

**OPTIMASI HIDROLISIS MEDIA PRODUKSI CANGKANG
UDANG MENGGUNAKAN KITINASE *SERRATIA
MARCESCENS* KAHN.15.12 TERHADAP KADAR N-ASETIL
GLUKOSAMIN SEBAGAI BAHAN SEDIAAN
SUPLEMEN OSTEOARTRITIS**

Siti Nur Azizah* , Rosida

Akademi Farmasi Jember

*E-mail: azizah.ariza@gmail.com

ABSTRAK

Limbah cangkang udang mengandung kitin yang tinggi yaitu sekitar 17-40%. Kitin tersebut dapat digunakan sebagai substat pertumbuhan bakteri kitinolitik yaitu *S.marcescens* KAHN 15.12. Bakteri tersebut akan mensekresikan enzim kitinase untuk mendegradasi kitin sebagai media pertumbuhannya hingga menghasilkan monomer N-asetil glukosamin (GlcNac). N-asetil glukosamin dapat dimanfaatkan sebagai bahan sediaan suplemen osteoarthritis. Penelitian ini bertujuan untuk memproduksi GlcNac hasil hidrolisis kitin cangkang udang menggunakan kitinase *Serratia marcescens* KAHN.15.12. Hasil konfirmasi aktivitas kitinolitik menggunakan media selektif yaitu agar koloidal kitin 0,3% menunjukkan bahwa *Serratia marcescens* KAHN 15.12 memiliki index kitinolitik sebesar 2,3 yang ditunjukkan dengan adanya zona bening disekitar koloni. Hasil optimasi perbedaan konsentrasi media produksi menunjukkan bahwa tepung cangkang udang 2% menghasilkan kadar GlcNac tertinggi yaitu sebesar 376,35 µg/ml setelah diuji dengan metode kolorimetri menggunakan reagen shcales pada panjang gelombang 420nm. Berdasarkan hasil tersebut menunjukkan bahwa setiap hidrolisis 1 gram tepung cangkang udang yang mengandung 18,7% kitin akan menghasilkan sebesar 70,54 mg GlcNac.

Kata Kunci: N-asetil glukosamin, kitinase, *Serratia marcescens*

PENDAHULUAN

Osteoarthritis (OA) merupakan penyakit sendi dan termasuk dalam empat kondisi penyakit otot dan tulang. Osteoarthritis menyebabkan berkurangnya kemampuan gerak pasien dan timbulnya rasa nyeri sehingga secara keseluruhan akan menurunkan kualitas hidup pasien. Lebih dari 70% penduduk dunia berusia diatas 65 tahun menderita OA (WHO, 2007; EFSA, 2009). Namun OA juga terjadi pada usia sebelum 45 tahun. Penyakit OA akan semakin meningkat seiring dengan bertambahnya usia dan tingkat obesitas. Saat ini, terapi medis pada pasien OA difokuskan pada

terapi nyeri sendi, yaitu penggunaan analgesik dan anti inflamasi non steroid (NSAID), namun penggunaan bahan tersebut masih memiliki efektivitas yang kurang optimal (Felson, 2006) bahkan menyebabkan risiko munculnya masalah yang berkaitan dengan obat. Kombinasi NSAIDs dengan obat lain seperti analgesic opioid dan glukosamin sangat dianjurkan sebagai diet suplemen glukosamin.

Glukosamin atau N-asetilglukosamina (GlcNac) merupakan senyawa gula amino yang secara alami ditemukan secara luas pada tulang rawan dan berperan penting untuk kesehatan

dan kelenturan sendi (Anderson et al., 2004). Kemampuan tubuh untuk mensintesis glukosamin akan mengalami penurunan seiring dengan bertambahnya umur. Hal ini disebabkan berkurangnya kemampuan proteoglikan untuk memproduksi glukosamin, sehingga akan menyebabkan OA (Santhosh dan Mathew, 2008). Glukosamin terbukti dapat menstimulasi produksi tulang rawan dan menghambat enzim yang menghancurkan tulang rawan (Clegg et al., 2006). Sehingga penambahan glukosamin sebagai suplemen dapat merangsang sel-sel tulang rawan dalam pembentukan proteoglikan dan kolagen sebagai protein esensial penyusun tulang rawan sehingga memperbaiki fungsi persendian. Glukosamin dapat diperoleh melalui hidrolisis kitin (Shantosh et al., 2007).

