

PRODUKSI DAN KARAKTERISASI ENZIM KITINASE DARI BAKTERI KITINOLITIK ASAL KERANG *Anadara granosa*

Nur Haedar¹, Hasnah Natsir², Fahrudin¹, Wilda Aryanti¹

¹Departemen Biologi Fakultas MIPA Universitas Hasanuddin, Makassar

²Departemen Kimia Fakultas MIPA Universitas Hasanuddin, Makassar
email: nda.nawir@gmail.com

ABSTRACT

This research aims to investigate the maximal generation time and the characterization of chitinase enzyme of Chitinolytic bacteria from Anadara granosa shell in various pH, temperature and substrate concentration. The result of the maximal time of Chitinolytic bacteria was showed at 120 hours. The result of Chitinolytic bacteria characteristic in various pH shows that the highest activity of chitinase is on pH 6 and in various temperature shows that the highest activity at 35⁰C while in various substrate concentration shows that the highest activity value of chitinase is on substrate concentration 0.5%.

Keywords: Characterization, Chitinolytics Bacteria, Chitinase Enzyme

PENDAHULUAN

Secara umum enzim sering digunakan dalam proses produksi dibidang industri pangan, farmasi dan industri kimia lainnya. Enzim yang digunakan pada umumnya diisolasi dari bakteri. Penggunaan enzim dalam proses produksi dapat meningkatkan efisiensi yang kemudian meningkatkan jumlah produksi. Bidang bioteknologi industri mengembangkan teknologi dan bioproses dengan segala ilmu pendukungnya, seperti mikrobiologi, rekayasa genetika, biokimia atau ilmu pendukung lainnya. Bioproses, yang didalamnya meliputi bidang produksi antara lain antibiotika, asam amino, pengendalian limbah, ataupun enzim (Marina, 2008).

Enzim merupakan kelompok

protein yang berperan penting dalam aktivitas biologi. Enzim berfungsi sebagai katalisator yang dapat mengatur reaksi tertentu sehingga dalam keadaan normal tidak terjadi penyimpangan hasil reaksi. Karena enzim mengkatalisator reaksi-reaksi tanpa mengubah struktur reaksi tersebut sehingga enzim biasa disebut biokatalisator (Rachmawaty dan Madihah, 2013).

Aplikasi enzimatik pada industri saat ini sedang berkembang dan enzim menjadi primadona karena aplikasinya dalam berbagai bidang industri antara lain industri makanan, minuman, industri tekstil, industri kulit dan kertas serta industri farmasi. Penggunaan enzim dalam industri pangan memberi banyak keuntungan sebagai bahan tambahan yang alami (Sarah dan Putro, 2009).

Industri berbasis bioteknologi seperti industri enzim dinilai sangat potensial untuk dikembangkan, mengingat tingginya komponen impor yang bisa disubstitusi sekaligus dengan adanya peralihan industri ke arah ramah lingkungan. Deputi Bidang Teknologi Agroindustri dan Bioteknologi Badan Pengkajian dan Penerapan Teknologi (2015) mengatakan bahwa saat ini, baru ada satu pelaku industri yang mulai memproduksi enzim yaitu enzim protease yang digunakan di industri penyamakan dan akan. Besarnya kebutuhan akan enzim di Indonesia, terutama bagi industri, mendorong BPPT melakukan berbagai upaya dalam pemenuhan enzim (Deputi, 2015).

Kitinase adalah enzim yang mendegradasi kitin menjadi N-asetilglukosamin. Degradasi kitin dapat dilakukan oleh organisme kitinolitik dengan melibatkan enzim kitinase. Organisme pendegradasi kitin diantaranya adalah dari kelompok bakteri. Bakteri yang dilaporkan memiliki aktivitas kitinolitik adalah *Vibrio furnissi*, *Serratia marcescens*, *Bacillus circulans* dan *Pseudomonas aeruginosa* (Muharni, 2010). Aktivitas kitinase dari bakteri kitinolitik sangat potensial digunakan sebagai agen pengendalian hayati terhadap jamur patogen maupun serangga hama. Ada beberapa faktor utama yang mempengaruhi aktivitas enzim adalah konsentrasi enzim, substrat, senyawa inhibitor dan aktivator, pH serta temperatur lingkungan. Berdasarkan uraian diatas maka akan dilakukan penelitian tentang produksi dan karakterisasi enzim kitinase dari bakteri kitinolitik asal kerang *Anadara granosa*.

