,5%, 1%, 1,5%, 2%, 2,5% (w/w). Kitosan selanjutnya diinkubasi selama 3 jam pada suhu 60°C. Reaksi dihentikan dengan pemanasan 100°C, selama 10 menit. Kemudian sampel disentrifuse kecepatan 9000 rpm sehingga diperoleh supernatan yang mengandung kitoooligosakarida.

Optimasi Suhu Hidrolisis Terhadap Kitoooligosakarida (Fawzya et al., 2009 Dimodifikasi)

Cara kerja untuk mengetahui suhu optimum hidrolisis kitoooligosakarida dengan cara membuat larutan kitosan 1% kemudian direaksikan dengan enzim kitosanase 0,5% lalu diinkubasi pada suhu 30, 40, 50, 60, 70, dan 80°C selama 3 jam.

Reaksi dihentikan dengan pemanasan 100°C, selama 10 menit. Kemudian sampel disentrifuse dengan kecepatan 9000 rpm sehingga diperoleh supernatan yang mengandung kitoooligosakarida.

Optimasi Waktu Hidrolisis Terhadap Kitoooligosakarida (Fawzya et al., 2009 Dimodifikasi)

Waktu hidrolisis yang optimum merupakan parameter penting hidrolisis untuk menghasilkan kitoooligosakarida yang optimal. Cara kerjanya yaitu larutan kitosan 1% direaksikan dengan enzim kitosanase 0,5% kemudian diinkubasi pada suhu 60°C dengan variasi lama hidrolisis 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, dan 8 jam. Reaksi dihentikan dengan pemanasan 100°C selama 10 menit. Kemudian sampel disentrifuse dengan kecepatan 9000 rpm sehingga diperoleh supernatan yang mengandung kitoooligosakarida.

Produksi Kitoooligosakarida pada Kondisi Optimum (Fawzya et al., 2009 Dimodifikasi)

Kondisi optimum didapatkan dari setiap kondisi optimum dari variabel konsentrasi enzim, suhu hidrolisis, dan lama waktu hidrolisis. Kitoooligosakarida yang dihasilkan pada kondisi optimum kemudian dianalisis gula reduksi (Sudarmaji, 2000), berat molekul (Wang et al., 2005), dan viskositasnya (Ridho et al., 2017).

Rancangan Percobaan

Rancangan percobaan yang digunakan dalam penelitian ini adalah rancangan acak lengkap (RAL) 3 faktor dan dua kali ulangan. Faktor tersebut meliputi konsentrasi enzim, lama waktu hidrolisis,

dan suhu hidrolisis. Faktor konsentrasi enzim (0,5%, 1%, 1,5%, 2%, 2,5%), suhu hidrolisis (30, 40, 50, 60, 70, dan 80°C), serta lama waktu hidrolisis (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, dan 8 jam). Data hasil penelitian dianalisis secara deskriptif kuantitatif. Data yang diperoleh diolah menggunakan aplikasi Minitab versi 19 dengan uji ANOVA taraf kepercayaan 95% dan dilanjutkan dengan uji Duncan (DMRT) taraf kepercayaan 5%. Hasil pengolahan data disajikan dalam bentuk diagram.

Metode Analisis

Bahan awal yaitu cangkang rajungan dianalisis karakteristik kadar air dan kadar abu. Karakteristik kitosan dianalisis kadar air, kadar abu, dan viskositas. Pengukuran kadar air dilakukan menggunakan metode gravimetri bersuhu 105°C dengan sampel sebanyak 1 g (AOAC, 2005), kadar abu diuji dengan metode gravimetrik dengan cara diabukan pada suhu 600°C dan suhu oven yang digunakan 105°C, sampel yang digunakan seberat 1 g (AOAC, 2005).

Larutan kitosan 1% dianalisis viskositasnya menggunakan *viscometer digital* NDJ-8s (Ridho *et al.*, 2017). Produk akhir yaitu kitoooligosakarida dianalisis kadar gula reduksi, viskositas, dan berat molekul. Kadar gula reduksi menggunakan metode *Nelson Somogy* pengenceran sampel yang digunakan 1000 (Sudarmaji, 2000). Hasil viskositas kitoooligosakarida kemudian dimasukkan dalam persamaan *Mark-Khun Houwing* untuk mengetahui berat molekul kitoooligosakarida (Wang *et al.*, 2005). Persamaan *Mark-Khun Houwing* sebagai berikut:

$$M = \frac{\text{antilog}([\eta] - \log \log k)}{\alpha}$$

Keterangan:

M = berat molekul

[η] = viskositas intrinsik

k = konstanta *Mark-Khun Houwing*
($3,5 \times 10^{-4}$)

α = konstanta *Mark-Khun Houwing*
(0,76)

HASIL DAN PEMBAHASAN

Karakteristik Cangkang Rajungan dan Kitosan

Analisis awal yaitu pengujian cangkang rajungan meliputi pengujian kadar air dan kadar abu. Cangkang rajungan memiliki kadar air 7,52% dan kadar abu sebesar 45,46%. Berdasarkan Natalia *et al.* (2021), kandungan senyawa kimia cangkang rajungan menunjukkan bahwa kadar air sebesar 10% dan kadar abu sebesar 38,12%.

