

## PENGUNAAN *RESPONSE SURFACE METHODOLOGY* UNTUK OPTIMASI PROSES DEKAFEINASI MENGGUNAKAN KITOSAN DARI KULIT UDANG

[The Use of Response Surface Methodology in Decaffeination Process with Chitosan]

Umar Santoso <sup>1)</sup>, Novia Tabahana <sup>2)</sup>, Henny Krissetiana H <sup>3)</sup>, dan Suhardi <sup>1)</sup>

<sup>1)</sup> Staf Pengajar Fakultas Teknologi Pertanian - UGM, Yogyakarta

<sup>2)</sup> Alumnus Fakultas Teknologi Pertanian -UGM, Yogyakarta

<sup>3)</sup> Staf Pengajar Fakultas Teknologi Pertanian - INTAN, Yogyakarta

### ABSTRACT

*The objective of the present study was to determine the optimum condition of decaffeination process with chitosan in a model system using Response Surface Methodology. A 1000ppm caffeine solution was mixed with chitosan in varied concentrations, temperatures and process times. After filtration, caffeine in the filtrate was determined. The lower caffeine in the filtrate the more effective the decaffeination process. Result of the experiment showed that among chitosan concentrations of 50, 60, 70, 80, 90, and 100 mg per 100 ml caffeine solution, the concentration of 70mg was the most effective. Among temperatures applied of 28, 40, 60, 80, 90, and 100°C, the most effective was of 90°C. And among the process times of 15, 30, 60, and 90 minutes, 15 minutes was the most effective. Result of optimization using RSM showed that the optimum condition of decaffeination process were concentration of chitosan of 69,52mg, temperature of 89,71°C, and process time of 14,88 minutes. Under this condition the process diminished 79,56% of caffeine from the model system.*

### PENDAHULUAN

Kitin, polimer (1-4)-2-asetamido-2-deoksi- $\beta$ -D-glukosamina adalah satu jenis biopolimer yang terutama terdapat sebagai penyusun cangkang udang-udangan (*Crustaceae*) dan serangga, serta terdapat dalam dinding sel jamur dan kamir. Adapun kitosan adalah kitin yang telah dihilangkan gugus asetilnya secara artifisial sehingga secara kimiawi merupakan poli-D-glukosamina. Namun, pada kenyataannya tidak ada polimer yang sepenuhnya terasetilasi maupun tidak ada yang sepenuhnya terdeasetilasi. Para ahli membedakan keduanya secara kimiawi berdasarkan kandungan nitrogennya, yaitu apabila kandungan total nitrogennya kurang dari 7%, polimer tersebut disebut kitin dan apabila kandungan nitrogennya lebih dari 7% disebut kitosan (Davies & Hayes, 1988).

Kitosan memiliki gugus amina bebas yang menjadikan polimer itu bersifat polikationik sehingga mempunyai kemampuan besar untuk mengikat logam-logam tertentu dan membentuk membran. Dengan sifat polikationiknya, kitosan dapat dimanfaatkan sebagai agensia penggumpal (*coagulating agent*) dalam penanganan limbah, terutama limbah berprotein, karena dapat menggumpalkan protein yang dapat dimanfaatkan untuk pakan ternak (Bough, 1975). Selain itu pada penanganan limbah cair, berdasarkan sifat konfigurasi

dalam sistem berair maka kitosan dapat digunakan sebagai agensia pengelat yang dapat menyerap logam meracun seperti merkuri, timah, tembaga, plutonium, dan uranium dalam perairan (Austin et al., 1981), dan juga digunakan untuk mengikat zat warna tekstil dalam air limbah (Knorr, 1983).

Dalam bidang pangan dan farmasi, kitosan banyak digunakan karena sifatnya dapat mengikat asam (Magnolata, 1978), mengikat air (Knorr, 1985), mengikat lemak serta memiliki aktivitas hipokolesterolemik dan aktivitas kekebalan tubuh (Suzuki et al., 1982; Sugano et al., 1978). Kitosan telah digunakan untuk menurunkan kadar asam pada buah-buahan, sayuran, dan ekstrak kopi. Kitin dan kitosan bersifat nontoksik (Arai dkk., 1968) sehingga aman digunakan di bidang pangan.

Dewasa ini ada sebagian masyarakat yang menggemari minuman kopi tetapi tidak menghendaki kandungan kafein yang tinggi. Oleh karena itu di pasaran telah tersedia produk kopi rendah kafein (*decaffeinated coffee*). Hal ini karena kafein (1,3,7- trimetil xantina) dapat menimbulkan efek fisiologis yang tidak diinginkan seperti rasa pusing dan jantung berdebar. Beberapa pustaka menyebutkan pengaruh negatif kafein bagi kesehatan manusia seperti menyebabkan malformasi pada rahim, mengurangi ketersediaan kalsium dan lain-lain (James, 1991; Massey, 1988; Siverz & Elliott, 1963). Untuk memproduksi kopi bubuk rendah kafein maka dilakukan

proses dekafeinasi. Ada dua metode yang umum dilakukan untuk proses dekafeinasi, yaitu Proses Eropa dan Proses Air Swiss. Cara pertama menggunakan metilena klorida sebagai pelarut sedangkan cara kedua menggunakan prinsip pelindian menggunakan air panas. Baik cara pertama maupun kedua ada kelemahannya yaitu, bahwa penggunaan pelarut organik tersebut kemungkinan dapat menimbulkan masalah keamanan bagi kesehatan sedangkan cara kedua perlu waktu proses yang relatif lama.

