

Karakterisasi enzim kitinase dan identifikasi isolat aktinomisetes KRC 21.D berasal dari Kebun Raya Cibodas

The characterization and identification chitinase enzyme in actinomycetes KRC 21.D isolate derived from Cibodas Botanical Garden

YATI SUDARYATI SOEKA

Bidang Mikrobiologi, Pusat Penelitian Biologi, Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI), Cibinong Science Center, Jl. Raya Jakarta Bogor Km 46
Cibinong, Bogor 16911, Jawa Barat. Tel.: +62-21-8762066. Fax. +62-21-8765062. *email: ceuceu_lipi@yahoo.com

Manuskrip diterima: 28 April 2015. Revisi disetujui: 8 Juni 2015.

Abstrak. Soeka YS. 2015. Karakterisasi enzim kitinase dan identifikasi isolat aktinomisetes KRC 21.D berasal dari Kebun Raya Cibodas. *Pros Sem Nas Masy Biodiv Indon 1: 1156-1161*. Tujuan penelitian ini adalah mengetahui aktivitas enzim kitinase dari aktinomisetes yang berasal dari Kebun Raya Cibodas. Seleksi secara kualitatif isolat yang mempunyai aktivitas enzim ditandai zona bening di sekitar koloni pada media yang mengandung substrat 1% koloidal kitin. Aktivitas enzim secara kuantitatif dianalisis terhadap waktu inkubasi, pH, suhu dan pengaruh ion logam dengan spektrofotometer pada λ 584 nm. Hasil penelitian menunjukkan bahwa aktivitas tertinggi aktivitas kitinase pada inkubasi 7 hari adalah $7,2 \cdot 10^{-3}$ U/mL, sedangkan pada media pertumbuhan pH 10 dan suhu 25°C adalah $8,05 \cdot 10^{-2}$ U/mL. Pengaruh ion logam dengan konsentrasi 1 mM dalam bentuk kation divalen diaktifkan oleh CaCl₂, ZnCl₂, MnCl₂ dan kation monovalen CoCl₂, NaCl, sedangkan kation divalen HgCl₂ menghambat aktivitas enzim. Hasil identifikasi secara molekuler isolat KRC 21.D adalah *Streptomyces macrosporeus*.

Kata kunci: Enzim kitinase, Kebun Raya Cibodas, *Streptomyces macrosporeus*

Abstract. Soeka YS. 2015. The characterization and identification chitinase enzyme in actinomycetes KRC 21.D isolate derived from Cibodas Botanical Garden. *Pros Sem Nas Masy Biodiv Indon 1: 1156-1161*. The aim of the research was to know the activity of chitinase enzyme in actinomycetes collected from Cibodas Botanical Garden. Based on the appearance of the clear zone around colonies on medium containing 1% colloidal chitin substrate, isolates were selected qualitatively. The enzyme activity was measured by spectrophotometer at λ 540 nm and examined at different incubation period, pH, temperature as well as 1mM solution of different divalent and monovalent cations. The results of the research showed that the highest chitinase activity, $7,2 \times 10^{-3}$ U/mL, was found at 7 days incubation, while the chitinase activity on growth medium at pH 10 and at 25°C was $8,05 \times 10^{-2}$ U/mL. Experimental result of influencing metal ions showed that Na⁺, Ca²⁺, Zn²⁺, Mn²⁺, Co²⁺ ions act as an enhancer while Hg²⁺ ions acts as inhibitors of chitinase enzyme activity. The molecular identification revealed that the isolate actinomycetes KRC 21.D was *Streptomyces macrosporeus*.

Key words: chitinase enzyme, Cibodas Botanical Garden, *Streptomyces macrosporeus*

PENDAHULUAN

Kitinase adalah enzim yang dapat mendegradasi kitin dan banyak dimanfaatkan sebagai agen biokontrol terutama bagi tanaman yang terserang infeksi mikroba (Hamid et al. 2013). Dua dekade terakhir kitin merupakan komponen utama dinding sel jamur dapat didegradasi enzim kitinase menghasilkan produk yang ramah lingkungan dibandingkan penggunaan zat kimia sebagai anti jamur (Gurung et al. 2013). Keberadaan kitin di alam sangat melimpah dan dengan cepat terdegradasi karena adanya beberapa mikroba yang mempunyai enzim kitinase yang mampu mendegradasi kitin (Herdyastuti et al. 2009).