Kadar abu dapat dipengaruhi oleh habitat dan lingkungan hidup dari rajungan memengaruhi kandungan dari senyawa kimia rajungan. Perbedaan habitat dan lingkungan hidup setiap lingkungan perairan dapat menyediakan asupan mineral yang berbeda-beda bagi organisme akuatik yang hidup di dalamnya. Setiap individu organisme juga memiliki kemampuan yang berbeda dalam meregulasi dan mengabsorpsi mineral sehingga akan memberikan pengaruh pada kadar abu dalam masing-masing. Mineral yang terdapat dalam suatu bahan berasal dari dua macam garam yaitu garam organik dan anorganik (Ramadhani, 2020). Tingginya kadar mineral yang terdapat pada cangkang rajungan sebagian besar adalah Ca dan P (Natalie *et al.*, 2021).

Proses pembuatan kitosan dari limbah cangkang rajungan diperoleh melalui tiga

tahapan yaitu tahap dimeniralisasi, deproteinasi, dan deasetilasi. Karakteristik kitosan tersaji pada **Tabel 1**.

Tabel 1. Karakteristik kitosan dari cangkang rajungan

Komponen	Nilai
Kadar air (%)	10,15±0,28
Kadar abu (%)	2,78±0,46
Viskositas (cPs)	118,38±0,33

Kadar air merupakan parameter penting dalam mutu produk kitosan. Berdasarkan BSN (2013) melalui SNI 7949-2013, kadar air kitosan sebesar $\leq 12\%$. Kitosan pada penelitian ini telah memenuhi persyaratan BSN yaitu $10,15 \pm 0,28\%$. Kadar air yang rendah dapat menekan atau mengurangi kerusakan pada kitosan, misalnya terhindar dari adanya aktivitas mikroorganisme akibat kelembaban. Yanti *et al.* (2018) menyebutkan kadar air kitosan $3,57\%$. Kadar air yang terkandung pada kitosan dipengaruhi oleh proses pengeringan, lama pengeringan yang dilakukan, jumlah kitosan yang dikeringkan, dan luas permukaan tempat kitosan dikeringkan (Agustina & Kurniasih, 2013).

Kadar abu juga merupakan parameter yang penting dalam menentukan mutu kitosan. Pengukuran kadar abu merupakan indikator efektivitas proses demineralisasi dalam menghilangkan mineral (Fernandez, 2004). Kadar abu kitosan dari cangkang rajungan berdasarkan penelitian ini sebesar $2,78 \pm 0,46\%$. BSN (2013) dalam SNI 7949-2013 menunjukkan kadar abu kitosan sebesar $\leq 12\%$. Kadar abu yang rendah menunjukkan kandungan mineral yang rendah. Mutu dan kemurnian kitosan akan semakin tinggi bila kadar abu yang dihasilkan semakin rendah (Setha

et al., 2019). Yanti *et al.* (2018) menyebutkan bahwa kadar abu kitosan $1,75\%$. Kandungan mineral pada *crustaceae* umumnya sebanyak $30-50\%$ dengan kadar $8-10\%$ dari total bahan organik. Mineral tersebut dapat dihilangkan dari matriks menggunakan larutan HCl. Garam-garam anorganik terikat secara fisik, dimana senyawa CaCO_3 lebih mudah dipisahkan dibanding protein. Demineralisasi secara umum dilakukan dengan larutan HCl atau asam lain seperti H_2SO_4 (Khor, 2010). Pada saat pencucian dengan akuades, mineral-mineral yang tidak terlarut pada proses demineralisasi ikut terbawa oleh air pencucian (Siregar *et al.*, 2016).

Viskositas berhubungan dengan berat molekul, dimana viskositas kitosan pada penelitian ini yaitu $118,38 \pm 0,33\%$. Kitosan ini tergolong memiliki viskositas yang rendah karena viskositas kurang dari < 200 cPs (Setha *et al.*, 2019). Faktor yang berpengaruh pada nilai viskositas yaitu kekuatan ion, pH, suhu deasetilasi, waktu proses dimineralisasi, dan suhu saat pengukuran (Rochima *et al.*, 2018).

Optimasi Konsentrasi Enzim pada Produksi Kitoooligosakarida

Hidrolisis merupakan proses pemecahan molekul kompleks menjadi molekul sederhana dengan bantuan air. Bertambahnya rasio enzim, menyebabkan bertambah banyak enzim yang mengatalisis reaksi pemutusan ikatan glikosida pada rantai kitosan. Menurut Rokhati (2015), pembentukan gula reduksi menunjukkan aktivitas enzim yang memotong ikatan glikosida pada kitosan. Semakin tinggi konsentrasi enzim maka semakin tinggi pula gula reduksi yang dihasilkan. Enzim

pada suatu konsentrasi substrat tertentu, kecepatan reaksi bertambah dengan bertambahnya konsentrasi enzim (Wang *et al.*, 2007).

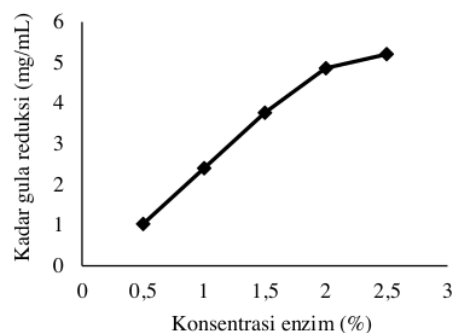
Hasil gula reduksi terendah pada konsentrasi 0,5% yaitu $1,03 \pm 0,48$ mg/mL dan tertinggi pada konsentrasi 2,5% yaitu $5,21 \pm 0,39$ mg/mL. Tetapi perlakuan konsentrasi 2,5% hasilnya tidak berbeda nyata dengan perlakuan konsentrasi 2% yaitu sebesar $4,86 \pm 0,09$ mg/mL (**Tabel 2**).

