

KARAKTERISTIK DAN SIFAT KINETIKA ENZIM KITINASE DARI ISOLAT BAKTERI T5a1 ASAL TERASI

Dedi Noviendri^{*)}, Yusro Nuri Fawzya^{*)}, dan Ekowati Chasanah^{*)}

ABSTRAK

Karakterisasi dan studi kinetika enzim kitinase dari isolat T5a1 asal terasi telah dilakukan. Karakterisasi ini mencakup penentuan suhu dan pH optimum, kestabilan enzim pada suhu optimumnya, dan pengaruh adanya ion logam terhadap aktivitas enzim. Dari hasil penelitian ini diketahui bahwa enzim kitinase T5a1 mempunyai suhu dan pH optimum masing-masing adalah 40°C dan 6,0. Enzim ini masih tetap stabil sampai dengan 160 menit inkubasi pada suhu 40°C. Kation Fe^{3+} dan Ca^{2+} dapat meningkatkan aktivitas enzim kitinase, sedangkan kation monovalen Mn^{2+} , Mg^{2+} , Cu^{2+} , Co^{2+} , Zn^{2+} , Ba^{2+} , NH_4^+ , K^+ , dan Na^+ dengan konsentrasi akhir 1,0 mM dapat menurunkan aktivitas enzim kitinase dari isolat T5a1. Nilai V_{maks} dan K_m enzim kitinase T5a1 ini masing-masing adalah sebesar 0,0048 U/mL dan 1,037 mg/mL.

ABSTRACT: *Characteristics and kinetics of chitinase enzyme produced by T5a1 isolated from terasi. By: Dedi Noviendri, Yusro Nuri Fawzya and Ekowati Chasanah*

Characteristics and kinetics of chitinase enzyme produced from T5a1 isolated from fish paste have been studied. This characterization included assessment of optimal temperature and pH, enzyme stability and metal ion influence toward enzyme activity. The result of experiment showed that the optimal temperature and pH of the enzyme activity were 40°C and 6.0, respectively. At 40 °C this enzyme was still stable until 160 minutes. It was found that the Fe^{3+} and Ca^{2+} increased the enzyme activity, whereas 1 mM Mn^{2+} , Mg^{2+} , Cu^{2+} , Co^{2+} , Zn^{2+} , Ba^{2+} , NH_4^+ , K^+ and Na^+ decreased the activity. V_{max} and K_m values of the enzyme were observed on 0.0048 U/mL and 1.037 mg/mL, respectively.

KEYWORDS: *chitinase enzyme, T5a1 terasi's bacterial isolate, characteristics and kinetics*

PENDAHULUAN

Kitin merupakan senyawa homopolimer polisakarida alami rantai panjang berbentuk linier (Tokuyasu *et al.*, 1999) yang mempunyai kelimpahan sangat besar dalam biosfer (Gohel *et al.*, 2006). Polimer ini tersusun dari residu N-asetilglukosamin (GlcNac) (Park *et al.*, 2000; Dahiya *et al.*, 2005^a) yang dihubungkan oleh ikatan β -(1,4)-glikosidik (Wang & Chang, 1997; Oh *et al.*, 2000; Purwani, 2002), tidak bercabang, mempunyai bobot molekul besar dan jumlahnya sangat berlimpah di alam. Kitin merupakan komponen utama dari kulit udang atau golongan krustase (Mahadevan & Crawford, 1997), eksoskeleton dari zooplankton laut seperti *coral* dan ubur-ubur (Gohel *et al.*, 2006), kulit insekta dan bahkan juga terkandung dalam beberapa jenis kapang (*fungi*). Senyawa kitin ini merupakan biopolimer (Tanaka *et al.*, 1999) terbesar kedua setelah selulosa (Martinou *et al.*, 1995; Thatte, 2004). Enzim kitinase (E.C.3.2.1.14) termasuk kelompok enzim hidrolase yang dapat mendegradasi kitin secara langsung menjadi produk dengan berat molekul kecil, yang banyak dihasilkan oleh mikroorganisme (Wang &

Chang, 1997), baik secara intra maupun ekstraseluler. Enzim ini dapat mendegradasi kitin polimerik menjadi oligosakarida kitin, deasetilkitobiosa, dan N-asetilglukosamin (Thompson *et al.*, 2001). Kebutuhan nutrisi mikroorganisme pendegradasi kitin dipenuhi oleh kitinase ekstraseluler yang mendegradasi bahan-bahan berkitin.