METODE PENELITIAN

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah bakteri kitinolitik terpilih (Isolat IK A) yang berasal dari cangkang kerang *Anadara granosa* dengan komposisi media $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, yeast ekstrak, bakto tripton, NaCl, K_2HPO_4 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, koloidal kitin dan aquadest.

Pembuatan Media Kolidal Kitin dan Media Kitin Agar

Pembuatan Media Kolidal Kitin yaitu Sebanyak 20 gram kitin dari serbuk kulit udang, ditambah 400 mL HCl pekat kemudian ditutup rapat dan dibiarkan selama 24 jam pada suhu 4°C (semua tahapan perlakuan dalam suhu dingin). Selanjutnya disaring dengan menggunakan glasswool dan filtrat yang diperoleh ditambahkan 200 mL air dingin dan pH larutan diatur menjadi 7,0 dengan penambahan NaOH 10N dan disentrifugasi pada 8000 rpm, suhu 4°C selama 15 menit. Filtrat dibuang dan pellet dicuci dengan air dingin kemudian sentrifugasi lagi. Endapan berupa pelet (kolidal kitin) disimpan pada suhu dingin.

Media agar kitin dibuat dengan mencampurkan koloidal kitin 0,5%, K_2HPO_4 0,1 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,01 g, yeast extract 0,05 g, pepton 0,1 g, bakto tripton 0,1 g, NaCl, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,1 g, dan agar 1 gr kedalam erlenmeyer yang berisi 100 mL aquades, larutan kemudian dihomogenkan dengan *magnetic stirrer* dan dipanaskan hingga larut, kemudian disterilkan dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit dengan tekanan 2 atm. Media kitin cair yang digunakan untuk produksi enzim kitinolitik dengan fermentasi memiliki komposisi yang sama dengan media agar kitin, untuk media cair tidak menggunakan agar. Terbentuknya zona bening menunjukkan

adanya isolat bakteri kitinolitik

Peremajaan bakteri Kitinolitik

Bakteri kitinolitik terpilih (Isolat IK A) yang berasal dari *Anadara granosa* diremajakan dengan mengambil masing-masing 1 ose isolat dan ditumbuhkan dengan metode goresan pada media kitin agar miring dan dengan metode kuadran pada cawan petri kemudian diinkubasi selama 24 jam.

Penyiapan Suspensi Bakteri Penghasil Enzim Kitinase

Satu ose koloni bakteri kitinolitik terpilih (Isolat IK A) disuspensikan kedalam tabung reaksi yang berisi media kitin cair sebanyak 5 mL kemudian diinkubasikan pada suhu 37°C selama 18-24 jam.

Produksi Enzim Kitinase Secara *In Vitro*

Produksi kitinase dilakukan dengan menggunakan inokulum aktif 10% dari bakteri kitinolitik terpilih (Isolat IK A) yang berasal dari cangkang kerang *Anadara granosa* dengan komposisi media (NH₄)₂SO₄, yeast ekstrak, bacto tripton, NaCl, K₂HPO₄, MgSO₄.7H₂O, dan koloidal kitin lalu dihomogenkan. Kemudian dishaker pada suhu 37°C, 180 rpm selama 6 hari dengan interval waktu sampling setiap 24 jam untuk tiap pengamatannya dan mengukur *Optical Density* (OD) dengan panjang gelombang 660 nm dari sampel tersebut.