Tabel 2. Pengaruh konsentrasi enzim pada produksi kitoooligosakarida

Konsentrasi enzim (%)	Gula reduksi (mg/mL)
0,5%	$1,03^d \pm 0,48$
1%	$2,39^c \pm 0,48$
1,5%	$3,77^b \pm 0,48$
2%	$4,86^{ab} \pm 0,09$
2,5%	$5,21^a \pm 0,39$

11 Keterangan: Nilai rata-rata yang diikuti dengan huruf berbeda menyatakan berbeda nyata ($p < 0,05$)

Berdasarkan **Tabel 1**, semakin tinggi konsentrasi enzim maka kadar gula reduksi yang dihasilkan semakin meningkat, dimana pada penelitian ini didapatkan konsentrasi enzim optimum yaitu pada konsentrasi 2%. Hal ini disebabkan pada enzim konsentrasi 2% memiliki aktivitas yang sama dengan konsentrasi 2,5%. Hubungan antara konsentrasi enzim dengan kadar gula reduksi tersaji pada **Gambar 1**.



Gambar 1. Hubungan konsentrasi enzim pada kadar gula reduksi

Gambar 1 menjelaskan bahwa semakin besar konsentrasi enzim maka gula reduksi yang dihasilkan semakin besar. Bertambahnya konsentrasi enzim, menyebabkan bertambah banyak enzim yang mengatalis reaksi pemutusan ikatan glikosida pada rantai kitosan. Menurut Rokhati *et al.* (2015), pembentukan gula reduksi menunjukkan aktivitas enzim yang memotong ikatan glikosida pada kitosan. Semakin besar konsentrasi enzim maka semakin besar pula gula reduksi yang dihasilkan. Enzim pada suatu konsentrasi substrat tertentu, kecepatan reaksi bertambah dengan bertambahnya konsentrasi enzim (Wang *et al.*, 2007). Sanchez *et al.* (2017) menghidrolisis kitoooligosakarida udang menggunakan enzim kitosanase konsentrasi 1% dapat menurunkan viskositas 76%. Roncal *et al.* (2017) menjelaskan bahwa hidrolisis kitoooligosakarida menggunakan 1% enzim kitosanase dari *S. griseus* dapat menghasilkan gula reduksi 0,5-2,25 mg/mL. Enzim kitosanase 0,05% juga mampu menghasilkan kitoooligosakarida bermolekul rendah.

Viskositas merupakan salah satu parameter yang menunjukkan terjadinya hidrolisis selain gula reduksi.

Kitoooligosakarida yang telah diperoleh dari setiap kondisi hidrolisis diukur viskositasnya dan didapatkan hasil pada **Tabel 3**.

Tabel 3. Pengaruh konsentrasi enzim pada viskositas kitoooligosakarida

Konsentrasi enzim (%)	Viskositas (cPs)
0,5%	40,54 ^d ±0,03
1%	30,65 ^c ±0,53
1,5%	28,37 ^b ±0,49
2%	18,6 ^{ab} ±0,27
2,5%	15,03 ^a ±0,05

Berdasarkan pengukuran viskositas (**Tabel 3**), proses hidrolisis berlangsung karena terjadi penurunan viskositas seiring dengan peningkatan jumlah konsentrasi enzim yang ditambahkan. Sarni *et al.* (2016) menjelaskan bahwa enzim kitosanase mampu menghidrolisis kitosan dengan cara pemutusan ikatan rantai panjang kitosan, tepatnya pada ikatan β(1-4) glukosida membentuk rantai kitosan yang lebih pendek.

Optimasi Suhu Hidrolisis pada Produksi Kitoooligosakarida

Suhu merupakan salah satu faktor yang berpengaruh pada kondisi hidrolisis kitoooligosakarida. Hidrolisis kitosan dilakukan dengan konsentrasi enzim kitosanase 0,5%, selama 3 jam sebagai variabel tetap. Menurut Choi *et al.* (2004), enzim kitosanase dari *Bacillus* sp. optimum pada suhu antara 30°C-70°C. Adapun pengaruh suhu terhadap kadar gula reduksi tersaji pada **Tabel 4**.

Tabel 4. Pengaruh suhu hidrolisis pada produksi kitoooligosakarida

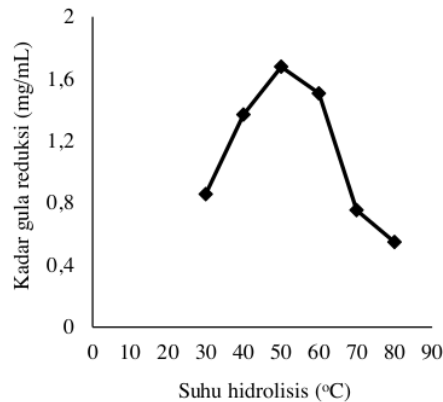
Suhu hidrolisis (°C)	Gula reduksi (mg/mL)
30	0,86 ^{dc} ±0,15
40	1,37 ^c ±0,19
50	1,68 ^a ±0,05
60	1,51 ^{ab} ±0,01
70	0,75 ^c ±0,09
80	0,55 ^d ±0,09

Keterangan: Nilai rata-rata yang diikuti dengan huruf berbeda menyatakan berbeda nyata ($p \leq 0,05$)

Tabel 4 menunjukkan bahwa gula reduksi cenderung naik seiring dengan bertambahnya suhu hidrolisis. Namun pada suhu 50°C, nilai gula reduksi yang dihasilkan mencapai titik maksimum sebesar 1,68±0,05 mg/mL. Berdasarkan hasil analisis statistik menunjukkan bahwa perlakuan suhu hidrolisis berpengaruh sangat nyata terhadap kenaikan gula reduksi hidrolisat kitoooligosakarida. Hasil analisis lanjut dengan uji DMRT ($\alpha=0,05$) menunjukkan bahwa gula reduksi hidrolisat berpengaruh nyata pada suhu hidrolisis 30, 40, 50, 60, 70, dan 80°C. Hubungan antara suhu hidrolisis dengan kadar gula reduksi tersaji pada **Gambar 2**.