Kitin adalah suatu homopolimer β -1,4 dengan monomer glukosamin (Patil et al., 2000). Kitin secara alami tersebar luas pada eksoskeleton serangga, dinding cendawan, dan cangkang udang (Bhattacharya et al., 2007). Produksi udang di Indonesia yang semakin meningkat setiap tahunnya, juga menyebabkan peningkatan pada limbah udang yang dihasilkan berupa cangkang, kepala dan ekor sekitar 35-40% (Badan Pusat Statistik, 2008). Saat ini, sebagian besar limbah kulit udang masih dimanfaatkan secara tradisional yang nilai ekonomisnya masih tergolong rendah, padahal kulit udang mengandung kitin yang cukup tinggi yaitu sekitar 17-40% (Kurita, 2006). Oleh karena itu *recovery process* sebagai teknologi alternatif perlu terus dilakukan, salah satunya memanfaatkan kitin pada cangkang udang tersebut sebagai substrat untuk produksi glukosamin. Shantosh dan Mathew (2007) menyatakan bahwa kitin merupakan salah satu produk bernilai ekonomis tinggi. Kitin dapat didegradasi secara enzimatik menggunakan kitinase

untuk produksi glukosamin (Tu et al., 2010; Lee dan Kim 2015).

Kitinase adalah enzim hidrolitik yang mendegradasi kitin. Kitinase banyak diaplikasikan dalam bidang industri dan pertanian (Patil et al., 2013). Kitinase dapat diproduksi oleh bakteri, fungi, insekta dan tanaman. Namun, produksi dan aplikasi kitinase dari bakteri lebih luas digunakan karena produksinya lebih mudah (Bhattacharya et al., 2007). Penelitian sebelumnya dilaporkan bahwa kitinase dari *Serratia marcescens* KAHN.15.12 memiliki suhu dan pH dengan kisaran luas yaitu 30-90 °C dan pH 4-9 serta memiliki stabilitas yang tinggi (Azizah et al., 2015). Karakteristik enzim tersebut sangat baik jika diaplikasikan dalam skala industri sebagai biokatalisator karena mampu stabil dalam berbagai kondisi lingkungan yang sering berubah dan mampu menghasilkan rendemen produk yang tinggi serta bersifat ramah lingkungan (Bhattacharya et al. 2007; Wang et al. 2014).

Namun saat ini, GlcNAc masih diproduksi secara kimia dengan konsentrasi asam dan temperatur tinggi. Proses tersebut mempunyai beberapa masalah seperti harga yang mahal, yield rendah (dibawah 65%) dan terdapat limbah asam. Oleh karena itu banyak perhatian lebih difokuskan untuk produksi GlcNAc menggunakan hidrolisis enzimatik (Jamialahmadi et al., 2011). Namun demikian masih belum ada laporan penggunaan kitinase dari mikroorganisme sebagai biokatalis kitin dari cangkang udang dalam produksi glukosamin sebagai bahan sediaan suplemen OA. Berdasarkan uraian tersebut, tujuan penelitian ini adalah produksi glukosamin dari kitin cangkang udang menggunakan kitinase *Serratia marcescens* KAHN.15.12

METODE PENELITIAN
Peremajaan *S.marcescens*
KAHN.15.12

Isolat bakteri kitinolitik yaitu *Serratia marcescens* KAHN.15.12 diperoleh dari IPB *Culture Collection*, Departemen Biologi, Institut Pertanian Bogor (Haryanto, 2013). Isolat tersebut di tumbuhkan pada media agar kitin (0.3% koloidal kitin, 0.1% MgSO₄.7H₂O, 0.02% K₂HPO₄, 0.1% yeast extract dan 1.5% bacto agar) pada 37°C selama 2 hari.

Konfirmasi morfologi makroskopis dan mikroskopis *S. marcescens*
KAHN.15.12

Karakter makroskopis dilakukan dengan cara mengamati morfologi koloni bakteri (bentuk koloni, elevasi, tepi dan struktur dalam koloni). Hasil pengamatan kemudian disesuaikan dengan petunjuk identifikasi menggunakan *Bergey's Manual of systematic bacteriology* oleh Vos *et al.* (2009).