Pengukuran Aktivitas Kitinase (Natsir, et al., 2010)

Aktivitas kitinase ditentukan dengan menggunakan metode Ueda dan Arai (1992) yaitu dengan mengambil sampling Isolat IK A sebanyak 1 mL, ditambahkan 0,15 mL larutan buffer

fosfat dicampur dengan 0,1 mL larutan enzim (sampel) dan 0,05 mL koloidal kitin (substrat). Campuran diinkubasi pada suhu 37°C selama 30 menit. Kemudian dishaker dengan 3000 rpm selama 10 menit pada suhu 4°C. Selanjutnya ditambahkan aquades dan reagen schales 1 mL. Kekeruhan disebabkan kitin tersisa dalam campuran diukur padapanjang gelombang 660 nm.

Karakterisasi Enzim Kitinase

Penentuan pH Optimum

Aktivitas enzim isolat IK A dianalisis dalam berbagai pH, yaitu 3,4,5,6,7 dan 8. Pengaturan pH 3-5 dilakukan dengan bufer sitrat sedangkan pH 6-8 menggunakan bufer fosfat. Kemudian diinkubasi selama 30 menit dan selanjutnya mengukur aktivitas enzim yang diperoleh pada setiap perubahan pH. Sehingga nilai yang menunjukkan aktivitas kitinase tertinggi ditetapkan sebagai pH optimum dan digunakan pada karakterisasi selanjutnya.

Penentuan Suhu Optimum

Aktivitas enzim isolat IK A dianalisis pada suhu yang berbeda-beda, yaitu 25°C, 30°C, 35°C, 40°C, dan 45°C dengan larutan penyangga 0,1 M dan pH optimum yang telah dicapai pada butir dan diinkubasi selama 30 menit. Selanjutnya mengukur aktivitas enzim yang diperoleh pada berbagai suhu yang berbeda. Sehingga nilai yang menunjukkan aktivitas kitinase tertinggi ditetapkan sebagai suhu optimum dan digunakan pada karakterisasi selanjutnya.

Konsentrasi Substrat

Aktivitas enzim isolat IK A dianalisis pada konsentrasi substrat yang berbeda-beda, yaitu 0,1%, 0,2% dan 0,3%, 0,4% dan 0,5%. Perlakuan ini menggunakan pH dan suhu optimum yang telah dianalisis sebelumnya.

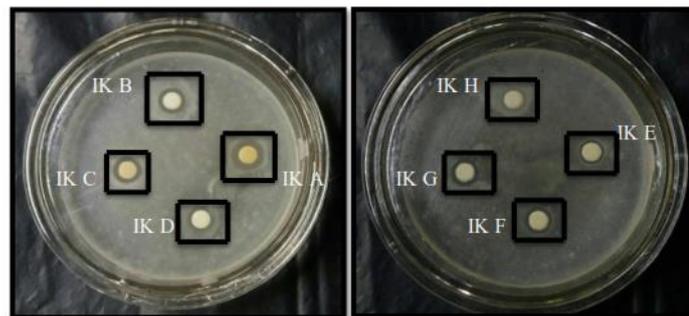
Selanjutnya diinkubasi selama 30 menit. Selanjutnya mengukur aktivitas enzim yang diperoleh pada konsentrasi substrat yang berbeda. Sehingga nilai yang menunjukkan aktivitas kitinase tertinggi ditetapkan sebagai konsentrasi substrat optimum.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Peremajaan Bakteri Kitinolitik

