

PRODUKSI ENZIM KITINASE DARI *Aspergillus niger* MENGGUNAKAN LIMBAH CANGKANG RAJUNGAN SEBAGAI INDUSER

Purkan Purkan^{1*}, Afaf Baktir¹, Arju Rohmah Sayyidah¹

¹Departemen Kimia Fakultas Sains dan Teknologi
Universitas Airlangga

*email: purkan@fst.unair.ac.id

Abstrak

Kitinase merupakan enzim hidrolitik yang dapat menghidrolisis kitin pada ikatan β -1,4-glikosidiknya dengan menghasilkan derivat-derivat kitin seperti oligomer kitin yang mempunyai banyak manfaat. Penelitian ini bertujuan untuk melakukan pengembangan produksi enzim kitinase dari sumber lokal yang melimpah di alam serta murah dengan melakukan optimasi substrat dalam hal ini digunakan substrat tetes tebu (molase) dan limbah cangkang rajungan untuk produksi enzim kitinase dari *Aspergillus niger*. Sebelumnya, dilakukan kultivasi isolat kapang *Aspergillus niger* dengan membuat kurva pertumbuhan menggunakan metode masa sel kering dimana dari hasil penelitian inokulasi optimal adalah 22 jam. Pada proses produksi, diperoleh waktu fermentasi optimal adalah 52 jam dengan menentukan uji aktivitasnya menggunakan metode turbidimetri. Hasil optimasi substrat menunjukkan bahwa enzim kitinase yang maksimal diperoleh pada penambahan molase 0,5% (b/v) dengan unit aktivitas enzim 0,14726 (U/mL) dan cangkang rajungan 2% (b/v) dengan unit aktivitas enzim yang dihasilkan 0,12826 (U/mL). Kitinase dari *Aspergillus niger* ini mempunyai pH optimal 6 dan suhu optimal 40 °C.

Kata kunci: *Aspergillus niger*, kitinase, cangkang rajungan, molase

Abstract

Chitinase is a hydrolytic enzyme that hydrolyzes chitin on β -1,4-glycosidic bond and thereby producing chitin derivatives such as chitin oligomers that have multiple benefits. The purpose of this research was to develop the production of chitinase enzyme from cheap and are abundant local nature sources, by optimizations substrate in this case the substrate used molasses and crab shell waste for the production of chitinase enzyme from *Aspergillus niger*. Previously, isolates of *Aspergillus niger* cultivated by creating a growth curve using dry cell mass method which from the results of research inoculation optimal are 22 hours. In the production process, obtained the optimum fermentation time is 52 hours to determine the activity test using turbidimetry method. Result of substrate optimizations indicate that chitinase enzyme maximum by addition of molasses obtained in 0.5% (w/v) with enzyme activity units 0.14726 (U/mL) and crab shells 2% (w/v) with enzyme activity units 0.12826 (U/mL). Chitinase from *Aspergillus niger* has a pH optimum 6 and temperature optimum 40 °C.

Keywords: *Aspergillus niger*, chitinase, crab shells, molasses

Pendahuluan

Salah satu penerapan bioteknologi yang terus berkembang adalah pemanfaatan

enzim dari mikroorganisme untuk biodegradasi. Dalam biodegradasi, enzim dari mikroorganisme berperan untuk

memecah molekul-molekul besar atau polimer yang ada di alam menjadi produk yang dapat dimanfaatkan. Salah satu polimer alam yang keberadaannya melimpah adalah kitin dimana secara umum enzim yang mendegradasi kitin adalah jenis enzim kitinase.

Kitinase merupakan enzim hidrolitik yang dapat menghidrolisis kitin pada ikatan β -1,4-glikosidiknya dengan menghasilkan derivat-derivat kitin seperti oligomer kitin. Beberapa penelitian telah mencoba menghidrolisis kitin dengan enzim yang dihasilkan oleh *Aspergillus sp*, *Bacillus sp*, *Clostridium sp*, *Serratia sp*, *Aeromonas sp*, dan *Trichoderma sp*. (Maggadani, 2012). *Aspergillus niger* merupakan jenis kapang yang dapat mensekresikan enzim selulase, kitinase, α -amilase, α -amilase, glukoamilase, katalase, pektinase, lipase, laktase, invertase, dan asam protease.