Dengan mempertimbangkan sifat-sifat fungsional kitosan maka diduga biopolimer ini dapat digunakan untuk mengikat kafein sehingga dapat digunakan untuk proses dekafeinasi. Dengan demikian proses ini dapat menjadi salah satu alternatif metode dekafeinasi yang efektif dan aman.

Dalam penelitian-penelitian yang berkaitan dengan optimasi proses dewasa ini telah dikembangkan penggunaan suatu metode yang disebut *response surface methodology (RSM)*, yaitu suatu kumpulan teknik penyelesaian masalah dengan menggunakan matematika dan statistik dalam bentuk model matematika atau fungsi dan menganalisis masalah tersebut, respons yang ingin dicapai dipengaruhi oleh beberapa peubah sehingga respons tersebut berada pada titik optimumnya (Montgomery, 1991). Penggunaan RSM untuk optimasi produk dan pengembangan pengolahan pangan telah banyak dilaporkan (Giovanni, 1983; Henika, 1972; Yusof & Ahmad, 1996).

Tujuan penelitian ini adalah menentukan kondisi optimum proses dekafeinasi dengan kitosan dalam sistem model, menggunakan RSM.

## METODOLOGI

### Bahan

Bahan dasar yang digunakan untuk pembuatan kitosan adalah cangkang (kulit keras) udang yang diperoleh dari pedagang udang di pasar lokal Yogyakarta. Bubuk kafein dibeli dari PT Brataco Chemical Bandung, dan bahan-bahan kimia lain yang lazim digunakan di laboratorium.

### Prosedur Penelitian

Penelitian ini dilakukan melalui beberapa tahap meliputi preparasi bahan dasar, pembuatan kitosan serta uji penciriannya, orientasi, dan tahap optimasi menggunakan program RSM.

### Preparasi Bahan Dasar

Cangkang udang dibersihkan, kemudian dikeringkan dalam *cabinet drier* selama 48-72 jam pada

suhu 40°C sehingga diperoleh cangkang udang kering. Selanjutnya bahan diblender dan diayak dengan asayakan 40 mesh untuk mendapatkan tepung cangkang udang.

### Pembuatan Kitosan

Tepung cangkang udang dideproteinasi dengan menggunakan NaOH 4% dengan nisbah 1:7 (b/v) pada suhu 100°C selama tiga jam disertai pengadukan (Suhardi dkk.1992). Kemudian dilakukan penyaringan menggunakan kertas saring dan pencucian dengan akuades, lalu dibilas dengan aseton untuk membantu melarutkan lemak serta zat-zat warna. Proses selanjutnya adalah demineralisasi menggunakan asam klorida 8% dengan nisbah 1:15 (b/v) selama 6 jam pada suhu kamar disertai pengadukan. Setelah dilakukan penyaringan, pencucian dan pembilasan, diperoleh kitin basah yang kemudian dikeringkan dalam *cabinet drier* suhu 40°C selama 24 jam. Untuk mendapatkan kitosan, dilakukan proses deasetilasi, yaitu diberi perlakuan dengan NaOH 40% 1:10 (b/v) pada suhu 100°C selama 3 jam disertai pengadukan. Setelah dilakukan pencucian, pembilasan, dan pengeringan maka didapatkan bubuk kitosan. Terhadap kitosan yang diperoleh, dilakukan uji iod, dan ditera kadar air, abu, serta total nitrogennya.

### Tahap Orientasi

Tahap orientasi bertujuan menunjukkan letak daerah optimum, meliputi optimasi konsentrasi kitosan yang ditambahkan, suhu, dan lama waktu proses dekafeinasi. Hasil eksperimen ini merupakan suatu kisaran daerah optimum yang nantinya akan ditentukan titik optimalnya dengan *Response Surface Methodology (RSM)* (Montgomery, 1991; Giovanni, 1983). Kadar kafein dalam filtrat hasil dekafeinasi ditera dengan metode spektrofotometri.

### Optimasi Konsentrasi Kitosan

Pertama-tama disiapkan larutan kafein 1000ppm. Kitosan ditambahkan pada konsentrasi beragam yaitu 50, 60, 70, 80, 90, dan 100 mg dalam 100mL larutan kafein. Proses dekafeinasi dilakukan pada suhu 80°C selama 30 menit disertai pengadukan.