Peremajaan isolate bakteri kitinolitik dilakukan dengan menumbuhkan kembali isolat kitinolitik yang berasal dari kerang *Anadara granosa* yang sebelumnya telah diuji antagonis dengan menggunakan jamur *Rhizoctonia solani*. Bakteri kitinolitik ditunjukkan dengan terbentuknya zona bening di sekitar koloni. Zona bening

tersebut membuktikan bahwa isolat mampu mendegradasi substrat kitin yang terkandung pada media agar kitin (Rochima, 2006), sehingga keberadaan kitin pada media akan menstimulir isolat IK A menghasilkan kitinase untuk memanfaatkan kitin sebagai sumber karbon. Hasil uji yang dilakukan oleh Besse (2016) menyatakan bahwa bakteri kitinolitik isolat IK A memiliki zona bening yang terbesar yaitu dengan diameter 1,21 mm dari ke 7 isolat lainnya yang telah di uji, dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Zona bening pada isolat bakteri kitinolitik asal kerang *Anadara gradosa*

Produksi Enzim Kitinase

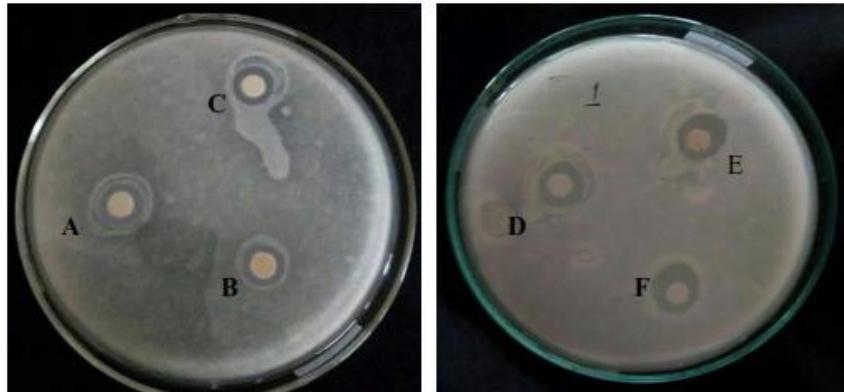
Optimasi waktu produksi dilakukan untuk mengetahui waktu panen yang tepat selama proses produksi enzim kitinase, dimana isolat IK A menghasilkan kitinase. Untuk menentukan waktu optimum, maka dilakukan produksi enzim dari 24 jam sampai 144 jam dengan selang waktu pengambilan sampel tiap 24 jam dan mengukur *Optical Dencity* (OD) dari isolat tersebut. Pada 24 jam hingga 120 jam nilai *Optical Dencity* (OD) mengalami peningkatan yaitu 0,062, 0,094, 0,142, dan 0,413 dan kemudian mengalami penurunan pada 144 jam yaitu 0,257. Nilai tertinggi berada pada 120 jam

yaitu 0,413 sehingga dianggap sebagai waktu produksi yang lebih baik untuk bakteri isolat IK A.

Produksi Enzim Kitinase secara *In Vitro*

Produksi enzim kitinase dari mikroorganisme lebih baik dibandingkan kitinase dari sumber yang lain karena kemudahannya berkembangbiak dalam waktu yang relatif singkat. Produksi kitinase dapat dilihat dengan adanya zona bening atau zona halo yang terbentuk pada media kitin. Isolat dishaker selama 144 jam (6 hari) dengan interval waktu sampling 24 jam. Zona bening pada isolat IK A dengan waktu inkubasi yang

berbeda-beda dapat dilihat pada Gambar 2.



Gambar 2. Zona bening produksi aktivitas kitinase isolat IK A

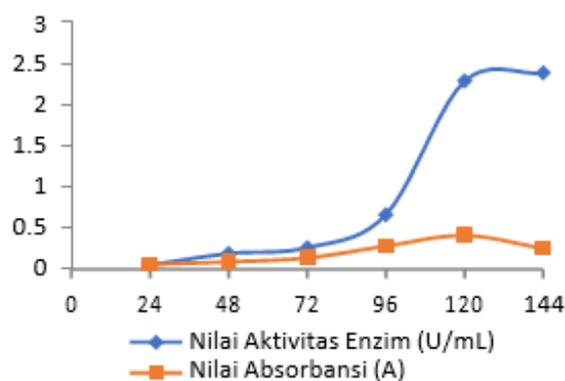
Keterangan: A: Inkubasi 1x24 jam D: Inkubasi 4x24 jam
B: Inkubasi 2x24 jam E: Inkubasi 5x24 jam
C: Inkubasi 3x24 jam F: Inkubasi 6x24 jam