Semakin tinggi suhu hidrolisis maka gula reduksi yang dihasilkan semakin tinggi dimana suhu 50°C merupakan suhu optimum dari proses hidrolisis (**Gambar 2**). Ismail (2019) melaporkan bahwa hidrolisis chitooligosakarida menggunakan enzim kitosanase dari *Pseudomonas* optimum pada suhu 50°C. Pagnoncelli *et al.* (2010) juga memproduksi kitoooligosakarida menggunakan enzim kitosanase dari *Paenibacillus ehimensis* pada suhu optimum 50°C. Enzim kitosanase dari *Matsubacter chitosanotabidus* optimum pada suhu 30-

40°C (Zilda *et al.*, 2016). Enzim kitosanase dari *Bacillus cereus* optimum pada suhu 70°C (Lestari *et al.*, 2019). Wangtueai *et al.* (2007) melaporkan enzim kitosanases dari *Bacillus cereus* TP 12.24 memiliki pH 4,5 dan suhu optimum 55°C.



Gambar 2. Hubungan suhu hidrolisis dengan kadar gula reduksi

Setiap enzim memiliki karakteristik yang berbeda disebabkan oleh perbedaan jenis mikroba yang memproduksi enzim tersebut. Peningkatan aktivitas enzim bisa dipengaruhi oleh suhu karena menurut Nurhaeni *et al.* (2019), peningkatan suhu reaksi sebesar 10°C akan meningkatkan aktivitas enzim 50-100%. Suhu dapat mempercepat proses reaksi namun pada titik suhu tertentu, kecepatan reaksi yang dikatalis oleh enzim akan mulai menurun atau bahkan tidak nampak lagi aktivitasnya. Kondisi suhu dimana enzim dapat menghasilkan aktivitas tertinggi disebut sebagai suhu optimum karena enzim berstruktur protein dan protein dapat rusak oleh panas maka pada suhu tinggi tertentu aktivitas enzim mulai menurun dan bahkan menghilang. Hal ini sangat dimungkinkan karena terjadinya denaturasi atau

kerusakan struktur enzim yang dapat menyebabkan kerusakan enzim secara keseluruhan maupun sebagian terutama pada sisi aktifnya (Wang *et al.*, 2007).

Proses hidrolisis menyebabkan terjadinya penurunan viskositas. Adapun pengaruh suhu hidrolisis terhadap penurunan viskositas hidrolisis kitosan menjadi kitoooligosakarida tersaji pada **Tabel 5**.

Tabel 5. Pengaruh suhu hidrolisis terhadap viskositas kitoooligosakarida

Suhu hidrolisis (°C)	Viskositas (cPs)
30	64,96 ^{de} ±0,93
40	57,27 ^c ±0,56
50	38,47 ^a ±0,31
60	40,55 ^{ab} ±0,03
70	41,71 ^e ±0,54
80	50,47 ^f ±0,92

Tabel 5 menunjukkan penurunan viskositas yang terjadi pada suhu 30-50°C, setelah itu viskositas naik pada suhu 60°C. Hal tersebut menunjukkan bahwa enzim memiliki aktivitas optimal pada suhu 50°C setelah itu aktivitas enzim berkurang akibat panas dari lingkungan yang menyebabkan kenaikan viskositas. Kenaikan viskositas ini terjadi oleh adanya penurunan aktivitas enzim karena hasil hidrolisis merupakan produk kitosan bermolekul lebih rendah yang memiliki struktur sama dengan substrat awal. Keberadaan produk dalam kondisi tertentu justru akan menjadi inhibitor yang akan menghambat kinerja enzim sehingga dapat terjadi rekombinasi dua atau lebih produk hasil hidrolisis pada sisi aktif enzim (Li *et al.*, 2005; Rokhati *et al.*, 2015).

Optimasi Waktu Hidrolisis Pada Produksi Kitoooligosakarida

Waktu hidrolisis adalah salah satu faktor yang berpengaruh dalam pembentukan hidrolisat kitoooligosakarida. Hidrolisis kitoooligosakarida dilakukan dengan konsentrasi enzim kitosanase 0,5%, suhu 60°C sebagai variabel tetap dan lama waktu hidrolisis yang digunakan yaitu 1 sampai 8 jam. Terbentuknya gula reduksi setelah proses hidrolisis merupakan salah satu indikator keberhasilan hidrolisis kitoooligosakarida. Adapun pengaruh lama waktu hidrolisis terhadap gula reduksi tersaji pada **Tabel 6**.