### Orientasi Optimasi Suhu

Variasi suhu yang dilakukan adalah suhu kamar (28°C), 40; 60; 80, 90, dan 100°C. Banyaknya kitosan yang digunakan adalah pada konsentrasi optimum yang telah diperoleh dari hasil orientasi pertama, dan lama waktu yang digunakan 30 menit.

**Orientasi Optimasi Waktu**

Variasi waktu yang dilakukan adalah 15, 30, 60, dan 90 menit. Dekafeinasi dilakukan pada kondisi konsentrasi optimum dan suhu optimum yang telah diperoleh dari hasil orientasi pertama dan kedua.

Proses dekafeinasi dilakukan dengan cara mencampur sampel 100 ml larutan kafein 1.000 ppm dengan kitosan pada kondisi yang ditentukan, dan diaduk dengan pengaduk bermagnet. Campuran kemudian disaring dengan kertas saring (Whatman No. 4) sehingga didapatkan filtrat yang kemudian ditentukan kandungan kafeinnya secara spektrofotometri.

**Optimasi RSM**

Hasil orientasi ketiga parameter dicari titik minimum, yaitu kondisi masing-masing yang menghasilkan kadar kafein terendah dalam filtrat (ppm). Kemudian ditentukan variabel X1, X2, dan X3 dari ketiga parameter dengan variabel Y adalah % penurunan kadar kafein. Setelah itu dibuat kode -1, 0, 1 untuk setiap variabel X, dengan 0 adalah titik minimum sedangkan -1 dan 1 adalah angka-angka di bawah dan di atas titik minimum dengan interval 5. Dari ketiga parameter selanjutnya dibuat 15 macam kombinasi yang telah ditentukan oleh program RSM berdasarkan Tabel 1.

Tabel 1. Kombinasi variabel X untuk data RSM

No	X1=Waktu	X2=Suhu	X3=Kons.
1	-1	-1	0
2	-1	1	0
3	1	-1	0
4	1	1	0
5	-1	0	-1
6	-1	0	1
7	1	0	-1
8	1	0	1
9	0	-1	-1
10	0	-1	1
11	0	1	-1
12	0	1	1
13	0	0	0
14	0	0	0
15	0	0	0

Langkah selanjutnya adalah mencari harga variabel Y (% penurunan kadar kafein) dengan cara seperti pada tahap orientasi dari ke-15 macam kombinasi di atas. Hasil atau respons yang diperoleh diolah dengan *software* RSM, dengan titik optimum akan didapatkan dan dibandingkan dengan titik-titik optimum yang diperoleh pada eksperimen dalam orientasi.

**HASIL DAN PEMBAHASAN**

**Kitosan**

Kitosan yang dihasilkan dari tepung cangkang udang pada penelitian ini disajikan pada Tabel 2.

Tabel 2. Ciri kitosan

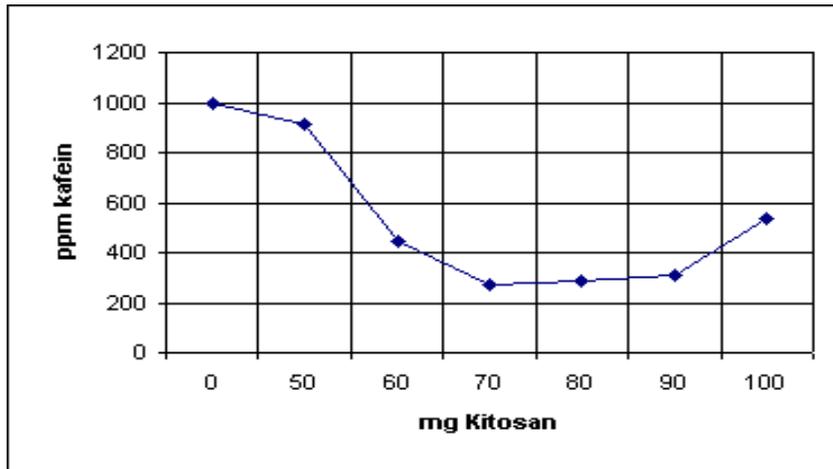
Bahan	Hasil (%)
Tepung cangkang udang	100
Kitin	21
Kitosan	20

Dalam penelitian ini kitin yang dihasilkan adalah sebesar 21% dari bobot tepung cangkang udang. Johnson dan Peniston (1982) melaporkan bahwa dalam cangkang udang-udangan terdapat kitin sekitar 20-25% bobot keringnya, dengan demikian hasil dalam penelitian ini termasuk dalam kisaran tersebut. Penelitian lain melaporkan bahwa kitin sebanyak 20% dapat diperoleh dari cangkang udang (*Penaeus merguensis*) yang diisolasi menggunakan enzim aktinase untuk deproteinasi (Santoso, 1990; Santoso et al., 1993). Kadar kitin dalam cangkang udang dipengaruhi oleh macam-macam faktor terutama jenis udang dan cara preparasinya. Adapun kitosan yang dihasilkan adalah sebesar 20% dari tepung cangkang udang atau 95% dari kitin.