Karakter mikroskopis dilakukan dengan pengecatan Gram. Sebanyak 1 ose isolat bakteri berumur 24 jam dilarutkan kedalam 5 ml aquades steril lalu divortek. Larutan tersebut kemudian diambil 100 µl dan diletakkan pada permukaan kaca objek kemudian difiksasi. Selanjutnya ditambahkan sebanyak 1-2 tetes kristal violet selama 1 menit dan dicuci dengan air mengalir. Pewarna kedua adalah ditambahkan 1 tetes iodine. Setelah 1 menit lalu dicuci dengan air mengalir. Pewarna ketiga adalah etil alkohol 95% selama 30 detik dan dicuci dengan air mengalir. Pewarna ketiga adalah safranin selama 2 menit dan dicuci dengan air mengalir, dikering anginkan, lalu diamati dengan mikroskop.

Konfirmasi aktivitas kitinolitik *S.marcescens* KAHN.15.12

Isolat bakteri diuji aktivitas kitinolitiknya menggunakan cara streak kuadran pada media agar kitin 0,3%. Kemudian diinkubasi pada 37°C selama 2 hari. Terbentuknya zona bening disekitar koloni tunggal menunjukkan adanya aktivitas kitinolitik. Kemudian index aktivitas kitinolitiknya dihitung dengan membandingkan antara diameter zona keseluruhan dengan diameter koloni (Azizah *et al.* 2015).

Pembuatan tepung cangkang udang dan koloidal kitin

Tepung cangkang udang digunakan sebagai media produksi GlcNAc. Cangkang udang yang terdiri dari kepala, cangkang dan ekor dicuci dengan air sampai bersih. Kemudian dioven pada suhu 50°C selama 24 jam sampai beratnya konstan. Cangkang udang yang sudah kering selanjutnya di haluskan menggunakan blender kemudian disaring menggunakan penyaring no 11.

Koloidal kitin digunakan sebagai substrat saat menguji kadar GlcNAc. Koloid kitin dibuat menurut metode Roberts dan Selitrennikoff (1988) dengan beberapa modifikasi. 5 gram bubuk kitin (sigma-aldrich co., USA) ditambahkan perlahan-lahan ke dalam 90 ml HCl terkonsentrasi dengan pengadukan selama 2 jam. Campuran ditambahkan ke 500 ml es dingin EtOH (95%) dengan pengadukan dan didiamkan semalaman pada 25 °C dan kemudian disimpan pada -20 °C. Selanjutnya disentrifugasi pada 6000 rpm selama 10 menit pada suhu 4 °C dan beberapa kali dicuci dengan penyangga sodium fosfat 0,1 M (pH 7,0) sampai pH alami. Kemudian kitin koloid dijaga pada kondisi 4 °C sampai digunakan.

Aktivitas kitinase dari *Serratia marcescens* KAHN.15.12

Sebanyak 2 lup bakteri diinokulasikan ke dalam 50 mL medium kitin cair dan diinkubasi selama 36 jam pada suhu 37 °C sambil dikocok pada kecepatan 120 rpm sebagai inokulum. Kemudian dari inokulum tersebut diambil 1 mL untuk diinokulasikan ke media koloidal kitin 0,3% 100 ml kemudian diinkubasi selama 54 jam. Kultur sel kemudian disentrifugasi selama 10 menit dengan kecepatan 6.000 rpm pada suhu 4 °C (Azizat el at., 2015). Supernatan merupakan crude enzim yang akan diuji konfirmasi aktivitas enzimnya menggunakan metode Spindler (1997).

Optimasi produksi glukosamin menggunakan media produksi tepung cangkang udang

Sebanyak 2 lup bakteri diinokulasikan ke dalam 50 mL medium kitin cair dan diinkubasi selama 36 jam pada suhu 37 °C sambil dikocok pada kecepatan 120 rpm sebagai inokulum (Azizat el at., 2013). Kemudian dari inokulum tersebut diambil 1 mL untuk diinokulasikan ke media produksi tepung cangkang udang 100 ml dengan konsentrasi bervariasi yaitu 1; 1,5; 2; 2,5; 3; 3,5; 4 dan 5%. Kemudian diinkubasi selama 24 jam. Kultur sel kemudian disentrifugasi selama 10 menit dengan kecepatan 6.000 rpm pada suhu 4 °C. Supernatan merupakan hasil fermentasi yang akan diuji kadar GlcNAc (Cahyani et al. 2014).

