
PRODUKSI DAN KARAKTERISASI ENZIM KITOSANASE DARI ISOLAT BAKTERI

Klebsiella sp

Sarni^a, Hasnah Natsir^a, Seniwati Dali^a

^aFakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Hasanuddin, Makassar

Koresponden penulis: Sarni_malik@yahoo.com

Abstrak

Enzim kitosanase merupakan enzim yang mengkatalisis reaksi endohidrolisis ikatan (1,4) - glukosida pada kitosan menjadi serangkaian kitooligosakarida atau oligomer kitosan. Diantara semua organisme penghasil kitosanase, bakteri mendapat perhatian khusus karena bakteri mampu memproduksi secara cepat kandungan biomassa sehingga senyawa bioaktif bisa diproduksi lebih mudah, cepat dan banyak dalam skala bioteknologi. Kitosanase dari mikroba memberikan hasil yang baik dalam memproduksi kitooligosakarida, namun sangat mahal untuk digunakan di industri dalam skala besar. Penelitian ini bertujuan untuk memproduksi dan karakterisasi ekstrak kasar enzim kitosanase dari *Klebsiella sp*. Enzim kitosanase diproduksi pada medium fermentasi yang mengandung 0,5% koloidal kitosan selama 60 jam dengan aktivitas 0,309 U/mL (5,235 U/mg), bekerja optimum pada suhu 40 °C dan pH 8, kecepatan maksimal enzim pada konsentrasi substrat (*soluble* kitosan) 1 %, diaktifkan oleh Co^{2+} ; Ca^{2+} dan Ni^{2+} serta dihambat oleh Zn^{2+} ; Mg^{2+} dan Cu^{2+} .

: Kitosanase, *Klebsiella*, kitooligosakarida

Abstrack

Kitosanase enzyme is an enzyme to catalyze the bonding endohidrolisis (1.4) - glucoside on chitosan into a series chitosan oligomers or kitooligosakarida. Among all organisms chitosanase, bacteria have a particular concern because the bacteria are able to produce quickly the content of the biomass so that the bioactive compounds could be produced more easily , faster and more in scale biotechnology. Chitosanase of microbes give good results in producing kitooligosakarida, but very expensive for use in large-scale industry. This study aims to manufacture and characterization of enzymes chitosanase crude extract of Klebsiella sp . Kitosanase enzyme produced in the fermentation medium containing 0.5 % colloidal chitosan for 60 hours with the activity of 0.309 U / mL (5,235 U / mg) , work optimally at 40 ° C and pH 8 , the maximum speed on the enzyme substrate concentration (soluble chitosan) 1 % , powered by Co^{2+} ; Ca^{2+} and Ni^{2+} and inhibited by Zn^{2+} ; Mg^{2+} and Cu^{2+} .

Keyword : *Chitosanase, Klebsiella, Chitooligosaccharide*

PENDAHULUAN

Kitosanase merupakan salah satu enzim kitinolitik, selain kitinase dan kitin deasetilase. Kitosanase berfungsi sebagai enzim pendegradasi kitosan menjadi oligomer kitosan atau kitooligomer dengan derajat polimerisasi yang tinggi. Kitosanase merupakan enzim yang termasuk dalam kelas enzim hidrolase yang kebanyakan diproduksi secara ekstraselular. *Enzyme Commission* mendefinisikan kitosanase (EC 3.2.1.123 atau 3.2.1.99) sebagai enzim yang mengkatalisis reaksi endohidrolisis ikatan (1,4)- glikosidik pada kitosan atau ikatan 2-amino-2-deoksi- -D-glukosida pada polimer kitosan yang menghasilkan serangkaian kitooligosakarida atau oligomer kitosan [6, 11, 13].

Kitosanase dihasilkan oleh bakteri, fungi dan tanaman sebagai enzim ekstraselular atau intraseluler. Sebagian besar bakteri dan fungi menghasilkan kitosanase ekstraseluler. Sedangkan pada tanaman dan fungi *zygomycetes* menghasilkan kitosanase intraseluler [13]. Kitosanase memiliki fungsi metabolime karena dapat menghidrolisis kitosan berberat molekul tinggi menjadi kitooligosakarida yang dapat diangkut dalam sel dan digunakan sebagai sumber karbon dan nitrogen. Fungsi lain dari kitosanase adalah sebagai perlindungan terhadap mikroorganisme pengganggu [5]. Pada umumnya kitosanase yang dihasilkan menghidrolisis ikatan endo kitosan untuk memproduksi oligomer kitosan dari komposisi dimer hingga oktamer glukosamin [3]. Kitosanase dari masing-

masing organisme menghasilkan pola hidrolisis yang berbeda tergantung pada tingkat deasetilasi substrat.

