

**Isolasi dan Karakterisasi Kitinase asal *Bacillus cereus* 11 UJ  
(Isolation and Chitinase Characterization of *Bacillus cereus* 11 UJ)**

**Y. Suryadi<sup>1</sup>, TP. Priyatno<sup>1</sup>, DN. Susilowati<sup>1</sup>, IM. Samudra<sup>1</sup>, N. Yudhistira<sup>2</sup> &  
ED. Purwakusumah<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Lab Biokimia dan Mikrobiologi BB Biogen Jl Tentara Pelajar 3a Bogor 16111,

<sup>2</sup>. Dept. Biokimia FMIPA IPB Jl . Agatis Darmaga Bogor

**Email:** yshid@yahoo.co.uk

**Memasukan:** November 2012, **Diterima:** Maret 2013

**ABSTRACT**

Chitinase hydrolyzes chitin polymer into oligomers or chitin monomer N-acetylglucosamine. This study was aimed to extract and characterize optimum chitinase activity derived from *B. cereus* 11 UJ. Chitinase isolation to the crude isolate enzyme was carried out using 70% saturated ammonium sulphate precipitation and cellophane membrane dialysis, and further characterized to obtain the optimum enzymes towards different conditions of pH, temperature, incubation time, effect of metal ions, as well as determination of  $K_m$  and  $V_{max}$  values. The results showed purity enzyme level of 2.40 and 5.23 fold compared with that of crude extract. The characterization showed that chitinase from *B. cereus* 11 UJ had an optimum pH 8, optimum temperature of 37°C, and optimum incubation of 120 minutes.  $Mn^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$ , and  $Cu^{2+}$  at concentration of 10 mM served as an inhibitor. Chitinase of *B. cereus* 11 UJ had a  $K_m$  value of 29.71  $\mu g / mL$  and a  $V_{max}$  of  $1035 \times 10^{-1} mg / mL \cdot seconds$ , respectively.

**Keywords:** *B. cereus* 11 UJ, chitinase, partial purification, ammonium sulphate, characterization

**ABSTRAK**

Kitinase merupakan enzim yang menghidrolisis polimer kitin menjadi oligomer kitin atau monomer N-asetilglukosamin. Penelitian ini bertujuan melakukan isolasi dan karakterisasi kitinase untuk memperoleh informasi aktivitas optimum kitinase asal *B. cereus* 11 UJ. Isolasi enzim kasar kitinase dan purifikasi parsial dilakukan dengan pengendapan amonium sulfat jenuh 70% dan dialisis menggunakan membran selofan, selanjutnya dikarakterisasi untuk memperoleh aktivitas optimum pada berbagai kondisi pH, suhu, waktu inkubasi, ion logam serta penentuan nilai  $K_m$  dan  $V_{maks}$ . Hasil penelitian menunjukkan pemurnian kitinase dengan amonium sulfat 70% dan dialisis menunjukkan tingkat kemurnian masing-masing 2.40 kali dan 5.23 kali dibandingkan dengan ekstrak kasar enzim. Hasil karakterisasi menunjukkan bahwa kitinase asal *B. cereus* isolat 11 UJ mempunyai pH optimum 8, suhu optimum 37°C, dan waktu inkubasi optimum selama 120 menit. Kation  $Mn^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$ , dan  $Cu^{2+}$  dengan konsentrasi 10 mM diketahui dapat berfungsi sebagai inhibitor. Kitinase mempunyai nilai  $K_m$  sebesar 29.71  $\mu g/mL$  dan  $V_{maks}$  sebesar  $1.035 \times 10^{-1} \mu g/mL$  detik.

**Kata kunci:** *B. cereus* 11 UJ, kitinase, purifikasi parsial, amonium sulfat, karakterisasi

**PENDAHULUAN**

Mikroba adalah sumber enzim yang paling banyak digunakan dibandingkan dengan tanaman dan hewan. Sebagai sumber enzim, mikroba lebih menguntungkan karena pertumbuhannya cepat, dapat tumbuh pada substrat yang murah dan lebih mudah ditingkatkan hasilnya melalui pengaturan kondisi pertumbuhan sehingga dapat digunakan sebagai pembasmi hama seperti *Bacil-*

*lus thuringiensis* untuk mengurangi serangan *Ostrinia Furnacalis* (Bahagiawati dkk 2009)

Salah satu jenis mikroba yang berpotensi sebagai agen pengendali hayati organisme pengganggu tumbuhan (OPT) adalah golongan mikroba kitinolitik. Mikroba kitinolitik merupakan jenis mikroba yang menarik untuk diisolasi dan dimanfaatkan sebagai penghasil kitinase karena mampu menghidrolisis kitin jamur penyebab penyakit tanaman (Susanto *et al.* 2005).

Pemanfaatan mikroba kitinolitik merupakan salah satu cara pengendalian hayati OPT yang efektif untuk jamur patogen tanaman, karena mekanisme pengendaliannya tidak tergantung pada ras patogen dan tidak merangsang timbulnya resistensi. Pengendalian hayati jamur dengan menggunakan mikroba kitinolitik didasarkan pada kemampuannya dalam menghasilkan kitinase dan  $\beta$ -1,3-glukanase yang dapat melisis sel jamur (El-Katatny *et al.* 2000). Kitinase yang diproduksi mikroba dapat menghidrolisis struktur kitin, senyawa utama penyusun dinding sel tabung kecambah konidia dan miselia, sehingga jamur tidak mampu menginfeksi tanaman. Mikroba kitinolitik memiliki kemampuan memproduksi kitinase dan memanfaatkan kitinase untuk asimilasi kitin sebagai sumber Karbon dan Nitrogen (Wu *et al.* 2001). Kitinase termasuk kelompok enzim hidrolase yang dapat mendegradasi kitin secara langsung menjadi produk bermolekul kecil secara intra maupun ekstraseluler secara acak dari dalam (endokitinase) atau dari ujung nonreduksi (eksokitinase) molekul kitin. (Wang & Chang 1997; Sudarsono *et al.* 2006). Enzim ini mendegradasi kitin menjadi oligosakarida kitin, yaitu diasetilkitobiosa dan N-asetilglukosamin.

Kitinase di alam memberikan kontribusi, diantaranya digunakan untuk mengisolasi protoplas jamur dan khamir. Hasil hidrolisis kitin berupa senyawa kitooligosakarida banyak dimanfaatkan dalam dunia kesehatan karena memiliki aktivitas anti tumor. Sumber kitinase tersebar mulai dari bakteri, serangga, virus, tumbuhan, dan hewan memainkan peran penting dalam proses fisiologi dan ekologi (Fujii & Miyashita 1993; Ohno *et al.* 2001). Mikroba prokariot pendegradasi kitin lainnya yang telah diketahui adalah *Photobacterium*, *Actinomycetes*, *Streptomyces* dan *Clostridium* (Thompson *et al.* 2001). Genus bakteri yang sudah banyak dilaporkan menghasil-

kan kitinase antara lain *Aeromonas*, *Alteromonas*, *Chromobacterium*, *Enterobacter*, *Ewingella*, *Pseudoalteromonas*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Vibrio* (Pleban *et al.* 1997). Beberapa spesies bakteri yang telah dipelajari antara lain *Bacillus cereus*, *B. Licheniformis*, *Clostridium* sp, *Enterobacter liquefaciens*, *Flavobacterium indoltheticum*, *Klebsiella* sp, *Micrococcus colpogenes*, *Serratia marcescens*, *Vibrio parahaemolyticus*, *V. alginolyticus*, dan *Pyrococcus* (Gao *et al.* 2003; Kamil 2007).