Aktinomisetes merupakan kelompok bakteri berfilamen yang jumlahnya melimpah di tanah (Sharma 2014). Mikroorganisme ini secara aerobik mampu mendegradasi senyawa-senyawa yang sukar didegradasi seperti kitin

(Brzezinska 2014). Kitin adalah polimer yang umum ditemukan pada dinding sel jamur kelas *Basidiomisetes*, *Ascomisetes* dan beberapa jenis *Deuteromisetes*, oleh karena itu aktinomisetes kitinolitik dapat dimanfaatkan sebagai salah satu alternatif agen pengendali hayati penyakit tanaman yang disebabkan oleh jamur (Yurnaliza 2007). Aktinomisetes dapat menghasilkan enzim selulase, amilase (Nurkanto 2008), pendegradasi senyawa lignoselulolitik seperti mananase, xilanase, selulase, ligninase, dan pektinase (Ratnakomala et al. 2009), mempunyai aktivitas antibiotik yang sangat kuat (Nurkanto et al. 2010) dan yang mempunyai kemampuan penghambatan terhadap *Mycobacterium* (penyebab penyakit Tuberkulosis) (Nurkanto 2010).

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas kitinase dari isolat aktinomisetes yang berasal dari Kebun Raya Cibodas, Cianjur, Jawa Barat.

BAHAN DAN METODE

Isolat-isolat yang digunakan dalam penelitian ini adalah isolat aktinomisetes yang diisolasi dari tanah Kebun Raya Cibodas, Jawa Barat. Kitin yang digunakan diperoleh dari PT. Vitalhouse Indonesia, Cirebon berasal dari limbah udang.

Preparasi koloidal kitin

Sebanyak 20 g kitin yang berbentuk *flake* ditambah 400 mL HCl pekat, distirer selama 2 jam kemudian diinkubasi di dalam lemari pendingin selama 24 jam. Larutan tersebut disaring dengan *glass wool* dan filtrat yang dihasilkan ditambah akuades steril yang sudah didinginkan dengan suhu 4°C selama satu malam, kemudian dinetralkan dengan 10 N NaOH sampai pH 7. Larutan disentrifugasi dengan kecepatan 7.780g selama 10 menit. Endapan yang diperoleh kemudian dibilas dengan akuades steril dan disentrifugasi lagi dengan kecepatan 7.780g selama 10 menit. Koloidal kitin tersebut kemudian disimpan di dalam lemari pendingin (Widhyastuti 2007).

Media seleksi

Isolat tersebut dipelihara dalam media kitin agar miring terdiri dari 1% koloidal kitin, 0,1% pepton, 0,1% KH₂PO₄, 0,05% MgSO₄.7H₂O, 2% agar dan media ini digunakan juga untuk menyeleksi bakteri murni yang dapat merombak kitin dalam petri dish. Inkubasi dilakukan pada suhu 37°C selama 3 hari. Hasil pengujian secara kualitatif menunjukkan bahwa isolat yang memiliki aktivitas kitinase ditandai dengan adanya zona bening di sekitar koloni. Isolat dari hasil uji kualitatif dengan zona bening tertinggi yang dipakai untuk penelitian selanjutnya.

Media produksi kitinase

Produksi inokulum dilakukan dengan cara isolat hasil seleksi secara kualitatif ditumbuhkan pada media kitin agar miring, diinkubasi pada suhu 37°C sampai berumur 3 hari.

Produksi kitinase dilakukan dengan menginokulasikan 1 ujung ose isolat berumur 3 hari ke dalam 50 ml media produksi 1% koloidal kitin, 0,1% pepton, 0,1% yeast, 0,02% K₂HPO₄, 0,05% MgSO₄.7 H₂O (Nurdebyandaru et al. 2010) di dalam bufer glisin-NaOH 0,05M dengan variasi pH alkalin, pH 7,5; 8; 8,5; 9; 10; 11, diinkubasi pada suhu 37°C selama 10 hari di dalam pengocok (*shaker*) inkubator dengan kecepatan 120 rpm. Setiap hari dilakukan pengambilan sampel sebanyak 4 mL. Filtrat dan endapannya dipisahkan dengan cara disentrifugasi dengan kecepatan 2270g selama 5 menit. Filtrat digunakan sebagai larutan enzim dan diuji aktivitas kitinasenya.

