

Kemampuan Kitinase *Streptomyces* RKt5 sebagai Antijamur terhadap Patogen *Fusarium oxysporum*

Yurnaliza^{1*)}, Sebastian Margino²⁾ dan Langkah Sembiring³⁾

¹⁾Departemen Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Sumatera Utara, Medan 20155

²⁾Fakultas Pertanian, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta 55281

³⁾Fakultas Biologi, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta 55281

Diterima 11-05-2010

Disetujui 11-05-2011

ABSTRACT

The purpose of the reasearch is to determine of antifungal activity from chitinase from *Streptomyces* RKt5 to inhibit growth of *Fusarium oxysporum*. The chitinase of *Streptomyces* RKt5 produced in liquid chitin medium with optimum conditions (inoculum concentration, pH and incubation time) and then partially purified with ammonium sulphate. The enzyme products were tested the antifungal activity against *F.oxysporum*. The results showed that mycelial growth of *F.oxysporum* can be inhibited by *Streptomyces* RKt 5 in dual culture test. The partial purified chitinase enzyme couldn't inhibit the fungal growth. But if the mycellium fragmented, the enzyme could degrade the fungal cell wall in incubation time. The frequency of fungal cell wall lysis and levels of N-acetylglucosamine released that have been increasing along with the length of incubation time.

Keywords: antifungal, chitinase, *Fusarium oxysporum*, *Streptomyces* RKt5

PENDAHULUAN

Kitinase merupakan enzim hidrolitik yang dapat mendegradasi kitin yaitu polimer dari b-1,4 N-setil-D-glukosamin. Senyawa ini terdapat melimpah di alam dan dapat ditemukan pada kerangka insekta, krustase dan dinding sel jamur (Nwe *et al.* 2011). Proses degradasi kitin di alam dilakukan oleh beberapa jenis jamur, bakteri, aktinomisetes dan tumbuhan (Matsumoto 2006). Kitinase adalah enzim kompleks yang umumnya terdiri dari beberapa jenis enzim yang dibedakan berdasarkan kerjanya yaitu endokitinase (EC. 3.2.1.14), eksokitinase dan b-1,4-N-asetilglukosamidase (EC. 3.2.1.30) (Sahai & Manocha 1993). Kitinase juga dikelompokkan berdasarkan urutan asam aminonya dan dibagi atas tiga famili yaitu famili 18, 19 dan 20. Famili 18 meliputi kitinase dari bakteri, jamur, serangga, tanaman (kelas III dan V) dan hewan. Famili 19 diidentifikasi dari tanaman (kelas I, II, dan IV) dan bakteri gram positif *Streptomyces*, sedangkan famili 20 dari *Vibrio harveyi* (Watanabe *et al.* 1999; Patil *et al.* 2000).

Mikroorganisme kitinolitik saat ini banyak diteliti terutama kemampuannya sebagai agen pengendali hayati penyakit tumbuhan terutama yang disebabkan oleh jamur patogen (Shaikh & Deshpande 1993; Patil *et al.* 2000; Gohel *et al.* 2006). Jamur umumnya memiliki dinding sel yang mengandung senyawa kitin. Kehadiran mikroorganisme kitinolitik di tanah terutama pada rhizoplane dan filoplane

tanaman dapat melindungi tanaman dari infeksi jamur. Kitin yang terdapat pada dinding sel jamur patogen dapat didegradasi atau dilisiskan oleh mikroorganisme kitinolitik sehingga mengurangi terjadinya infeksi penyakit.