Strategi seleksi sangat membantu untuk mengetahui strain mikroba penghasil senyawa kimia tertentu seperti enzim, antibiotik atau metabolit sekunder lainnya (Sahai & Manocha 1993; El-Mansi & Brice 1999). Aktivitas kitinase yang ditunjukkan oleh bakteri merupakan parameter yang digunakan dalam seleksi bakteri kitinolitik (Park *et al.* 2000). Aktivitas enzim yang dihasilkan oleh mikroba dapat diketahui dengan seleksi pada medium selektif dengan komposisi tertentu, sehingga hanya jenis-jenis mikroba tertentu saja yang dapat hidup. Aktivitas kitinase merupakan ukuran perubahan molekul substrat menjadi produk dalam satuan waktu pada kondisi tertentu. Aktivitas kitinase yang diperoleh dari bakteri dapat ditentukan secara kualitatif maupun kuantitatif (Green *et al.* 2005).

Penelitian sebelumnya telah dilakukan penapisan terhadap aktivitas kitinase dan glukanase dari berbagai isolat indigenus Indonesia. Penapisan yang telah dilakukan meliputi penentuan isolat bakteri yang mampu menghasilkan kitinase dan glukanase tertinggi dengan cara mengukur aktivitasnya secara kualitatif dan kuantitatif, serta aplikasinya terhadap penghambatan pertumbuhan jamur patogen tanaman seperti *Pyricularia oryzae* dan *Ganoderma boninens*. Salah satu bakteri yang memiliki kemampuan aktivitas kitinase dan glukanase tertinggi yaitu bakteri isolat 11 UJ (Suryadi *et al.* data belum dipublikasi).

Hipotesis penelitian ini adalah didapatkan informasi mengenai aktivitas optimal kitinase asal bakteri isolat 11 UJ. Penelitian ini bertujuan melakukan isolasi dan karakterisasi kitinase untuk memperoleh informasi mengenai aktivitas optimal kitinase asal bakteri isolat 11 UJ. Informasi yang diperoleh mengenai aktivitas optimal kitinase dapat dimanfaatkan sebagai acuan untuk berbagai penelitian selanjutnya.

## BAHAN DAN CARA KERJA

Bakteri isolat 11 UJ diperoleh dari koleksi kultur mikroba BB Biogen dalam bentuk ampul diremajakan dengan cara diencerkan dengan 100  $\mu$ L aquades, kemudian diambil satu ose dan digores secara kuadran pada cawan petri yang mengandung media nutrient agar (NA). Selanjutnya media diinkubasi pada suhu 28°C selama 2 hari dan media siap dijadikan stok kultur. Satu tabung media Luria broth (LB) yang mengandung 10 g/L tripton, 10 g/L NaCl, dan 5 g/L ekstrak khamir, diinokulasi dengan satu ose bakteri isolat 11 UJ dari stok cawan agar. Kultur diinkubasi dalam suhu ruang selama 24 jam sambil digojok pada *orbital shaker* dengan kecepatan 120 rpm.

Identifikasi isolat bakteri 11 UJ dengan menggunakan sekuensing 16 S rRNA dilakukan berdasarkan protokol standar. Isolasi genomik DNA dilakukan menggunakan kit *Wizard DNA extraction* (Promega). 16s rRNA gen diamplifikasi menggunakan spesifik primer 63F dan 1387R. Reaksi PCR dijalankan mengikuti protokol dan agarose elektroforesis. DNA sekuensing dilakukan di *First base* (Malaysia). Hasil analisa sekuensing dianalisis dengan BLAST server dari Biology workbench (SDSC).

Media pertumbuhan dan produksi kitinase berasal dari media kitin cair yang dibuat pada Erlenmeyer 1L dan mencampurkannya sebanyak

125 mL koloid kitin, 0.65 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 1.5 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.25 g NaCl, 0.5 g  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 0.12 g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  dan 0.005 g CaCl dan 20 g bacto agar, kemudian dihomogenkan dengan *magnetic stirrer* dan disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121°C, tekanan 1 atm selama 2 jam. Ke dalam media kemudian diinokulasikan dengan 10 mL bakteri dari media LB berumur 24 jam. Kultur diinkubasi pada suhu 28°C selama 72 jam sambil digojok pada alat *orbital shaker* dengan kecepatan 120 rpm, kemudian kultur di sentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm selama 10 menit pada suhu 4°C. Supernatan yang diperoleh mengandung ekstrak kasar protein dipisahkan dan diuji aktivitas dan kadar proteinnya.

Isolasi parsial kitinase *B. cereus* dilakukan menggunakan amonium sulfat jenuh 70% dan membran dialisis (Barker 1998).

Supernatan yang mengandung ekstrak kasar kitinase disiapkan, kemudian ke dalam larutan enzim kasar ditambahkan larutan amonium sulfat jenuh sedikit demi sedikit sambil diaduk perlahan dengan *magnetic stirrer* sampai konsentrasi amonium sulfat dalam larutan enzim mencapai 70%. Supernatan disimpan selama 1 malam pada suhu 4°C. Selanjutnya protein dipisahkan dari supernatan dengan disentrifugasi pada 10.000 rpm selama 10 menit. Pelet yang diperoleh dipisah dan disuspensi ke dalam 2 mL PBS serta diuji aktivitas dan kadar proteinnya.

Kantung membran dialisis berbahan selofan dipotong sesuai dengan volume fraksi. Kantung direbus dalam EDTA alkali (5 mM EDTA dan 200 mM natrium bikarbonat) selama 5 menit, kemudian dibilas dengan  $\text{dH}_2\text{O}$ , dan perebusan diulangi sebanyak dua kali. Presipitat dimasukkan ke dalam kantung, kemudian kedua ujungnya dijepit. Kantung yang berisi presipitat dimasukkan ke dalam gelas piala yang berisi 1 L buffer PBS 50 mM pH 7.0 dan diaduk dengan *magnetic stirrer* selama 24 jam. Hasil dialisis diuji

aktivitas dan kadar proteinnya.