Pengujian aktivitas kitinase

Aktivitas kitinase diuji dengan mengukur kadar gula amino sebagai produk hidrolisis kitin oleh kitinase. Konsentrasi N asetil gula amino diukur menggunakan metode kolorimetrik yang dimodifikasi (Reissig et al. 1955). Senyawa *N*-asetil glukosamin (GlcNAc) digunakan sebagai standar untuk penghitungan aktivitas kitinase. Satu unit kitinase adalah banyaknya enzim yang dapat menghasilkan 1 μ mol *N*-asetil glukosamin dari substrat

koloidal kitin per menit. Sebanyak 0,5 mL larutan enzim direaksikan dengan 0,5 mL substrat 1% koloidal kitin dengan pH 7 dan diinkubasi pada suhu 50°C selama 30 menit. Reaksi enzimatik dihentikan dengan memasukkan campuran ke dalam air mendidih selama 5 menit. Selanjutnya disentrifugasi dengan kecepatan 10.160g selama 5 menit dan filtrat dipisahkan dari endapan. Sebanyak 250 μ L filtrat ditambah 50 μ L potasium tetraborat, dididihkan selama 3 menit dan didinginkan dengan segera. Ditambahkan 1,25 mL reagen 4- (dimetil amino) benzaldehida (DMAB), diinkubasi pada suhu 37°C selama 20 menit dan OD dibaca dengan spektrofotometer pada λ 584 nm (Widhyastuti 2007).

Karakterisasi enzim kitinase

Pengaruh suhu inkubasi enzim. Variasi suhu inkubasi 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35°C dan pengaruh ion logam Ca²⁺, Mn²⁺, K⁺, Na⁺, Cu²⁺, Hg²⁺, dalam bentuk garam dari masing-masing CaCl₂, MnCl₂, KCl, NaCl, CuCl₂, HgCl₂ sebagai aktivator atau inhibitor terhadap aktivitas kitinase dengan cara mereaksikan larutan enzim dengan substrat 1% kitin dengan 1 mM ion logam tersebut dengan dibandingkan dengan enzim tanpa penambahan logam.

Identifikasi isolat KRC 21 D (Nugroho 2009)

Identifikasi isolat KRC 21 D dengan menggunakan sekuensing 16S rDNA primer 20F (5'-GATTTTGATCCTGGCTCAG-3') dan 1500R (5'-GTTACCTTGTTACG ACTT-3'). Reaksi PCR dijalankan mengikuti protokol dan agarose elektroforesis. DNA sekuensing dilakukan di *Fierst base* (Malaysia). Hasil analisa sekuensing dianalisis dengan BLAST server dari Biology workbench (SDSC).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Seleksi isolat aktinomisetes yang berasal dari tanah di Kebun Raya Cibodas, didapat 17 isolat yang tumbuh di dalam media tumbuh dengan mudah dan baik, sedangkan yang dapat mendegradasi kitin ada 6 isolat yaitu isolat dengan nomor KRC 1.16 D; KRC 1.23 D; KRC 4.5 D; KRC 4.15 D dan KRC 21D yang ditandai dengan adanya zona bening di sekitar koloni. Isolat KRC 21D memiliki zona bening di sekitar koloni yang terbesar (Tabel 1). Isolat KRC 21 D ini yang selanjutnya dipakai untuk penelitian. Zona bening di sekitar isolat KRC 21 D ditunjukkan pada Gambar 1.

Aktivitas tertinggi didapat pada pH 7,5 hari ke 6 sebesar 16.10⁻³ U/mL, pH 8 pada hari ke 4 sebesar 9. 10⁻³ U/mL, pH 8,5 pada hari ke 6 sebesar 13.10⁻³ U/mL, pH 9 pada hari ke 6 sebesar 6.10⁻³ U/mL, pH 10 pada hari ke 7 sebesar 72.10⁻³ U/mL, pH 11 pada hari ke 7 sebesar 37. 10⁻³ U/mL (Gambar 2).

Pengaruh waktu inkubasi terhadap aktivitas enzim kitinase didapat setelah diinkubasi selama tujuh hari sebesar 7,2.10⁻³ (U/mL) (Gambar 3).

Pengaruh suhu terhadap aktivitas enzim kitinase pada pH 10 aktivitas tertinggi didapat pada inkubasi dengan suhu 25°C sebesar 8,05.10⁻³ U/mL (Gambar 4).