Kitinase mempunyai banyak manfaat antara lain sebagai antihama karena sifatnya yang dapat mematikan serangga (entomopatogenisitas), kitinase dari bakteri dilaporkan pula oleh Regev *et al.* (1996) bersinergi dengan endotoksin dari *B. thuringiensis* dalam menekan larva *Spodoptera littoralis* pada tebu (Toharisman, 2007). Hasil hidrolisis kitin oleh kitinase juga menghasilkan N-asetilglukosamin yang digunakan untuk pengawet, substrat untuk perbaikan jaringan dan reaksi antiinflamasi, meningkatkan kelembaban dan keelastisan kulit, penyembuhan luka (Chen *et al.*, 2010), terapi pengobatan osteoarthritis (nyeri sendi) dan sebagai makanan suplemen (Sashiwa *et al.*, 2002). N-asetilglukosamin juga dapat dikonversi menjadi hexa-N-kitobiosa yaitu suatu oligosakarida yang memiliki aktivitas antitumor (Patil *et al.*, 2000).

Banyaknya manfaat enzim kitinase dan senyawa turunan kitin mengakibatkan meningkatnya kebutuhan enzim kitinase sehingga perlu dilakukan pengembangan produksi enzim kitinase dari sumber lokal yang melimpah di alam serta harganya

yang relatif murah. Salah satunya adalah penggunaan limbah yang mengandung kitin. Kitin merupakan komponen penyusun peptidoglikan dinding sel mikroba yang banyak ditemukan pada eksoskeleton serangga, krustasea, dan dinding sel jamur (Chen *et al.*, 2010). Di Indonesia udang dan kepiting merupakan komoditas yang memainkan peranan penting sebagai sumber kitin karena hasil pengolahannya banyak menghasilkan limbah. Menurut Peniston (1982) pengolahan udang dan kepiting menghasilkan limbah 50-60% dari berat utuh dengan kandungan kitin 20-30%. Substrat fermentasi yang melimpah dan mudah didapat lainnya adalah molase (tetes tebu) yang merupakan hasil samping pembuatan gula dan pemanfaatannya masih sedikit. Menurut Dellweg (1983) kandungan gula dalam molase pada 75 % bahan kering sebesar 62 % (Widyanti, 2010). Sehingga penelitian ini bertujuan untuk melakukan optimasi produksi dan karakterisasi enzim kitinase dari *Aspergillus niger* menggunakan substrat molase (tetes tebu) dan kitin dari cangkang rajungan yang melimpah di alam Indonesia ini.

Metode Penelitian

Alat dan Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain: limbah cangkang rajungan, HCl 5%, NaOH 5%, PDA, kapas, kasa, *aluminium foil*, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, KH_2PO_4 , $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, *yeast* ekstrak, glukosa, molase, $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$, NaH_2PO_4 , asam sitrat, dan akuades. Sedangkan peralatan terdiri dari termometer, magnetik stirer, tabung falcon, tabung Eppendorf, jarum ose, pipet tetes, lemari pendingin Toshiba Glacio dan Sanyo, mikropipet, *tube*, dan orbital shaker TS-330A. Instrumen yang digunakan diantaranya timbangan analitik Mettler Toledo AL204, *sentrifuge* Beckman (tipe TJ-6), *laminar air flow cabinet* Kottermann 8580, pH meter Mettler Toledo, inkubator Memmert, Sanstat

Water Bath type SYK-382-M dan Gerhardt, autoclave electric model No. 25X, vortex meter VM-300, dan spektrofotometer UV-VIS Shimadzu UV-1800.

Prosedur Penelitian

Pembuatan media

Media padat untuk peremajaan isolat *Aspergillus niger* digunakan media Potato Dextrose Agar (PDA). Untuk media pertumbuhan terdiri dari (g/L air): $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1,0; KH_2PO_4 1,5; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,2; yeast ekstrak 0,2, glukosa, molase, ditambahkan dengan akuades, sedangkan untuk media produksi seperti media pertumbuhan dengan ditambah induser cangkang rajungan.

Kultivasi isolat penghasil enzim kitinase

Isolat *Aspergillus niger* diremajakan dengan cara memindahkan satu ose koloni dari stok biakan kedalam media padat yang telah disiapkan kemudian diinkubasi pada suhu 30 °C selama 3 hari.