Konsentrasi N-asetilglukosamin (GlcNAc) dihitung berdasarkan kurva standar yang disiapkan dari larutan stok dengan konsentrasi larutan 0, 10, 20, 30, 40, 50, dan 60  $\mu\text{g/mL}$  dalam volume 100  $\mu\text{L}$  akuades. Selanjutnya ke dalam larutan standar GlcNAc ditambahkan 100  $\mu\text{L}$  reagen Schales, kemudian campuran dididihkan selama 5 menit dan absorbansinya diukur dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 420 nm. Selanjutnya kurva standar dibuat dengan plot konsentrasi standar terhadap absorban. Pengujian aktivitas kitinase secara kuantitatif dilakukan menggunakan modifikasi metode Spindler (1997). Gula pereduksi yang dibebaskan ditentukan secara kolorimetri dengan pereaksi Schales (Wang & Chang, 1997). Sebanyak 30  $\mu\text{L}$  koloid kitin, 68  $\mu\text{L}$  buffer fosfat pH 7 (50 mM) dan 2  $\mu\text{L}$  fraksi amonium sulfat 70% dihomogenasi dalam tabung eppendorf dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 30 menit. Pada perlakuan kontrol, filtrat enzim dipisahkan dari substrat pada saat inkubasi. Setelah inkubasi, filtrat enzim yang terpisah disatukan, kemudian disentrifugasi selama 5 menit dengan kecepatan 10.000 rpm. Sebanyak 50  $\mu\text{L}$  filtrat kemudian direaksikan dengan 50  $\mu\text{L}$  akuades dan 100  $\mu\text{L}$  reagen Schales. Selanjutnya, campuran dididihkan selama 3 menit dan diukur absorbansinya pada panjang gelombang 420nm, kemudian ditentukan nilai aktivitas kitinasenya. Penentuan aktivitas kuantitatif kitinase dilakukan dengan menentukan terbentuknya produk akhir yaitu gula pereduksi N-asetilglukosamin (GlcNAc) yang dibebaskan dari kitin selama reaksi hidrolisis. Definisi satu unit aktivitas kitinase adalah sejumlah enzim yang menghasilkan 1  $\mu\text{mol}$  gula reduksi yang ekuivalen dengan GlcNAc per menit (Green *et al.* 2005; Guthrie *et al.* 2005).

Penentuan pH optimal dari aktifitas kitinase dilakukan dengan cara mereaksikan kitinase (hasil pengendapan amonium sulfat 70%)

pada berbagai buffer pH dengan rentang pH 4-10. Buffer yang digunakan meliputi buffer sitrat (pH 4-6), buffer fosfat Tris-HCl (pH 6-8), dan buffer glisin-NaOH (pH 8-10). Konsentrasi buffer yang digunakan adalah 50 mM. Suhu optimal ditentukan dengan cara membedakan suhu inkubasi masing-masing pada suhu 20°, 30°, 37°, 40°, 50°, 60°, 70°, dan 80°C. Waktu inkubasi optimum ditentukan dengan cara menginkubasi campuran reaksi berdasarkan lama waktu inkubasi (30, 60, 90, 120, 150, 180 dan 210 menit). Pengaruh penambahan ion logam terhadap aktivitas enzim kitinase diuji menggunakan kation monovalen ( $\text{K}^+$ , dan  $\text{Na}^+$ ), divalen ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ) dan polivalen EDTA. Kation-kation tersebut diperoleh dari senyawa kimia Merck (Damstat, Jerman).

Larutan stok koloid kitin diencerkan menjadi beberapa konsentrasi dalam 250  $\mu\text{L}$  menggunakan buffer PBS pH 7. Ekstrak amonium sulfat ditambahkan sebanyak 5  $\mu\text{L}$  ke dalam masing-masing vial. Campuran dihomogenkan dengan vorteks dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 30 menit. Konsentrasi GlcNAc yang terbentuk ditentukan dengan metode Spindler (1997). Kecepatan terbentuknya GlcNAc ditentukan, kemudian diplot dalam kurva bersama konsentrasi substrat berdasarkan persamaan Lineweaver-Burk, selanjutnya ditentukan nilai  $V_{\text{maks}}$  dan  $K_m$ .

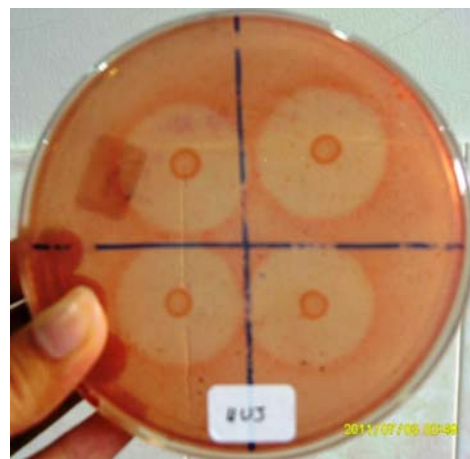
Pengukuran protein dilakukan dengan mereaksikan protein standar dan reagen Bradford mengikuti prosedur Bradford (1976). Larutan protein standar dibuat dengan menggunakan BSA (*bovine serum albumin*) dengan konsentrasi 0, 1, 2, 4, 6, 8, 10  $\mu\text{g/mL}$  dalam 50  $\mu\text{L}$  NaCl 0.15 M. Campuran dihomogenkan dengan vorteks dan diinkubasi selama 10 menit pada suhu ruang. Sampel protein fraksi diambil sebanyak 5  $\mu\text{L}$  dan diencerkan dalam 250  $\mu\text{L}$  NaCl 0.15 M, kemudian ditambahkan dengan 250  $\mu\text{L}$  reagen Bradford dan dihomogenkan dengan vorteks.

Absorban diukur pada panjang gelombang 595nm setelah campuran diinkubasikan pada suhu ruang selama 20 menit. Konsentrasi protein ditentukan dengan persamaan kurva standar.

**HASIL**

**Identifikasi isolat bakteri 11UJ**

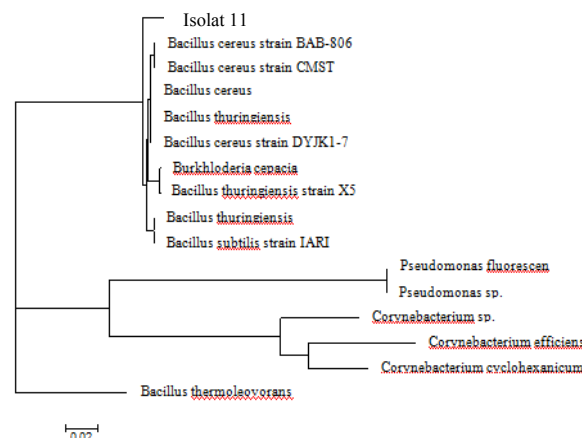
Potensi bakteri dalam memproduksi kiti-nase (indeks kitinolitik) ditentukan berdasarkan nisbah antara diameter zona bening (*halo*) dengan diameter koloni bakteri. Zona bening terbentuk akibat kitinase yang dibebaskan ke luar sel bakteri untuk memecah makromolekul kitin menjadi molekul kitin yang lebih kecil, ditunjukkan pada Gambar 1.



