

PENGARUH pH, SUHU DAN JENIS SUBSTRAT TERHADAP AKTIVITAS KITINASE *Bacillus* sp. RNT9

Effect of pH, Temperature and Type of Substrate on Chitinase Activity of Bacillus sp. RNT9

Satrio Adil Pamungkas*, Indun Dewi Puspita, Ustadi Ustadi
Departemen Perikanan, Fakultas Pertanian, Universitas Gadjah Mada
Jl. Flora Bulaksumur, Karang Malang, Caturtunggal, Depok, Sleman Regency, Special Region of Yogyakarta 55281
Email: satrio.adil.pamungkas@mail.ugm.ac.id

Diserahkan tanggal 11 Oktober 2022, Diterima tanggal 4 Maret 2023

ABSTRAK

Limbah perikanan yang berasal dari udang, kepiting, dan kerang, umumnya mengandung kitin yang merupakan suatu polisakarida. Kitin memiliki struktur polimer linier yang terdiri dari monomer β -1,4-N-asetil-D-glukosamin, dan memiliki banyak manfaat dalam bentuk produk turunannya. Produk turunan kitin, seperti glukosamin dan N-Asetilglukosamin, memiliki nilai ekonomi yang tinggi sebagai bahan baku alternatif di berbagai industri seperti farmasi dan pangan. Proses degradasi kitin menjadi senyawa tersebut dapat dilakukan melalui reaksi enzimatik dengan bantuan enzim kitinase yang diproduksi oleh bakteri. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pH (6, 7 dan 8), suhu (30°C, 35°C dan 40°C) dan jenis substrat (koloidal kitin, kitin serbuk dan tepung cangkang udang) terhadap aktivitas kitinase *Bacillus* sp. RNT9. Parameter yang diuji adalah aktivitas kitinase (U/mL) dan kadar N-Asetilglukosamin (NAG) medium (ppm). Kedua parameter ini diukur secara kuantitatif dengan metode kolorimetri. Hasil penelitian menunjukkan bahwa kondisi terbaik untuk menghasilkan aktivitas kitinase pada *Bacillus* sp. RNT9 adalah dengan medium pH 8, suhu inkubasi 35°C dan jenis substrat kitin koloidal. Aktivitas kitinase tertinggi yang diproduksi *Bacillus* sp. RNT9 berturut-turut sebesar 0,0008 U/mL pada perlakuan pH 8 pada hari ke-2 fermentasi, 0,0013 U/mL yang diperoleh pada perlakuan suhu 35°C hari untuk ke-4 dan 0,0010 U/mL yang diperoleh pada perlakuan jenis substrat koloidal kitin untuk hari ke-2 fermentasi. Konsentrasi NAG mencapai nilai tertinggi pada optimasi pH 8 untuk hari ke-2 fermentasi sebesar 9,5968 ppm. Pada optimasi suhu 35°C untuk hari ke-4 fermentasi sebesar 32,387 ppm serta pada perlakuan optimasi jenis substrat koloidal kitin untuk hari ke-4 fermentasi sebesar 26,031 ppm.

Kata kunci: *Bacillus* sp. RNT9; jenis substrat; kitinase; pH; suhu

ABSTRACT

Fishery waste originating from shrimp, crabs and clams, generally contains chitin which is a polysaccharide. Chitin has a linear polymer structure consisting of β -1,4-N-acetyl-D-glucosamine monomers, and has many benefits in the form of its derivative products. Chitin derivative products, such as glucosamine and N-acetylglucosamine, have high economic value as alternative raw materials in various industries such as pharmaceuticals and food. The process of degradation of chitin into these compounds can be carried out through enzymatic reactions with the help of chitinase enzymes produced by bacteria. This study aims to determine the effect of pH (6, 7 and 8), temperature (30°C, 35°C and 40°C) and type of substrate (colloidal chitin, chitin powder and shrimp shell flour) on the chitinase activity of Bacillus sp. RNT9. The parameters tested were chitinase activity (U/mL) and medium N-Acetylglucosamine (NAG) levels (ppm). Both of these parameters were measured quantitatively by the colorimetric method. The results showed that the best conditions for producing chitinase activity in Bacillus sp. RNT9 is with a medium of pH 8, incubation temperature of 35°C and the type of substrate is colloidal chitin. The highest chitinase activity produced by Bacillus sp. RNT9 was 0,0008 U/mL, respectively, at pH 8 treatment on the 2nd day of fermentation, 0,0013 U/mL obtained at 35°C temperature treatment for the 4th day and 0,0010 U/mL obtained at treatment type of chitin colloidal substrate for the 2nd day of fermentation. The concentration of NAG reached the highest value at the optimization of pH 8 for the 2nd day of fermentation of 9,5968 ppm. At the optimization temperature of 35°C for the 4th day of fermentation it was 32,387 ppm and at the optimization treatment of chitin colloidal substrate for the 4th day of fermentation it was 26,031 ppm.