Untuk membuat kurva pertumbuhan dilakukan dengan metode masa sel kering. Isolat *Aspergillus niger* yang telah diremajakan dalam media padat diambil dengan kawat ose kemudian dimasukkan kedalam media pertumbuhan. Selanjutnya dilakukan inkubasi pada suhu ruang dengan penggojokan pada 170 rpm. Sampling dilakukan tiap 4 jam kemudian disaring dan dicuci dengan aquadest selanjutnya dikeringkan dengan oven sampai diperoleh masa sel kering yang konstan.

Produksi enzim kitinase

Sebanyak 1 mL inokulum ditambahkan kedalam 100 mL media produksi, kemudian di inkubasi pada suhu 30 °C dengan penggojokan 170 rpm selama 6 hari, setelah itu disentrifugasi pada 3500 rpm selama 20 menit dengan suhu 4 °C. Supernatan yang terbentuk setelah disentrifugasi adalah ekstrak kasar enzim kitinase atau *crude enzyme chitinase* yang selanjutnya diuji aktivitasnya. Penentuan

Aktivitas Enzim dilakukan dengan cara, 400 μL enzim kitinase ditambah dengan 1600 μL substrat kitin (1% koloidal kitin b/v dalam 50 mM buffer fosfat pH 7). Campuran diinkubasi pada suhu 37 °C selama 30 menit, kemudian dilakukan pengukuran aktivitas kitinase dengan diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer pada λ 660 nm.

Optimasi waktu fermentasi

Sebanyak 1 mL inokulum ditambahkan kedalam 100 mL media produksi kemudian diinkubasi pada suhu 30 °C dengan penggojokan 170 rpm selama 6 hari. Sampel di ambil tiap 4 jam. Sampel disentrifugasi untuk di ambil supernatannya yang selanjutnya di lakukan uji aktivitas.

Optimasi konsentrasi molase untuk produksi enzim kitinase

Sebanyak 1 mL inokulum ditambahkan kedalam 100 mL media produksi dengan variasi konsentrasi molase 0,2; 0,4; 0,5; 0,6; 0,8; dan 1 (% b/v) dengan konsentrasi limbah cangkang rajungan dibuat sama sebesar 1%. Media produksi kemudian diinkubasi pada suhu 30 °C dengan penggojokan 170 rpm selama waktu fermentasi optimal yang telah diperoleh, kemudian enzim yang diperoleh diuji aktivitasnya.

Optimasi konsentrasi cangkang rajungan untuk produksi enzim kitinase

Sebanyak 1 mL inokulum ditambahkan kedalam 100 mL media produksi dengan variasi konsentrasi limbah cangkang rajungan sebesar 0,5%, 1%, 1,5%, 2%, 2,5%, dan 3%. Konsentrasi molase yang ditambahkan besarnya disesuaikan dengan hasil optimasi yang telah diperoleh sebelumnya kemudian di inkubasi pada suhu 30 °C dengan penggojokan 170 rpm selama waktu fermentasi optimal yang telah diperoleh, setelah itu enzim yang diperoleh diuji aktivitasnya.

Karakterisasi pH enzim kitinase

Penentuan pH optimum dilakukan dengan memasukkan ekstrak kasar enzim kitinase sebanyak 400 μ l, dan ditambah dengan 1600 μ l substrat kitin (1% koloidal kitin b/v dalam 50 mM buffer). Masing - masing tabung diinkubasi 30 menit pada pH yang berbeda-beda, yaitu 3, 4, 5, 6, 7 dan 8. Dalam hal ini untuk pH 3, 4, 5, 6, dan 7 digunakan buffer fosfat sitrat sedangkan untuk pH 6, 7 dan 8 digunakan buffer fosfat.

Karakterisasi suhu enzim kitinase

Penentuan suhu optimum dilakukan dengan memasukkan ekstrak kasar enzim kitinase sebanyak 400 μ l, dan ditambah dengan 1600 μ L substrat kitin (1% koloidal kitin b/v dalam 50 mM buffer). Masing - masing tabung diinkubasi selama 30 menit pada suhu yang berbeda - beda, yaitu 20 °C, 30°C, 40°C, 50°C dan 60°C.