Kitinase dari isolat KRC 21.D diaktifkan oleh kation divalen CaCl_2 , ZnCl_2 , MnCl_2 , dan kation monovalen CoCl_2 , NaCl , sedangkan kation divalen HgCl_2 merupakan penghambat aktivitas enzim masing-masing pada konsentrasi 1 mM (Tabel 2).

Hasil analisis dengan data di Gene Bank melalui analisa BLAST menunjukkan 99% derajat keasaman isolat aktinomisetes KRC 21.D yang diampikasi dengan sekuensing 16S rDNA menggunakan primer 20F dan 1500R adalah *Streptomyces macrosporeus* (Tabel 3).

Pembahasan

Kitin dipreparasi dengan hidrolisis parsial dengan HCl pekat akan menghasilkan koloidal kitin yang mampu menginduksi kitinase kompleks seperti N-asetilglukosamin, berlimpah dan polisakarida terbarukan setelah selulosa (Aziz et al. 2012). Aktinomisetes sangat banyak digunakan dalam pengobatan kanker, bioremediasi, menghasilkan beberapa antibiotik dan hormon pertumbuhan tanaman Indole-3-acetic acid, alat biokontrol, agen biopestisida, senyawa anti jamur, *biocorrosion* dan sebagai sumber senyawa *agroactive* (Sharma 2014). Genus aktinomisetes dapat memanfaatkan kitin sebagai sumber karbon dan nitrogen (Yurnaliza 2002).

Zona bening terbentuk akibat dari aktivitas enzim kitinase yang terbentuk keluar sel memecah makromolekul kitin menjadi molekul yang lebih kecil (Suryadi et al. 2013).

Menurut Gohel et al. (2006) aktivitas kitinase secara kualitatif ditentukan adanya zona bening di sekitar koloni isolat yang tumbuh pada medium agar kitin. Mikroba yang mampu memproduksi kitinase secara kualitatif setelah waktu inkubasi tertentu ditandai dengan adanya zona bening (Suryadi et al. 2014).

Tabel 1. Isolat aktinomisetes hasil isolasi dari tanah Kebun Raya Cibodas

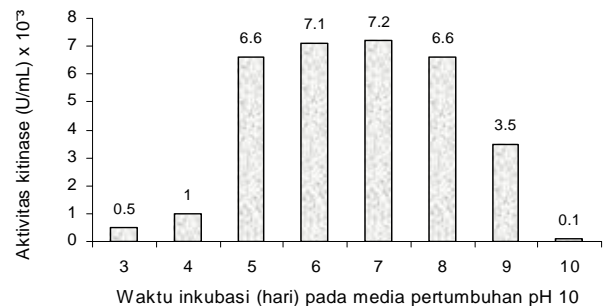
No. Isolat	Zona bening	No. Isolat	Zona bening	No. Isolat	Zona bening
1. 1.11 D	-	7. 3.45	-	13. 4.10 D	-
2. 1.15 D	-	8. 3.60	-	14. 4.13 D	-
3. 1.16 D	++	9. 4.3 D	-	15. 4.15 D	+/-
4. 1.17 D	-	10. 4.5	-	16. 5.115	-
5. 1.23 D	++	11. 4.5 D	+/-	17. 21 D	+++
6. 2.7	+	12. 4.7 D	-		

Tabel 2. Pengaruh penambahan ion logam terhadap aktivitas kitinase

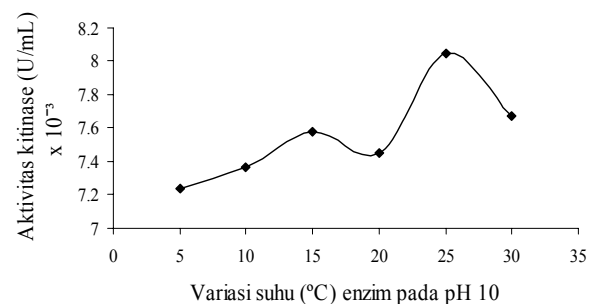
Penambahan logam	Aktivitas kitinase $\times 10^{-3}$ (U/ml)	Konsentrasi (%)	Aktivator/inhibitor
Tanpa logam	7,05	100	
Ca^{2+}	7,70	109,22	Aktivator
Mn^{2+}	7,20	102,13	Aktivator
Zn^{2+}	7,15	101,42	Aktivator
Na^+	7,6	107,80	Aktivator
Co^{2+}	7,23	102,55	Aktivator
Hg^{2+}	1,00	14,18	Inhibitor