Produksi kitinasenya dapat dilihat dari warna media yang menjadi transparan (terbentuknya zona bening) disekeliling koloni bakteri. Zona bening yang membuat warna media transparan disebabkan oleh enzim kitinase yang dikeluarkan kedalam media sebagai metabolit bakteri. Kitinase merupakan enzim ekstraseluler yang dihasilkan bakteri kitinolitik yang berperan penting dalam menghidrolisis kitin. Enzim ekstraseluler adalah enzim yang dihasilkan didalam sel, tetapi dikeluarkan ke media tumbuhnya (Tsujiyo, *et. al.*, 1999). Besar kecilnya zona bening sangat tergantung pada kemampuan bakteri untuk memproduksi kitinase yang

sangat bervariasi. Perbedaan tersebut mungkin disebabkan perbedaan kecil pada gen yang mengkodennya (Transmo dan Harman, 1993).

Pengukuran Aktivitas Kitinase

Aktivitas kitinase merupakan ukuran jumlah produk yang dihasilkan dari suatu pemecahan substrat kitin (Herdyastuti, 2009). Aktivitas kitinase isolat IK A dengan koloidal kitin sebagai substratnya memiliki nilai aktivitas pada 24 jam hingga 120 jam mengalami peningkatan sehingga aktivitas optimum kitinase terjadi pada 120 jam. Grafik nilai *Optical Density* dan aktivitas kitinase dapat dilihat pada Gambar 3:



Gambar 3. Grafik nilai Optical Density dan aktivitas kitinase

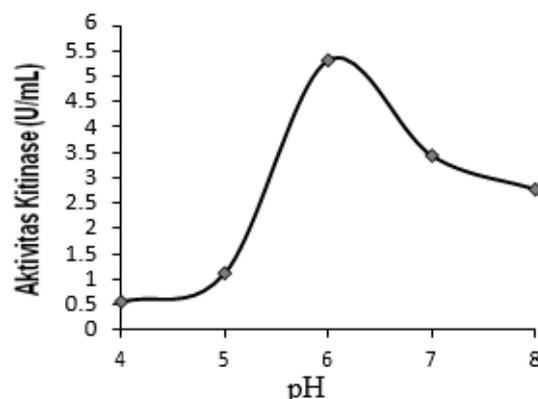
Keberadaan kitin dalam media produksi akan menstimulir bakteri untuk mensekresi kitinase keluar dari sel sehingga dapat memecah polimer kitin menjadi monomernya. Peningkatan aktivitas enzim menunjukkan bahwa semakin banyak substrat yang terhidrolisis. Aktivitas enzim kitinase terus meningkat dari 0 jam inkubasi hingga mencapai waktu inkubasi optimum pada 120 jam yaitu 2,683 U/mL, hal ini dapat terjadi karena pada 24 jam masih sedikit enzim yang bereaksi dengan substrat dan akan meningkat seiring dengan peningkatan waktu inkubasi hingga

mencapai waktu inkubasi optimum. Setelah mencapai waktu optimum, aktivitas enzim menurun dikarenakan telah terjadi akumulasi produk hidrolisis yang selanjutnya dapat menghambat aktivitas enzim (Purkan, *et. al.*, 2014).