Pada uji iod, kitosan hasil penelitian ini memberikan warna violet, sedangkan kitin tetap berwarna coklat, hal ini sesuai informasi dari pustaka mengenai ciri kedua macam biopolimer tersebut (Muzzarelli, 1977, Muzzarelli, 1985). Kitin dan kitosan hasil penelitian ini mengandung total nitrogen masing-masing 5,68 dan 9,75%, dan kadar abu masing-masing 0,9 dan 0,96%.

**Orientasi Optimasi Konsentrasi**

Parameter pertama yang dicari daerah optimalnya adalah konsentrasi kitosan yang ditambahkan ke dalam larutan kafein. Hasil yang diperoleh dari percobaan ini dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Hasil orientasi optimasi konsentrasi

Dari percobaan ini ditunjukkan bahwa daerah optimum berada pada penambahan konsentrasi kitosan 70 mg yang menghasilkan titik minimum (kadar kafein terendah dalam filtrat), yaitu dapat menurunkan kafein sebanyak 72,67 %.

**Orientasi Optimasi Suhu**

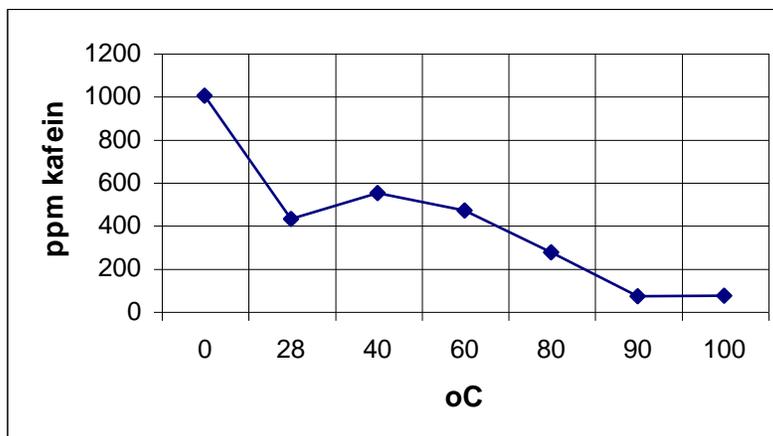
Orientasi kedua dilakukan untuk mengindikasikan suhu optimum bagi proses dekafeinasi menggunakan kitosan. Hasil yang diperoleh dapat dilihat pada Gambar 2.

Pada eksperimen ini didapatkan titik minimumnya adalah pada suhu 90°C , dengan penurunan kadar kafein adalah 93,03%. Titik minimum ini merupakan indikasi daerah optimum untuk parameter suhu.

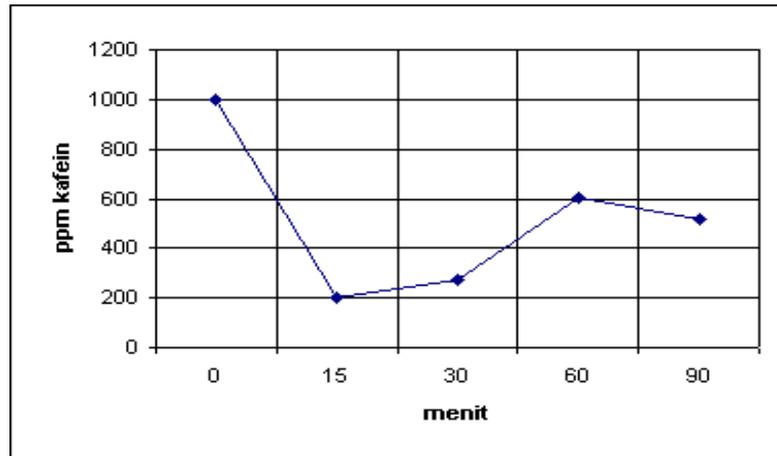
**Orientasi Optimasi Waktu**

Pada orientasi ini digunakan waktu 15, 30, 60, dan 90 menit. Hasilnya terlihat pada Gambar 3.

Dari daerah optimum yang telah didapatkan maka dapat dilakukan perhitungan secara statistik untuk mengetahui kondisi optimal proses dekafeinasi. Metode statistik yang digunakan adalah program RSM yang merupakan suatu program komputer yang dapat memvisualisasikan suatu masalah ke dalam model matematika, yang memperlihatkan hubungan antara respon dan peubah yang mempengaruhi sistem tidak diketahui seperti pada sistem ini.



Gambar 2. Hasil orientasi optimasi suhu



Gambar 3. Hasil orientasi optimasi waktu

**Response Surface Methodology**

Tahap penentuan titik-titik optimum secara simultan dengan RSM dilakukan dengan 2 cara, yaitu dengan eksperimen manual terhadap 15 kombinasi dari ketiga parameter dan dengan perhitungan menggunakan program RSM.