Kitin yang terdapat pada dinding sel jamur terikat bersama komponen dinding sel lainnya seperti glukukan, mannan dan protein. Jumlah kitin pada dinding sel jamur tidak sama untuk setiap jenis. Secara umum kandungan kitin dan kitosan pada spesies jamur berbeda bervariasi dari 2-60% berat kering miselium. Kandungan kitin juga bervariasi diantara jenis dalam genus yang sama (Knezevic-Jugovic *et al.* 2011). Jamur kelas *Ascomycetes*, *Zygomycetes*, *Basidiomycetes* dan *Deuteromycetes* umumnya mengandung kitin. Sedangkan Kelas *Oomycetes* dominan glukukan. Kitin pada jamur berbentuk mikrofibril yang memiliki panjang berbeda tergantung pada spesies dan lokasi selnya. Mikrofibril merupakan penyusun utama struktur dinding sel jamur dan terdiri dari rantai-rantai polisakarida yang saling bersilangan membentuk anyaman. Polimer lain penyusun dinding sel jamur seperti glukukan, mannan dan protein ikut memperkokoh struktur dinding sel jamur (Knezevic-Jugovic *et al.* 2011).

Mikroorganisme dengan kemampuan kitinolitik diyakini mampu berperan mengendalikan serangan jamur perusak tanaman dengan menjadikan kitin sebagai sumber karbon dan nitrogen (Gohel *et al.* 2006; Kamil *et al.* 2007).

Beberapa kelompok bakteri dan jamur dengan kemampuan kitinolitik dipakai dalam mengendalikan patogen tanaman seperti *Bacillus* (Huan *et al.* 2005), *Enterobacter* (Chernin *et al.* 1995), jamur *Trichoderma* (Harjono & Widyastuti 2001; Harighi *et al.* 2007) dan *Streptomyces* (Sadeghi *et al.* 2006). Prapagdee *et al.* (2008), menyatakan bahwa *S. hygroscopicus* secara *in vitro* bersifat antagonis terhadap *Colletotrichum gloeosporioides* and *Sclerotium rolfsii* dan menghambat pertumbuhan jamur patogen dengan aktivitas enzim hidrolitik seperti kitinase dan glukanas.

Pada penelitian sebelumnya telah ditemukan isolat *Streptomyces* RKt 5 yang diisolasi dari rizosfer kacang tanah dengan kemampuan kitinolitik tinggi (Yurnaliza *et al.* 2003). Bakteri ini menghasilkan enzim kitinase dengan aktivitas optimum pada pH 5,5 dan suhu 50°C (Yurnaliza *et al.* 2008). Kemampuan antijamur bakteri ini akan diujikan terhadap jamur *Fusarium oxysporum*. Jamur ini merupakan patogen asal tanah yang penting secara ekonomi, karena dapat menyebabkan busuk dan layu *Fusarium* pada akar, batang dan kecambah pada lebih dari 100 jenis tanaman. Pengendalian penyakit ini sulit dilakukan karena jamur dapat bertahan lama di tanah sebagai saprofit. Maka pada penelitian ini akan dikaji kemampuan *Streptomyces* RKt5 sebagai antijamur terutama dalam melisis dinding sel jamur *Fusarium oxysporum*.

BAHENDAN METODE

Biakan *Streptomyces* RKt-5 (Yurnaliza *et al.* 2003). Jamur patogen uji yaitu *Fusarium oxysporum* isolat bawang merah. Jamur ini disimpan pada biakan miring medium Potato Dekstrosa Agar (PDA). Enzim kitinase dari *Streptomyces* RKt 5 diproduksi pada medium kitin cair yang mengandung garam minimal dan 0,2 % koloidal kitin (Hsu & Lockwood 1975). Medium mineral dalam setiap liter nya terdiri dari 0,7 g K_2HPO_4 ; 0,3 g KH_2PO_4 ; 0,5 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; 0,01 g $FeSO_4 \cdot 7H_2O$; 0,001 g $ZnSO_4$; 0,001 g $MnCl_2$. Koloidal kitin dipreparasi dari *Chitin Shrimp shells* (Sigma) secara hidrolisis parsial menggunakan HCl 10 N (Labeda & Shearer 1990).