Mikroorganisme prokariot pendegradasi kitin (memiliki enzim kitinase) umumnya berasal dari kelompok bakteri peluncur (*gliding bacteria*), *Pseudomonas*, *Vibrio*, *Photobacterium*, *Actinomycetes*, *Bacillus*, *Aeromonas*, *Streptomyces*, dan *Clostridium*. Di antara bakteri tersebut diketahui bahwa *Pseudomonas*, *Bacillus*, dan *Streptomyces* ditemukan pada lingkungan alkali. Selain itu kitinase juga dihasilkan oleh mikroorganisme eukariotik seperti *Myxomycetes*, *Zygomycetes*, *Deuteromycetes*, *Ascomycetes*, dan *Basidiomycetes* (Gooday, 1990 dalam Situmorang, 2003). Isolasi bakteri kitinolitik dari hasil perikanan dan produk olahannya telah dilakukan (Zilda & Chasanah, 2005; Uria & Chasanah, 2005). Beberapa isolat bakteri kitinolitik potensial yang telah diisolasi adalah JB4 (*Staphylococcus captis*) (Noviendri *et al.*, 2006; Noviendri & Fawzya, 2008)

^{*)} Peneliti pada Balai Besar Riset Pengolahan Produk dan Bioteknologi Kelautan dan Perikanan, DKP

dan T5a1 dari terasi, 34bs dari *sponge* dan KPU218 dari limbah udang (Krisnawang *et al.*, 2006). Dari beberapa isolat bakteri kitinolitik yang telah berhasil diisolasi, isolat T5a1 merupakan bakteri yang terpilih untuk diteliti lebih lanjut untuk produksi enzim kitinase. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui karakter dan kinetika enzim kitinase dari isolat T5a1 guna memudahkan aplikasi selanjutnya.

BAHAN DAN METODE

Produksi Enzim

Isolat T5a1 murni hasil isolasi dari terasi (Zilda & Chasanah, 2005) ditumbuhkan dalam media *Minimally Syntetic Medium* (MSM)) padat steril (Katatny *et al.*, 2000), kemudian sebanyak dua ose isolat dikultivasi ke dalam 25 mL medium MSM cair dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam pada *waterbath shaker* dengan kecepatan 120 rpm, dan siap dijadikan *starter*. Starter dengan konsentrasi 10% (v/v) ditumbuhkan di dalam medium cair pada suhu 37°C selama satu malam pada *waterbath shaker*. Pada akhir masa fermentasi, biomassa dipisahkan dengan cara sentrifugasi dengan kecepatan 8.000 g pada suhu 4°C selama 15 menit untuk diambil supernatannya. Enzim dikonsentrasikan dengan teknik *salting out*, yaitu dengan menambahkan amonium sulfat ke dalam supernatan hingga mencapai 40% tingkat kejenuhan (%TK) (Uria & Chasanah, 2005; Zilda & Chasanah, 2005). Endapan dikumpulkan dengan cara sentrifugasi dengan kecepatan 8.000 g pada suhu 4°C selama 15 menit. Endapan (enzim) ini kemudian dilarutkan dalam 15 mL bufer fosfat 0,05 M pH 7,0; lalu didialisis di dalam bufer yang sama pada suhu 4°C selama semalam. Larutan enzim siap untuk digunakan pada pengujian selanjutnya.

Pengujian Aktivitas Enzim

Aktivitas enzim kitinase diuji berdasarkan metode Splinder (1997) yang dimodifikasi. Modifikasi ini dilakukan pada nilai konsentrasi dan volume pereaksi yang digunakan berdasarkan penelitian pendahuluan. Pengujian aktivitas enzim dilakukan dengan menggunakan substrat koloidal kitin dengan konsentrasi 1,5% (b/v). Larutan enzim (150 µL) ditambahkan ke dalam campuran yang mengandung 300 µL koloidal kitin 1,5% dan 150 µL bufer fosfat dengan pH 7,0. Campuran diinkubasi pada suhu 37°C selama 10 menit. Selanjutnya disentrifugasi pada kecepatan 9.000 g pada suhu 4°C selama 5 menit. Pelet dibuang dan supernatan diambil sebanyak 200 µL, lalu ditambah dengan 500 µL H₂O dan 1.000 µL pereaksi *Schales*, selanjutnya dididihkan selama 10 menit. Setelah dingin, absorbansi larutan diukur pada

panjang gelombang 420 nm dengan menggunakan spektrofotometer UV-VIS (UV-1201 Shimadzu). Satu unit aktivitas kitinase didefinisikan sebagai jumlah enzim yang menghasilkan 1 µmol gula reduksi yang ekuivalen dengan N-asetilglukosamin (GlcNAc) selama 1 menit.

Karakterisasi Enzim Kitinase

Karakterisasi enzim yang dilakukan adalah, penentuan suhu dan pH optimum enzim, penentuan stabilitas enzim pada suhu optimalnya dan pengaruh kation terhadap aktivitas enzim.

Pengaruh Suhu dan pH terhadap Aktivitas Enzim

Aktivitas enzim diukur pada berbagai suhu untuk menentukan suhu optimumnya. Suhu yang digunakan adalah 30, 37, 40, 50, 60, dan 70°C. Sedangkan pH optimum ditentukan dengan cara mereaksikan enzim kitinase dengan substrat pada berbagai pH, kemudian mengukur aktivitasnya pada suhu optimumnya. Bufer yang digunakan meliputi bufer sitrat (pH 4,0–6,0), bufer fosfat (pH 6,0–8,0), bufer borat (pH 8,0–9,0), dan bufer glisin (pH 9,0–10,0). Konsentrasi bufer yang digunakan pada penelitian ini adalah 0,2 M.