Langkah pertama yang harus dilakukan adalah menentukan parameter mana yang dinyatakan sebagai X1, X2, dan X3. Biasanya dalam RSM waktu dan suhu dipilih sebagai X1 dan X2 sedangkan parameter lain dinyatakan sebagai X3 (Montgomery, 1991). Karena itu dalam sistem ini pun waktu dinyatakan sebagai X1, suhu sebagai X2, dan konsentrasi kitosan sebagai X3.

Dari masing-masing peubah X, ditentukan titik minimum sebagai titik tengah tak kode kemudian

ditentukan titik bawah tak kode dan titik atas tak kode berupa titik-titik di bawah dan di atas titik tengah dengan interval 5. Untuk mempermudah penulisan dibuat suatu kode, yaitu -1 untuk titik bawah, 0 untuk titik tengah atau optimum, dan 1 untuk titik atas. Pernyataan diatas dapat dijelaskan pada Tabel 3.

Dari kode-kode di atas dibuat 15 macam kombinasi seperti pada Tabel 4. Bila dilihat dengan cermat sebenarnya hanya 13 kombinasi yang dibutuhkan namun untuk titik optimumnya, yaitu kombinasi ke-13, dibuat sebanyak 3 kali ulangan sehingga seluruhnya menjadi 15 macam kombinasi.

Tabel 3. Kode dan tak kode untuk kombinasi RSM

<b>X1 waktu (menit)</b>			
Kode	-1	0	1
Tak Kode	10	15	20
<b>X2 suhu (°C)</b>			
Kode	-1	0	1
Tak Kode	85	90	95
<b>X3 konsentrasi (mg kitosan)</b>			
Kode	-1	0	1
Tak Kode	65	70	75

Tabel 4. Kombinasi RSM dalam kode

No	X1	X2	X3
1	-1	-1	0
2	-1	1	0
3	1	-1	0
4	1	1	0
5	-1	0	-1
6	-1	0	1
7	1	0	-1
8	1	0	1
9	0	-1	-1
10	0	-1	1
11	0	1	-1
12	0	1	1
13	0	0	0
14	0	0	0
15	0	0	0

Kombinasi di atas merupakan kombinasi yang telah ditentukan RSM sebagai data yang dibutuhkan untuk menentukan respons yang ingin dicapai agar respons berada pada titik optimumnya. Langkah selanjutnya adalah melakukan eksperimen terhadap 15 kombinasi RSM di atas yang diperoleh hasil variabel Y dinyatakan dalam % penurunan kadar kafein. Hasil eksperimen didapatkan data seperti tertera pada Tabel 5.

Harga masing-masing peubah X yang didalam RSM disebut sebagai *eigen* yaitu waktu optimum (X1) = 14,876 menit, suhu optimum (X2) = 89,709°C, dan konsentrasi kitosan optimum (X3) = 69,5145 mg. Dengan harga peubah Y (% penurunan kadar kafein) yang disebut sebagai *respons* = 79,563 %.

Jika dibandingkan dengan eksperimen secara bertahap maka hasil untuk masing-masing peubah tidak jauh berbeda seperti pada Tabel 6.

Tabel 5. Hasil percobaan 15 kombinasi

No.	X1 (waktu) Menit	X2 (suhu) °C	X3 (konsentrasi) mg Kitosan	Y % Penurunan kafein
1	10	85	70	72,518
2	10	95	70	76,096
3	20	85	70	70,354
4	20	95	70	77,355
5	10	90	65	76,181
6	10	90	75	68,628
7	20	90	65	75,431
8	20	90	75	68,656
9	15	85	65	74,936
10	15	85	75	87,171
11	15	95	65	75,644
12	15	95	75	73,253
13	15	90	70	79,533
14	15	90	70	78,897
15	15	90	70	80,141

Hasil eksperimen ini kemudian digunakan sebagai data dalam program komputer RSM. Dari RSM didapatkan

model matematika untuk sistem ini adalah :

$$Y = a_0 + a_1.x_1 + a_2.x_2 + a_3.x_3 + a_4.x_1.x_1 + a_5.x_2.x_2 + a_6.x_3.x_3 + a_7.x_1.x_2 + a_8.x_1.x_3 + a_9.x_2.x_3$$

dengan

**a0 = 79,52364**  
a1 = -0,203376

**a5 = 0,042049**  
a6 = -1,814706

a2 = -0,328892  
a3 = -0,560534  
a4 = -5,484966

a7 = 0,855751  
a8 = 0,1945  
a9 = -3,656511

Tabel 6. Hasil eksperimen (orientasi) vs hasil RSM

Variabel	Hasil eksperimen	Hasil RSM
Konsentrasi (mg kitosan )	70	69,5145
Suhu (°C)	90	89,709
Waktu (menit)	15	14,876
% Penurunan kafein	79,857	79,563

Tanda *eigen* hasil RSM merupakan campuran positif dan negatif, tanda ini menunjukkan bahwa sistem tersebut memiliki lebih dari sebuah titik optimum. Respons yang demikian disebut sebagai *sadel*.