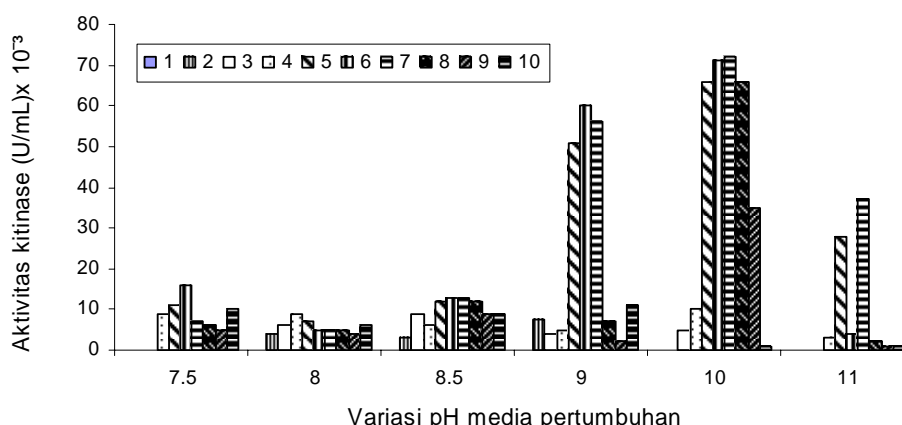
Gambar 1. Zona bening di sekitar koloni Aktinomisetes KRC 21 D



Gambar 3. Aktivitas kitinase pada pH 10 dengan waktu inkubasi 1-10 hari



Gambar 4. Pengaruh suhu terhadap aktivitas kitinase



Gambar 2. Pengaruh pH media pertumbuhan terhadap aktivitas kitinase dengan waktu inkubasi 1-10 hari

Tabel 3. Homologi sekuen nukleotida isolat KRC 21. D dengan Blast Database

Nama sampel	Hasil Blast	Fasta
KRC 21.D	<i>Streptomyces macrosporeus</i> 1760 bits, 928 bp, 99%, 0.0	<pre> CCCGTGAGTCCCCAGCACCACAAGGGCCTGCTGGCAACACGGGA CAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCAGACACG AGCTGACGACAGCCATGCACCACCTGTACACCGACCACAAGGGGG CGCTGTCTCCAGACGTTTCCCGGTGTATGTCAAGCCTTGGAAGGT TCTTCGCGTTGCGTCGAATTAAGCCACATGCTCCGCCGCTTGTGCGG GCCCCGTC AATTCCTTTGAGTTTAGCCTTGCGGCCGTACTCCCCA GGCGGGGC AACTAATGCGTTAGCTGCGGCACGGACGACGTGGAATG TCGCCACACCTAGTGCCACCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTA TCTAATCCTGTTGCTCCCCACGTTTTCGCTCCTCAGCGTCAGTATCG GCCCAGAGATCCGCCCTTCGCCACCGGTGTTCTCCTGATATCTGCGCA TTTACCCTACACCAGGAATTCCGATCTCCCCTACCGA AACTTAGC CTGCCGATCGACTGCAGACCCGGGTTAAGCCCCGGGCTTTTACA ACCGACGCGACAAGCCGCTACGAGCTCTTTACGCCCAATAAATCCG GACAACGCTCGCGCCCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTT AGCCGGGCTTCTTCTGAGGTACCGTCACTTTGCTTCTTCCCTGCT GAAAGAGTTTACAACCCGAAGGCCGTCATCCCTCACGGCGGCTCG CTGCATCAGGCTTTCGCCATTGTGCAATATTCGCCACTGCTGCCTCC CGTAGGAGTCTGGGCCGTGCTCAGTCCCAGTGTGGCCGGTTCGCCCT CTCAGGCCGCTACCCGTCGTCGCTTGGTGAGCCGTTACCTCACCA ACAAGCTGATAGCCGCGGGCTCATCCTGCACCG </pre>