Produksi Kitinase. Produksi kitinase dilakukan menurut Yurnaliza *et al.* (2008), dengan penambahan 5% (v/v) starter, pH medium 6,8 dan suhu ruang selama 72 jam. Pemanenan enzim dilakukan dengan sentrifugasi pada 4000 rpm selama 20 menit pada suhu 4°C. Supernatan dipresipitasi dengan ammonium sulfat pada kejenuhan 70% (b/v). Presipitat didialisis semalam pada suhu 4°C menggunakan 10 mM buffer fosfat pH 6,8 dalam kantong

dialisis dengan membran yang mempunyai *molecular weight cut off* 12.000 (Sigma). Satu unit aktivitas enzim kitinase didefinisikan sebagai jumlah enzim yang membebaskan sebanyak μmol NAG/jam. N-asetilglukosamin (NAG) yang dihasilkan dianalisis secara kolorimetri menurut metode Reissig (1955), (Muzarelli & Peter 1997). Penentuan jumlah protein terlarut ditentukan dengan metode Lowry (Plummer 1978).

Uji Antagonis antara Bakteri *Streptomyces* RKt 5 dan *F.oxysporum*. Uji antagonis dilakukan untuk melihat kemampuan bakteri *Streptomyces* RKt5 menghambat pertumbuhan jamur *F.oxysporum* pada kondisi terinduksi kitin. Pada bagian tengah cawan petri yang berisi media kitin agar, ditumbuhkan jamur *F.oxysporum*. Pada kedua sisi koloni jamur dengan jarak yang sama, diinokulasi biakan *Streptomyces* RKt 5. Zona jernih di sekeliling koloni *Streptomyces* RKt 5 menunjukkan terjadinya hidrolisis kitin. Jamur *F.oxysporum* yang tumbuh pada tengah cawan petri akan berinteraksi dengan zona hidrolisis dan koloni *Streptomyces* RKt5. Interaksi yang terjadi antara bakteri *Streptomyces* RKt5 dan jamur *F.oxysporum*, diamati secara visual, dan dideskripsikan secara kualitatif. Inkubasi dilakukan sampai 21 hari dan dicatat perubahan yang terjadi pada pertumbuhan jamur *F.oxysporum*.

Uji kemampuan antijamur enzim kitinase. Uji kemampuan antijamur enzim kitinase ditentukan berdasarkan adanya penghambatan-pemanjangan miselium jamur *F.oxysporum* saat terjadi kontak dengan enzim kitinase (Bormann *et al.* 1999). Pada pinggir miselium jamur umur 3 hari di medium PDA, diletakkan cakram kertas yang telah direndam cairan enzim hasil purifikasi (konsentrasi 8,92 mg prot/ml) dengan jarak 1 cm dari pinggir koloni jamur. Kontrol digunakan cakram kertas yang direndam dengan akuades steril. Hambatan pemanjangan miselium *F. oxysporum* yang mengarah ke cakram yang berisi enzim dan akuades (kontrol) diamati secara visual setelah 12 jam inkubasi pada suhu kamar.

Lisis dinding sel jamur *Fusarium oxysporum*. Kemampuan enzim kitinase dalam melisis dinding sel jamur ditentukan dengan melihat perubahan yang terjadi pada miselium jamur setelah dicampur dengan enzim kitinase. Miselium jamur *F. oxysporum* ditumbuhkan dalam medium PDB selama 5 hari pada suhu 30°C. Miselium dipanen dan disaring dengan kertas saring *Whatman* No. 1, kemudian dicuci dengan akuades steril beberapa kali. Miselium dipotong menggunakan *waring blender* selama 15 detik pada kecepatan lambat (*low speed*), dan kemudian

disentrifus selama 10 menit pada 4000 rpm. Pelet miselium dicuci kembali dengan akuades steril dan disuspensikan ke dalam 50 mM buffer sitrat (pH 5,5) yang mengandung 100 mM NaCl dan NaN_3 0,05%. Suspensi miselium dan enzim kitinase (konsentrasi 8,92 mg prot/ml) dicampur dengan perbandingan 1:1 dan diinkubasi pada suhu 35°C (Singh *et al.* 1999). Perubahan yang terjadi pada miselium diamati dengan menggunakan mikroskop cahaya perbesaran 400 kali, setelah inkubasi 1, 2, 4 dan 6 jam. Kontrol adalah miselium jamur yang tanpa perlakuan enzim. Miselium jamur diwarnai dengan *laktofenol blue*. Kadar N asetil glukosamin yang dibebaskan dari dinding sel jamur ditentukan secara kolorimetri dengan metode Reissig (1955), (Muzarelli & Peter 1997).