Penentuan Stabilitas Enzim pada Suhu Optimumnya

Penentuan stabilitas enzim dilakukan dengan cara inkubasi larutan enzim (50 µL) dalam *waterbath* pada suhu optimumnya selama 0, 15, 30, 45, 60, 80, 100, 120, dan 160 menit, lalu didinginkan dengan es selama 15 menit, kemudian diuji aktivitasnya.

Pengaruh Kation Terhadap Aktivitas Enzim

Pengaruh penambahan kation terhadap aktivitas enzim kitinase diuji dengan menggunakan kation monovalen (NH₄⁺, K⁺, dan Na⁺), divalen (Ca²⁺, Mn²⁺, Li²⁺, Co²⁺, Zn²⁺, Ba²⁺, dan Mg²⁺), dan trivalen (Fe³⁺) dalam bentuk garam kloridanya. Senyawa ini ditambahkan ke dalam enzim dengan konsentrasi akhir 1,0 mM (Wang & Chang, 1997; Rahayu *et al.*, 2004). Campuran ini diinkubasi selama 15 menit pada suhu 40°C (suhu optimum enzim untuk kedua isolat), kemudian diukur aktivitasnya. Sebagai kontrol dalam pengujian ini dipergunakan larutan enzim yang tidak mengandung logam yang diujikan.

Kinetika Enzim

Parameter yang diamati dalam kinetika enzim ini adalah nilai kecepatan maksimum (V_{maks}), dan konstanta Michaelis-Menten (K_m) dari enzim kitinase. Nilai K_m yang diukur menunjukkan besarnya

konsentrasi substrat yang dicapai pada kecepatan $\frac{1}{2} V_{maks}$. Dalam penentuan kinetika enzim ini, digunakan substrat koloidal kitin dengan konsentrasi 0 sampai dengan 7,5 mg/mL.

HASIL DAN BAHASAN

Pengaruh Suhu Terhadap Aktivitas Enzim

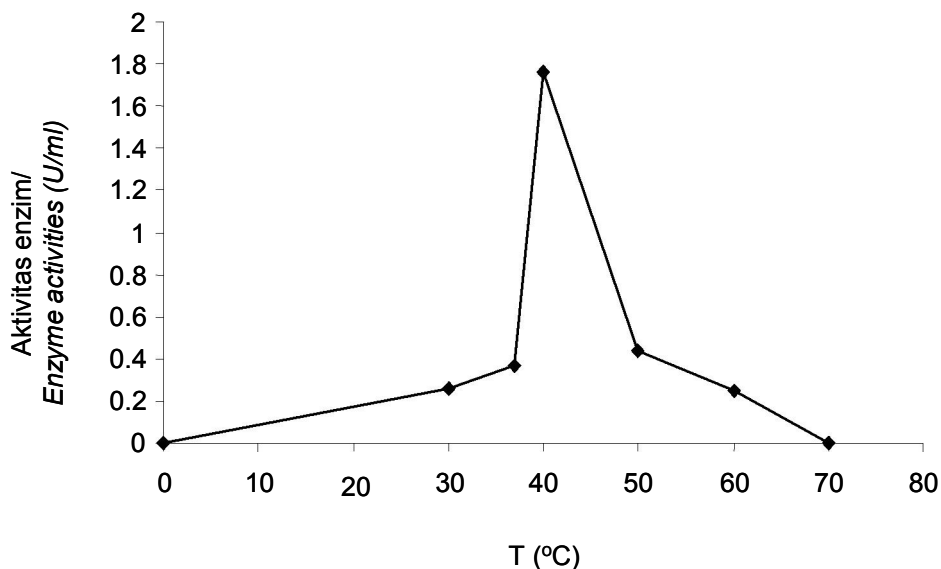
Pengaruh suhu terhadap aktivitas kitinase dari penelitian ini dapat dilihat pada Gambar 1. Aktivitas maksimum kitinase dari isolat T5a1 dicapai pada suhu 40°C sebesar 1,759 U/mL, tetapi mengalami penurunan pada suhu 50°C. Wang & Chang (1997) menemukan bahwa dua kitinase yang dihasilkan oleh *Pseudomonas aeruginosa* K-187 mempunyai suhu optimum 40 dan 50°C. Suhu optimum sebesar 45°C dimiliki oleh kitinase dari *Vibrio* sp. 98CJ1102 (Park *et al.*, 2000), *Enterobacter* sp. NRG4 (Dahiya *et al.*, 2005b), dan *Arthrobacter* sp. NHB-10 (Okazaki *et al.*, 1996). Enzim kitinase yang berasal dari isolat T5a1 ini dapat digolongkan ke dalam enzim kitinase mesofilik yang mempunyai suhu optimum berkisar antara 25–45°C.

Pada umumnya peningkatan suhu inkubasi dapat menyebabkan peningkatan aktivitas enzim karena peningkatan kecepatan gerak termal molekul, sehingga meningkatkan jumlah molekul yang mempunyai energi cukup untuk memasuki keadaan transisinya. Kenaikan suhu 10°C biasanya mengakibatkan kenaikan aktivitas enzim sebanyak dua kali lipat (Bollag & Edelstein, 1991). Aktivitas tertinggi enzim akan diperoleh pada suhu optimumnya (Jayanti, 2002).