Dari data yang diperoleh dapat dibuat suatu visualisasi dalam bentuk kurva bagi keseluruhan sistem. Untuk ini dapat dilakukan dengan memvisualisasikannya ke dalam bentuk 3 dimensi, dan karena itu perlu ada sebuah peubah yang diasumsikan konstan. Sebagai contoh, untuk melihat hubungan antara suhu dan konsentrasi maka waktu diasumsikan konstan. Kurva 3 dimensi ini dibuat dalam bentuk plot permukaan (*surface plot*) dan plot kontur (*contour plot*). Untuk pembuatan kurva, perlu dilakukan perhitungan dengan memasukkan harga masing-masing peubah ke dalam model sistem sebagai berikut (Tabel 7, 8, dan 9).

1. Kurva 1, waktu (X1) diasumsikan konstan. Kode = - 0.0248, tak kode = 14.876

Tabel 7. Data kurva untuk X1 konstan

No	X2	X3	Y
1	85	70	79.917
2	95	70	79.217
3	85	70	79.917
4	95	70	79.217
5	90	65	78.276
6	90	75	77.145
7	90	65	78.276
8	90	75	77.145
9	85	65	75.012
10	85	75	81.194
11	95	65	81.624
12	95	75	73.181
13	90	70	79.525
14	90	70	79.525
15	90	70	79.525

2. Kurva 2, suhu (X2) diasumsikan konstan. Kode = - 0.0582, tak kode = 89.709

Tabel 8. Data kurva untuk X2 konstan

No	X1	X3	Y
1	10	70	74.311
2	10	70	74.311
3	20	70	73.805
4	20	70	73.805
5	10	65	73.039
6	10	75	71.954
7	20	65	72.143
8	20	75	71.837
9	15	65	78.076
10	15	75	77.380
11	15	65	78.076
12	15	75	77.380
13	15	70	79.543
14	15	70	79.543
15	15	70	79.543

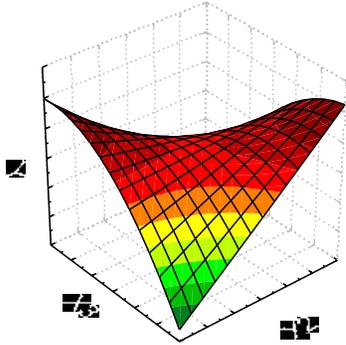
3. Kurva 3, konsentrasi (X3) diasumsikan konstan. Kode = -0.0971, tak kode = 69.5145

Tabel 9. Data kurva untuk X3 konstan

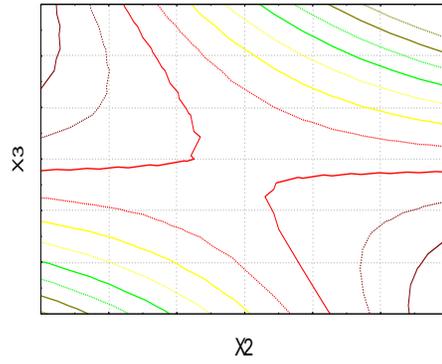
No	X1	X2	Y
1	10	85	75.170
2	10	95	73.511
3	20	85	73.014
4	20	95	74.778
5	10	90	74.298
6	10	90	74.298
7	20	90	73.854
8	20	90	73.854
9	15	85	79.577
10	15	85	79.577
11	15	95	79.629
12	15	95	79.629
13	15	90	79.561
14	15	90	79.561
15	15	90	79.561

Kurva-kurva yang diperoleh dapat dilihat pada Gambar 4.