Diantara semua organisme penghasil kitosanase, bakteri mendapat perhatian khusus karena bakteri mampu memproduksi secara cepat kandungan biomassa sehingga senyawa bioaktif bisa diproduksi lebih mudah, cepat dan banyak dalam skala bioteknologi [4]. Beberapa penelitian tentang kitosanase dan aplikasinya telah dilakukan antara lain : Choi dkk (2004) meneliti kitosanase dari *Bacillus sp.* galur KCTC 0377BP memiliki pH optimum 4 – 6 pada temperatur 30°C dan digunakan untuk produksi oligomer kitosan, Pagnoncelli dkk (2010) yang memproduksi enzim kitosanase dari *Paenibacillus ehimensis* dan aplikasinya untuk menghidrolisis kitosan pada suhu dan pH optimum 55 °C dan pH 6, Wangtueai dkk (2007) memproduksi dan mengkarakterisasi enzim kitosanase dari *Bacillus cereus* TP 12.24 yang memiliki pH dan suhu optimum 6,5 dan 55 °C. Meskipun enzim kitosanase dari mikroba memberikan hasil yang terbaik dalam memproduksi kitooligosakarida, namun sangat mahal untuk digunakan di industri dalam skala besar. Pada penelitian ini bertujuan memproduksi dan karakterisasi ekstrak kasar enzim kitosanase dari isolat bakteri spon *Klebsiella sp.*

METODE PENELITIAN

Bahan dan Alat

Bahan yang digunakan antara lain : bakteri spon *Klebsiella sp.* (koleksi laboratorium Biokimia Jurusan Kimia UNHAS), kitosan (Sigma), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, K_2HPO_4 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, NaNO_2 , $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$,

NaH₂PO₄, Na₂HPO₄, Na₂CO₃, CuSO₄.5H₂O, K₃[Fe(CN)₆], bakto pepton, bakto agar, glukosamin HCl, amonium sulfamat, *Bovine Serum Albumin* (BSA), natrium-kalium-tartrat, foolin, *yeast extract*

Alat yang digunakan antara lain : neraca analitik, inkubator, *autoclave*, lemari pendingin, bunsen, *wrist action shaker*, vortex mixer, *shaker inkubator*, sentrifus dingin, oven (Eyela NDO-400, Jepang), jarum ose, enkas, penangas, pinset, *waterbath shaker*, spektronik 20D+, dan alat-alat gelas yang umum digunakan.

Peremajaan Mikroba

Medium inokulum dibuat dengan melarutkan yeast ekstrak (0,05%), NaCl (0,1%), Bakto Pepton (0,1%), CaCl₂ (0,01%), K₂HPO₄ (0,01%), MgSO₄. 7H₂O (0,01%), koloidal kitosan (0,5 %) dalam akuades. Selanjutnya larutan dipanaskan dan disterilkan selama 30 menit di dalam autoklaf. Isolat mikroba (*Klebsiella sp*) dimasukkan ke dalam medium inokulum. Biakan mikroba tersebut *dishaker* dengan kecepatan 150 rpm selama 24 jam pada suhu 37 °C, kemudian dimasukkan dalam medium LA (yeast ekstrak 0,05%; NaCl 0,1%; Bacto agar 1,5%; Bakto Pepton 0,1%; CaCl₂ 0,01%; K₂HPO₄ 0,01%; MgSO₄. 7H₂O 0,01%; koloidal kitosan 0,5%) dengan metode tuang dan diinkubasi selama 3 x 24 jam pada suhu 37 °C [12]. Selanjutnya mikroba yang tumbuh dan berzona bening digunakan untuk proses peremajaan bakteri *Klebsiella sp*, dimana 2-3 ose bakteri digores pada medium LA dan diinkubasi dengan waktu dan suhu yang sama sebelumnya.