Keywords: *Bacillus* sp. RNT9; chitinase; pH; substrate; temperature

PENDAHULUAN

Limbah hasil perikanan yang berasal dari *crustacea* sebanyak 200 ribu ton belum dimanfaatkan setiap tahunnya. Limbah ini belum termanfaatkan secara baik dan berdaya guna, sehingga memiliki nilai ekonomi yang cukup rendah (KKP, 2015). Limbah hasil perikanan berupa kulit udang sebagian

besar hanya dimanfaatkan sebagai bahan baku terasi, petis, kerupuk dan lainnya (Harini *et al.*, 2004). Limbah hasil perikanan yang berasal dari golongan udang, kepiting dan kerang banyak mengandung kitin. Kitin merupakan suatu polisakarida, suatu polimer linier yang tersusun atas monomer β -1,4-N-asetil-D-glukosamin. Secara hayati polimer polisakarida ini disintesis hampir satu miliar ton per tahun di

dunia. Kitin merupakan suatu polisakarida kedua terbanyak di alam setelah selulosa. Kitin sebagai bahan baku yang melimpah di lingkungan, memiliki struktur dan karakteristik yang unik, yaitu tidak larut dalam air (Soeka, 2012). Kitin yang diperoleh dari berbagai sumber memiliki struktur sama, kecuali ikatannya dengan protein dan kalsium karbonat yang merupakan dua komponen lain pada kulit udang. Kitin banyak ditemukan sebagai komponen eksoskeleton kelompok *Crustacea*, dinding sel insekta, kapang dan kamir (Islam *et al.*, 2017). Kadar kitin dalam kulit udang dan kepiting sekitar 40-60%, sedangkan pada dinding sel fungi berkisar 22-24% (Soeka, 2012).

Kitin memiliki berbagai manfaat dalam bentuk produk hasil degradasinya. Hasil degradasi kitin dapat menjadi produk alternatif yang memiliki nilai ekonomi sebagai bahan baku produk industri hasil perikanan. Produk hasil degradasi kitin adalah glukosamin dan N-Asetilglukosamin. Senyawa ini sering dimanfaatkan pada bidang industri farmasi dan pangan (Widhyastuti, 2010). Salah satu contohnya manfaatnya adalah pada pengobatan luka bakar (Islam *et al.*, 2017). Pembuatan produk hasil degradasi kitin berupa glukosamin dan N-Asetilglukosamin, dapat dilakukan melalui reaksi enzimatis dengan bantuan enzim kitinase yang dihasilkan oleh bakteri.

Kitinase adalah enzim yang mampu menghidrolisis kitin (polimer dari β -1,4 N-Asetil-D-glukosamin) (Soeka, 2012). Enzim kitinase merupakan enzim yang memiliki banyak manfaat di kehidupan manusia, terutama dalam bidang medis, farmasi, industri makanan maupun pertanian karena enzim ini mempunyai kemampuan menghidrolisis kitin menjadi N-Asetilglukosamin (Herdyastuti *et al.*, 2009). Mikroorganisme menghasilkan banyak enzim hidrolitik, dan di antaranya adalah kitinase. Bakteri kitinolitik menguraikan kitin secara aerobik dan kondisi anaerobik dan ditemukan di berbagai habitat. Di lingkungan laut, mereka terlibat dalam siklus nutrisi dari sejumlah besar kitin yang berasal dari cangkang arthropoda dan sumber lain (Souza *et al.*, 2011).