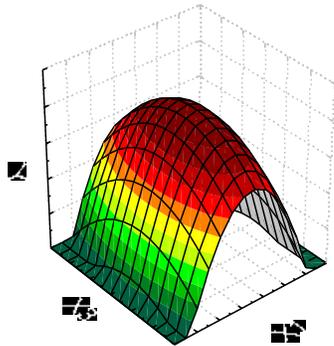
Surface Plot X1 konstan



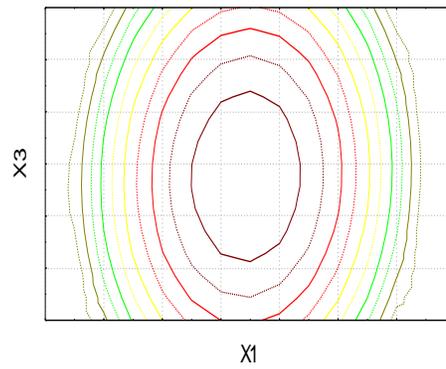
Contour Plot X1 konstan



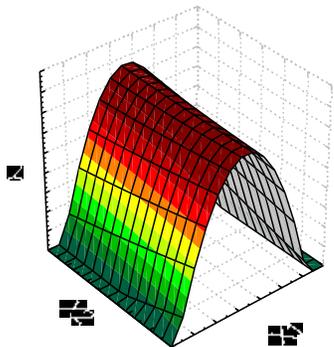
Surface Plot X2 konstan



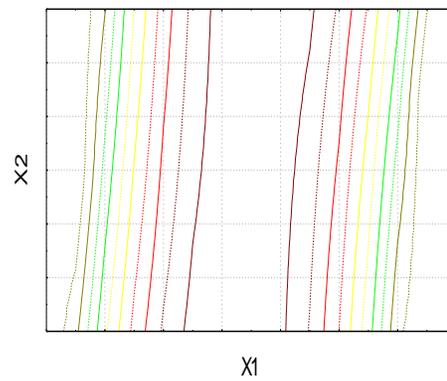
Contour Plot X2 konstan



Surface Plot X3 konstan



Contour Plot X3 konstan



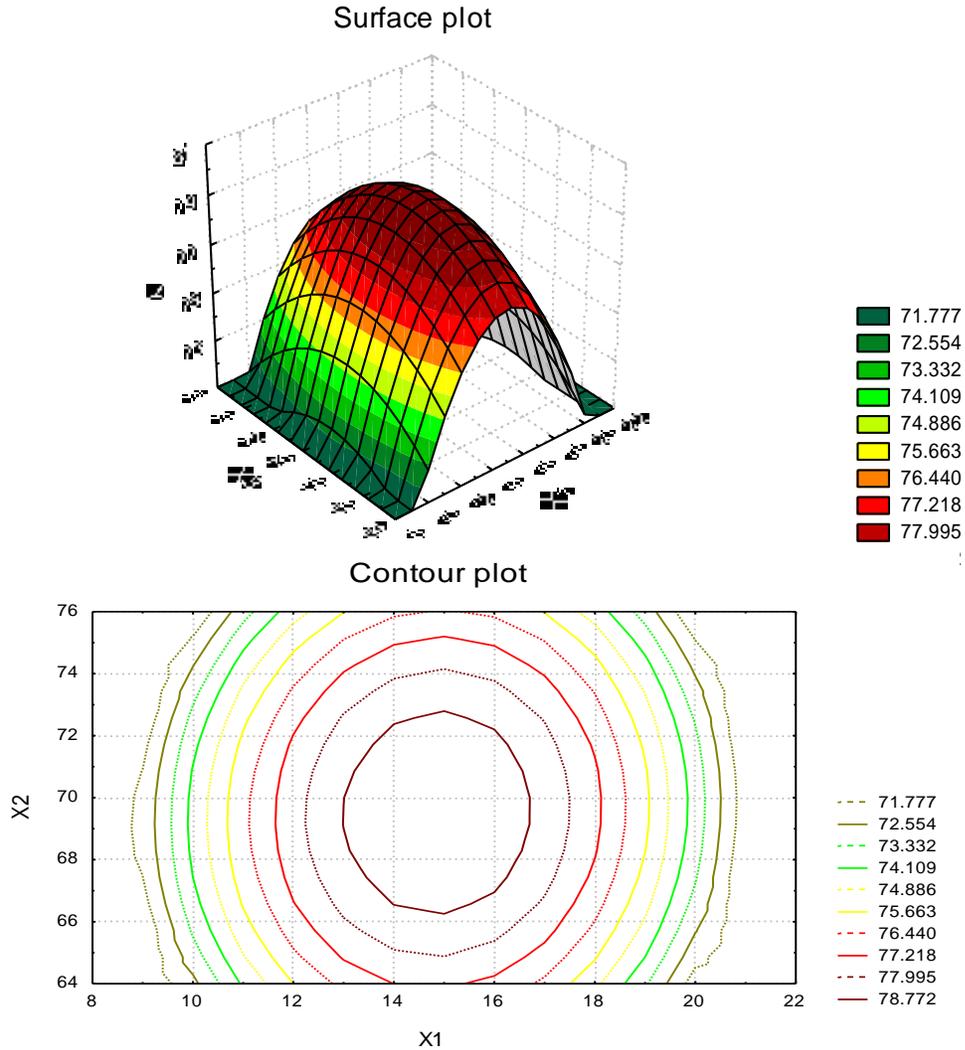
A

B

Gambar 4. Surface plot (A) dan contour plot (B)

Ketiga kurva masing-masing Gambar 4A dan 4B tersebut sebenarnya merupakan sebuah kurva 4 dimensi yang dilihat dalam bentuk 3 dimensi dari sudut pandang peubah yang berbeda. Karena tujuan penelitian ini adalah untuk

mencari kondisi optimum proses dekafeinasi maka kurva kedua merupakan visualisasi sistem yang paling baik karena terlihat daerah optimumnya. Visualisasi tersebut dapat dilihat pada Gambar 5.



Gambar 5. Surface Plot (A) dan Contour Plot (B) sistem model

**KESIMPULAN**

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa dengan menggunakan program *response surface methodology* (RSM) didapatkan kondisi optimum proses dekafeinasi dalam sistem model larutan kafein 1000ppm adalah konsentrasi kitosan 69,52mg/100mL; suhu 89,71°C; dan waktu proses 14,88 menit. Dengan kondisi seperti tersebut

proses dekafeinasi dapat menurunkan kadar kafein dalam sistem sebanyak 79,56%.