Produksi Enzim Kitosanase

Produksi enzim kitosanase dimulai dengan pembuatan medium inokulum untuk starter yang mengandung 0,5% koloidal kitosan, kemudian bakteri *Klebsiella sp* hasil peremajaan diinokulasikan dalam media starter dan diinkubasi pada shaker incubator pada suhu 37 °C, 180 – 200 rpm selama 24

jam. Medium starter sebanyak 10% (v/v) diinokulasikan ke dalam medium produksi kemudian diinkubasi selama 6 hari dengan suhu dan kecepatan yang sama untuk medium starter dan setiap 12 jam dilakukan *sampling* untuk pengukuran OD. Enzim yang dihasilkan disentrifugasi dingin pada 4 °C 3500 rpm selama 30 menit yang diikuti dengan mengukur aktivitas kitosanase serta ditentukan kadar proteinnya dengan metode Lowry, dimana BSA (*Bovine Serum Albumin*) sebagai larutan standar.

Pengukuran Aktivitas Enzim Kitosanase

Campuran reaksi sampel yang terdiri dari 100 µL *soluble* kitosan 1 %, 100 µL enzim (ekstrak kasar) dan 100 µL 50 mM buffer fosfat pH 6 diinkubasi selama 30 menit pada suhu 37 °C. Reaksi enzimatik dihentikan dengan memasukkannya dalam penangas air 100 °C selama 15 menit. Sementara itu di tempat terpisah dibuat campuran kontrol yang terdiri dari 100 µL *soluble* kitosan 1% dan 100 µL 50 mM buffer fosfat pH 6 diinkubasi seperti campuran sampel dan diinaktivasi. Tahap selanjutnya adalah pewarnaan terhadap sampel dan kontrol. Pewarnaan sampel dilakukan dengan mencampur 200 µL sampel yang telah diinkubasi dengan 800 µL akuades dan 1000 µL pewarna Schales. Pada tempat yang terpisah, larutan kontrol diambil sebanyak 133 µL kemudian dicampurkan dengan 67 µL enzim, 800 µL akuades dan 1000 µL pewarna Schales. Sampel dan kontrol selanjutnya dipanaskan di dalam penangas air bersuhu 100 °C selama 15 menit. Setelah pemanasan, sampel dan kontrol disentrifugasi dengan kecepatan 8000 rpm pada suhu 4 °C selama 10 menit. Supernatan hasil sentrifugasi diukur absorbansinya pada panjang gelombang 420 nm. Untuk standar digunakan larutan glukosamin dengan konsentrasi 0 – 100 µg/mL dan dilakukan dengan prosedur yang sama seperti pada pengukuran sampel. Aktivitas enzim ditentukan berdasarkan

jumlah glukosamin yang dibebaskan selama hidrolisis substrat kitosan. Satu unit aktivitas enzim didefinisikan sebagai jumlah enzim yang dibutuhkan untuk menghasilkan μmol residu glukosamin per menit setelah diinkubasi dengan larutan kitosan [2, 6, 7, 15].

Pengaruh pH

Aktivitas kitosanase diuji pada beberapa variasi pH. Penentuan pH optimum dilakukan dengan mereaksikan enzim dengan buffer pada pH yang berkisar antara 4-10. Buffer yang digunakan dalam penentuan pH optimum adalah 0,2 M buffer sitrat fosfat (pH 4, 5 dan 6), buffer fosfat (pH 6, 7, dan 8), buffer borat (pH 9 dan 10).

Pengaruh Suhu

Mengukur aktivitas kitosanase pada suhu inkubasi yang beragam. Suhu optimum ditentukan dengan mereaksikan ekstrak kasar enzim dengan substrat pada suhu 30 °C, 40 °C, 50 °C, dan 60 °C, yang dilakukan pada pH optimumnya [2, 15].

Pengaruh Konsentrasi Substrat

Menganalisis aktivitas enzim dengan konsentrasi substrat (soluble kitosan) yang divariasikan yakni dari 0,5 % sampai 1,5 % dengan interval 0,25 %. Perlakuan ini menggunakan pH dan suhu optimum yang telah diperoleh sebelumnya dengan waktu inkubasi selama 30 menit.

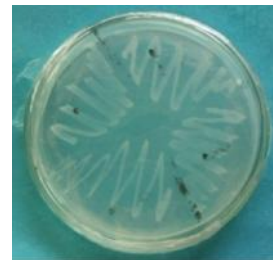
Pengaruh Penambahan Ion Logam

Pengujian dilakukan dengan mereaksikan enzim pada pH, suhu dan konsentrasi substrat optimum. Pada saat reaksi, ion logam ditambahkan ke dalam tabung sampel dan kontrol. Beberapa ion logam yang digunakan merupakan kation bivalen dengan konsentrasi 10 mM antara lain Co^{2+} , Zn^{2+} , Mg^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} dan Ca^{2+} . Pada saat bersamaan, dibuat kontrol positif yang tidak ditambahkan dengan ion logam. Hasil reaksi ditentukan nilai aktivitasnya [2, 3, 11].