HASIL DAN PEMBAHASAN

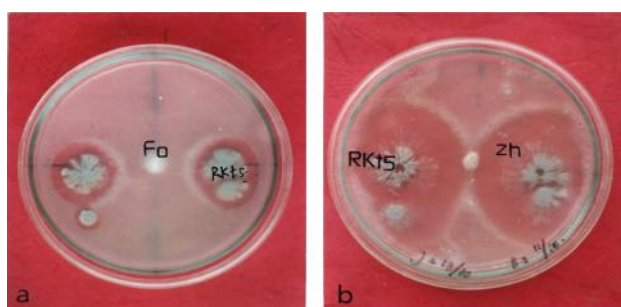
Produksi kitinase pada kondisi optimal dengan penambahan 5% (v/v) starter, pH medium 6,8 pada suhu ruang selama 72 jam, dihasilkan kitinase dengan aktivitas spesifik 2,13 U/mg⁻¹. Pada purifikasi secara parsial dilakukan aktivitas spesifik enzim ini meningkat sebanyak 3,13 kali kemurniannya dibandingkan dengan aktivitas spesifik enzim kasarnya.

Hasil uji antagonis antara *Streptomyces* Rkt-5 dan jamur *F. oxysporum* pada medium kitin agar (Gambar 1) menunjukkan adanya hambatan pertumbuhan jamur. Pengamatan dilakukan pada waktu inkubasi 14 hari dan 21 hari. Pada 14 hari hambatan pertumbuhan miselium jamur terdapat di sekeliling koloni *Streptomyces* Rkt5 (Gambar 1a) dan pada 21 hari hambatan pertumbuhan menjadi semakin besar (Gambar 1b). Hambatan pertumbuhan miselium jamur *F.oxysporum* diduga tidak hanya disebabkan oleh enzim kitinase, melainkan juga karena enzim dan metabolit lain yang juga dihasilkan oleh *Streptomyces* Rkt5.

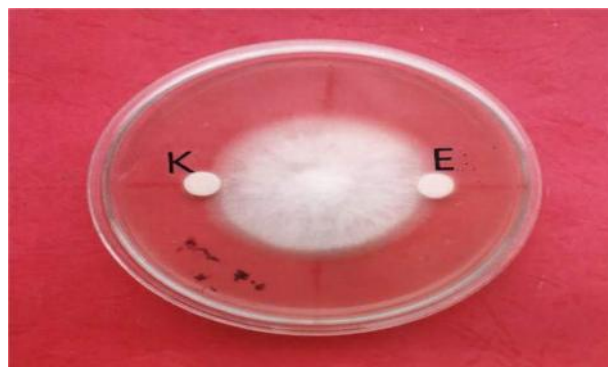
Pada uji kemampuan antijamur enzim kitinase hasil purifikasi parsial terhadap miselium jamur *F. oxysporum*, tidak

ditemukan adanya perubahan pada pertumbuhan jamur. Pada Gambar 2, dapat dilihat bahwa tidak ada perbedaan nyata antara pertumbuhan miselium jamur pada kedua sisi cakram yang ditetesi enzim kitinase (E) dan kontrol (K). Enzim kitinase yang diujikan tidak dapat menghambat pertumbuhan koloni jamur. Ada dua kemungkinan yang menyebabkan hal ini terjadi, pertama adalah komposisi dinding sel dari jenis jamur uji yang digunakan dan kedua konsentrasi enzim kitinase yang digunakan untuk uji.