**DAFTAR PUSTAKA**

Anonim, 1973. Pilot Plant Could Develop into New Industry for Converting Waste Shells into Chitin & Chitosan. Pacific North West SEA 6 (1) : 6.

- Arai, K., Kinumaki, T., Fujita, T., 1968.** Toxicity of Chitosan. Bull. Tokai Reg. Fish. Res. Lab., 56:89-95.
- Austin, P. R., Brine, C. J., Castle, J. E., and Zikakis, J. P., 1981.** Chitin : New Facet of Research. Science 212 : 749.
- Bough, Wayne, A., 1975.** Reduction of Suspended Solid in Vegetable Canning Waste Effluents by Coagulation With Chitosan. J. Food Sci., 40:297-301
- Campbell, F. L., 1929.** The Detection and Estimation of Insect Chitin and The Irrelation of Chitinization to Hardness and Pigmentation of The Cuticle of The American Cockroach *Periplareae americana*. Ann. Entomol. Soc. Am. 22, 401-426.
- Cochran, W. G., and Cox, G. M., 1957.** Experimental Design. Wiley, New York.
- Davies, D. H. and Hayes, E. R., 1988.** Determination of The Degree of Acetylation of Chitin and Chitosan. In "Methods in Enzymology" vol. 161, Biomass Part B, p. 442, Wood, W. A. and Kellog, S. T. (eds). Academic Press, San Diego, New York.
- Eiseinberg, S.,1988.** Looking for The Perfect Brew. Science News, vol. 133, pp. 252-253.
- Giovanni,M., 1983.** Response Surface Methodology and Product Optimisation. Food Tech., 37 Nov. 41-45.
- Henika. R.G., 1972.** Simple and effective system for use with Response Surface Methodology. Cereal Sci. Today 17 (10): 304-314.
- James, J. E., 1991.** Caffeine and Health. Academic Press, New York.
- Magnolata, D., 1978.** A Process of Deacidifying a Coffee Extract and The Deacidified Extract Obtained. UK Patent Application GB 2029 688A.
- Massey, L. K., 1988.** Acute Effect of Dietary Caffeine and Sucrose on Urinary Mineral Excretion in Healthy Adolescents. Nutr. Res 8 (9).
- Montgomery, D. C., 1991.** Design and Analysis of Experiments. John Wiley & Sons, New York.
- Morjani, M. N., Achuta, V., and Imam Khasim, D., 1975.** Viscosity of Chitosan from Prawn Waste. Central Food Technological Research Institute, Mysori.
- Muzzarelli, R. A. A., 1977.** *Chitin*. Pergamon Press, Oxford.
- Muzzarelli, R. A. A., 1985.** *The Polysaccharides*. Vol. 3. Academic Press, New York.
- Rene Wilboux, 1963.** *Agriculture Engineering, Coffee Processing*. Farm Products Processing, Informal Working Bulletin no. 20, FAO United Nation, Rome, Italy.
- Santoso,U., 1990.** Studi tentang kitin cangkang udang (*Penaeus merguensis*) I: Isolasi menggunakan Actinase E dan EDTA. Agritech 10 (3) 2-12.
- Santoso,U., Koguchi,T., Yamada,K., Iijima, T., Wada, M., Tadokoro, T., and Maekawa,M., 1993.** Purification of chitin from Indonesian shrimp (*Penaeus merguensis*) shells using Actinase E. *J. Agric. Sci., Tokyo Nogyo Daigaku* Vol. 38 No. 1, p.27-34.
- Siverz, M., and Elliott Foote, H.,1963.** *Coffee Processing Technology*. Vol. I dan II. The Avi Publishing Company, Inc., West Port, Connecticut.
- Sugano, M., Fujikawa, T.,Hiratsuji, Y., Hasegawa, Y., 1978.** Hypocholesterolemic Effects of Chitosan in Cholesterol-fed Rats. *Nutr. Rep. Int.*, 18:531-537.
- Suhardi, Umar Santoso dan Sudarmanto, 1992.** Pemanfaatan limbah pengolahan udang untuk produksi kitin. Fakultas Teknologi Pertanian UGM, Yogyakarta.
- Suzuki, S., Okura, Y., Hashimoto, K., suzuki, M., 1982.** Immunoadjuvant Effect on Chitin and Chitosan. *In* Proceedings, International Conference on Chitin/Chitosan, 2<sup>nd</sup>, Hirano, S., Tokura, S., Eds., The Japanese Society of Chitin and Chitosan. Tottori, Japan.
- Yusof, S. and Ahmad,M., 1996.** Use of Response Surface Methodology in the development of banana crackers. Proceeding of National Seminar on Food Technology '96, held by MARDI, Kuala Lumpur, Malaysia, 23-24 September 1996.