HASIL DAN PEMBAHASAN

Peremajaan mikroba

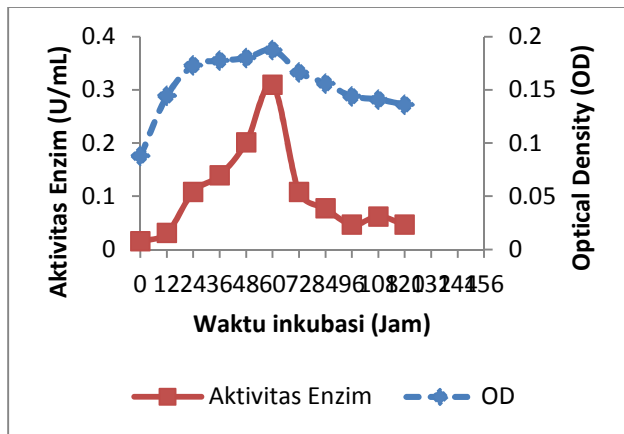
Bakteri *Klebsiella sp* merupakan salah satu bakteri simbiosis spon yang memiliki aktivitas kitinolitik. Hal ini dapat terlihat dari pertumbuhan mikroba yang optimal pada kondisi temperatur 37 °C dengan pH 7,0 dalam medium LA (*Luria agar*) modifikasi dan medium inokulum cair yang mengandung koloidal kitosan 0,5%. *Klebsiella sp* dapat mendegradasi kitosan karena mengandung enzim kitosanase yang dapat terinduksi dengan adanya koloidal kitosan pada medium pertumbuhannya. Adanya aktivitas kitosanase ditandai dengan terbentuknya areal bening di sekitar koloni bakteri seperti terlihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Koloni *Klebsiella sp* dalam medium padat LA

Produksi Enzim dan Uji Aktivitas Kitosanase

Enzim kitosanase diawali dengan menumbuhkan *klebsiella sp* pada medium fermentasi yang mengandung koloidal kitosan sebagai substratnya untuk mengetahui kondisi optimal produksi. Pertumbuhan bakteri *Klebsiella sp* pada medium fermentasi semakin meningkat dalam interval pertambahan waktu, peningkatan pertumbuhan dimulai dari hari pertama kedua dan mulai menurun di hari ketiga.



Gambar 2. Aktivitas enzim kitosanase & optical density (OD) terhadap waktu inkubasi

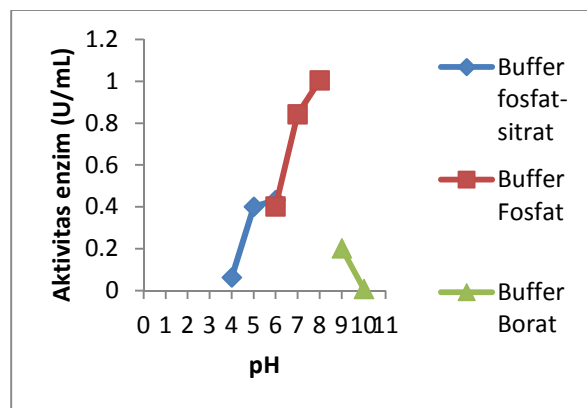
Aktivitas enzim (Gambar 2) berbanding lurus dengan laju pertumbuhan bakteri, dimana dengan semakin bertambahnya waktu inkubasi aktivitas dan laju pertumbuhan bakteri semakin meningkat. Peningkatan terjadi mulai 12 hingga 60 jam waktu inkubasi. Pertumbuhan optimal bakteri dengan aktivitas tertinggi terjadi pada akhir fase stasioner (60 jam) dengan nilai OD 0,1875 dan nilai aktivitas 0,309 U/mL, sehingga waktu produksi optimal produksi enzim kitosanase dari *Klebsiella sp* adalah 60 jam inkubasi. Pertumbuhan bakteri dan aktivitas kitosanase mengalami penurunan pada 72 jam hingga 144 jam waktu inkubasi. Hal ini disebabkan oleh terjadinya akumulasi bahan toksik, nutrisi yang sangat terbatas sehingga banyak sel yang mati. Jumlah sel mati bertambah secara eksponensial atau kebalikan dari fase logaritmik pertumbuhan. Di samping itu sel-sel bakteri akan dihancurkan oleh pengaruh enzim itu sendiri (*otolisis*), selanjutnya bakteri mati secara total [1].