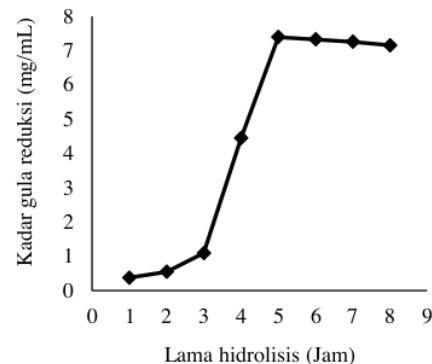
Tabel 6. Pengaruh waktu hidrolisis terhadap kadar gula reduksi

Waktu hidrolisis (Jam)	Gula reduksi (mg/mL)
1	0,38 ^d ±0,44
2	0,55 ^{cd} ±0,58
3	1,09 ^c ±0,39
4	4,45 ^b ±0,48
5	7,39 ^a ±0,48
6	7,33 ^a ±0,48
7	7,26 ^a ±0,48
8	7,16 ^a ±0,43

Keterangan: Nilai rata-rata yang diikuti dengan huruf berbeda menyatakan berbeda nyata ($p \leq 0,05$)

Tabel 6 menunjukkan gula reduksi cenderung naik dengan bertambahnya suhu hidrolisis. Pada lama hidrolisis 5 jam nilai gula reduksi yang dihasilkan mencapai titik optimum sebesar 7,39±0,48 mg/mL. Lama waktu hidrolisis berpengaruh sangat nyata terhadap kenaikan gula reduksi hidrolisat kitoooligosakarida. Kadar gula reduksi naik secara signifikan oleh bertambahnya waktu hidrolisis sehingga mencapai waktu hidrolisis optimum yaitu padat lama

hidrolisis 5 jam. Hubungan suhu hidrolisis dengan gula reduksi tersaji **Gambar 3**.



Gambar 3. Pengaruh lama hidrolisis terhadap kadar gula reduksi

Gambar 3 menunjukkan bahwa nilai gula reduksi hasil hidrolisis enzim kitosanase meningkat ketika pada waktu 1 sampai 5 jam. Setelah 5 jam maka hidrolisis berlangsung menurun seiring dengan waktu reaksi yang bertambah. Kenaikan kadar gula reduksi terjadi 5 jam awal, setelah 5 jam terjadi penurunan gula reduksi yang signifikan. Setiap enzim memiliki kondisi optimum hidrolisis yang berbeda. Jeon & Kim (2000) melaporkan hasil hidrolisis kitoooligosakarida menggunakan enzim kitosanase dari *Bacillus pumilus* optimum setelah 3 jam. Sanchez *et al.* (2017) menggunakan enzim kitosanase pada *Streptomyces griseus* yang optimum pada jam ke-4. Jenis mikroorganisme yang berbeda menghasilkan karakteristik enzim yang berbeda pula (Fawzya *et al.*, 2009). Menurut Dong *et al.* (2014), lama waktu hidrolisis tidak hanya memengaruhi kadar gula reduksi tetapi juga terhadap rendemen yang dihasilkan. Aktivitas enzim akan meningkat dengan bertambahnya waktu reaksi hingga mencapai waktu optimum.

Apabila waktu optimum telah tercapai maka penambahan waktu hidrolisis tidak akan memengaruhi reaksi hidrolisis. Waktu reaksi sangat berpengaruh pada aksi hidrolisis kitoooligosakarida. Dimana waktu yang lama akan menyebabkan banyak rantai kitosan yang terdegradasi dan menghasilkan kitoooligosakarida dengan berat molekul rendah (Handayani *et al.*, 2013).

Berat molekul kitoooligosakarida berhubungan dengan tingkat viskositas dari suatu larutan tersebut. Semakin tinggi rendah viskositas kitoooligosakarida menunjukkan semakin rendah pula berat molekulnya. Adapun hubungan antara lama waktu hidrolisis dengan viskositas yang terbentuk tersaji pada **Tabel 7**.

Tabel 7. Pengaruh waktu hidrolisis terhadap viskositas kitoooligosakarida

Waktu hidrolisis (Jam)	Viskositas (cPs)
1	64,23 ^d ±0,77
2	58,57 ^{cd} ±0,69
3	40,55 ^c ±0,03
4	36,23 ^b ±0,73
5	27,44 ^a ±0,37
6	26,87 ^a ±0,26
7	26,09 ^a ±0,24
8	25,32 ^a ±0,17

Kitoooligosakarida yang dihasilkan dari proses hidrolisis enzim kitosanase dari *Bacillus* sp. mengalami penurunan viskositas yang signifikan pada waktu hidrolisis 1 sampai 5 jam, namun pada jam ke-5 hingga ke 8 viskositas relative stabil. Hal ini mengindikasikan bahwa aktivitas enzim relatif meningkat pada jam 5 awal, sedangkan pada jam 5 ke atas aktivitas enzim relatif stabil. Sarni *et al.* (2016) melaporkan bahwa terjadi penurunan viskositas pada kitoooligosakarida yang

dihidrolisis menggunakan enzim kitosanase dari *Klepsiella* sp. pada 3 jam pertama. Rokhati *et al.* (2016) menyebutkan bahwa hidrolisis kitoooligosakarida selama 4 jam menggunakan kombinasi enzim *exocellulase* dan *endocellulase* mampu menurunkan viskositas hingga 17,34 cPs. Semakin lama waktu hidrolisis maka interaksi antara enzim dan substrat semakin tinggi yang mengakibatkan semakin banyak pemutusan ikatan β (1,4) glikosidik pada kitosan menjadi molekul lebih sederhana dan menyebabkan viskositas turun. Setiap enzim memiliki karakteristik yang berbeda berdasarkan cara memperoleh enzim tersebut, mikroba yang menghasilkan, dan lainnya. Adapun faktor yang dapat memengaruhi aktivitas enzim diantaranya suhu, pH, konsentrasi, dan lama waktu hidrolisis (Rochima *et al.*, 2018).