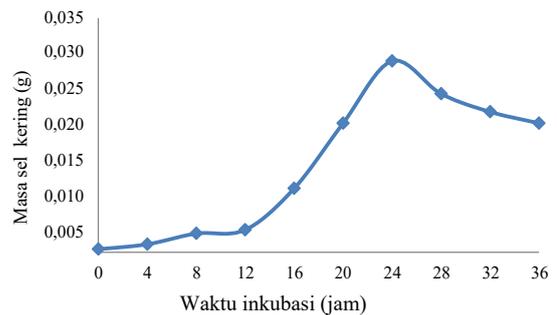
Hasil dan Pembahasan

Kultivasi Isolat Kapang *Aspergillus niger*

Aspergillus niger yang telah menjadi koleksi laboratorium Biokimia Universitas Airlangga diremajakan dengan menanam kembali pada media padat Potato Dextrose Agar (PDA). Pertumbuhan ini diamati dengan munculnya spora berwarna hitam menyerupai bubuk kopi yang mulai terlihat pada hari ketiga.

Isolat yang telah diremajakan digunakan untuk pembuatan starter untuk menghasilkan sel-sel yang lebih aktif yang biasa disebut dengan inokulum. Untuk membuat inokulum ini perlu mengetahui pertumbuhan optimal kapang sehingga dilakukan pembuatan kurva pertumbuhan. Pada penelitian ini digunakan perhitungan massa sel kering untuk pembuatan kurva pertumbuhan. Untuk menghitung massa sel kering dilakukan inokulasi *Aspergillus niger* pada media pertumbuhan selama 3 hari, disampling tiap 4 jam disaring lalu dioven untuk mendapatkan massa sel kering yang konstan. Grafik hubungan antara waktu dan masa sel kering ditampilkan pada Gambar 1.

Dari Gambar 1 dapat diketahui bahwa pada waktu inkubasi 0 sampai 4 jam merupakan fase adaptasi (lag) yang merupakan tahap penyesuaian terhadap lingkungan baru. Pada waktu inkubasi 4 sampai 12 jam merupakan fase initial log, fase dimana sel-sel mulai membelah. Selanjutnya mulai waktu inkubasi 12 sampai 24 jam kapang mengalami fase log, fase dimana mikroba membelah dengan cepat dan konstan mengikuti kurva logaritmik.



Gambar 1. Profil pertumbuhan *Aspergillus niger*

Pada waktu inkubasi 24 jam merupakan puncak namun sudah memasuki fase stasioner sampai waktu inkubasi 36 jam yang menunjukkan penurunan. Pada fase ini jumlah populasi sel tetap karena jumlah sel yang tumbuh sama dengan jumlah sel yang mati. Ukuran sel pada fase ini menjadi lebih kecil-kecil karena sel tetap membelah meskipun zat-zat nutrisi sudah habis. Karena kekurangan zat nutrisi, sel kemungkinan mempunyai komposisi berbeda dengan sel yang tumbuh pada fase logaritmik (Fardiaz, 1989).

Pada fase stasioner ini juga dihasilkan metabolit sekunder seperti biosintesis koenzim, hormon, nukleotida, pigmen, toksin, enzim dan lain - lain. Berdasarkan kurva pertumbuhan tersebut didapatkan bahwa waktu inokulasi optimal *Aspergillus niger* adalah 22 jam.

Produksi dan uji aktivitas enzim kitinase

Enzim kitinase merupakan enzim ekstraseluler yang disekresikan kapang pada media produksinya. Enzim ini

diperoleh dengan cara memisahkan sel kapang dengan media pertumbuhannya melalui sentrifugasi pada kecepatan 3500 rpm dan suhu 4°C sampai koloni yang terbentuk terpisah dari supernatan. Supernatan yang dihasilkan merupakan ekstrak kasar enzim kitinase.

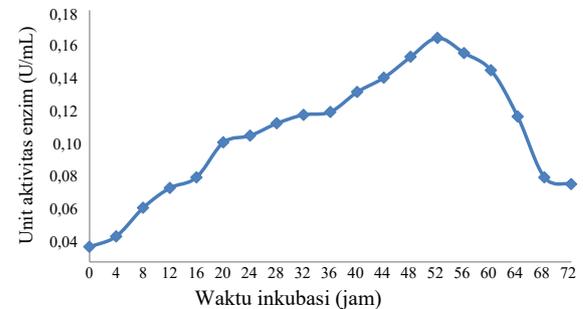
Uji aktivitas kemudian dilakukan untuk membuktikan bahwa supernatan yang dihasilkan dari proses sebelumnya adalah ekstrak kasar enzim kitinase, serta untuk mengetahui unit aktivitas enzim kitinase yang dihasilkan. Uji aktivitas kitinase dilakukan dengan menambahkan 1600 µL substrat koloidal kitin 1% dengan 400 µL ekstrak enzim kasar kitinase, kemudian diukur absorbansinya menggunakan Spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 660 nm (Kholifah, 2013). Unit aktivitas enzim didefinisikan sebagai jumlah enzim yang menghidrolisis kitin per mg per mL per menit pada kondisi percobaan.