Selain pengukuran terhadap nilai aktivitas enzim, pengukuran kadar protein juga diperlukan untuk mengetahui nilai aktivitas spesifik suatu enzim. Berdasarkan data pengukuran kadar protein enzim kitosanase dari *Klebsiella sp* menunjukkan bahwa kadar protein tertinggi di hari

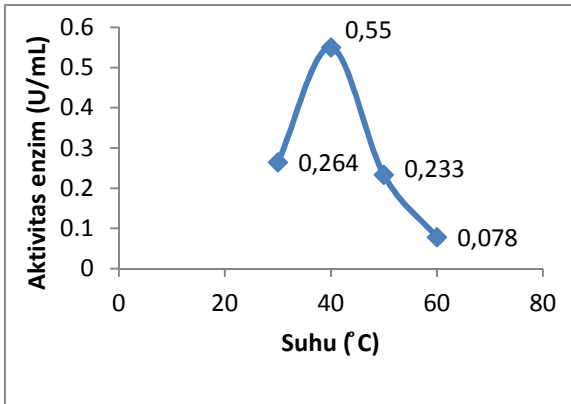
pertama dan kedua inkubasi, namun memiliki aktivitas yang rendah. Hal ini mengindikasikan bahwa adanya enzim kitinolitik lain yang disekresikan selain kitosanase. Kadar protein enzim kitosanase pada pertumbuhan bakteri (OD) dan aktivitas optimum pada penelitian ini adalah 0,059 mg/mL, sehingga aktivitas spesifik enzim yang diperoleh sebesar 5,235 U/mg.

Pengaruh pH

Kenaikan pH akan meningkatkan aktivitas kitosanase hingga pH 8 (Gambar 3), setelah itu kenaikan pH menyebabkan menurunnya aktivitas enzim secara signifikan. Kitosanase dari *Klebsiella sp* bekerja secara optimal pada buffer fosfat pH 8 (pH optimum) dengan aktivitas mencapai 1,005 U/mL. Struktur ion enzim tergantung pada pH lingkungannya seperti protein pada umumnya. Enzim dapat berbentuk ion positif, ion negative atau ion bermuatan ganda (*zwitter ion*). Dengan demikian perubahan pH lingkungan akan berpengaruh terhadap efektivitas bagian aktif enzim dalam membentuk kompleks enzim substrat. Dalam hal ini pH dapat mempengaruhi aktivitas enzim dengan mengubah struktur atau dengan mengubah muatan residu fungsional pada pengikatan substrat atau katalisis [8].



Gambar 3. Grafik pengaruh pH terhadap aktivitas Ekstrak kasar Enzim Kitosanase dari *Klebsiella sp*



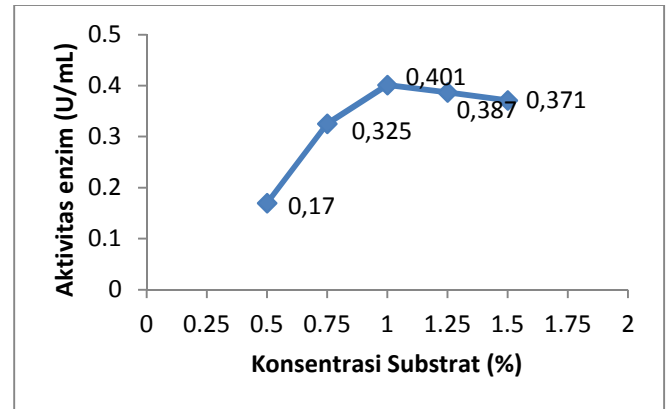
Gambar 4. Grafik pengaruh suhu inkubasi terhadap aktivitas ekstrak kasar enzim kitosanase