Hasil Hidrolisat Kitoooligosakarida Pada Kondisi Optimum

Hidrolisis merupakan proses pemecahan molekul kompleks menjadi molekul sederhana dengan bantuan air. Berdasarkan data optimasi konsentrasi enzim, suhu hidrolisis, dan lama hidrolisis kemudian dilakukan hidrolisis kitoooligosakarida menggunakan enzim kitosanase dengan konsentrasi enzim 2% (w/w) kitosan, suhu hidrolisis 50°C, dan lama hidrolisis 5 jam maka diperoleh hasil hidrolisat kitoooligosakarida pada **Tabel 8**.

Tabel 8. Karakteristik kitoooligosakarida rajungan

Komponen	Nilai
Gula reduksi (mg/mL)	8,49±0,38
Viskositas (cPs)	19,08±0,01
Berat molekul (kDa)	4,51±0,44

Pada kondisi optimum dihasilkan kitoooligosakarida yang memiliki gula reduksi sebesar $8,49 \pm 0,38$ mg/mL (**Tabel 8**). Pagnoncelli *et al.* (2010) melaporkan bahwa kitoooligosakarida hasil hidrolisis enzim kitosanase dari *Paenibacillus ehimensis* memiliki kadar gula reduksi sebesar 1,2 mg/mL. Kadar gula reduksi kitoooligosakarida menunjukkan terjadi proses hidrolisis karena menurut Rokhati *et al.* (2016) setiap pemutusan ikatan glikosida pada rantai kitosan akan membentuk satu gula reduksi dan satu gula non reduksi.

Viskositas kitoooligosakarida dari cangkang rajungan yaitu sebesar $19,08 \pm 0,01$ cPs (**Tabel 8**). Kitoooligosakarida hasil hidrolisis enzimatis menghasilkan viskositas 2,15 cPs (Yawzya *et al.*, 2009). Viskositas yang rendah menunjukkan bahwa proses hidrolisis berhasil yang ditandai dengan penurunan viskositas. Viskositas ini akan digunakan untuk menentukan berat molekul. Berat molekul merupakan salah satu parameter penting. Kitoooligosakarida pada penelitian ini memiliki berat molekul $4,51 \pm 0,44$ kDa (**Tabel 8**). Sanchez *et al.* (2017) meneliti kitoooligosakarida yang memiliki berat molekul sebesar 5,6 kDa. Berat molekul dari kitoooligosakarida yang rendah memiliki sifat lebih mudah larut dalam air dibanding sebelum terhidrolisis (Julianti *et al.*, 2012). Kemampuan enzim untuk mendegradasi ikatan glikosidik menyebabkan terjadinya penurunan viskositas intrinsik yang berbanding lurus dengan berat molekul sehingga dengan menurunnya viskositas intrinsik dari oligomer kitosan maka terjadi pula penurunan berat molekulnya. Hal ini mengindikasikan bahwa telah terjadi

pemutusan ikatan rantai panjang pada kitosan, tepatnya pada ikatan $\beta(1-4)$ glukosida membentuk rantai kitosan yang lebih pendek (Nurhaeni *et al.*, 2019). Kitoooligosakarida dengan berat molekul rendah dilaporkan memiliki banyak aktivitas biologi seperti antimikroba, antikanker, antioksidan, dan efek imunostimulan yang tergantung pada sifat fisikokimianya (Qin *et al.*, 2002).

Kitoooligosakarida memiliki aktivitas antimikroba karena mampu menghambat pertumbuhan *Escherichia coli* dan *L. monocytogenes* (Sanchez *et al.*, 2017). Hal ini dikarenakan COS (*chitooligosaccharides*) memiliki muatan positif dari gugus amina. Gugus amina ini juga mampu menyatu dengan empedu sehingga menghambat penyerapan kolesterol. Dimana Jin *et al.* (2017) menjelaskan bahwa 1% kitoooligosakarida dari kepiting dapat menurunkan kolesterol 49–64 mg/g secara *in-vitro*. Gugus amina dari COS diduga memiliki aktivitas sebagai antioksidan sebagaimana penelitian El-Sayed *et al.* (2017) yang menghasilkan COS dengan aktivitas antioksidan metode DPPH sebesar 86,97 mgAAE/gr dan dengan metode FRAP sebesar 93,56 μ gTE/mg atau sekitar 9,356%.

KESIMPULAN

Kondisi optimal proses hidrolisis kitoooligosakarida cangkang rajungan dengan menggunakan enzim kitosanase komersil dari *Bacillus* sp. yaitu pada suhu hidrolisis 50°C, konsentrasi enzim 2%, selama 5 jam. Kitoooligosakarida yang dihasilkan memiliki kadar gula reduksi sebesar $8,49 \pm 0,38$ mg/mL, viskositas sebesar $19,08 \pm 0,01$ cPs, dan berat molekul sebesar 4,51 kDa.