**Gambar 1.** Uji kualitatif aktivitas kitinase *B. cereus* 11 UJ pada media kitin agar setelah pewarnaan dengan pewarna congo red 2%. Tanda panah menunjukkan zona bening.

**Amplifikasi isolat 11UJ dengan 16S ribosomal DNA**

Isolat bakteri 11UJ diamplifikasi dengan sekuensing 16S rDNA menggunakan primer 63F dan 1387R. Hasil amplifikasi produk PCR mempunyai satu pita DNA berukuran 1.3 kb (data tidak ditampilkan). DNA disekeuensing dua arah untuk memastikan identitasnya. Hasil analisis terhadap sekuen isolat bakteri 11UJ yang dianalisis dengan data di Gene Bank melalui analisa BLASTN menunjukkan 99% derajat kesamaan dengan *B. cereus* strain BAB 806 dan strain CMST (Gambar 2).



**Gambar 2.** Filogenetik bakteri 11 UJ yang dianalisis berdasarkan program PHYLIP version 3.6.

**Produksi dan uji aktivitas kitinase *B. cereus* 11 UJ**

Pengendapan protein yang dilakukan dengan cara menambahkan garam amonium sulfat 70% ke dalam larutan enzim kasar. Selanjutnya protein yang telah mengendap dipisahkan berdasarkan bobot molekul oleh kantung dialisis berupa membran selofan yang bersifat semi permeabel. Pemurnian kitinase asal *B. cereus* 11 UJ dari larutan enzim kasar hingga dialisis dapat dilihat pada Tabel 1.

Kitinase yang telah diendapkan dengan

amonium sulfat 70% memiliki tingkat kemurnian sebesar 2.40 kali dibandingkan dengan larutan enzim kasarnya dengan perolehan (*yield*) 2.23%, sedangkan setelah dialisis memiliki tingkat kemurnian sebesar 5.23 dengan *yield* 0.83%. Selain itu aktivitas total dan kadar protein total yang terkandung pada masing-masing tahap pemurnian mengalami penurunan, sedangkan aktivitas spesifik mengalami peningkatan seiring dengan proses pemurnian.

Penggunaan garam amonium sulfat dan dialisis dapat meningkatkan tingkat kemurnian 2-6 kali dari ekstrak kasar enzimnya. Hal ini diiringi

dengan peningkatan aktivitas spesifik. Kadar protein total yang dihitung jauh lebih tinggi sebesar 21.39 g dalam 250 mL media, sedangkan pada tahap pemisahan protein menggunakan konsentrasi amonium sulfat 70% dan dialisis, kadar protein total yang dihitung sebesar 199 mg dalam 3 mL larutan buffer PBS dan 34 mg dalam 0.8 mL larutan sampel.

Aktivitas spesifik kitinase setelah dialisis menggunakan membran (10 kDa *cut off*) meningkat lebih tinggi dibandingkan dengan aktivitas spesifik hasil pengendapan menggunakan amonium sulfat. Aktivitas spesifik yang semakin tinggi menunjukkan enzim semakin murni. Hal ini disebabkan kehilangan protein non-enzim pada beberapa tahap pemisahan yang dilalui dalam pemurnian enzim.

### Karakterisasi kitinase pH

Penentuan pH optimum kitinase dilakukan dengan menggunakan tiga jenis buffer yang berbeda yaitu buffer Sitrat-Fosfat, buffer Tris-Hcl dan buffer Glysin-NaOH dengan rentang pH 4-8.

Berdasarkan hasil penelitian yang ditampilkan dalam Gambar 3, terlihat bahwa pH optimum kitinase *B. cereus* 11 UJ dicapai oleh buffer Glysin-NaOH pH 8 dengan nilai aktivitas enzim sebesar 0.059 U/mL. Selain itu dilakukan juga *over lap* pH dari ketiga jenis buffer tersebut, yaitu pada pH 6 dan 8.

### Suhu

Pengaruh suhu terhadap aktivitas kitinase *B. cereus* 11 UJ dapat dilihat pada Gambar 4. Berdasarkan hasil yang diperoleh, terlihat bahwa variasi suhu yang diuji memberikan pengaruh terhadap aktivitas kitinase *B. cereus* 11 UJ.

Kitinase memiliki suhu optimum 37°C dengan nilai aktivitas enzim sebesar 0.070 U/mL. Dari gambar 4 terlihat bahwa pada suhu yang lebih rendah dari suhu optimumnya, aktivitas enzim juga rendah namun cenderung meningkat. Setelah melewati suhu optimum, yaitu pada suhu 40-80°C aktivitas enzim terus menurun.

### Waktu inkubasi

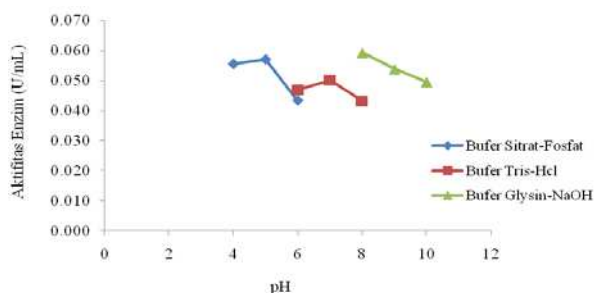
Hasil pengujian stabilitas kitinase *B. cereus* 11 UJ dengan rentang waktu inkubasi 30-210 disajikan pada Gambar 5. Aktivitas enzim relatif stabil hingga menit ke-120 dengan aktivitas tertinggi dicapai pada menit ke-90 yaitu sebesar 0.009 Unit/mL, kemudian aktivitas enzim mengalami penurunan setelah menit ke-120. Inkubasi yang dilakukan pada pH dan suhu optimumnya yaitu pada pH 8 dan suhu 37°C, aktivitas kitinase isolat tersebut tidak cepat mengalami penurunan.

### Ion logam

Berdasarkan hasil percobaan penambahan senyawa logam dengan konsentrasi 10 mM pada kitinase *B. cereus* 11 UJ, menunjukkan kation  $\text{a}^{2+}$  dan  $\text{Mg}^{2+}$  meningkatkan aktivitas kitinase meskipun tidak berbeda dengan control. Penambahan kation  $\text{Ca}^{2+}$  memperlihatkan kenaikan aktivitas

**Tabel 1.** Pemurnian amonium sulfat dan dialisis terhadap aktivitas kitinase *B. cereus* 11 UJ

| Tahap Pemurnian Kitinase | Volume Enzim (mL) | Aktivitas Total (U) | Protein Total (mg) | Aktivitas Spesifik (U/mg) | Yield (%) | Tingkat Kemurnian |
|--------------------------|-------------------|---------------------|--------------------|---------------------------|-----------|-------------------|
| Enzim Kasar              | 230               | 4.301               | 21390              | 0.00020                   | 100       | 1                 |
| Ammonium Sulfat 70%      | 3                 | 0.096               | 199                | 0.00048                   | 2.23      | 2.40              |
| Dialisis                 | 0.8               | 0.036               | 34                 | 0.00105                   | 0.83      | 5.23              |