Pengaruh Suhu

Ekstrak kasar enzim kitosanase dari *klebsiella sp* bekerja secara optimal pada suhu 40 °C dengan nilai aktivitas sebesar 0,55 U/mL (Gambar 4). Hal ini menunjukkan bahwa enzim bekerja lambat pada suhu 30 °C, sedangkan suhu yang lebih tinggi enzim bekerja lebih cepat dalam mempercepat reaksi akibat peningkatan energi kinetik molekul-molekul yang bereaksi. Namun dengan berjalannya reaksi enzimatik, titik maksimal akan dicapai, dalam hal ini pada suhu optimum dan setelah itu laju reaksi akan menurun dengan peningkatan suhu. Oleh karena enzim adalah suatu protein sehingga kenaikan suhu dari batas reaksi selanjutnya akan menyebabkan terjadinya denaturasi yaitu berubahnya struktur tiga dimensi yang khas dari suatu enzim.

Pengaruh Konsentrasi Substrat

Berdasarkan hasil yang diperoleh pada penelitian ini, terjadi peningkatan aktivitas kitosanase dari konsentrasi *soluble kitosan* 0,5 %, 0,75 % dan maksimal pada 1 % dengan aktivitas berturut-turut yaitu 0,17 U/mL, 0,325 U/mL dan 0,401 U/mL. Aktivitas mulai menurun namun tidak signifikan pada konsentrasi 1,25% dan 1,5% seperti terlihat pada Gambar 5.



Gambar 5. Pengaruh konsentrasi substrat terhadap aktivitas ekstrak kasar kitosanase dari bakteri *Klebsiella sp*

Hal ini menunjukkan bahwa konsentrasi substrat juga mempengaruhi kecepatan reaksi yang dikatalisis oleh enzim. Ketika konsentrasi substrat dinaikkan pada konsentrasi enzim yang tetap, kecepatan reaksi akan meningkat hingga mencapai titik tertentu (konsentrasi optimum). Pada penelitian ini kecepatan maksimum terjadi pada konsentrasi substrat 1% dengan aktivitas 0,401 U/mL namun pada konsentrasi yang lebih besar cenderung konstan. Hal ini disebabkan pada batas konsentrasi substrat tertentu, semua bagian aktif enzim telah dipenuhi oleh substrat atau telah jenuh dengan substrat. Oleh karena itu, walaupun konsentrasi substrat diperbesar tidak menyebabkan aktivitas enzim meningkat.

Pengaruh Penambahan Ion Logam

Salah satu zat yang dapat berfungsi sebagai aktivator atau inhibitor dalam proses katalisis enzim adalah ion logam. Menurut Palmer (1991) yang diacu dalam Natsir (2010) pada konsentrasi tertentu ion logam dapat berfungsi mengaktifkan enzim (sebagai aktivator) dan pada konsentrasi tertentu pula dapat menghambat kerja enzim (sebagai inhibitor). Pada penelitian ini penambahan ion logam atau kation divalent pada konsentrasi 10 mM dapat meningkatkan aktivitas enzim kitosanase (*crude*) dari *Klebsiella sp* dan juga ada yang menurunkan aktivitasnya. Pada grafik (Gambar 6) terlihat ekstrak kasar kitosanase tanpa penambahan ion logam yang merupakan control memiliki aktivitas relative 100 %. Dari enam ion

logam yang ditambahkan, masing-masing tiga ion yang meningkatkan dan menghambat aktivitas enzim kitosanase yaitu Co^{2+} , Ca^{2+} dan Ni^{2+} dengan aktivitas relative berturut-turut 116%, 136%, 212% (aktivitas relative tertinggi). Sedangkan ion logam yang memberikan pengaruh penghambatan terhadap aktivitas kitosanase adalah Zn^{2+} , Mg^{2+} , dan Cu^{2+} dengan aktivitas relative masing-masing 24 %, 16 %, dan 40 %. Ion logam dapat berfungsi sebagai kofaktor enzim karena dapat berperan dalam pengikatan enzim dengan substrat untuk menstabilkan konformasi aktif enzim.

KESIMPULAN

Produksi enzim kitosanase dari bakteri *Klebsiella sp* menggunakan medium fermentasi yang mengandung 0,5% koloidal kitosan selama 60 jam dengan aktivitas 0,309 U/mL (5,235 U/mg). Ekstrak kasar enzim kitosanase hasil isolasi optimum pada suhu 40 °C dan pH 8, kecepatan maksimal enzim pada konsentrasi substrat (*soluble* kitosan) 1 %, diaktifkan oleh Co^{2+} ; Ca^{2+} dan Ni^{2+} serta dihambat oleh Zn^{2+} ; Mg^{2+} dan Cu^{2+} .