Analisis kadar GlcNAc

Analisis kadar glukosamin dilakukan dengan menggunakan metode Spindler (1997). Sebanyak 600 µL campuran diambil dan dididihkan pada 100 °C selama 10 menit dan didinginkan

selama 10 menit pada 4 °C. Setelah sentrifugasi pada 8400 g selama 5 menit, ditambahkan ke dalam akuades 500 µL dan 1000 µL reagen schales dan dididihkan kembali pada 100 °C selama 10 menit. Campuran kemudian diukur absorbansi pada panjang gelombang 420 nm. Kadar glukosamin diketahui dengan memplotkan hasil absorbansi sampel dengan kurva standar GlcNAc.

Efisiensi Hidrolisis kitin oleh *S.marcescens* KAHN.15.12

Tingkat efisiensi degradasi kitin oleh *S.marcescens* KAHN.15.12 merupakan prosentase rasio antara konsentrasi GlcNAc dengan konsentrasi substrat yang digunakan saat analisis kadar GlcNAc. nilai efisiensi degradasi kitin dihitung berdasarkan rumus sebagai berikut:

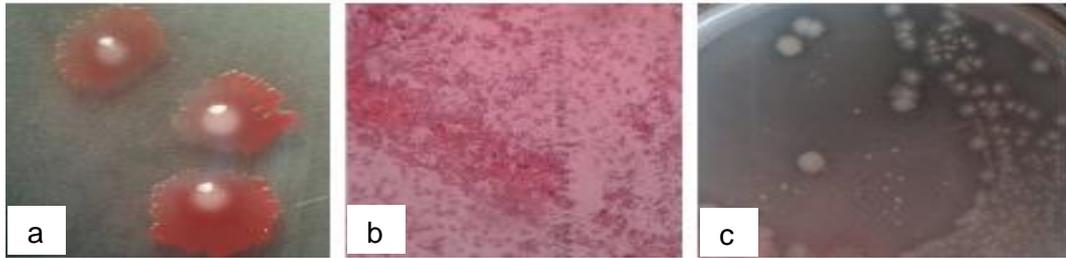
Rumus :

$$\frac{[\] \text{GlcNAc}}{[\] \text{Substrat koloidal kitin}} \times 100\%$$

HASIL PENELITIAN

Peremajaan dan kofirmasi aktivitas kitinolitik dari *S.marcescens* KAHN.15.12

Pengamatan morfologi dan sel *S.marcescens* KAHN.15.12 menunjukkan bahwa koloni berwarna merah dan mengkilat, bentuknya bulat, tepi koloni bergelombang, dan permukaannya menggunung. Morfologi sel menunjukkan bahwa bentuk sel cocobasil, berukuran 0,3 µm dan berwarna merah artinya bersifat Gram negatif (Gambar 1a dan 1b). Konfirmasi aktivitas kitinolitik *S.marcescens* KAHN.15.12 menunjukkan adanya zona bening disekitar koloni dengan index kitinolitik dan aktivitas enzim yang sama dengan penelitian sebelumnya (Gambar 1c dan Tabel 1).



Gambar 1. Morfologi *S.marcescens* KAHN.15.12 dan konfirmasi aktivitas kitinolitik. Koloni *S.marcescens* KAHN.15.12 pada media koloidal kitin dalam nutrisi agar berumur 48 jam (a) sel *S.marcescens* KAHN.15.12 menggunakan mikroskop pembesaran 10x (b) zona bening disekitar koloni *S.marcescens* KAHN.15.12 menggunakan media koloidal kitin agar (c)