DAFTAR PUSTAKA

- Aam, B.B, Heggset, E.B., Norberg, A.L., Sorlie, M., & Eijsink, V.G. (2010). Production of chitoooligosaccharides and their potential applications in medicine. *Journal of Medicine and Life*, 2(8), 1482-1517.
- Agustina, S., & Kurniasih, Y. (2013). Pembuatan kitosan dari cangkang udang dan aplikasinya sebagai adsorben untuk menurunkan kadar logam Cu. *Proseding Seminar Nasional. IKIP Mataram. Matarami*. 9-10 Oktober 2013.
- AOAC. (2005). *Official Methods of Analysis of The Association of Official Analytical Chemist*. AOAC Inc., Washington.
- BSN [Badan Standardisasi Nasional]. (2013). *Standar Mutu Kitosan. SNI 7949-2013*. Jakarta: Badan Standardisasi Nasional Indonesia.
- Butarbutar, E. (2018). "Uji Aktivitas Antibakteri Kitosan Berbahan Baku Cangkang Rajungan (*Portunus pelagicus*) Terhadap Bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*". Skripsi. Kimia, Universitas Sumatra Utara, Medan.
- Chasanah, E., Zilda, S.D., & Uria, A.R. (2009). Screening and characterization of bacterial kitosanase from marine environment. *Journal Coastal Development*, 12(2), 64-72.
- Choi, J.Y., Kim, E.J., Piao, Z., Yun, Y.C., & Shin, Y.C. (2004). Purification and characterization of kitosanase from *Bacillus* sp. strain KCTC 0377BP and its application for the production of chitosan oligosaccharides. *Journal American Society for Microbiology, Applied and Environmental Microbiology*, 70(8), 4522-4531.
- Dong, H, Yaoson, W., Liming, Z., Jiachun, Z., Quanming, X., & Yongjun, Q. (2014). Key technologies of enzymatic preparation for dp 6-8 chitoooligosaccharides. *Journal of Food Process Engineering*, 38(2015), 336-344.
- Fawzya, Y.N., Sitohang, M.N., Syarmalina, & Pratitis, A. (2009). Produksi kitoooligosakarida menggunakan enzim sellulase dari *Trichoderma resei* dan bioavalibilitas sebagai antibakteri. *Jurnal Pascapanen dan Bioteknologi Kelautan dan Perikanan*, 4(2), 105-112.
- Fernandez, K. (2004). "Physicochemical and Functional Properties of Crawfish Chitosan as Affected by Different Processing Protocols". Thesis. Food Technology, Seoul National University. Seoul.
- Handayani, H.P.L., Paramarta, S.R., & Rokhati, N. (2013). Depolimerisasi kitosan dengan hidrolisa enzimatis menggunakan enzim α -amilase. *Jurnal teknologi, Kimia dan Industri*, 2(4), 45-52.
- Ismail, A.S. (2019). Microbial valorization of shrimp byproduct via the production of thermostable kitosanase and antioxidant chitoooligosaccharides. *Journal Biocatalysis and Agriculture Biotechnology*, 2(3), 21-34.
- Jeon, Y., & Kim, S. (2000). Production of chitoooligosaccharides using an ultrafiltration membrane reactor and their antibacterial activity. *Journal Carbohydrate Polymers*, 41(3), 133-141.
- Jin, Q., Huahua, Y., Xueqin, W., Kecheng, L., & Pengcheng, L. (2017). Effect of the molecular weight of water-soluble chitosan on its fat cholesterol binding capacities and inhibitory activities to pancreatic lipase. *Journal Biocatalysis and Agriculture*, 4(3), 61-84.

- Julianti, S., Agusnar, H., & Alfian, Z. (2012). Pembuatan kitosan oligomer melalui metode degradasi oksidatif dan pengaruhnya terhadap viskositas dan berat molekul. *Jurnal Saintia Kimia*, 1(1), 12-23.
- Khor, E. (2010). *Chitin*. Singapore: Singapore Press.
- Laيلي, I.Z., Noor, H., & Sukardi. (2019). Karakteristik fisik kimia kitosan dari cangkang rajungan (*Portunus pelagicus*) melalui proses deasetilasi dengan konsentrasi NaOH dan waktu ekstraksi serta di aplikasikan sebagai bahan pengawet alami pada fillet ikan nila. *Prosiding Jurnal Universitas Muhammadiyah Malang*, 5(2), 30-43.
- Li, J., Du, Y., Yang, J., Feng, T., Li, A., & Chen, P. (2005) Preparation and characterisation of low molecular weight chitosan and chitoooligomers by a commercial enzyme, polymer degradation and stability. *Journal Chemistry*, 87(3), 441-448.
- Lodhi, G., Kim, Y.S.J., Hwang, W., Moon, S.K.S.H., Jeoni, B.T., & Park, P.J. (2014). Chitoooligosaccharides and its derivatives: Preparation and biological applications. *Journal BioMed Research International*, 1(2), 45-51.
- Mourya, V.K., Inamdar, N.N., & Choudhar, Y.M. (2011). Chitoooligosaccharides: Synthesis, characterization and applications. *Journal Polymer Science*, 53(7), 583-612.
- Natalia, D.A, Dharmayanti, N., & Dewi, F.R. (2021). Produksi kitosan dari cangkang rajungan (*Portunus sp.*) pada suhu ruang. *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*, 24(3), 301-309.
- Nurhaeni, N., Angriani, S., Pasjan, S., & Jusman. (2019). Penentuan suhu dan pH hidrolisis kitosan dari cangkang keong sawah (*Pila ampullacea*) terhadap berat molekul hidrolisatnya. *Jurnal Riset Kimia*, 5(1), 90-99.
- Pagnoncelli, M.G.N., de-Araujo, N.K., da-Silva, N.M.P., & Macedo, G.R., (2010). Kitosanase production by *Paenibacillus ehimeusis* and its application for chitosan hydrolysis. *Journal Brazilian Archives of Biology and Technology*, 53(6), 1461-1468.
- Purwatiningsih, S., Wukirsari, T., Sjahrizza, A., & Wahyono, D. (2009). *Sumber Biomaterial Masa Depan*. Bogor: IPB Press.
- Qin, C., Du, Y.M., & Xiao, L. (2002). Effect of hydrogen peroxide treatment on the molecular weight and structure of chitosan. polym degradation and stability. *Journal Chemistry and Biology*, 7(6), 211-218.
- Rahman, M.H., Hjeljord, L.G., Aam, B.B., Sorlie, M., & Tronsmo, A. (2015). Antifungal effect of chitoooligosaccharides with different degrees of polymerization. *European Journal of Plant Pathology*, 141(1), 147-158.
- Ramadhani, Z.A. (2020). Komposisi kimia (proksimat) tepung cangkang kepiting bakau (*Scylla Serrata*). *Jurnal Perikanan* 13(1), 25-31.
- Ridho, F.A., Bambang, R., & Uju. (2017). Kitoooligosakarida melalui depolimerisasi kitosan dengan hidrogen peroksida untuk aplikasi biopreservatif pindang tradisional. *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*, 20(3), 19-24.
- Rochima, E., Suhartono, M.T., Dahrul, S., & Sugiyono. (2018). Karakteristik kitosan hasil deasetilasi enzimatis oleh kitin deasetilase isolat *Bacillus papandayan* K29-14. *Buletin Teknologi Hasil*