Bacillus sp. sebagai salah satu jenis mikroorganisme kitinolitik, memiliki persebaran yang luas serta pertumbuhan yang cepat. Bakteri ini merupakan salah satu bakteri gram positif. Aktivitas kitinase yang dihasilkan oleh *Bacillus* sp. dipengaruhi oleh berbagai parameter seperti kondisi pertumbuhan yang meliputi kondisi pH, suhu serta sumber kitin yang tersedia. Produksi enzim ini dapat dimaksimalkan dengan menerapkan parameter yang optimal seperti suhu, pH dan komposisi medium (Sumantha *et al.*, 2006). Penelitian oleh Suryadi *et al.* (2013) menyebutkan kitinase dari isolat *Bacillus cereus* 11 UJ memiliki aktivitas sebesar 0,07 U/mL. Kitinase *B. cereus* 11 UJ mempunyai nilai Km sebesar 29,71 61 μ g/mL. Aktivitas kitinase yang dihasilkan oleh *Bacillus cereus* 11 UJ optimum pada pH 8 dan suhu 37°C dengan substrat koloidal kitin. Isolat *Bacillus circulans* dari penelitian Muharni dan Nurmawati (2017) menghasilkan enzim kitinase tertinggi pada akhir fase eksponensial yaitu pada jam ke-20 sebesar 0,58 U/mL. Cheba *et al.* (2016) menemukan aktivitas kitinase yang dihasilkan oleh *Bacillus* sp. R2 mencapai kondisi optimum pada pH 7,5 dan suhu 40°C dengan menggunakan substrat koloidal kitin. Penelitian oleh Dhananjaya (2018) menyebutkan jenis substrat kitin terbaik untuk menghasilkan aktivitas kitinase *Bacillus cereus* SMG 1.1 adalah koloidal kitin, pada suhu 30°C dan pH 8.

Bacillus sp. RNT9 merupakan isolat *Bacillus* sp. ke 8 yang diduga merupakan spesies *Bacillus cereus* SSW1. Isolat

RNT9 ini merupakan salah satu isolat *Bacillus* sp. yang diisolasi dari produk ronto dan tersimpan di Laboratorium Mutu dan Keamanan Hasil Perikanan, Departemen Perikanan, Fakultas Pertanian, Universitas Gadjah Mada, (Hargogya, 2019). Penelitian Hargogya (2019) mendapatkan 10 isolat *Bacillus* spp., yaitu RNT1, RNT2, RNT4, RNT5, RNT6, RNT7, RNT8, RNT9, RNT10, dan RNT11. Isolat yang dipakai pada penelitian ini adalah isolat RNT9 karena isolat ini merupakan salah satu isolat *Bacillus* sp. dengan indeks kitinolitik 2,7 dan belum pernah dilakukan pengujian aktivitas kitinase dengan berbagai faktor perlakuan yang berbeda, sehingga belum diketahui kondisi yang optimal pada isolat RNT9 ini dalam menghasilkan aktivitas kitinase. Parameter yang digunakan dalam penelitian ini adalah pH, suhu, dan jenis substrat. Faktor lingkungan ini merupakan beberapa faktor yang mempengaruhi aktivitas kitinase yang diproduksi oleh bakteri. Patut dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui pengaruh pH, suhu, dan jenis substrat terhadap *Bacillus* sp. RNT9 dalam menghasilkan aktivitas enzim kitinase.

METODE PENELITIAN

Waktu dan Lokasi Penelitian

Penelitian dilaksanakan pada bulan Oktober 2020 – Mei 2021. Penelitian dilakukan di Laboratorium Mutu dan Keamanan Hasil Perikanan, Departemen Perikanan, Fakultas Pertanian, Universitas Gadjah Mada.

Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah, jarum ose, jarum inokulasi, korek api, bunsen, pengaduk, kertas pH, pH meter, *yellow tip*, *blue tip*, mikrotube 1,4 mL, mikrotube 2 mL, tabung falkon 50 mL, rak tabung reaksi, termometer, selang, pipet ukur, gelas ukur, gelas beker, botol gelap, corong kaca, tabung reaksi, petridish, mikropipet 1.000 μ l, mikropipet 100 μ l, spuute, erlenmeyer 100 mL, erlenmayer 250 mL, erlenmayer 500 mL, erlenmayer 1.000 mL, tutup erlenmeyer, timbangan analitik (Shimadzu BX320D), Vortex (Thermolyne), kompor (Quantum), *hot plate stirrer* (Labnet), Autoklaf (Hirayama), Oven (Eyela WFQ-601SD), *Miller Refrigerator*, *Chiller* (RSA), *Waterbath shaker* (Sibata WS-240), *Centrifuge* (Eppendorf 5810R) dan Spektrofotometer (Thermo Spectronic-Genesys 20).