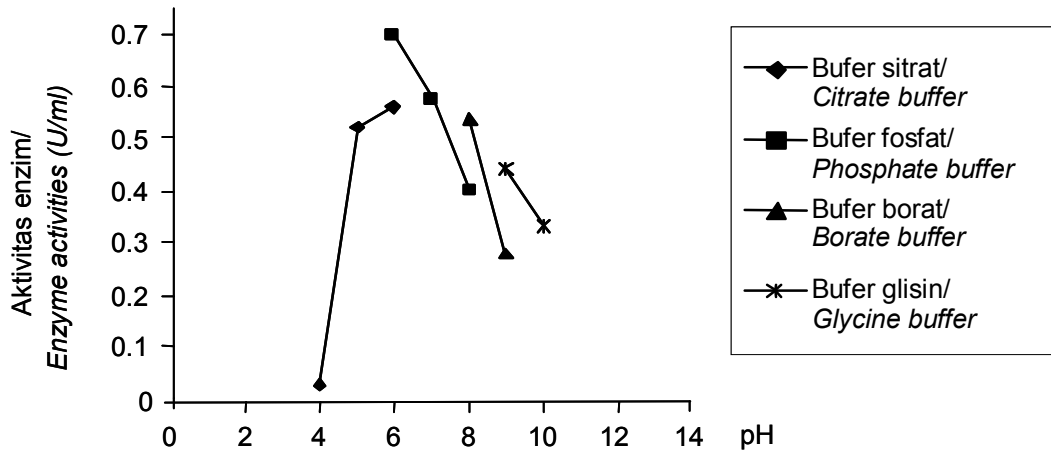
Pengaruh pH Terhadap Aktivitas Enzim

Enzim memiliki pH optimum yang khas, yaitu pH yang menyebabkan aktivitas maksimum (Lehninger, 1995). Semua reaksi enzim dipengaruhi oleh pH medium tempat reaksi terjadi (Suhartono, 1989), dan pada umumnya enzim aktif pada pH netral atau dengan kisaran pH 5–9 (Suhartono, 1989; Rahayu, 2000). Pengaruh pH terhadap aktivitas enzim dapat dilihat pada Gambar 2. Aktivitas maksimum isolat T5a1 dicapai pada pH 6,0 bufer fosfat sebesar 0,696 U/mL. Hal ini mirip dengan hasil penelitian Okazaki pada tahun 1995 dengan menggunakan *Streptomyces* sp J-13-3, bahwa pH optimum dua kitinase yang dihasilkan oleh mikroorganisme tersebut adalah 6,0 (Rahayu, 2000).

Nilai pH optimum 6,0 juga ditemukan pada kitinase *Trichoderma harzianum* (Katatny *et al.*, 2000), *Bacillus licheniformis* MB-2 (Situmorang, 2003), *Vibrio* sp. 98CJ1102 (Park *et al.*, 2000) dan isolat 13,30 yang diisolasi dari Manado (Jayanti, 2002). Sedangkan kitinase yang memiliki pH optimum 7,0 ditemukan pada isolat 13,5 (Jayanti, 2002), isolat K-29-14 yang diisolasi dari kawah Kamojang Jawa Barat (Rahayu, 2000; Rahayu *et al.*, 2004), dan isolat bakteri termofilik GP18 yang diisolasi dari sumber air panas Gunung Pancar (Lestari, 2000), pH optimum 8,0 pada isolat 12,2 (Jayanti, 2002), pH optimum 7,0–8,0 pada isolat 13,9 (Jayanti, 2002) dan *Bacillus* sp. 13,26 (Purwani *et al.*, 2004). Sedangkan dua kitinase yang dihasilkan oleh *Pseudomonas aeruginosa* K-187 mempunyai pH optimum 7,0 dan 8,0 (Wang & Chang, 1997).



Gambar 1. Pengaruh suhu terhadap aktivitas kitinase dari isolat T5a1.
Figure 1. The effect of temperature on chitinase activity of T5a1 isolate.



Gambar 2. Pengaruh pH terhadap aktivitas kitinase dari isolat T5a1.

Figure 2. The effect of pH on the activity of chitinase produced from T5a1 isolate.