- Perikanan. Universitas Padjajaran, Bandung.
- Rokhati, N., Bambang, P., Titik, I., Mohammad, S., & Luthfi, K. (2015). Hidrolisis enzimatik kitosan dengan kombinasi enzim endo glucanase dan cellobiohydrolase. *Jurnal Reaktor*, 15(4), 261-267.
- Roncal, T., Oviedo, A., Armentia, I.L., Fernande, L., & Villaran, M.C. (2017). High yield production of monomer free chitosan oligosaccharides by pepsin catalyzed hydrolysis of a high deacetylation degree chitosan. *Journal Carbohydrate Research*, 342(2), 2750-2756.
- Sanchez, A., Mengibar, M., Rivera-Rodrgueze, Moerchbacher, G., Acosta, N., & Heras, A. (2017). The effect of preparation processes on the physicochemical characteristics and antibacterial activity of chitoooligosaccharides. *Journal Carbohydrate Polymers*, 157(2), 251-257.
- Sarni, S., Natsir, H., & Dali, S. (2016). Chitosan oligomer production from waste tiger shrimp (*Penaeus monodon*) using enzymes kitosanase of bacterial isolates *Klebsiella* sp. *Journal Chemistry*, 3(2), 283-289.
- Setha, B., Fitriani, R., Bernita, B., & Silaban. (2019). Karakteristik kitosan dari kulit udang vaname dengan menggunakan suhu dan waktu yang berbeda dalam proses deasetilasi. *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*, 22(3), 31-40.
- Siregar, E.C., Suryati, & Hakim, L. 2016. Pengaruh suhu dan waktu reaksi pada pembuatan kitosan dari tulang sotong (*Sepia officinalis*). *Jurnal Teknologi Kimia Unimal*, 5(2), 37-44.
- Wang, S., Huang, Q., & Wang, Q. (2005). Study on the synergetic degradation of chitosan with ultraviolet light and hydrogen peroxide. *Journal Carbohydrate Research*, 340(4), 1143-1147.
- Wang, Y., Zhou, P., Yu, J., Pan, X., Wang, P., Lan, W., & Tao, S. (2007). Antimicrobial effect of chitoooligosaccharides produced by kitosanase from *Pseudomonas* CUY8 Asia Pacific. *Journal of Clinical Nutrition*, 16(3), 132-139.
- Wangtueai, S., Worawattanamateekul, W., Sangjindavong, M., Naranong, N., & Sirisansaneeyakul, S. (2007). Production and partial characterization of kitosanases from newly isolated *Bacillus cereus*. *Journal Kasetsart*, 41(2), 346-355.
- Yanti, R., Drastinawati, & Yusnimar. (2018). Sintesis kitosan dari limbah cangkang kepiting dengan variasi suhu dan waktu pada proses deasetilasi. *Jurnal Teknik*. 5(2), 12-23.
- Zilda, D.S., Fawzya, Y.N., & Chasanah, E. (2016). Characteristic enzym kitosanase from *Matcusuerbacter c.* *Jurnal Pascapanen dan Perikanan*, 1(1), 43-49.

9_Optimasi_kitooligosaskarida_rajungan.pdf

ORIGINALITY REPORT

18%

SIMILARITY INDEX

18%

INTERNET SOURCES

6%

PUBLICATIONS

3%

STUDENT PAPERS

PRIMARY SOURCES

1	ejournal.undip.ac.id Internet Source	3%
2	nanopdf.com Internet Source	3%
3	ojs3.unpatti.ac.id Internet Source	2%
4	es.scribd.com Internet Source	2%
5	journal.ubpkarawang.ac.id Internet Source	1%
6	text-id.123dok.com Internet Source	1%
7	jurnal.untad.ac.id Internet Source	1%
8	www.scribd.com Internet Source	1%
9	ejournal.unitomo.ac.id Internet Source	1%

10

[idoc.pub](#)

Internet Source

1 %

11

[eprints.upnjatim.ac.id](#)

Internet Source

1 %

12

[core.ac.uk](#)

Internet Source

1 %

13

[pt.scribd.com](#)

Internet Source

1 %

Exclude quotes On

Exclude matches < 1%

Exclude bibliography On