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah cangkang udang kering, kitin komersial, karet gelang, kertas layang, kertas label, isolasi, plastik, kapas, *glasswool*, NaOH 1N, HCL, NaOCL 5,25% (Bayclin), Akuades, K₂HPO₄ (Merck), KH₂PO₄ (Merck), MgSO₄.5H₂O (Merck), ZnSO₄ (Merck), MnCl₂, *agar bacteriological* (Oxoid), NaH₂PO₄.H₂O, NaH₂PO₄.12H₂O, N-Asetilglukosamin (TCL), p-dimetilaminobenzaldehida (DMAB), asam asetat glasial, pottasium borat, asam borat, sodium borat, KOH, isopropyl alkohol, medium *Nutrient Broth* (NB), medium *Tryptone Soya Broth* (TSB) dan gliserol.

Pembuatan Kitin Koloidal

Pembuatan kitin koloidal mengacu berdasarkan metode Arnold dan Solomon (1986), yaitu kitin yang ditelah disiapkan kemudian ditimbang sebanyak 20 g dan dilarutkan dalam 150 mL HCL (37%), kemudian dihomogenkan tanpa panas, kemudian disaring menggunakan *glasswool*. Larutan kemudian dituang perlahan kedalam 800 mL akuades yang

bersuhu $\pm 4^{\circ}\text{C}$ dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu $\pm 4^{\circ}\text{C}$. Endapan putih yang terbentuk merupakan kitin koloidal. Endapan tersebut kemudian dicuci menggunakan air hingga netral kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 6.000 rpm selama 10 menit pada suhu 4°C . Supernatan dibuang dan endapannya diambil sebagai kitin koloidal yang siap untuk digunakan.

Pembuatan Kitin Koloidal Agar

Pembuatan media kitin koloidal agar ini mengacu pada metode Hsu dan Lockwood (1975). Medium kitin koloidal agar ini dibuat dengan melarutkan KH_2PO_4 (0,03%), K_2HPO_4 (0,07%), kitin koloidal (2%), *bacto agar* (2%), $\text{MgSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0,05%), ZnSO_4 (0,0001%) dan MnCl_2 (0,0001%) ke dalam erlenmeyer berisi 1.000 mL akuades. Kemudian erlenmeyer disterilisasi pada suhu 121°C selama 20 menit, dihomogenkan dan dituang dalam petridish.

Pembuatan Kitin Koloidal Cair

Pembuatan media kitin koloidal (*broth*) ini juga mengacu pada metode Hsu dan Lockwood (1975). Medium kitin koloidal ini dibuat dengan melarutkan KH_2PO_4 (0,03%), K_2HPO_4 (0,07%), kitin koloidal (2%), $\text{MgSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0,05%), ZnSO_4 (0,0001%) dan MnCl_2 (0,0001%) ke dalam erlenmeyer berisi 1.000 mL akuades. Kemudian erlenmeyer disterilisasi pada suhu 121°C selama 20 menit dan dituang dalam erlenmeyer.

Penyegaran Isolat *Bacillus* sp. RNT9

Penyegaran dilakukan terhadap kultur biakan sebelum digunakan sebagai inokulum. Isolat awal *Bacillus* sp. RNT9 dalam gliserol stok koleksi Laboratorium Mutu dan Keamanan Hasil perikanan ditumbuhkan dalam kitin agar. Koloni yang tumbuh diambil 3 koloni tunggal dan dimasukkan masing-masing ke dalam 3 tabung medium *Nutrient Broth*. Bakteri yang sudah tumbuh kemudian diambil 0,5 mL dimasukkan ke dalam 0,5 mL larutan gliserol 50%. Pembuatan gliserol 50% dilakukan dengan cara mencampurkan 0,25 mL akuades dan 0,25 mL gliserol, kemudian disterilkan dan dimasukkan ke dalam mikrotube secara aseptis. Isolat dalam gliserol stok dapat disimpan pada suhu -20°C . Untuk persiapan inokulum, isolat dalam gliserol stok diambil sebanyak satu ose kemudian digoreskan pada medium kitin agar dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 5 hari untuk memastikan koloni yang tumbuh adalah isolat murni. Koloni tunggal dari kitin agar diambil dan ditumbuhkan kembali pada medium *Nutrient Broth* dengan suhu 37°C selama 24 jam.