Jamur *F. oxysporum* dibandingkan jamur patogen lainnya lebih tahan terhadap lisis. Sivan dan Chet (1989), melaporkan bahwa dua isolat *Trichoderma harzianum* gagal mendegradasi jamur *F. oxysporum* dibandingkan dengan jamur lain dari kelas Ascomycetes dan Basidiomycetes seperti *Rhizoctonia solani* dan *Sclerotium rolfsii*. Padahal jamur ini mampu menghasilkan enzim kitinase dan b-1,3 glukanas ke dalam medium jika ditumbuhkan pada medium yang mengandung kitin dan laminarin. Ia berpendapat bahwa beberapa protein dan lipid yang melapisi dinding sel menghalangi aktivitas enzim kitinase. Penelitian Kamel *et al.* (1993), menggunakan miselium jamur *F. oxysporum* dan *Rhizoctonia solani* yang sama-sama diperlakukan dengan enzim kitinase selama 5 menit menunjukkan bahwa miselium jamur *F. oxysporum* juga lebih tahan terhadap pengaruh enzim tersebut dibandingkan dengan jamur *R. solani*. Berbeda dengan penelitian yang dilakukan oleh Harjono dan Widyastuti (2001); Harighi *et al.* (2007), yang masing masing mengujikan kemampuan antijamur kitinase murni dari *Trichoderma atroviride* PTTC5220 dan *Trichoderma resei* terhadap jamur *Rhizoctonia solani* dan *Ganoderma philippii*. Hasil penelitian menunjukkan bahwa kitinase murni yang diujikan mampu menghambat pertumbuhan miselium jamur uji. Enzim endokitinase murni dari *Trichoderma resei* pada konsentrasi 100-200 µg/ml, dapat melisis ujung hifa *G.philippii*.



Gambar 1 Aktivitas antijamur *Streptomyces* Rkt5 terhadap pertumbuhan miselium jamur *F.oxysporum* pada media kitin agar pada inkubasi 14 (a) dan 21 hari (b). Zh (zona lisis), Fo (*F.oxysporum*), Rkt5 (*Streptomyces* Rkt5)



Gambar 2 Aplikasi enzim kitinase hasil purifikasi parsial (E) dan akuades steril (K) terhadap pemanjangan miselium jamur *F. oxysporum*

Pengujian kemampuan antijamur enzim kitinase pada jenis jamur yang berbeda memberikan hasil yang berbeda. Jamur *F.oxysporum* memang lebih tahan terhadap kitinase karena komposisi dinding selnya berbeda dengan jamur *R.solani* atau *Ganoderma*. Schoffemeer *et al.* (1999), menyatakan bahwa komposisi dinding sel dari jamur *F.oxysporum* pada lapisan luar terdapat senyawa glikoprotein yang melindungi permukaan miselium. Sementara kitin dan glukukan terdapat pada lapisan dalam. Kandungan glikoprotein pada dinding sel sebanyak 50-60% dari total massa dinding sel, dimana dari hasil analisis gula yang terdapat pada dinding sel dari tiga forma spesialis *F.oxysporum* menunjukkan bahwa jamur ini tidak hanya mengandung glukosa dan (N-asetil) glukosamin tetapi juga mannanosa, galaktosa dan asam uronik yang diduga berasal dari glikoprotein dinding sel.