**Gambar 3.** Pengaruh pH terhadap aktifitas kitinase *B. cereus* 11 UJ.

relatif enzim menjadi 104.55%, atau mengalami peningkatan sebesar 4.55% dari aktivitas enzim kontrol; sedangkan kation  $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$  dan EDTA menurunkan aktivitas kitinase *B. cereus* 11 UJ. Penurunan aktivitas relatif enzim terbesar terjadi pada penambahan 10 mM kation  $Mn^{2+}$  yaitu sebesar 60.79% dibandingkan kontrol. Begitu juga dengan penambahan kation  $Cu^{2+}$  dan  $Fe^{2+}$ , terjadi penurunan yang relatif tidak jauh berbeda antara keduanya yaitu masing-masing dapat menurunkan aktivitas relatif enzim menjadi 32.28% dan 31.88%. Hal yang serupa juga diperlihatkan oleh kation EDTA,  $Zn^{2+}$ ,  $Na^+$ , dan  $K^+$ , yang menurunkan aktifitas relatif enzim masing-masing sebesar sebesar 22.38%, 12.28%, 5.74% dan 0.79% (Gambar 6).

### Kinetika kitinase

Data yang dihasilkan merupakan hasil reaksi pada konsentrasi substrat yang berbeda selama 30 menit. Data yang diperoleh diplot dalam kurva double reciprocal (Gambar 7).

Persamaan yang diperoleh dari uji kinetika adalah  $y = 9.66 + 287 x$ . Persamaan tersebut memiliki variabel x untuk  $1/[S]$  dan y untuk  $1/v$ . Nilai  $V_{maks}$  diperoleh dari nilai invers 9.66 yaitu  $1.035 \times 10^{-1} \mu\text{g/mL detik}$ , sedangkan  $K_m$  diperoleh dari gradien persamaan garis Lineweaver-Burk yang merupakan nilai  $K_m/V_{maks}$ , sehingga nilai  $K_m$  yang diperoleh dari perhitungan adalah  $29.71 \mu\text{g/mL}$ . Nilai  $K_m$  yang diperoleh pada penelitian ini cukup tinggi sehingga kitinase *B.*

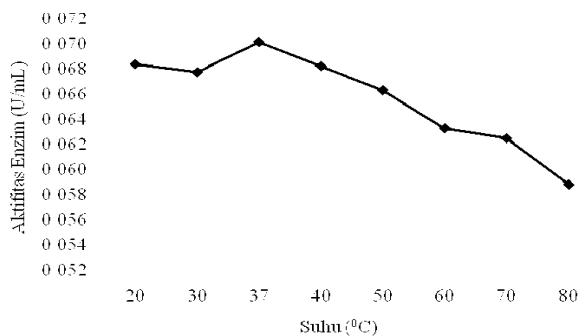
*cereus* 11 UJ mempunyai afinitas yang rendah terhadap substrat koloidal kitin. Nilai  $V_{maks}$  atau kecepatan maksimum dari reaksi enzimatik diperoleh dengan nilai  $1.035 \times 10^{-1} \mu\text{g/mL detik}$ , yang artinya pada kondisi optimum, kitinase dapat mengubah substrat koloidal kitin menjadi GlcNAc sebesar  $1.035 \times 10^{-1} \mu\text{g/mL}$  tiap detik.

## PEMBAHASAN

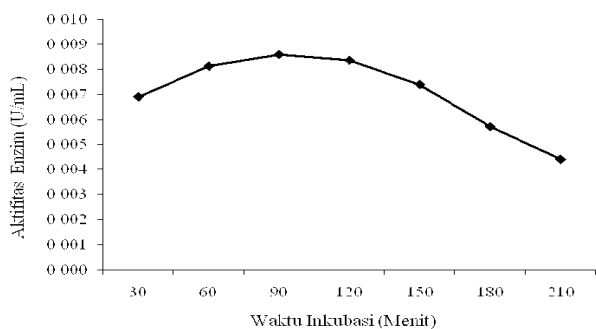
Mikroba kitinolitik yang dapat melisis atau mendegradasi kitin menjadi monomer-monomernya diduga mampu menghambat pertumbuhan jamur patogen tanaman padi dengan cara merusak dinding jamur tersebut. Menurut Gohel *et al.* (2006), aktivitas kitinase secara kualitatif ditentukan oleh adanya zona bening di sekitar koloni bakteri yang tumbuh pada medium agar kitin. Adanya zona bening di sekitar koloni bakteri setelah waktu inkubasi tertentu, membuktikan bahwa bakteri tersebut mampu memproduksi kitinase (Park *et al.* 2000). Kitinase yang disekresikan bakteri dalam medium agar kitin kemudian diikat oleh partikel kitin (koloidal kitin), sehingga kitin menjadi terdegradasi dan komposisi kitin dalam medium menjadi berkurang. Degradasi oligomer kitin dan penggunaan molekul hasil degradasi tersebut oleh bakteri membuat medium tampak jernih terutama disekitar koloni bakteri (Chen & Lee 1994).

Hasil analisis filogenetik juga mengelompokkan bakteri yang dekat dengan kelompok lainnya seperti *B. thuringiensis* dan *B. subtilis*. Kelompok bakteri ini dilaporkan mempunyai daya antibakteri melalui produksi enzim ekstraseluler kitinase (Suryadi *et al.* 2011).

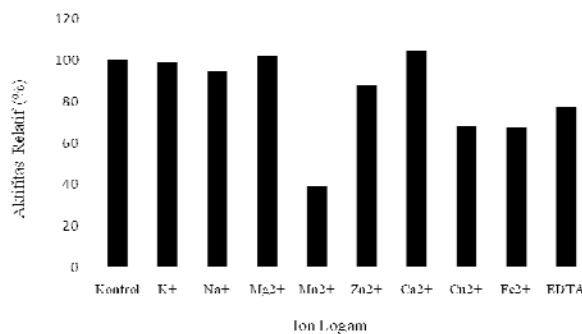
Tahap awal dari pemurnian kitinase adalah metode ekstraksi yang bertujuan untuk memisahkan enzim dari campuran partikel non-enzim. Penambahan garam atau pelarut organik dilakukan untuk mengendapkan protein.



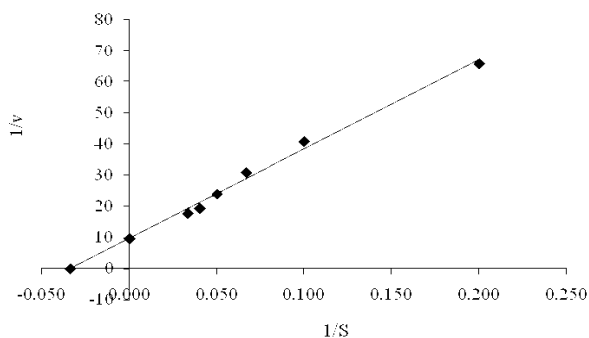
**Gambar 4.** Pengaruh suhu inkubasi terhadap aktifitas kitinase *B. cereus* 11 UJ.