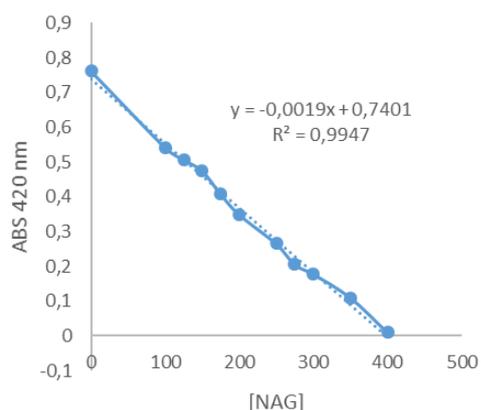
Tabel 1. Konfirmasi aktivitas kitinolitik dan aktifitas enzim kitinase

Isolat	Index kitinolitik	Aktivitas enzim kitinase (U)	Aktivitas spesifik (U/mg)
<i>S.marcescens</i> KAHN.15.12	2,3	1,116	140

Optimasi Produksi GlcNAc dari *Serratia marcescens* KAHN.15.12

Pengukuran kadar GlcNAc menggunakan hasil dari nilai regresi standar GlcNAc pada Gambar 2. Berdasarkan Gambar 3 menunjukkan bahwa *Serratia marcescens* KAHN.15.12 mampu tumbuh pada substrat tepung cangkang udang. Konsentrasi tepung cangkang udang

yang bervariasi merupakan substrat pertama untuk pertumbuhan bakteri yang mempengaruhi kadar GlcNAc. Konsentrasi substrat 2 % menghasilkan kadar GLCNAC optimal yaitu 376,35 µg/ml. Berdasarkan Gambar 3 menunjukkan bahwa Konsentrasi substrat 2 % menghasilkan kadar GLCNAC optimal yaitu 376,35 µg/ml.

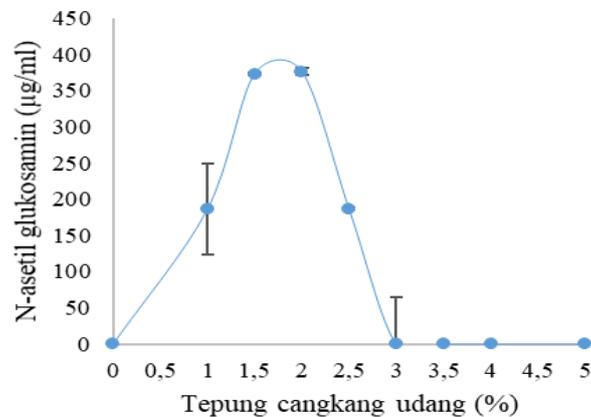


Gambar 2. Kurva standar GlcNAc

Kemampuan kitinase dalam merombak substrat kitin menjadi GlcNAc dapat diketahui dari nilai efisiensi kitinase. Efisiensi kitinase dalam merombak kitin ditunjukkan pada

Tabel 2. Hasil penelitian menunjukkan bahwa nilai efisiensi terbesar diperoleh dari kitinase yang memproduksi GlcNAc pada konsentrasi tepung cangkang 2% yaitu 37,63%. Kandungan kitin pada

tepung cangkang udang adalah 18,7% cangkang udang akan menghasilkan dengan nilai efisiensi 37,63% maka GlcNAc sebesar 70,54 mg diduga setiap hidrolisis 1 gram tepung



Gambar 3. Produksi N-asetil glukosamin oleh *S. marcescens* KAHN.15.12 pada variasi konsentrasi media produksi

Tabel 2. Nilai efisiensi kitinase *S.marcescens* KAHN.15.12 pada uji aktivasi dengan media produksi tepung cangkang udang

Konsentrasi tepung cangkang udang (%)	N-asetil glukosamin (µg/ml)	Nilai efisiensi katalitik (%)
1	186,17	18,61
1,5	372,85	37,28
2	376,35	37,63
2,5	186,92	18,69
3	0	0
3,5	0	0
4	0	0