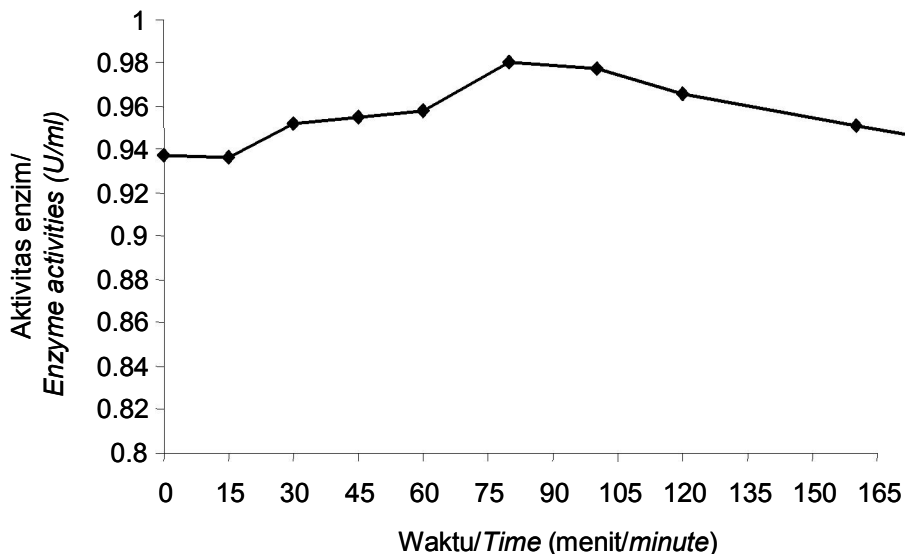
Pengujian Stabilitas Enzim pada Suhu Optimumnya

Hasil pengujian stabilitas kitinase isolat T5a1 (Gambar 3) memperlihatkan profil kurva kestabilan terhadap panas yang relatif mirip dengan profil kurva kestabilan terhadap panas dari kitinase isolat JB4 (Noviendri *et al.*, 2006). Aktivitas enzim kitinase dari isolat T5a1 pada inkubasi awal sebesar 0,938 U/mL mengalami kenaikan sampai sebesar 0,938 U/mL pada waktu inkubasi 80 menit, setelah itu mengalami penurunan secara perlahan menjadi 0,951 U/mL seiring dengan pertambahan waktu inkubasi 160 menit. Hal ini menunjukkan bahwa enzim kitinase mengalami kerusakan/denaturasi yang semakin meningkat dengan bertambahnya waktu inkubasi.

Stabilitas enzim merupakan fungsi dari kekuatan-kekuatan penstabil enzim yaitu, ikatan hidrogen, ikatan hidrofobik, interaksi ionik, ikatan logam, dan jembatan disulfida (Suhartono, 1989). Semakin tinggi kekuatan penstabil enzim, maka enzim akan semakin stabil (Rahayu, 2000). Enzim kitinase yang berasal dari *Bacillus* sp. 13,26 dapat stabil sampai waktu 5 jam pada suhu 60–80°C (Purwani *et al.*, 2004), dan dari *Bacillus* K-29-14 dapat stabil sampai waktu 5 jam pada suhu 70°C (Rahayu *et al.*, 2004).

Pengaruh Kation Terhadap Aktivitas Enzim

Beberapa enzim diketahui membutuhkan ion-ion tertentu untuk menjamin aktivitasnya. Ion-ion tersebut dapat berperan sebagai aktivator pada konsentrasi



Gambar 3. Pengaruh lama inkubasi terhadap aktivitas kitinase dari isolat T5a1 pada suhu 40°C.

Figure 3. The effect of incubation time at 40°C on the activities of chitinase produced from T5a1 isolate.

tertentu atau sebagai inhibitor pada kondisi yang berbeda. Ion-ion logam ini diperlukan sebagai komponen pada sisi aktifnya. Pengaruh ion logam terhadap aktivitas relatif kitinase isolat T5a1 dapat dilihat pada Gambar 4.

Penambahan 1,0 mM kation Mn^{2+} , Mg^{2+} , Cu^{2+} , Co^{2+} , Zn^{2+} , Ba^{2+} , NH_4^+ , K^+ , dan Na^+ dapat menurunkan aktivitas enzim kitinase dari isolat T5a1. Kation Mn^{2+} , Mg^{2+} dan Zn^{2+} dapat menurunkan aktivitas kitinase dari *Pseudomonas aeruginosa* K-187 (Wang & Chang, 1997), kation Cu^{2+} , Co^{2+} , Ag^+ , dan Hg^+ pada kitinase dari *Enterobacter* sp. NRG4 (Dahiya *et al.*, 2005b), Fe^{2+} dan Cu^{2+} pada kitinase dari *Vibrio* sp. 98CJ11027 (Park *et al.*, 2000) dan Zn^{2+} pada kitinase dari *Bacillus* K-129-14 (Rahayu *et al.*, 2004). Dari semua kation yang dapat menurunkan aktivitas enzim kitinase dari isolate T5a1, kation divalen Co^{2+} memiliki kemampuan tertinggi, sampai tinggal 54,07%. Untuk enzim kitinase dari isolat T5a1 ini, penambahan 1,0 mM kation Ca^{2+} dan Fe^{3+} dapat meningkatkan aktivitas enzim kitinase masing-masing menjadi 120,32% dan 131,71%. Secara kimiawi, suatu inhibitor tidak dapat dibedakan dari aktivator. Setelah mereka berinteraksi dengan enzim, barulah dapat dilihat perbedaannya. Aktivator akan berikatan dengan enzim dan menyebabkan kenaikan kecepatan reaksi enzim, sedangkan inhibitor berikatan dengan enzim dan menyebabkan penurunan kecepatan reaksi enzim (Suhartono, 1989).