Karakterisasi Enzim Kitinase

Penentuan pH Optimum

Isolat IK A dengan inkubasi 120 jam pada berbagai variasi yaitu pH 4-5 dengan buffer sitrat sedangkan pH 6-8 menggunakan buffer fosfat. Aktivitas maksimum isolat IK A dicapai pada pH 6,0 bufer fosfat sebesar 5,316 U/mL dapat dilihat pada Gambar 4 sebagai berikut:



Gambar 4. Pengaruh pH terhadap aktivitas kitinase pada suhu 27°C

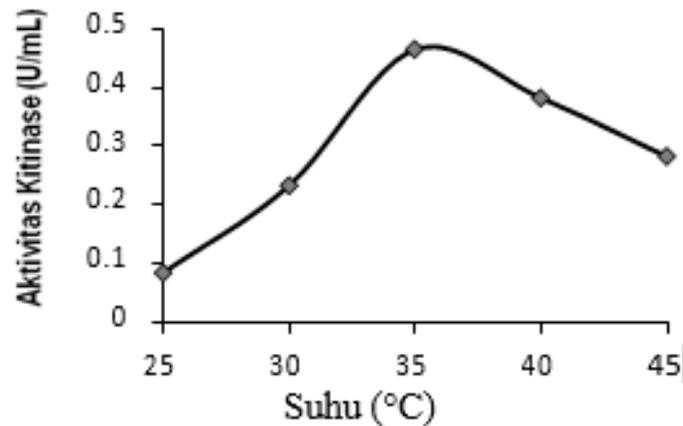
Hal ini mirip dengan hasil penelitian Okazaki pada tahun 1995 dalam (Rahayu, 2000) dengan menggunakan *Streptomyces sp. J-13-3*, bahwa pH optimum dua kitinase yang dihasilkan oleh mikroorganisme kitinolitik adalah 6,0. Nilai pH optimum 6,0 juga ditemukan pada kitinase *Trichoderma harzianum*, *Bacillus licheniformis* MB-2 (Situmorang, 2003), *Vibrio sp. 98CJ1102* (Park *et. al.*, 2000) dan isolat 13,30 yang diisolasi dari Manado (Jayanti, 2002). Enzim kitinase dengan mikroba

Pseudomonas sp. TKU015 memiliki pH optimum 6 dan stabil pada pH 5-7. *Streptomyces sp. ANU 6277* memiliki pH optimum 6.

Penentuan Suhu Optimum

Pada variasi suhu tersebut, aktivitas isolat IK A mengalami kondisi optimum pada suhu 35°C. Hal tersebut terlihat dengan adanya kenaikan aktivitas dari suhu 25°C hingga suhu 35°C kemudian mengalami penurunan

aktivitas pada suhu 40°C dan 45°C dapat dilihat pada Gambar 5 sebagai berikut:



Gambar 5. Pengaruh suhu terhadap aktivitas kitinase pada pH 6

Aktivitas enzim kitinase mengalami penurunan setelah mendapatkan kondisi suhu optimum. Hal ini dikarenakan adanya tingkat katalisis reaksi oleh enzim akan meningkat seiring dengan peningkatan suhu (Purkan, et, al., 2016). Bertambahnya suhu sampai dengan suhu optimum menyebabkan terjadinya kenaikan kecepatan reaksi enzim karena bertambahnya energi kinetik yang mempercepat gerak enzim dan substrat. Namun apabila enzim berada di atas suhu optimumnya maka aktivitas akan menurun. Hal ini terjadi karena enzim termasuk jenis protein yang dapat mengalami denaturasi pada suhu tinggi. Denaturasi ini menyebabkan perubahan pada konformasi enzim akibat adanya perenggangan ikatan hidrogen yang bersifat reversibel sehingga dapat mempengaruhi sisi aktif enzim untuk berikatan dengan substrat (Mulyani et, al., 2009).