PEMBAHASAN

Karakteristik morfologi *S.marcescens* KAHN.15.12 sebagai penghasil kitinase menurut Vos *et al.* (2009) merupakan karakteristik yang dimiliki oleh *S.marcescens*. Selain itu penelitian Azizah *et al* (2015) juga melaporkan bahwa isolat KAHN.15.12 telah teridentifikasi sebagai *S.marcescens* secara molekuler menggunakan 16s rRNA. Konfirmasi aktivitas kitinolitik dengan terbentuknya zona bening disekitar koloni menunjukkan adanya aktivitas hidrolitik oleh enzim ekstraseluler kitinase yang diekresikan oleh bakteri tersebut. Produk hidrolisis tersebut berupa gula sederhana yaitu N-asetil glukosamin

sehingga ditunjukkan dengan daerah bening. Sedangkan sisa kitin yang tidak terhidrolisis ditunjukkan dengan daerah yang lebih putih. Index kitinolitik dan aktivitas enzim *S.marcescens* KAHN.15.12 masih stabil sama dengan yang telah diteliti oleh Azizah *et al* (2015). Hal ini dikarenakan teknik penyimpanan biakan isolat bakteri dilakukan secara liofilisasi dan tetap dijaga pada media selektif yang mengandung kitin. Teknik penyimpanan liofilisasi memiliki kelebihan yaitu menjaga stabilitas isolat, mencegah kontaminasi dan dapat disimpan dengan jangka waktu tak terbatas (Crueger dan Crueger, 1984).

S.marcescens KAHN.15.12 mampu tumbuh pada media produksi tepung cangkang udang. Menurut Mahata dan Mawarda (2011) dalam Cahyani (2013) tepung cangkang udang mengandung kitin sebesar 18,75%. Kemampuan tumbuh bakteri di media tersebut menunjukkan bahwa tepung cangkang udang mampu mensuplai nutrisi bagi pertumbuhan sel. Kitin pada tepung cangkang udang tersebut selanjutnya dihidrolisis oleh ekstraseluler kitinase yang merupakan metabolit primer dari bakteri. Hasil hidrolisis kitin menghasilkan N-asetilglukosamin yang selanjutnya akan digunakan kembali oleh sel bakteri sebagai sumber karbon untuk pertumbuhannya (Asril *et al.* 2014). Optimasi media produksi menggunakan tepung cangkang udang menunjukkan bahwa kadar GlcNAc tertinggi terdapat pada konsentrasi media 2%. Menurut Stewart dan Parry (1984) menyatakan bahwa konsentrasi substrat yang tidak terlalu tinggi merupakan keadaan yang optimum pada fermentasi *submerged*. Tingkat efisiensi hidrolisis tepung cangkang udang menggunakan kitinase *S.marcescens* KAHN.15.12 lebih besar dibandingkan dengan penelitian Cahyani *et al* (2014). Oleh karena itu kitinase dari *S.marcescens* KAHN.15.12 terbukti dapat digunakan sebagai biokatalis potensial untuk mendegradasi kitin pada cangkang udang sebagai bahan baku dalam menghasilkan N-asetil glukosamin.

KESIMPULAN

Berdasarkan penelitian dapat disimpulkan bahwa kitinase dari *S. marcescens* KAHN 15.12 mampu menghidrolisis kitin pada cangkang udang hingga menghasilkan N-asetil glukosamin.

SARAN

Perlu penelitian lanjut terkait optimasi waktu produksi GlcNAc

dengan menggunakan metode pembuatan kurva tumbuh *S. marcescens* KAHN 15.12 menggunakan media produksi tepung cangkang udang 2%.

UCAPAN TERIMA KASIH

Kami mengucapkan terimakasih kepada AKFAR JEMBER yang telah membiayai penelitian ini melalui Hibah Internal Tahun 2017. Kepada Muhammad Saiful Rahman dan Dyah Lilis Suryani yang telah membantu penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Anderson JW, Nicolosi RJ, Borzelleca JF. 2005. Glucosamine effects in humans: a review of effects on glucose metabolism, side effects, safety considerations and efficacy. *Food and Chemical Toxicology*. 43:187-201.
- Azizah SN, Mubarik NR, Sudirman LS. 2015. Potential of chitinolytic *Bacillus amyloliquefaciens* SAHA 12.07 and *Serratia marcescens* KAHN 15.12 as biocontrol agents of *Ganoderma boninense*. *Research Journal of Microbiology*. 10 (10): 452-465
- Bhattacharya D, Nagpure A, Gupta RK. 2007. Bacterial chitinases: properties and potential. *Crit Rev Biotech*. 27(1):21-28.
- Clegg DO, Reda DJ, Harris CL, Klein MA, O'Dell JR, Hooper MM, Bradley JD, Bingham CO 3rd, Weisman MH, Jackson CG, Lane NE, Cush JJ, Moreland LW, Schumacher HR Jr, Oddis CV, Wolfe F, Molitor JA, Yocum DE, Schnitzer TJ, Furst DE, Sawitzke AD, Shi H, Brandt KD, Moskowitz RW, Williams HJ. 2006. Glucosamine, chondroitin sulfate, and the two in combination for painful knee osteoarthritis. *New England*