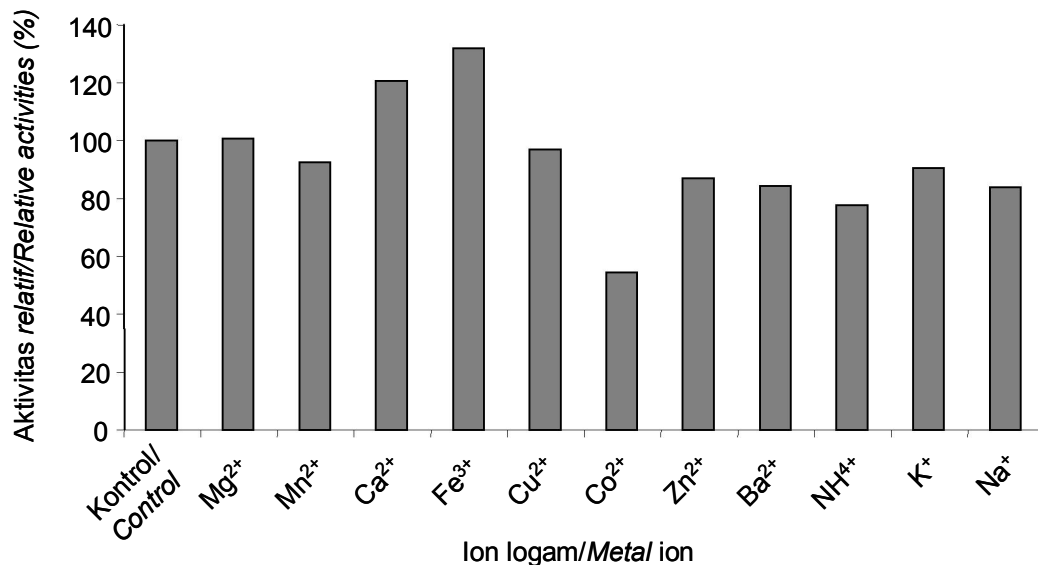
Kinetika Enzim

Salah satu faktor yang dapat mempengaruhi aktivitas enzim adalah konsentrasi substrat yang

digunakan. Semakin tinggi konsentrasi substrat yang digunakan, maka semakin tinggi aktivitas enzim atau semakin tinggi kecepatan reaksi yang dikatalisis oleh enzim tersebut. Namun pada suatu titik tertentu, yaitu kecepatan maksimum (V_{maks}), adanya penambahan konsentrasi substrat dalam jumlah tertentu tidak akan dapat meningkatkan kecepatan reaksi enzim. Jika terus dilakukan penambahan konsentrasi substrat ke dalam reaksi yang dikatalisis oleh enzim, maka akan dapat menurunkan aktivitas enzim atau kecepatan reaksi. Dalam hal ini, substrat yang ditambahkan tersebut akan menjadi inhibitor dalam reaksi enzimatik. Dari hasil penelitian ini diperoleh nilai V_{maks} dan K_m enzim kitinase dari isolat T5a1 adalah sebesar 0,0048 U/mL dan 1,037 mg/mL (Gambar 5). Bila dibandingkan dengan enzim kitinase 34bs (*Erwinia* sp.) (Noviendri & Uria, 2008), maka nilai V_{maks} dari enzim kitinase ini relatif lebih kecil, yaitu sebesar 0,2346 U/ml. Sedangkan nilai K_m nya relatif sama yaitu sebesar 1,61 mg/mL.