**Gambar 6.** Pengaruh ion logam terhadap aktifitas relatif kitinase *B. cereus* 11 UJ



**Gambar 5.** Pengaruh waktu inkubasi terhadap aktifitas kitinase *B. cereus* 11 UJ



**Gambar 7.** Persamaan Lineweaver-Burk aktivitas kitinase *B. cereus* 11 UJ

Penurunan aktivitas total kitinase setelah pengendapan menunjukkan adanya kitinase yang tidak mengendap pada konsentrasi amonium sulfat 70%. Hal ini diduga ada sebagian kitinase yang tidak terekstrak oleh bahan pengeksrak. Selain itu, ada sebagian protein yang terdenaturasi selama proses ekstraksi berlangsung. Begitu juga dengan kadar protein total setelah dipekatkan menunjukkan penurunan. Kadar protein total yang terkandung pada enzim kasar jauh lebih tinggi dibandingkan dengan dua tahap pemurnian lainnya. Hal ini dimungkinkan pada ekstrak kasar dilakukan pemisahan sel dengan menggunakan tekanan tinggi (sentrifugasi) yang akan memecah komponen sel bakteri, sehingga komponen sel yang merupakan protein non-enzim akan bercampur dengan enzim kitinase pada larutan media.

Pengendapan protein menggunakan konsentrasi amonium sulfat 70% didasarkan pada penelitian Gomes *et al.* (2001) yang menunjukan

bahwa penggunaan fraksi amonium sulfat dengan konsentrasi 50%-80% memiliki kemampuan yang baik dalam mengendapkan protein dari ekstrak kasar enzim. Hasil penelitian Tjandrawati *et al.* (2003) menggunakan *Trichoderma viride* TNJ63, melaporkan kitinase yang dihasilkan melalui tahap dialisis memiliki tingkat kemurnian sebesar 2.9 kali dari enzim kasarnya; sementara hasil penelitian Yong *et al.* (2005) menggunakan bakteri C4 memiliki tingkat kemurnian 2.7 dan 5.64 kali untuk tahapan amonium sulfat dan dialisis. Hasil penelitian lain dari Narayana & Vijayalakshmi (2009), melaporkan kitinase yang diperoleh dari tahapan pemurnian amonium sulfat memiliki tingkat kemurnian 2.2 dengan *yield* 87.4%.

Hampir semua enzim sangat sensitif terhadap perubahan pH, dan biasanya aktivitas enzim akan berkurang bila pH medium berubah dari pH yang bukan merupakan pH opti-



mumnya.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa jenis buffer yang digunakan dalam penentuan pH optimum enzim kitinase memiliki pengaruh terhadap aktivitas enzim. Hal ini disebabkan oleh kekuatan ionik pada masing-masing buffer berbeda, sehingga akan mempengaruhi gugus ionik enzim. Setiap enzim mempunyai karakterisasi pH optimum yang aktif pada kisaran pH yang relatif sempit. Kitinase yang dihasilkan oleh *Pseudomonas aeruginosa* K-187 menurut hasil penelitian Wang & Chang (1997) mempunyai nilai pH 8. Reaksi enzim sangat dipengaruhi oleh pH medium tempat reaksi terjadi (Suhartono, 1989), dan pada umumnya enzim aktif pada kisaran pH 5-9 (Rahayu *et al.* 2004). Pada larutan alkali (pH  $\geq$  9) kemungkinan terjadi kerusakan pada residu sistin, sedangkan pada larutan asam (pH kurang dari 4) hidrolisis dari ikatan peptida yang tidak stabil dapat terjadi di samping residu asam aspartat. Setiap enzim mempunyai pH optimum yang khas yaitu kisaran pH dimana enzim menunjukkan aktivitas maksimum dengan stabilitas yang tinggi (Lehninger *et al.* 2004).

Penentuan pH optimum bertujuan untuk mengetahui kondisi optimum aktivitas enzim sehingga dapat mengetahui penggunaan enzim yang sesuai dengan karakterisasinya. Efek pH terhadap enzim dapat mempengaruhi titik isoelektrik enzim. Nilai pH yang terlalu tinggi atau terlalu rendah akan menyebabkan ketidakstabilan pada konformasi enzim sehingga menyebabkan aktivitas enzim menurun. Keadaan pH optimum berhubungan dengan kondisi saat pemberi atau penerima proton yang penting pada sisi katalitik enzim berada dalam tingkat ionisasi yang diinginkan (Lehninger *et al.* 2004).

Setiap enzim pada umumnya memiliki aktivitas maksimum pada suhu tertentu, aktivitas enzim akan semakin meningkat dengan bertambahnya suhu sampai suhu optimum tercapai.

Setelah itu kenaikan suhu lebih lanjut akan menyebabkan aktivitas enzim menurun. Hal ini menyebabkan perubahan konformasi enzim-substrat sehingga mengalami hambatan untuk berikatan. Selain itu suhu tinggi akan merusak struktur enzim sehingga mengalami denaturasi (Lehninger *et al.* 2004). Berdasarkan suhu pertumbuhannya, mikroba digolongkan menjadi lima kelompok yaitu psikrofil tumbuh pada suhu 5-20°C, mesofil suhu 20-45°C, termofil 45-65°C, termofil ekstrim 65-85°C dan hipertermofil 85-100°C. Menurunnya aktivitas mengikuti meningkatnya suhu di atas optimum biasanya disebabkan oleh perusakan enzim (Sudaryati 2009). Kitinase yang berasal dari *B. cereus* 11 UJ dapat digolongkan ke dalam kitinase mesofilik, karena memiliki suhu optimum pada suhu 37°C. Suhu mempengaruhi energi kinetik molekul. Kenaikan energi kinetik molekul yang terjadi saat suhu tinggi dapat meningkatkan frekuensi tumbukan, sehingga meningkatkan laju reaksi (Murray *et al.* 2005).

Kitinase *B. cereus* 11 UJ memiliki stabilitas mencapai waktu inkubasi 120 menit. Hal ini menunjukkan bahwa setelah melewati menit ke-120, aktivitas terus mengalami penurunan diduga akibat substrat yang tersedia sudah habis terdegradasi menjadi derivatnya atau terjadi akumulasi GlcNAc hasil degradasi dalam medium fermentasi. GlcNAc dalam jumlah yang berlimpah dapat menghambat produksi kitinase (Sudaryati 2009). Kitinase *B. cereus* 11 UJ menurut hasil penelitian ini masih memiliki stabilitas yang relatif rendah. Rahayu *et al.* (2004) mengatakan bahwa semakin rendah kekuatan penstabil enzim, maka semakin tidak stabil suatu enzim. Sebaliknya apabila semakin tinggi kekuatan enzim, maka enzim tersebut akan semakin stabil. Stabilitas enzim merupakan fungsi dari kekuatan penstabil enzim yaitu ikatan hidrogen, ikatan hidrofobik, interaksi ionik, ikatan logam dan jembatan disulfida (Suhartono 1989).