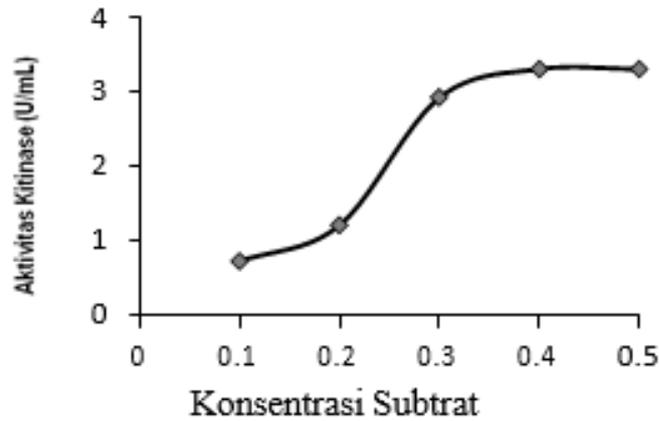
Konsentrasi Substrat

Substrat yang umum digunakan dalam memproduksi enzim kitinase

yaitu koloidal kitin. Koloidal kitin adalah kitin yang dilarutkan dalam asam klorida pekat seperti telah dipelajari oleh Hsu dan Lockwood (1975) sebagai media selektif untuk mendapatkan *Actinomycetes* dari air dan tanah. Mikroorganisme kitinolitik dapat diseleksi keberadaannya dengan mendegradasi media agar kitin yang dapat dideteksi dengan adanya zona bening disekitar koloni bakteri. Metode konvensional yang menggunakan koloidal kitin sebagai substrat ditemukan sangat efektif untuk menentukan aktivitas kitinase. *Enterobacter sp NRG4* menunjukkan aktivitas tinggi terhadap kitin *swollen*, kitin koloidal, kitin yang diregenerasi dan glikol kitin dibandingkan dengan serbuk kitin (Herdyastuti, 2009).

Berdasarkan hasil penelitian bahwa aktivitas enzim dengan konsentrasi substrat 0,1%, 0,2% dan 0,3%, 0,4% dan 0,5% dengan nilai aktivitas kitinase tertinggi pada 0,5%. Pada variasi

konsentrasi substrat mengalami peningkatan secara terus menerus dari konsentrasi substrat 0,1% hingga 0,5% dapat dilihat pada Gambar 6:



Gambar 6. Pengaruh konsentrasi substrat terhadap aktivitas kitinase pada kondisi pH 6 dan suhu 35°C

Stewart dan Parry (1981) menyatakan bahwa substrat yang tidak terlalu tinggi adalah keadaan optimum pada fermentasi, yang diduga karena pada konsentrasi tersebut difusi oksigen dan absorpsi enzim terhadap substrat berjalan optimal (Cahyani, 2013). Kecepatan reaksi yang dikatalisis oleh enzim sangat dipengaruhi oleh konsentrasi substrat. Pada konsentrasi substrat yang sangat rendah, kecepatan reaksi yang dikatalisis enzim juga sangat

rendah. Sebaliknya, kecepatan reaksi akan meningkat dengan meningkatnya konsentrasi substrat sampai tercapai titik tertentu, yaitu titik batas kecepatan reaksi maksimum. Setelah titik batas, enzim menjadi jenuh oleh substratnya, sehingga tidak dapat berfungsi lebih cepat. Pembatas kecepatan enzimatik ini adalah kecepatan penguraian kompleks enzim-substrat menjadi produk dan enzim bebas (Rahayu, 2000).

KESIMPULAN

Waktu optimum produksi enzim kitinase dari bakteri kitinolitik yang berasal dari kerang *Anadara granosa* yang diuji dengan jamur *Rhizoctonia solani* yang telah terpilih yaitu isolat IK Ayaitu pada 120 jam dengan nilai aktivitas enzim kitinase sebesar 2,683 U/mL. Karakterisasi enzim kitinase dari isolat IK A yang dilakukan pada berbagai pH didapatkan nilai aktivitas optimum

pada pH 6 dengan nilai aktivitas terbesar yaitu 5,316 U/mL. Pada kondisi suhu didapatkan enzim kitinase optimum pada suhu 35°C dengan nilai aktivitas tertinggi yaitu 0,55 U/mL sedangkan pada konsentrasi substrat aktivitas enzim kitinase optimum pada konsentrasi substrat 0,5% dengan nilai aktivitas enzim sebesar 3,316 U/mL.