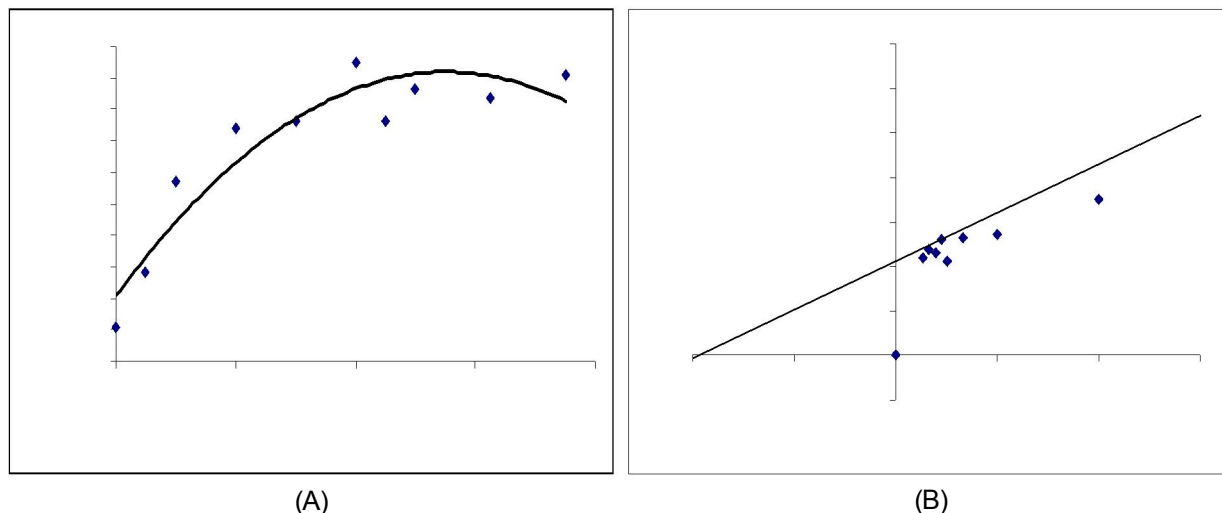
KESIMPULAN

Enzim kitinase yang dihasilkan oleh isolat bakteri T5a1 dari terasi mempunyai suhu dan pH optimum 40°C dan 6,0 bufer fosfat. Enzim ini memiliki ketahanan terhadap panas yang relatif lama pada suhu 40°C yaitu 160 menit waktu inkubasi. Kation Mn^{2+} , Mg^{2+} , Cu^{2+} , Co^{2+} , Zn^{2+} , Ba^{2+} , NH_4^+ , K^+ , dan Na^+ dengan konsentrasi 1,0 mM dapat menurunkan aktivitas enzim kitinase isolat T5a1. Sedangkan penambahan kation Fe^{3+} dan Ca^{2+} dapat meningkatkan aktivitas enzim kitinase. Nilai V_{maks} dan



Gambar 4.
Figure 4.

Pengaruh ion logam terhadap aktivitas kitinase dari isolat T5a1 pada suhu 40 °C dan pH 6,0.
Effect of metal ion on the activity of chitinase produced from T5a1 isolate measured at 40 °C and pH 6.0.



Gambar 5. Kurva Michaelis-Menten (A) dan Line WeaverBurk (B) enzim kitinase dari isolat T5a1.
Figure 5. Michaelis-Menten (A) and Line WeaverBurk (B) curves of chitinase enzyme produced from T5a1 isolate.

K_m kitinase dari isolat T5a1 adalah masing-masing sebesar 0,0048 U/ml dan 1,037 mg/ml.

DAFTAR PUSTAKA

- Bollag, D.M. and Edelstein, S.J. 1991. *Protein Methods*. Willey-Liss, USA. 230 pp.
- Dahiya, N., Tewari, R., and Hoondal, G.S. 2005^a. Biotechnological aspects of chitinolytic enzymes: a review. *J. Appl. Microbiol Biotechnol.* 71(6): 773–782
- Dahiya, N., Tewari, R., Tiwari, R.P., and Hoondal, G.S. 2005^b. Chitinase from *Enterobacter* sp. NRG4: Its purification, Characterization and Reaction pattern. *Elect. J. Biotechnol.* 8(2):134–145.
- Gohel, V., Singh, A., Vimal, M., Ashwini, P., and Chhatpar, H. S. 2006. Bioprospecting and antifungal potential of chitinolytic microorganism. *African. J. Biotechnol.* 5(2):54–72.
- Jayanti, J.F.L. 2002. *Studi Kitinase dan Kitin Deasetilase Termotabil dari Isolat Asal Manado*. Skripsi. Jurusan Teknologi Pangan dan Gizi, Fakultas Teknologi Pertanian, IPB, Bogor.
- Katatny, M. H. E., Somitsch, W. Robra, K. H. Katatny, M. S. E., and Gubitz, G. M. 2000. Production of Chitinase and 1,3-glucanase by *Trichoderma harzianum* for Control of the Phytopathogenic Fungus *Sclerotium rolfsii*. *J. Food. Technol. Biotechnol.* 38(3):173–180.
- Krisnawang, H., Fawzya, Y.N., and Noviendri, D. 2006. *Optimasi dan Karakterisasi Parsial Enzim Kitosanase Dari Isolat KPU218 asal Limbah Udang*. Dipresentasikan pada Seminar Nasional dan Diseminasi Teknologi Hasil Perikanan di Lampung. Tanggal 4-5 Desember 2006.
- Lehninger, A.L. 1995. *Dasar-dasar Biokimia. Jilid 1*. Erlangga, Jakarta.
- Lestari, P. 2000. *Karakterisasi Kitinase Ekstraseluler Asal Bakteri Termofilik GP18 dari Sumber Air Panas Gunung Pancar*. Thesis Pascasarjana, IPB.
- Mahadevan, B. and Crawford, D.L. 1997. Properties of the chitinase of the antifungal biocontrol agent *Streptomyces lydicus* WYEC108. *J. Enzyme Microb. Technol.* 20: 489–493.
- Martinou, A., Kafetzopoulos, D., and Bouriotis, V. 1995. Chitin deacetylation by enzymatic means: monitoring of deacetylation processes. *J. Carbohidr. Res.* 273(2): 235–242.
- Noviendri, D., Chasanah, E., dan Fawzya, Y.N. 2006. Karakterisasi enzim kitinase yang diproduksi oleh isolat bakteri JB4 dari terasi. *JPB. Perikanan.* 1(2): 85–92.
- Noviendri, D. dan Uria, A.R. 2008. *Karakterisasi enzim kitinase 34Bs (Erwinia sp.) dari Lingkungan Laut Untuk Aplikasi Bioinsektisida*. Temu Ilmiah Peneliti Badan Riset Kelautan dan Perikanan. DKP, Hotel Jayakarta, Jakarta. 12 pp.
- Noviendri, D. dan Fawzya, Y.N. 2008. *Produksi Enzim Kitosanase dari Bakteri Staphylococcus captis dan Pengaruh Perlakuan Ultrafiltrasi dan Liofilisasi Terhadap Aktivitasnya*. Dipresentasikan pada Seminar Nasional Perikanan Indonesia 2008. Di Sekolah Tinggi Perikanan Jakarta. Pada tanggal 4-5 Desember 2008. 12 pp.
- Oh, Y.S., Shih, I.L., Tzeng, Y.M., and Wang, S.L. 2000. Protease produced by *Pseudomonas aeruginosa* K-187 and its application in deproteinization of shrimp and crab shell wastes. *J. Enzyme. Microb. Technol.* 27: 3–10.
- Okazaki, K., Kawabata, T., Nakano, M., and Hayakawa, S. 1996. Purification and properties of chitinase from *Arthrobacter* sp. NHB-10. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 63(9): 1644–1646.
- Park, S.H., Lee, J.H, and Lee, H.K. 2000. Purification and characterization of chitinase from a marine bacterium, *Vibrio* sp. 98CJ11027. *J. Microbiol.* 38(4): 224–229.