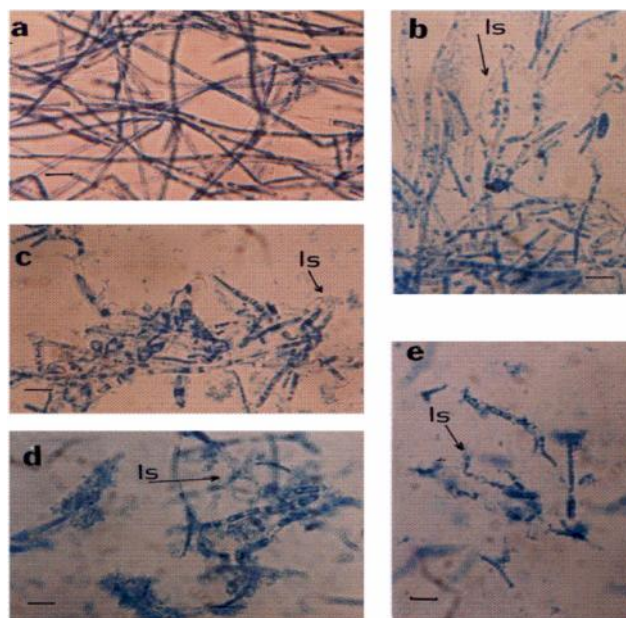
Kitinase dalam aktivitas penghambatannya membutuhkan enzim lain yang bekerja simultan dalam menghambat pertumbuhan jamur uji. Hambatan pertumbuhan terjadi pada miselium jamur yang ditumbuhkan bersama dengan *Streptomyces* RKt5 pada media yang mengandung kitin. Kitin yang ditambahkan menginduksi enzim kitinase dan juga *Streptomyces* RKt5 mengaktifkan enzim-enzim hidrolitik lainnya untuk menghambat pertumbuhan jamur. Penjelasan dari fenomena ini adalah kitinase aktinomisetes akan lebih efektif menghambat pertumbuhan jamur *F.oxysporum* jika terdapat bersama-sama dengan mikroorganisme penghasilnya dalam keadaan terinduksi kitin.

Miselium jamur yang utuh sulit untuk ditembus oleh kitinase murni, dan aktivitas enzim ini akan efektif jika miselium jamur yang diujikan telah berada dalam bentuk potongan-potongan. Enzim kitinase mampu melisiskan potongan dinding sel jamur *F.oxysporum* yang diberikan dengan konsentrasi yang sama dengan pengujian sebelumnya. Secara mikroskopis miselium jamur yang terpapar kitinase menunjukkan perubahan bentuk jika dibandingkan dengan miselium yang hanya ditetesi akuades steril. Fragmentasi miselium *F.oxysporum* diamati mulai sejak inkubasi 1 sampai 6 jam. Miselium jamur pada awalnya panjang-panjang dan utuh (Gambar 3a), setelah 1 jam mulai terpotong menjadi bagian yang lebih pendek (Gambar 3b). Potongan miselium jamur yang diinkubasi selama 2 jam (Gambar 3c) lebih pendek dibanding pada miselium yang diinkubasi 1 jam dan yang diinkubasi selama 4 jam (Gambar 3d) lebih pendek dari yang diinkubasi 2 jam, demikian seterusnya sampai waktu inkubasi 6 jam. Semakin lama waktu inkubasi, ukuran miselium jamur *F.oxysporum*

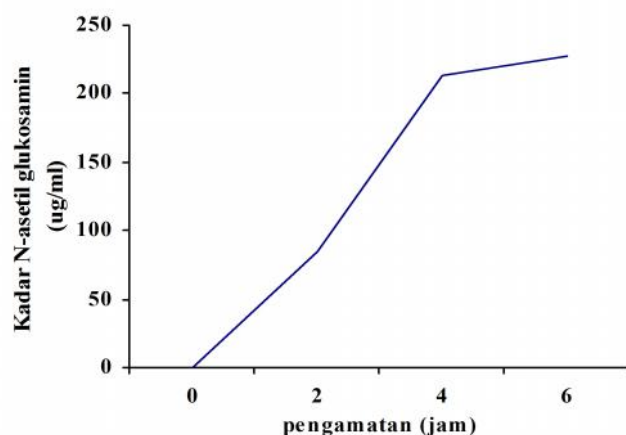
menjadi semakin pendek dan sedikit. Hampir seluruh bagian miselium jamur menjadi hancur dan lisis pada waktu inkubasi 6 jam (Gambar 3e).

Terjadinya lisis pada dinding sel jamur *F.oxysporum* ditandai dengan meningkatnya jumlah NAG pada medium. Pada inkubasi 2 jam dibebaskan sebanyak 84,30 µg/ml NAG, dan meningkat terus pada jam ke-4 dan 6 menjadi sebanyak 213,63 µg/ml dan 227,78 µg/ml (Gambar 4). NAG yang terdapat pada medium berasal dari miselium jamur yang melisis.