Optimasi waktu fermentasi

Untuk mendapatkan jumlah enzim yang maksimal, perlu diketahui aktivitas *Aspergillus niger* dalam menghasilkan enzim kitinase. Dalam penelitian ini dilakukan uji aktivitas yang disampling tiap 4 jam sekali untuk mendapatkan waktu fermentasi optimal sehingga dapat diketahui kapan enzim dapat dipanen. Grafik hubungan antara waktu fermentasi dengan absorbansi ditunjukkan pada Gambar 2.

Dari Gambar 2 menunjukkan bahwa produktivitas kitinase terus mengalami peningkatan seiring bertambahnya waktu fermentasi hingga mencapai titik optimum yaitu 52 jam. Dalam produksi enzim ini kapang berada pada fase stasioner, yakni kurang lebih 1,5 hari setelah fase pertumbuhan. Singkatnya kapang dalam produksi enzim kitinase ini karena tidak diperlukan lagi waktu adaptasi yang cukup lama akibat nutrisi yang tersedia dan kondisi lingkungan yang baru tidak berbeda dengan sebelumnya, sehingga tidak diperlukan waktu penyesuaian yang

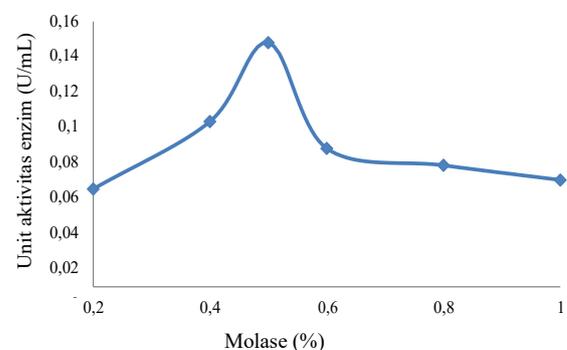
lama untuk mensintesis enzim-enzim. Setelah mencapai titik optimum secara perlahan aktivitas enzim kitinase semakin menurun. Hal tersebut karena sel telah banyak yang mati sehingga berdampak pada menurunnya enzim yang dihasilkan.



Gambar 2. Profil produktivitas enzim kitinase dari *Aspergillus niger*

Optimasi konsentrasi molase

Berdasarkan hasil dari Balai Penelitian Tanaman dan Sayuran (2010) molase memiliki kandungan MgO, Fe, Mn, dan Zn masing-masing 0,37 %, 226 ppm, 31 ppm, dan 10 ppm serta kadar gula total sebesar 43,98 % (Widyanti, 2010). Kandungan ion logam dan gula ini diperlukan dalam proses fermentasi untuk memberikan nutrisi kepada kapang agar bisa hidup, namun jika ditambahkan dalam keadaan berlebih juga akan mengganggu produktivitas enzim sehingga dalam penelitian ini dilakukan optimasi jumlah molase yang akan ditambahkan. Grafik hubungan antara konsentrasi molase dan unit aktivitas enzim ditampilkan Gambar 3.



Gambar 3. Profil penentuan konsentrasi molase optimum.

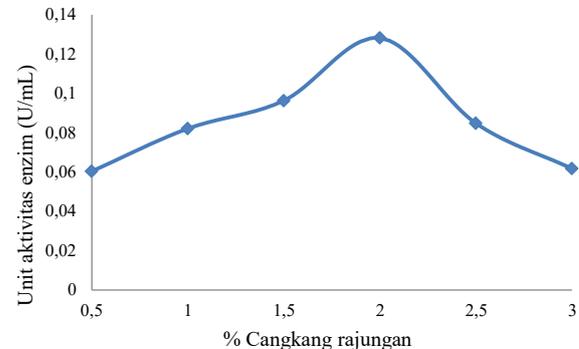
Dari Gambar 3 dapat dilihat bahwa enzim kitinase yang dihasilkan meningkat seiring dengan meningkatnya konsentrasi molase yang ditambahkan sampai pada konsentrasi 0,5% dengan aktivitas enzim 0,14726 (U/mL) namun setelah itu mengalami penurunan. Hal ini dikarenakan apabila jumlah molase yang ditambahkan terlalu besar *Aspergillus niger* akan lebih menggunakan molase untuk proses metabolismenya dibandingkan dengan menggunakan cangkang rajungan untuk menghasilkan metabolit sekunder enzim kitinase.