- Cruger W dan Cruger A. 1984. *Biotechnology. A textbook of industrial microbiology*. Sinauer Associates, Inc. Sunderland.
- Cahyani L. 2013. Pemanfaatan tepung cangkang udang sebagai media produksi kitinase oleh bakteri kitinolitik isolat 26. *Skripsi*. Universitas Jember. Jember.
- EFSA [European Food Safety Authority]. 2009. Scientific Opinion on the substantiation of a health claim related to glucosamine hydrochloride and reduced rate of cartilage degeneration and reduced risk of development of osteoarthritis pursuant. Parma, Italy. *European Food Safety Authority*. 7(10): 1358.
- Felson DT. 2006. Osteoarthritis of the knee. *New England Journal of Medicine*. 354: 841-848.
- Jamialahmadi K, Behravan J, Fathi NM, Tabatabaei Y, Shahverdi AR, Faramarzi, MA. 2011. Enzymatic Production of N-Acetyl-D-Glucosamine from Chitin Using Crude Enzyme Preparation of *Aeromonas* sp. PTCC1691. *Biotechnology*. 10(3): 292-297.
- Haryanto, A., 2013. Isolation of chitinolytic bacteria used as biological control of suspected pathogenic fungi on oil palm seedlings. *Skripsi*. Bogor Agricultural University. Bogor.
- Kim PI dan Chung KC. 2004. Production of an antifungal protein for control of *Colletotrichum lagenarium* by *Bacillus amyloliquefaciens* MET0908. *FEMS Microbiol Letter*. 234: 177-183
- Kurita K. 2006. Chitin and chitosan: functional biopolymers from marine crustaceans. *Macromolecular Biotechnology*. 8(3): 203-226
- Patil RS, Ghormade V, Deshpande MV. 2000. Chitinolytic enzymes: an exploration. *Enzym of Microbiology and Technology*. 26:473-483.
- Patil NS, Waghmare SR, Jadhav JP. 2013. Purification and characterization of an extracellular antifungal chitinase from *Penicillium ochrochloron* MTCC 517 and its application in protoplast formation. *Process Biochemistry*. 48:176-183.
- Shantosh S, Mathew PT. 2007. Preparation of glucosamine and carboxymethylchitin from shrimp shell. *Journal of Applied Polymer Science*. 107: 280-285.
- Spindler KD. 1997. *Chitinase and chitosanase assays*. Di dalam: Muzarelli RAA, MG Peter, editor. *Chitin Handbook*. Gottamare (IT): Alda Tecnogafica.
- Steward, J. dan Parry, J. 1984. Factor Influencing The Production Of Cellulose By *Aspergillus fumigates* (Fresenius). *Journal of general mikrobiology*. 24: 144-149.
- Tu, S., X. Qiu, L. Cao, R. Han, Y. Zhang and X. Liu, 2010. Expression and characterization of the chitinases from *Serratia marcescens* GEI strain for the control of Varroa destructor, a honey bee parasite. *Journal of Invertebrate Pathology*. 104: 75-81.
- Wang Z, Wang Y, Zheng L, Yang X, Liu H, Guo J. 2014. Isolation and characterization of an antifungal protein from *Bacillus licheniformis* HS10. *Biochemistry and Biophysic Reseach Community*. 454:48-52.

- Vos PD, Garrity GM, Jones D, Krieg NR, Ludwig W, Rainey FA, Schleifer KH dan Whitman WB. 2009. *Bergey's Manual of systematic bacteriology: second edition Volume Tree the Firmicutes*. New York: Springer Dordrecht Heidelberg London.
- WHO [World Health Organization]. 2007. A Model for Establishing Upper Levels of Intake for Nutrients and Related Substances. In: FAO/WHO Technical Workshop on Nutrient Risk Assessment, Geneva, Switzerland.

Halaman Sengaja dikosongkan