Enzim kitinase merupakan suatu protein yang memiliki aktivitas biokimiawi sebagai katalis suatu reaksi, karena merupakan suatu protein dan enzim ini sangat rentan terhadap kondisi lingkungan (Hamid et al. 2013). Perubahan konsentrasi substrat, pH lingkungan, suhu dan waktu inkubasi yang berbeda akan mengakibatkan aktivitas enzim kitinase mengalami perubahan (Chauhan and Singh 2013). Setiap enzim yang mempunyai pH dan suhu tertentu menyebabkan aktivitasnya mencapai keadaan optimum (Brzezinska et al. 2013, Hamid et al. 2013). Kondisi pH dan suhu yang optimum akan mendukung enzim kitinase dalam melakukan katalisa suatu reaksi dengan baik (Hamid et al. 2013). pH dan suhu yang kurang sesuai akan mengakibatkan kerusakan atau tidak aktifnya protein dalam suatu enzim, menyebabkan fungsi dan aktivitas dari enzim tersebut berkurang (Gurung et al. 2013).

Faktor lingkungan sangat penting untuk kegiatan mikroba baik sebagai sumber daya nutrisi maupun energi (Konopka 2009). Aktivitas enzim kitinase dari aktinomisetes isolat BB 2.6 dengan waktu inkubasi 5 hari sebesar $3,05 \cdot 10^{-2}$ U/mL. Aktivitas kitinase optimal didapat pada suhu 50°C dan pH 8,0 masing-masing $3,8 \cdot 10^{-2}$ dan $3,52 \cdot 10^{-2}$ U/mL (Soeka 2009). Sedangkan isolat BB 3.2 mempunyai aktivitas kitinase optimum dengan waktu inkubasi 3 hari sebesar $1,66 \cdot 10^{-2}$ U/mL, pada konsentrasi substrat 1% sebesar $2,83 \cdot 10^{-2}$ U/mL. Pada pH 8,0 dan suhu 50°C masing-masing $9,3 \cdot 10^{-2}$ dan $12,98 \cdot 10^{-2}$ U/mL (Soeka 2010).

Faktor suhu minimum, maksimum dan optimum merupakan faktor lingkungan terpenting yang mempengaruhi pertumbuhan dan kehidupan semua mikroorganisme (Anonymous 2015).

Hasil penelitian Brzezinska et al. (2013) produksi kitinase dari *Streptomyces sporovirgulis* optimum setelah diinkubasi selama empat hari dengan konsentrasi koloidal kitin 0,3% pada pH 8,0, suhu 35°C dan enzim dalam menjalankan metabolisme sangat peka terhadap suhu. Ion logam diperlukan dalam bentuk kation monovalen dan divalen sebagai aktivator untuk meningkatkan aktivitas pada enzim-enzim tertentu. Namun ion-ion tersebut dapat pula bertindak sebagai penghambat pada konsentrasi tertentu. Hasil penelitian dari Suryadi et al. (2013) ion dari Ca^{2+} dan Mg^{2+} dapat meningkatkan aktivitas kitinase, sedangkan ion K^+ , Na^+ , Mn^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{2+} dan EDTA masing-masing dengan konsentrasi 10 mM menurunkan aktivitas kitinase dari *B. cereus* 11 UJ. *Streptomyces macrosporeus* termasuk order *Helotiales*, kelas *Leotiomycetes*, phylum *Ascomycota*, kingdom *fungi*. *Streptomyces macrosporeus* dapat memproduksi Carbomycin (Magnamycin) - B447, tumbuh pada suhu 28°C (Ettlinger et al. 1958). *Streptomyces* merupakan kelompok aktinomisetes yang paling banyak memproduksi antibiotik, satu organisme dapat memproduksi lebih dari satu jenis antibiotik bahkan masing-masing antibiotik yang dihasilkan satu sama lainnya tidak saling berhubungan (Nurkanto et al. 2008), selalu menjadi sumber bagi ribuan senyawa bioaktif. Isolat *Streptomyces* yang diisolasi dari tanah akan menghasilkan enzim hidrolitik, seperti enzim selulase, amilase, lipase, protease dan gelatinase (Sonya et al. 2015). *Streptomyces*, *Nocardia*, *Streptosporangium*, *Micromonospora* dan *Actinoplanes* genus dari aktinomisetes yang dapat memanfaatkan kitin sebagai sumber karbon dan nitrogennya (Adegboye and Babalola. 2012). Di antara ke lima genus aktinomisetes khitinolitik tersebut juga dapat melarutkan fosfat dan mendegradasi selulosa sehingga berpotensi sebagai agen hayati dalam menjaga kesehatan ekosistem dan berpeluang untuk pengembangan pupuk hayati yang ramah lingkungan (Nurkanto 2007). Hal ini karena *Streptomyces* adalah genus aktinomisetes dengan jumlah terbanyak di tanah. Hampir semua anggota genus *Streptomyces* menghasilkan kitinase. *Streptomyces* menghasilkan kitinase untuk aplikasi bioteknologi dan karena itu ditetapkan sebagai salah satu mikroorganisme terbaik untuk mempelajari produksi serta aspek biokimia kitinase melalui berbagai kondisi dan lingkungan (Sowmya et al. 2012).