Kitinase melisiskan dinding sel miselium yang telah dipotong-potong dengan blender. Kitin pada dinding sel dengan mudah dirombak. Protein dan lemak tidak menghalangi masuknya enzim ke bagian dinding miselium



Gambar 3 Perubahan miselium jamur *F.oxysporum* yang diperlakukan dengan kitinase. a) kontrol tanpa pemberian kitinase, b) perubahan miselium setelah waktu inkubasi 1 jam, c) 2 jam, d) 4 jam dan e) 6 jam. (Perbesaran 400 x. Bar = 20 µm. (ls) miselium yang lisis. Pewarnaan laktofenol blue



Gambar 4 Kadar NAG yang dibebaskan ke dalam medium selama terjadi lisis dinding sel jamur *F.oxysporum* oleh kitinase

yang mengandung kitin. Dinding-sel yang melisis dan ditemukannya NAG pada medium membuktikan dugaan ini. Hal yang sama dibuktikan oleh Singh *et al.* (1999), dengan menambahkan enzim kitinase dari *Streptomyces* sp. 385 pada miselium jamur *F. oxysporum* f. sp *cucumerinum* dan ke dalam medium juga ditemukan adanya NAG yang dibebaskan selama proses berlangsung.

SIMPULAN

Kitinase *Streptomyces* RkT 5 bersifat antijamur dan mampu melisis dinding sel dari potongan miselium jamur *Fusarium oxysporum*. Kemampuan antijamur dari kitinase *Streptomyces* RkT5 akan efektif jika mikrobial kitinolitik langsung berinteraksi dengan jamur patogen pada keadaan terinduksi kitin.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih ditujukan kepada Program BPPS Dikti Departemen Pendidikan Nasional atas bantuan dana yang diberikan selama melaksanakan penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Bormann, C., Baier, D., Ho, I., Raps, C., Berger, J., Jung, G. & Schwarz, H. 1999. Characterization of a novel, antifungal, chitin-binding protein from *streptomyces tendae* Tu⁹⁰¹ that interferes with growth polarity. *J. Bacteriol* **181**(24): 7421–7429.
- Chernin, L., Ismailov, Z., Haran, S. & Chet, I. 1995. Chitinolytic *enterobacter agglomerans* antagonistic to Fungal Plant Pathogens. *Appl. Environ. Microbiol* **61**(5): 1720–1726.
- Gohel, V., Singh, A., Vimal, M., Ashwini, P. & Chhatpar, H.S. 2006. Review. Bioprospecting and antifungal potential Chitinolytic microorganisms. *African J. of Biotechnology* **5**(2): 54-72.
- Harighi, M.J., Zamani, M.R. & Motallebi, M. 2007. Evaluation of antifungal activity of purified chitinase 42 from *trichoderma atroviride* PTCC5220. *Biotechnology* **6**(1): 28-33.
- Harjono & Widyastuti, S.M. 2001. Antifungal activity of purified endochitinase produces by biocontrol agent *trichoderma reesei* against *ganoderma philippii*. *Pakistan Journal of Biological Sciences* **4**(10): 1232-1234.
- Hsu, S.C. & Lockwood, J.L. 1975. Powdered chitin agar as a selective medium for enumeration of actinomycetes in water and Soil. *Appl. Microbiol* **29**: 422-426.
- Huan, C.-J., Wang, T.-K., Chung, S.-C. & Chen, C.-Y. 2005. Identification of an antifungal chitinase from a potential biocontrol agent, *Bacillus cereus* 28-9. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology* **38**(1): 82-88.
- Kamel, Z., Heikel, N. & Fahmy, F. 1993. Extracellular chitinase from *streptomyces* species and its antifungal activity. *Acta Pharmaceutica Turcica* **35**: 135-143.