DAFTAR PUSTAKA

Arif, R.A., 2013. *Potensi Kitin Deasetilase dari Bacillus licheniformis HSA3-1A Untuk Produksi Kitosan dari Limbah Udang Putih (Penaeus merguensis) Sebagai Bahan Pengawet Bakso Ikan*. Tesis tidak Diterbitkan. Program Pascasarjana Universitas Hasanuddin, Makassar.

Chasanah E., Zilda, S.D., dan Uria A.R., 2009. Screening and Characterization of Bacterial Chitosanase From Marine Environment. *J. Coastal Development*. Vol. 12 (2) : 64-72.

Choi J.Y., Kim E.J., Piao Z., Yun Y.C., Shin Y.C., 2004. Purification and Characterization of Chitosanase from

Bacillus sp. Strain KCTC 0377BP and Its Application for the Production of Chitosan Oligosaccharides. American Society for Microbiology, *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 70 (8) : 4522-4531

Ginting, L.E., Warouw, V., dan Suleman, W.R., 2010. Aktivitas Antibakteri Dari Ekstrak Kasar Bakteri Yang Berasosiasi Dengan Sponge *Acanthostrongylophora sp*. UNSTRAT, Manado. *J. Perikanan dan Kelautan Tropis Vol. VI-3*.

Heggset, E.B., 2012. *Enzymatic Degradation of Chitosan : A Study of the Mode of Action of Selected Chitinases and Chitosanases*. Thesis for the degree of Philosophiae Doctor. Faculty of Natural Science and Technology, Norwegian University of Science and Technology, NTNU-Trondheim

Hotmatua A., 2004. *Potensi Antimikroba Oligomer Kitosan yang Dihasilkan Dengan Menggunakan Enzim Termotabil Kitosanase LH 28.38*, Skripsi tidak Diterbitkan. Institut Pertanian Bogor, Bogor.

Jo Yu-Young, Jo K.J., Jin Y.L., Kuk J.H., Kim K.Y., Kim T.H., Park R.D., 2003. Characterization of Endochitosanases Producing *Bacillus cereus* P16. *J. Microbiol. Biotechnol* 13 (6) : 960-968

Murray, R.K., Granner, D.K., Mayes, P.A., Rodwell, V.W.; alih bahasa: Andry Hartono, 2003. *Biokimia Harper*. Ed. 25. ECG. Jakarta

Natsir Hasnah, 2010. *Kajian Enzim Kitinase Termotabil dari Bakteri Termofil : Produksi, Pemurnian, Karakterisasi, dan Aplikasi Dalam Hidrolisis Kitin*. Disertasi. Program Pasca Sarjana, Jurusan kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu pengetahuan Alam, Universitas hasanuddin, Makassar

- Pagnoncelli M.G.N., de Araujo N.K., da Silva N.M.P., Assis C.F., Rodrigues S., Macedo G.R., 2010. Chitosanase Production by *Paenibacillus ehimeusis* and its Application for Chitosan Hydrolysis. *Brazilian Archives of Bio. And Tech. an Inter. J.* 53(6): pp1461 - 1468.
- Prastitis, 2006. *Isolasi dan Karakterisasi Enzim kitosanase dari Bakteri Laut Yang Berasosiasi Dengan Spons*, Skripsi tidak Diterbitkan., Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Putri, N.F., 2015. *Isolasi dan Karakterisasi L-Glutaminase dari Bakteri Simbion Spons dan Aplikasinya sebagai Antimikroba*, Skripsi tidak Diterbitkan. Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Hasanuddin, Makassar.
- Sayuti, Z.A., 2004. *Analisis Beberapa Sifat Biokimiawi dan Kinetika dari Kitosanase Crude Bacillus sp Asal Indonesia*, Skripsi tidak Diterbitkan. Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Wangtueai S., Worawattanamateekul W., Sangjindavong M., Naranong N., Sirisansaneeyakul S., 2007. Production and Partial Characterization of Chitosanases from Newly Isolated *Bacillus cereus*. *Kasetsart J (Nat. Sci.)* 41 : 346 - 355
- Yoon H.G., Kim H.Y., Shin D.H., Cho H.Y., 2001. Thermostable Chitosanase from *Bacillus sp.* Strain CK4 : Its Purification, Characterization, and Reaction Patterns. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 65(4) : 802-809.