Optimasi konsentrasi cangkang rajungan

Enzim kitinase dari *Aspergillus niger* merupakan golongan enzim induktif, dimana proses biosintesisnya memerlukan induser. Jika kitin yang berfungsi sebagai induser tersebut tersedia, maka induser akan mengikat protein repressor sehingga protein repressor mengalami perubahan alosterik yang dapat mengubah bentuk dan menyebabkan represor tidak lagi mampu mengikat ke operator. Akibatnya RNA polimerase dapat mentranskripsi gen yang dibutuhkan untuk degradasi kitin dan bakteri mampu mensintesis enzim yang diperlukan untuk metabolismenya. Dalam hal ini digunakan cangkang rajungan sebagai sumber kitin karena melimpahnya kandungan yang dimiliki. Grafik hubungan antara konsentrasi cangkang rajungan dan unit aktivitas enzim ditampilkan Gambar 4.

Dari Gambar 4 diperoleh bahwa peningkatan konsentrasi induser berbanding lurus dengan tingginya produksi enzim kitinase. Tahap ini hanya berlangsung hingga tercapainya konsentrasi optimum induser sebesar 2,0% dengan aktivitas enzim 0,12826 (U/mL), selebihnya produktivitas enzim mengalami penurunan. Konsentrasi induser yang kecil menyebabkan afinitas pengikat repressor oleh induser rendah. Begitu pula sebaliknya, konsentrasi induser yang terlalu besar menyebabkan kejenuhan pada produktivitas enzim

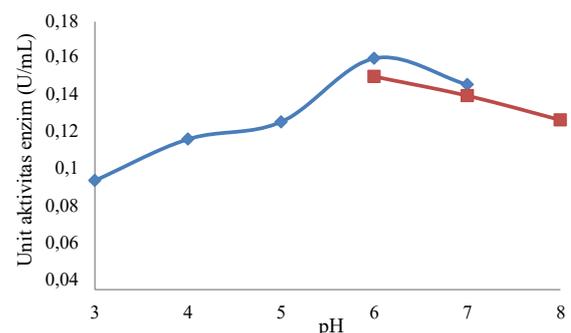
kitinase. Karena konsentrasi induser yang terlalu besar dapat menghambat terbentuknya kompleks enzim substrat sehingga produksi enzim tidak berjalan maksimal.



Gambar 4. Profil penentuan konsentrasi cangkang rajungan

Penentuan pH optimum enzim kitinase

Salah satu faktor yang mempengaruhi aktivitas enzim adalah pH, karena pengikatan enzim dengan substrat dan reaksi katalisisnya bergantung pada interaksi antara substrat dengan rantai samping asam amino penyusun sisi aktif enzim (Bender, 2002). Untuk mengetahui pH optimum enzim kitinase, dilakukan penambahan bufer dengan pH 3; 4; 5; 6; 7; dan 8 menggunakan suhu 37 °C. Kurva hubungan antara pH dengan aktivitas enzim ditampilkan pada Gambar 5.



Gambar 5. Pengaruh pH terhadap aktivitas enzim

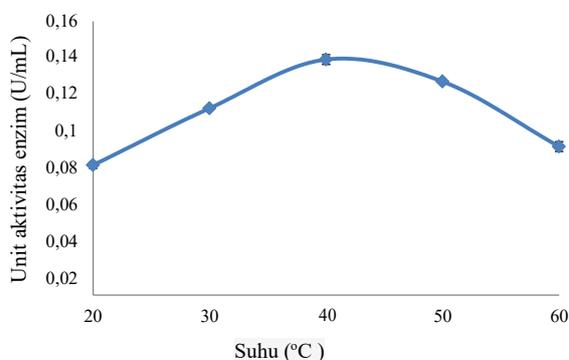
Berdasarkan Gambar 5 diperoleh pH optimum enzim kitinase adalah 6 karena menunjukkan absorbansi yang terbesar dibanding yang lain dengan aktivitas enzim 0,1554 (U/mL). Dalam penelitian

ini dilakukan uji pada pH 3-7 menggunakan bufer sitrat fosfat dan pH 6-8 menggunakan bufer fosfat.