Hasil penelitian menunjukkan bahwa enzim kitinase dari isolat KRC 21 D *Streptomyces macrosporeus* perlu dilanjutkan. Dicoba untuk aplikasinya sebagai alat biokontrol, agen biopestisida, senyawa anti jamur.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini didanai oleh DIPA-Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI). Penulis mengucapkan terima kasih kepada Arif Nurkanto dan Dian Alfian Nurcahyanto atas bantuannya dalam mengidentifikasi aktinomisetes KRC 21.D dan kepada Ninu Setianingrum atas asistensinya di laboratorium.

DAFTAR PUSTAKA

- Adegboye MF, Babalola OO. 2012. Taxonomy and ecology of antibiotic producing actinomycetes African J Agric Res. DOI: 10.5897/AJARX11.071
- Anonymous. 2015. Evaluation and Definition of Potentially Hazardous
- Aziz SMA, Moharam ME, Hamed HA, Mouafi FE. 2012. Extracellular metabolites produced by a novel strain, *Bacillus alvei* NRC-14: 1. some properties of the chitinolytic system. New York Sci J 5 (1): 53-62.
- Brzezinska MS, Jankiewicz U, Burkowska A, Walczak M. 2014. Chitinolytic Microorganisms and Their Possible Application in Environmental Protection. Curr Microbiol. DOI: 10.1007/s00284-013-0440-4
- Brzezinska MS, Jankiewicz U, Lisiecki K.. 2013. Optimization of cultural conditions for the production of antifungal chitinase by *Streptomyces sporovirgulis*. Appl Biochem Microbiol DOI: 10.1134/S0003683813020014
- Chauhan M, Singh P. 2013. Production, optimization and characterization of chitinase enzyme by *Bacillus subtilis*. AGRIWAYS 1: 5-11.
- Ettlinger L, Corbaz R, Hutter R. 1958. Zur systematik der Actinomyceten. 4. Eine arzeneinteilung der gattung *Streptomyces* Waksman and Henrici. Arch Mikrobiol 31:326-358.
- Foods - Chapter 3. Factors that Influence Microbial Growth. U.S. Food and Drug Administration. www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/.../ucm094145.htm [21 Mei 2015]
- Gohel V, Singh A, Vimal M, Ashwini P, Chhatpar HS. 2006. Bioprospecting and antifungal potential of chitinolytic microorganisms. African J Biotech 5 (2): 54-72.
- Gurung N, Ray S, Bose S, Rai V. 2013. A broader view: Microbial enzymes and their relevance in industries, medicine, and beyond. Bio Med Research Intl. DOI:10.1155/2013/329121
- Hamid R, Khan MA, Ahmad M, Ahmad MM, Abidin M Z, Musarrat J, Javed S. 2013. Chitinases: An update. J Pharm Bioallied Sci. DOI: 10.4103/0975-7406.106559
- Herdyastruti N, Raharjo TJ, Mudasar, Matsjeh S. 2009. Chitinase and chitinolytic microorganism: Isolation, characterization and potential. Indo J Chem 9 (1): 37-47.
- isolates producing chitinase and glucanase for biocontrol of plant fungal pathogens. J Agric Technol 10 (4): 983-999.
- Konopka A. 2009. What is microbial community ecology? ISME J. DOI:10.1038/ismej.2009.88.
- Nugroho AJ. 2009. Identifikasi 12 isolat Aktinomisetes 'Kultur Koleksi LIPI MC' secara Molekular. Laporan Teknik. Pusat Penelitian Biologi- LIPI, Cibinong-Bogor.
- Nurdebyandaru N, Mubarik NR, Prawasti TS. 2010. Chitinolytic bacteria isolated from chili rhizosphere: Chitinase characterization and application as biocontrol for *Aphis gossypii*. Microbiology Indonesia. DOI: 10.5454/mi.4.3.1
- Nurkanto A, Listyaningsih F, Julistiono H, Agusta A. 2010. Eksplorasi keanekaragaman aktinomisetes tanah Ternate sebagai sumber antibiotik. J Biol Indon 6 (3): 325-339.
- Nurkanto A, Rahmansyah M, Kanti A. 2008. Seri Panduan: Teknik Isolasi Aktinomisetes. LIPI Press, Jakarta.
- Nurkanto A. 2007. Identifikasi Aktinomisetes tanah hutan pasca kebakaran Bukit Bangkirai Kalimantan Timur dan potensinya sebagai pendegradasi selulosa dan pelarut fosfat. Biodiversitas 8 (4): 314-319
- Nurkanto A. 2008. Studi kelimpahan aktinomisetes tanah dan hubungannya terhadap enzim selulase, amilase, total karbon dan nitrogen hutan pasca kebakaran Bukit Bangkirai Kalimantan Timur. J Biol Indon 5 (1): 81-89.
- Nurkanto A. 2010. Eksplorasi Keanekaragaman Aktinomisetes Kawasan Perbatasan Kalimantan- Malaysia: Pencarian Senyawa Aktif Antibiotik dan Penyakit Tropis (Tuberculosis). Laporan Teknik. Pusat Penelitian Biologi-LIPI, Cibinong-Bogor.
- Ratnakomala S, Fahrurrozi, Kartina G, Lisdiyanti P. 2009. Pemanfaatan Aktinomisetes Indonesia Untuk Produksi Inokulum Bakteri Pendegradasi Lignoselulosa. Laporan DIKTI 2009. Pusat Penelitian Biologi-LIPI, Cibinong-Bogor.
- Reissig JL, Strominger JL, Leloir LF. 1955. A modified colorimetric method for the estimation of N-acetyl amino sugars. J Biol Chem 217: 959-966
- Sharma M. 2014. Actinomycetes: Source, identification, and their applications. Int J Curr Microbiol App Sci 3 (2): 801-832.