Penambahan ion-ion logam dari beberapa senyawa memiliki pengaruh terhadap kinerja aktivitas kitinase. Beberapa enzim diketahui membutuhkan ion-ion tertentu untuk menjamin aktivitasnya, ion-ion tersebut dapat berperan sebagai aktivator pada konsentrasi tertentu atau sebagai inhibitor pada kondisi yang berbeda. Enzim bersifat tidak stabil, oleh karena itu aktivitasnya dalam mensintesis substrat menjadi produk dipengaruhi oleh berbagai kondisi fisika maupun kimia. Hal ini bervariasi tergantung dari karakteristik enzim yang bersangkutan. EDTA merupakan *chelating agent* yang dapat mengkelat ion yang berperan dalam aktivitas enzim sehingga aktivitas enzim turun. Penambahan kation  $\text{Ca}^{2+}$  pada kitinase dari *Enterobacter sp.* NRG4 dapat meningkatkan aktivitas enzim; sementara adanya kation  $\text{Cu}^{2+}$  pada kitinase yang diisolasi dari *Vibrio sp.* 98CJ11027 (Park *et al.* 2000) dan kation  $\text{Co}^{2+}$  pada kitinase yang diisolasi dari *Bacillus* K-129-14 (Rahayu *et al.* 2004) dapat meningkatkan aktivitas enzim tersebut.

Wang & Chang (1997) melaporkan bahwa, kation  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ , dan  $\text{Zn}^{2+}$  dapat menghambat aktivitas kitinase dari *Pseudomonas aeruginosa* K-187. Kation  $\text{Hg}^+$ ,  $\text{Ag}^+$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ , dan  $\text{Co}^{2+}$  dapat menghambat kitinase dari *Vibrio sp.* 98CJ11027 (Park *et al.* 2000) dan  $\text{Zn}^{2+}$  menghambat kitinase dari *Bacillus* K-129-14 (Rahayu *et al.* 2004). 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).

Kecepatan reaksi suatu enzim pada setiap konsentrasi substrat dapat dihitung jika nilai  $K_m$  dan  $V_{maks}$  enzim tersebut diketahui (Lehninger *et al.* 2004). Hal ini menunjukkan bahwa enzim

menurunkan energi aktivasi keseluruhan reaksi. Konstanta Michaelis-Menten ( $K_m$ ) beberapa enzim sangat beragam, tetapi sebagian besar enzim memiliki  $K_m$  antara 2 mM dan 5 mM (Ogawa & Ando 2009). Enzim memiliki nilai konstanta Michaelis-Menten ( $K_m$ ) yang berbeda satu sama lain. Konstanta ini bersifat spesifik dan menyatakan konsentrasi substrat yang diperlukan oleh suatu enzim untuk mencapai setengah kecepatan reaksi maksimum ( $V_{maks}$ ), berdasarkan persamaan Lineweaver-Burk yang merupakan persamaan turunan dari persamaan Michaelis-Menten. Persamaan garis Lineweaver-Burk merupakan persamaan linear. Invers kecepatan reaksi ( $1/v$ ) diplot terhadap invers konsentrasi substrat ( $1/[S]$ ) (Harisha 2007). Peningkatan konsentrasi substrat tidak meningkatkan kecepatan laju reaksi, karena saat semua enzim telah terjenuhi oleh substrat, kecepatan enzim menjadi tetap. Nilai  $K_m$  suatu enzim menunjukkan ukuran afinitas enzim-substrat. Jika nilai  $K_m$  besar, maka afinitas enzim-substrat rendah. Sebaliknya jika  $K_m$  kecil, maka afinitas enzim-substrat tinggi (Bintang 2010).

## KESIMPULAN DAN SARAN

Bakteri isolat 11 UJ yang digunakan dalam penelitian ini telah diidentifikasi ke dalam spesies *B. cereus* berdasarkan sekuensing 16S rDNA.

Pemurnian parsial menggunakan amonium sulfat 70% dan dialisis dapat meningkatkan kemurnian sebesar 2.40 kali dan 5.23 kali dibandingkan dengan ekstrak kasar enzim.

Hasil karakterisasi terhadap fraksi pemurnian amonium sulfat 70% menunjukkan pH optimum 8, suhu optimum  $37^\circ\text{C}$ , dan waktu inkubasi optimum selama 120 menit. Adanya pengaruh logam dengan konsentrasi 10 mM menunjukkan kemungkinan ion  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ , dan  $\text{Cu}^{2+}$  sebagai inhibitor terhadap aktivitas kitinase. Kitinase *B. cereus* 11 UJ mempunyai nilai  $K_m$  sebesar 29.71

$\mu\text{g/mL}$  dan  $V_{\text{maks}}$  sebesar  $1.035 \times 10^{-1} \mu\text{g/mL/dt}$ .

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk melengkapi informasi yang diperoleh seperti analisis bobot molekul (SDS PAGE) maupun pemurnian protein dengan kromatografi penukar ion.