- Kamil, Z., Rizk, M., Saleh, M. & Moustafa, S. 2007. Isolation and identification of rhizosphere soil chitinolytic bacteria and their potential in antifungal biocontrol. *Global Journal of Molecular Sciences* **2**(2): 57-66.
- Knezevic-Jugovic, Z., Petronijevic, Z. & Smelcerovic, A. 2011. Chitin and Chitosan from Microorganisms. In: Kim S-K (Ed) *Chitin, Chitosan, Oligosaccharides and Their Derivatives: Biological Activities and Applications*. New York: CRC Press Taylor and Francis Group.
- Labeda, D.P. & Shearer, M.C. 1990. *Isolation of Actinomycetes for Biotechnological Applications*. In: D.P. Labeda (Ed.) *Isolation of Biotechnological Organisms from Nature*: McGraw-Hill Publishing Company.
- Matsumoto, K.S. 2006. Fungal Chitinases, In : Guevara-Gonzales R.G and Torres-Pacheco I (Eds). *Advances in Agricultural and Food Biotechnology*. Reseach Signpost, India. 289-304.
- Muzarelli, R.A.A. & Peter (Eds), M.G. 1997. *Chitin Handbook*. European Chitin Society.
- Nwe, N, Furuike, T., & Tamu H. 2011. Chitin and Chitosan from Terrestrial Organisms. In; Kim S-K (Ed) *Chitin, chitosan, oligosaccharides and their derivatives : biological activities and applications*. New York: CRC Press Taylor & Francis Group.
- Patil, R.S., Ghormade, V. & Deshpande, M.V. 2000. Chitinolytic enzymes: an exploration. *Enzyme and Microbial Technology* **26**: 473-483.
- Plummer, D.T. 1978. *An Introduction to Practical Biochemistry*. 2nd Ed. Tata Mc Graw-Hill Publishing Company Ltd., New Dehli.
- Prapagdee, B., Kuekulvong, C. & Mongkolsuk, S. 2008. Antifungal potential of extracellular metabolites produced by *Streptomyces hygrosopicus* against phytopathogenic fungi. *Int. J. Biol. Sci* **4**(5): 330-337.
- Sadeghi, A.A.R., Hessian, H., Askari, S., Aghighi & Bonjar, G.H.S. 2006. Biological control potential of two *streptomyces* isolates on *rhizoctonia solani*, the causal agent of damping-off of sugar Beet. *Pakistan Journal of Biological Sciences* **9**(5): 904-910.
- Sahai, A.S. & Manocha, M.S. 1993. Chitinases of fungi and plants: their involvement in morphogenesis and host-parasite interaction. *FEMS Microbiol. Rev* **11**: 317-338.
- Schoffemeer, E.A.M., Klis, F.M., Sietsma, J.H. & Cornelissen, B.J.C. 1999. The cell wall of *fusarium oxysporum*. *Fungal Genet Biol* **27**: 275–282.
- Shaikh, S.A. & Deshpande, M.V. 1993. Review. Chitinolytic enzymes : Their contribution to basic and applied research. *world J. Microbiol. Biotech* **9**: 468-475.
- Singh, P.P., Shin, Y.C., Park, C.S. & Chung, Y.R. 1999. Biological control of *fusarium* wilt of cucumber by chitinolytic bacteria. *Phytopathology* **89**: 92-99.
- Sivan, A. & Chet, I. 1989. Degradation of fungal cell walls by lytic enzymes of *Trichoderma harzianum*. *J. Gen. Microbiol* **135**: 675-682.
- Yurnaliza, Margino, S. & Sembiring, L. 2003. Isolasi aktinomisetes kitinolitik dari rhizosfer dan kompos. *Komunikasi Penelitian* **15**(2): 27-35.
- Yurnaliza, Margino, S. & Sembiring, L. 2008. Kondisi optimum untuk produksi kitinase dari *streptomyces* RkT5 dan karakterisasi pH dan suhu enzim. *Biota*, **13**(3): 169-174.
- Watanabe, T., Kanai, R., Kawase, T., Tanabe, T., Mitsutomi, M., Sakuda, M. & Miyashita, K. 1999. Family 19 chitinases of *streptomyces* species : characterization and distribution. *Microbiol* **145**: 3353-3363.