DAFTAR PUSTAKA

- Cahyani, Lutfiya. 2013. *Pemanfaatan Tepung Cangkang Udang Sebagai Media Produksi Kitinase Oleh Bakteri Kitinolitik Isolat 26*. Skripsi. Universitas Jember. Jawa Timur.
- Herdyastuti, N., Raharjo, T.J., Mudasir., Matsjeh, S. 2009. Chitinase and Chitinolytic Microorganism Isolation, Characteristic and Potential. *Jurnal Chemistry. Vol (9)1: 37-47*.
- Marina, Dewi, I., 2008. *Isolasi Bakteri Dan Uji Aktivitas Kitinase Termofilik Kasar Dari Sumber Air Panas Tinggi Raja, Simalungun, Sumatera Utara*. Tesis. Universitas Sumatera Utara. Medan.
- Muharni & H Widjajanti. 2010. Skrining Bakteri Kitinolitik Antagonis Terhadap Pertumbuhan Jamur Akar Putih (*Rigidoporus lignosus*) Dari Rizosfir Tanaman Karet. *Jurnal Penelitian Sains 14(1):50-56*.
- Muharni, 2010. Isolasi dan Identifikasi Bakteri Penghasil Kitinase dari Sumber Air Panas Danau Ranau Sumatera Selatan. Universitas Sriwijaya. Sumatera Selatan. *Jurnal Penelitian Sains Edisi Khusus Juni 2010 (D)10:06-09*.
- Mulyani, N. S., Asy'ari, M. dan Prasetyoningsih, H. 2009. Penentuan Konsentrasi Optimum Oat Spelt Xylan Pada Produksi Xilanase dari *Aspergillus niger* Dalam Media PDB (Potato Dextrose Broth). *Journal Kimia Sains & Aplikasi. Vol(12): 1 – 10*.
- Natsir, H., Patong, A.R., Suhartono, M.T. and Ahmad, A. 2010. Production and Characterization of Chitinase Enzymes from Hot Spring in South Sulawesi, *Bacillus* sp. HSA3-1a. *Indo. J. of Chem. 10(2): 256–260*.
- Natsir, H., Patong, A.R., Suhartono, M.T. and Ahmad, A. 2013. Isolation And Purification Of Thermostable Chitinase *Bacillus licheniformis* Strain HSA3-1a From Sulili Hot Springs In South Sulawesi, Indonesia. *International Journal of Pharma and Bio Sciences. 4(3): (B) 1252-1259*.
- Purkan, Afaf Baktir, dan Arju Rohmah, S. 2016. Produksi Enzim Kitinase dari *Aspergillus niger* menggunakan Limbah Cangkang Rajungan Sebagai Induser. Universitas Airlangga. Jawa Timur. *Jurnal Kimia Riset. Vol(1): 34-41*.
- Purkan, Azizah, Badi'atul, Afaf, Bakteir dan Sri, Sumarsih. 2014. Eksplorasi Bakteri Kitinolitik dari Sampah Organik: Isolasi dan Karakterisasi Enzim Kitinase. *Jurnal Molekul. Vol (9)2: 128-135*.
- Rachmawaty dan Madihah, 2013. Potensi Perlakuan Awal Limbah Kulit Udang Untuk Produksi Enzim Kitinase Oleh *Trichoderma Virens* Pada Fermentasi Substrat Padat. *Jurnal Bionature. Vol (14)1: 33-37*.
- Rahayu, S. 2000. *Pemurnian dan Karakterisasi Kitinase dan Kitin Deasetilase Termostabil dari Isolat Bacillus K-29-14 Asal Kawah Lamojang, Jawa Barat*. Tesis Program Pascasarjana. Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Sarah, Putra SR., Putro HS., 2009. *Isolasi Amilase Termostabil Dari Bakteri Termofilik*. Prosiding Kimia FMIPA. Institut Teknologi Sepuluh. Surabaya