- Soeka YS, Triana E, Setianingrum N. 2010. Aktivitas Aktinomisetes dari Bangka Belitung koleksi Bidang Mikrobiologi, Puslit Biologi-LIPI dalam memproduksi enzim kitinase. *J Tek Ling* 11 (3): 417-423.
- Soeka YS. 2009. Kondisi optimum produksi kitinase dari Aktinomisetes dengan karakterisasi pH dan suhu enzim. *Berkala Penelitian Hayati*. Edisi Khusus no 3C: 57-61.
- Sonya MH, Altalhi AD, Badria EZGS, Sadik AS. 2015. Enzymatic activities of some *Streptomyces* isolated from soil at Taif Region. *Int J Curr Microbiol App Sci* 4 (2): 19-32.
- Sowmya B, Gomathi D, Kalaiselvi M, Ravikumar G, Arulraj C, Uma C. 2012. Production and purification of chitinase by *Streptomyces* sp. from soil. *J Adv Sci Res* 3 (3): 25-29.
- Suryadi Y, Priyatno TP, Susilowati DN, Samudra IM, Yudhistira N, Purwakusumah ED. 2013. Isolasi dan karakterisasi kitinase asal *Bacillus cereus* 11 UJ. *J Biol Indon* 9 (1): 51-62.
- Suryadi Y, Susilowati DN, Lestari P, Priyatno TP, Samudra IM, Hikmawati N dan Mubarik NR. 2014. Characterization of bacterial
- Widhyastuti N. 2007. Produksi Kitinase Ekstraseluler *Aspergillus rugulosus* 501 secara Optimal pada Media Cair. *J Berita Biologi* 8 (6): 547-553.
- Yurnaliza. 2002. Senyawa Khitin dan Kajian Aktivitas Enzim Mikrobial Pendegradasinya. Universitas Sumatera Utara, Medan.
- Yurnaliza. 2007. Kajian Peran Aktinomisetes Khitinolitik Dalam Pengendalian Jamur Patogen *Fusarium oxysporum* Skala Laboratorium. Universitas Sumatera Utara, Medan.