Penentuan suhu optimum enzim kitinase

Aktivitas enzim dipengaruhi oleh beberapa faktor, salah satunya adalah suhu. Hal ini dikarenakan seperti halnya pada reaksi kimia lainnya, tingkat katalisis reaksi oleh enzim akan meningkat seiring dengan peningkatan suhu (Polgar, 1990). 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 dkk., 2009).

Untuk mengetahui suhu optimum enzim kitinase dilakukan penentuan suhu optimum pada rentang antara 20 – 60 °C dan menggunakan buffer pH 6, yakni pH optimum yang telah didapatkan sebelumnya. Grafik nilai absorbansi hubungan antara suhu dengan aktivitas enzim ditampilkan Gambar 6.



Gambar 6. Pengaruh suhu terhadap aktivitas enzim

Dalam penelitian ini diperoleh suhu optimum enzim kitinase 40 °C karena menunjukkan absorbansi yang terbesar dibanding menggunakan suhu inkubasi yang lain, dengan aktivitas enzim 0,1377 (U/mL). Suhu optimum enzim kitinase dari *Aspergillus niger* ini tergolong cukup tinggi. Hal ini dikarenakan *Aspergillus niger* bersifat mesofilik (Fardiaz, 1989) sehingga enzim yang dihasilkan juga bersifat tahan terhadap panas.

Kesimpulan

Dari penelitian ini didapatkan bahwa jumlah optimum substrat molase yang ditambahkan dalam produksi enzim kitinase dari *Aspergillus niger* adalah 0,5% (b/v) dengan aktivitas enzim yang dihasilkan 0,13776 (U/mL). Sedangkan jumlah optimum substrat cangkang rajungan yang ditambahkan dalam produksi enzim kitinase dari *Aspergillus niger* adalah 2,0% (b/v) dengan unit aktivitas enzim yang dihasilkan 0,07682 (U/mL). Enzim kitinase dari *Aspergillus niger* yang dihasilkan mempunyai pH optimum 6 dan suhu optimum 40 °C.

Ucapan Terima Kasih

Terima kasih disampaikan kepada Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi yang membiayai penelitian ini, melalui Kontrak Nomor: 004/SP2H/KPM/DIT. LITABMAS/V/2013

Daftar Pustaka

- Chen, J. K., Shen, C. R. and Liu, C. L. (2010). N-acetylglucosamine: Production and Applications, *Journal of Marine Drugs*, 8, 2493 – 2516
- Fardiaz, S. (1989). *Fisiologi Fermentasi*, Pusat Antar Universitas ITB, Bandung
- Kholifah, A. (2013). Pemurnian Parsial dan Uji Stabilitas Enzim Kitinase dan β -1,3-Glukanase dari Cairan Digestif *Achatina fulica*, *Skripsi*, Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Airlangga, Surabaya

- Maggadani, B. P. (2012). Optimasi Produksi N-asetilglukosamin dari Kitin Menggunakan Kitinase Hasil Isolasi Bakteri, *Tesis*, Pasca Sarjana Universitas Indonesia, Depok
- Mulyani, N. S., Asy'ari, M. dan Prasetiyoningsih, H. (2009). Penentuan Konsentrasi Optimum *Oat Spelt Xylan* Pada Produksi Xilanase dari *Aspergillus niger* Dalam Media PDB (*Potato Dextrose Broth*), *Journal Kimia Sains & Aplikasi*, XII, 1 – 10
- Patil, R. S., Ghormade, V. and Deshpande, M. V. (2000). Chitinolytic Enzymes Exploration, *Enzyme and Microbial Technology*, 26, 473 – 483
- Sashiwa, H., Fujishima, S., Yamano, N., Kawasaki, N., Nakayama, A., Muraki, E., Hiraga, K., Oda, K. and Aiba, S. (2002). Production of N-Acetyl-D- glucosamine from α -Chitin by Crude Enzymes from *Aeromonas hydrophila* H2330, *Carbohydrate Research*, 337, 761 – 763.
- Toharisman, A. (2007). Peluang Pemanfaatan Enzim Kitinase Di Industri Gula, *Laporan Hasil Penelitian*, P3GI Pasuruan.
- Widyanti, E. M. (2010). Produksi Asam Sitrat Dari Substrat Molase pada Pengaruh Penambahan VCO (Virgin Coconut Oil) Terhadap Produktivitas *Aspergillus Niger* Itbcc L74 Terimobilisasi, *Tesis*, Universitas Diponegoro, Semarang