- Purwani, E.Y. 2002. *Karakteristik Enzim Kitinase Termostabil dari Bakteri Termofilik Bacillus sp.* 13.26. Thesis Program Pascasarjana, IPB.
- Purwani, E.Y., Suhartono, M.T., Rukayadi, Y., Hwang, J.K., and Pyun, Y.R. 2004. Characteristics of thermostable chitinase enzymes from the Indonesian *Bacillus* sp. 13.26. *J. Enzyme. Microbiol. Technol.* 35: 147–153.
- Rahayu, S. 2000. *Pemurnian dan Karakterisasi Kitinase dan Kitin Deasetilase Termostabil dari Isolat Bacillus K-29-14 Asal Kawah Lamojang, Jawa Barat.* Thesis Program Pascasarjana, IPB.
- Rahayu, S., Tanuwidjaya, F., Rukayadi, Y., Suwanto, A., Suhartono, M. T., Hwang, J. K., and Pyun, Y.R. 2004. Study of Thermostable Chitinase Enzymes from Indonesian *Bacillus* K29-14. *J. Microbiol. Biotechnol.* 14(4): 647–652.
- Situmorang, S.H. 2003. *Karakterisasi Enzim Kitinase Termostabil Isolat Bacillus licheniformis MB-2 dari Tompaso, Sulawesi Utara Menggunakan Teknik Zimogram.* Skripsi. Jurusan Teknologi Pangan dan Gizi, Fakultas Teknologi Pertanian, IPB, Bogor.
- Splinder, K.D. 1997. Chitinase and chitosanase assays. In Muzzarelli, R.A.A. and Peter, M.G. (eds.). *Chitin Handbook*. Italy: Atec Grottammare. p. 229–235.
- Suhartono, M.T. 1989. *Enzim dan Bioteknologi*. Depdikbud. Ditjen Dikti-PAU. IPB, Bogor. p. 53–102.
- Tanaka, T., Fujiwara, S., Nishikori, S., Fukui, T., Takagi Masahiro, and Imanaka, T. 1999. A unique chitinase with dual active site and triple substrate binding sites from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus kodakaraensis* KOD1. *J. Applied. Environ. Microbiol.* 65(12): 5338–5344.
- Thatte, M.R. 2004. *Synthesis and Antibacterial Assessment of Water-soluble Hydrophobic Chitosan Derivatives Bearing Quaternary Ammonium Functionality*. PhD. Disertation. Lousiana State University, LA. 126 pp.
- Thompson, S.E., Smith, M., Wilkinson, M.C, and Peek, K. 2001. Identification and Characterization of a Chitinase Antigen from *Pseudomonas aeruginosa* Strain 385. *J. Applied. Environ. Microbiol.* 67(9): 4001–4008.
- Tokuyasu, K., Kaneko, S., Hayashi, K., and Mori, Y. 1999. Production of recombinant chitin deacetylation in the culture medium of *Escherichia coli* cells. *J. FEBS.* 458: 23–26.
- Uria, A.R. and Chasanah, E. 2005. *Chitinase and Chitosanase from Microorganism Associated with Marine Sponge*. Dipresentasikan pada the 9th of ASEAN Food Conference in Jakarta.
- Wang, S.L. and Chang, W.T. 1997. Purification and characterization of two bifunctional chitinase/lysozymes extracellularly produced by *Pseudomonas aeruginosa* K-187 in a shrimp and crab shell powder medium. *J. Applied. Environ. Microbiol.* 63(2): 380–386.
- Zilda, D.S. and Chasanah, E. 2005. *Screening of Chitinolytic Bacteria from Terasi*. Dipresentasikan pada the 9th of ASEAN Food Conference di Jakarta.