## DAFTAR PUSTAKA

- Barker, K. 1998. *At the Bench: A Laboratory Navigator*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Bahagiawati, H. Rizjaani, AK. Sibuea. 2009. Toksisitas Isolat *Bacillus thuringiensis* yang Mengandung Gen *cry 1A* Terhadap Hama Penggerek Batang Jagung, *Ostrinia furnacalis* Guenee. *J. Biol. Indonesia* 6 (2): 97-105
- Bradford, MM. 1976. A Rapid and Sensitive Method of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal. Biochem.* 12: 248-254.
- Bintang, M. 2010. *Biokimia Teknik Penelitian*. Jakarta: Erlangga.
- Chen, JP., & MS. Lee. 1994. Simultaneous Production and Partition of Chitinase During Growth of *Serratia marcescens* in an Aqueous Two phase System. *Biotech.* 8(11): 783-788.
- El-Katatny, MH, W. Somitch, KH. Robra, MS. El-Katatny, & GM. Gübitz. 2000. Production of Chitinase and  $\beta$ -1,3-glucanase by *Trichoderma harzianum* for Control of the Phytopathogenic Fungus *Sclerotium rolfsii*. *Food Technol. Biotechnol.* 38: 173-180.
- El-Mansi, EMT., & CFA. Bryce. 1999. *Fermentation Microbiology and Biotechnology*. London: Taylor.
- Fujii, T., & K. Miyashita. 1993. Multiple Domain Structure in a Chitinase Gene (Chic) of *Streptomyces lividans*. *J. Gen. Microbiol.* 139: 677-686.
- Fukamizo, T. 2000. Chitinolytic enzymes: catalysis, substrate binding, and their application. *Cur. Prot. Peptide Sci.* 1:105-124.
- Gao, JMW., KR. Bauer, MA. Shockley, Pysz, & RM. Kelly. 2003. Growth of Hyperthermophilic Archaeon *Pyrococcus furiosus* on Chitin Involves Two Family 18 Chitinases. *J. App. Env. Microbiol.* 69:3119-3128
- Gijzen, M., K. Kuflu, D. Qutob, & JT. Chernys. 2001. A Class I Chitinase from Soybean Seedcoat. *J. Expt. Bot.* 52: 2283-2289.
- Gohel, V., A Singh, M Vimal, P. Ashwini., & HS. Chatpar. 2006. Bioprospecting and Antifungal Potential of Chitinolytic Microorganisms. *African J. Biotech.* 5(2): 54-72.
- Gomes, RC., CS. Alviano, CJ. Ulhoa, LF. Linhares, & RR. Coelho. 2001. Purification of a thermostable endochitinase from *Streptomyces* RC1071 isolated from a cerrado soil and its antagonism against phytopathogenic fungi. *Appl. Microbiol.* 90:653-661.
- Green, AT., MG. Healy, & A. Healy. 2005. Production of chitinolytic by *Serratia marcescens* QMB1466 using various chitinous substrates. *J. Chem. Tech. & Biotech.* 80: 28-34.
- Guthrie, JL., S. Khalif, & AJ. Castle. 2005. An Improved Method for Detection and Quantification of Chitinase Activities. *Can. J. Microbiol.* 51(6): 491-495.
- Harisha, S. 2007. *Biotechnology Procedures and Experiments Handbook*. New Delhi: Infinity Science Press.
- Kamil, Z. 2007. Isolation and identification of Rhizosphere Soil Chitinolytic Bacteria and their Potential in Antifungal Biocontrol. *Global J. Mol. Sci.* 2(2):57-66.
- Lehninger, AL., DL. Nelson., & MM. Cox. 2004. *Principles of Biochemistry*. New York: Worth Press.
- Murray, RK., DK. Granner, PA. Mayes, & VW. Rodwell. 2005. *Harper's Illustrated 13 Biochemistry*. Twenty-Sixth Edition. New

- York: McGraw-Hill.
- Narayana, JP. Kolla, & M. Vijayalakshmi. 2009. Chitinase Production by *Streptomyces* Sp. Anu 6277. *Brazilian J. Microbiol.* 40: 725-733.
- Ogawa, A., & F. Ando. 2009. Sucrose metabolism for the development of seminal root in maize seedlings. *J. Plant Product* 9-16.
- Ohno, T., S. Armand., T. Hata., N. Nikaidou., B. Henrissat., M. Mitsutomi., & T. Watanabe. 2001. A Modular Family 19 Chitinase Found in The Prokaryotic Organism *Streptomycesgriceus* HUT 6037. *J. Bacteriol.* 178: 5065-5070.
- Park, SH., J. Lee, & HK. Lee. 2000. Purification and Characterization of Chitinase from A Marine Bacterium, *Vibrio sp.* 98CJ11027. *J. Microbiol.* 38(4): 224-229.
- Pleban, S., L. Chernin., & I. Chet. 1997. Chitinolytic activity of an endophytic strain of *Bacillus cereus*. *J. Appl. Microbiol.* 25: 284-288.
- Pujiyanto, S., DA. Suprihadi, Wijanarka, & S. Purwantisari. 2004. *Potensi Bakteri Kitinolitik Isolat Lokal untuk Memproduksi Enzim Kitinase dan Mengendalikan Kapang Patogen*. [Laporan Penelitian]. Semarang: FMIPA UNDIP.
- Rahayu, S., MT. Tanuwidjaya, Y. Rukayadi, A. Suwanto, MT. Suhartono, JK. Hwang & YR. Pyun. 2004. Study of thermostable chitinase enzymes from indonesian *Bacillus* K-29-14. *J. Microbiol. Biotechnol.* 14(4): 647-652.
- Sahai, AS., & MS. Manocha. 1993. Chitinases of Fungi & Plants: Their Involvement in Morphogenesis & Host-Parasite Interaction. *FEMS Microbiol. Rev.* 11:337-338.
- Sudaryati, YA. 2009. Kondisi optimum produksi kitinase dari aktinomisetes dengan karakteristikasi pH dan suhu enzim. *Berkala Panel. Hayati* 3: 57-61.
- Sudarsono, P. Endang, Siswanto, & S. Ilyas. 2006. Aktivitas Enzim Kitinase pada Kacang Tanah yang Sehat dan yang Terinfeksi *Sclerotium rolfsii*. *J. Hayati.* 13(2):73-78.
- Suhartono, MT. 1989. Enzim dan Bioteknologi. Bogor: Departemen Pendidikan dan Kebudayaan. Direktorat Jendral Pendidikan Tinggi. PAU Bioteknologi, IPB.
- Suryadi, Y., DN. Susilowati, KE. Putri & NR. Mubarik. 2011. Antagonistic activity of indigenous Indonesian bacteria as the suppressing agent of rice fungal pathogen. *J. Int. Environ. Appl. Sci.* 6(4):558-568.
- Susanto, A., PS. Sudharto, & RY. Purba. 2005. Enhancing biological control of basal stem rot disease (*Ganoderma boninense*) in oil palm plantation. *Mycopath.* 159(1): 153-157.
- Spindler, KD. 1997. *Chitinase and Chitosanase Assays*. Muzarelli, RAA & MG. Peter, (eds). Chitin Handbook. Alda Tecnografica p.229-235.
- Thompson, SE., M. Smith, MC. Wilkinson, & K. Park. 2001. Identification and characterization of a chitinase antigen from *Pseudomonas aeruginosa* strain 385. *J. Appl. Env. Microbiol.* 67(9):4001-4008.
- Tjandrawati, TN., M. Ali., C. Ginting., Wahyuningsih., A. Dahliaty., S. Devi., & Y. Sukmarisa. 2003. Isolasi dan Karakterisasi sebagian Kitinase *Trichoderma viride* TNJ63. *J Nat. Indonesia* 5(2): 101-106.
- Wang, SL, & WT.Chang. 1997. Purification and Characterization of Two Bifunctional Chitinase/Lysozimes Extracelullarly Produce by *Pseudomonas aeruginosa* K-187 in a Shrimp and Crab Shel Powder Medium. *J. Appl. Environ. Microbiol.* 63:380-386.
- Wu, ML., YC. Chuang, JP. Chen, CS. Chen, & MC. Chang. 2001. Identification & Characterization of the Three Chitin-Binding Domains within the Multidomain Chitinase Chi92 from *Aeromonas hydrophila* jp 101. *J. Appl. Env. Microbiol.* 67: 5100-5106.
- Yong, T., J. Hong, L. Zhangfu, L. Zang., D. Xiuqiong, K. Tao, G. Shaorong, & L. Shingui. 2005. Purification and Characterization of An Extracelluler Chitinase Produced by *Bacterium* C4. *Ann. Micro-biol.* 55 (3): 213-218.