Persiapan Inokulum *Bacillus* sp. RNT9

Tahap selanjutnya yaitu isolat bakteri pada tahap penyegaran dimasukkan ke dalam medium *Nutrient Broth* (konsentrasi inokulum 2%) untuk dikulturkan pada suhu 37°C . Pertumbuhan bakteri diamati dengan melihat kepadatan bakteri setiap 1 jam pada masing-masing 3 ulangan berdasarkan kekeruhan atau *Optical Density* (OD) selama 24 jam. Pengukuran dilakukan dengan mengambil sebanyak 1 mL biakan bakteri dalam medium *Nutrient Broth*, kemudian diukur absorbansinya pada panjang gelombang 600 nm dengan spektrofotometer. Akuades digunakan sebagai blanko dalam spektrofotometri. Hasil pembacaan spektrofotometer pada

setiap jam dibuat menjadi grafik hubungan antara nilai kekeruhan (*Optical Density*) dengan waktu untuk mendapatkan kurva pertumbuhan bakteri. Berdasarkan kurva pertumbuhan tersebut, waktu panen inokulum ditentukan saat bakteri mengalami fase *late log phase*.

Optimasi pH

Tahap optimasi pH ini bertujuan untuk menentukan nilai pH dengan aktivitas kitinase tertinggi yang dihasilkan *Bacillus* sp. RNT9. Optimasi pH medium yang akan dilakukan untuk menghasilkan kitinase menggunakan pH 6, 7 dan 8. Pengaturan pH media dilakukan dengan penambahan HCL 1M atau NaOH 1M sampai pada pH yang diinginkan. Inokulum hasil tahap persiapan dimasukkan ke dalam 100 mL medium kitin koloidal pada berbagai nilai pH (konsentrasi inokulum 1%). Kemudian diinkubasi pada suhu 37°C dengan kecepatan agitasi 100 rpm selama 5 hari. Setiap hari pengambilan data dilakukan dengan melakukan sampling sebanyak 2 x 1 mL pada setiap perlakuan untuk pengujian aktivitas kitinase dan kandungan NAG dalam medium fermentasi. Setiap perlakuan nilai pH dilakukan ulangan sebanyak 2 kali, sehingga diperoleh total 6 perlakuan yang dilakukan dalam optimasi pH.

Optimasi Suhu

Tahap optimasi suhu ini bertujuan untuk menentukan nilai suhu dengan aktivitas kitinase tertinggi yang dihasilkan *Bacillus* sp. RNT9. Optimasi suhu medium yang akan dilakukan untuk menghasilkan aktivitas kitinase terbesar menggunakan 3 tingkatan suhu, yaitu suhu 30°C , 35°C dan 40°C . Inokulum hasil tahap persiapan dimasukkan ke dalam 100 mL medium kitin koloidal (konsentrasi inokulum 1%). Nilai pH dengan aktivitas kitinase tertinggi pada tahap sebelumnya digunakan dalam tahap optimasi ini. Kemudian diinkubasi dengan berbagai perlakuan suhu dan kecepatan agitasi 100 rpm selama 5 hari. Setiap hari pengambilan data dilakukan dengan melakukan sampling sebanyak 2 x 1 mL pada setiap perlakuan untuk pengujian aktivitas kitinase dan kandungan NAG dalam medium fermentasi. Setiap perlakuan tingkatan suhu dilakukan ulangan sebanyak 3 kali, sehingga diperoleh total 9 perlakuan yang dilakukan dalam optimasi suhu.

Optimasi Jenis Substrat

Dari beberapa jenis substrat yang umum digunakan sebagai sumber-sumber kitin, tahap penelitian ini menggunakan 3 jenis substrat, yaitu kitin koloidal, kitin serbuk dan tepung cangkang udang. Substrat tepung cangkang udang dibuat dengan cara mengeringkan cangkang udang bersih hingga sangat kering, kemudian diblender atau miller hingga halus dan disaring menggunakan *mesh size* 70. Substrat kitin serbuk dibuat dengan menghaluskan kitin komersial yang dibeli dengan blender ataupun miller kemudian juga disaring menggunakan *mesh size* 70. Substrat kitin koloidal dibuat dengan proses yang terdapat pada bagian pembuatan kitin koloidal. Inokulum hasil tahap persiapan dimasukkan ke dalam 100 mL medium tepung cangkang konsentrasi 2%, kitin serbuk konsentrasi 2%; dan kitin koloidal konsentrasi 2% (konsentrasi inokulum 1%). Komposisi medium selain substrat sumber kitin sama seperti yang tertulis pada bagian pembuatan kitin koloidal. Nilai pH dan suhu dengan aktivitas kitinase tertinggi pada tahap sebelumnya digunakan dalam tahap optimasi ini.

Kemudian diinkubasi dengan kecepatan agitasi 100 rpm selama 5 hari. setiap hari pengambilan data dilakukan dengan melakukan sampling 2 x 1 mL pada setiap periakuan untuk pengujian aktivitas kitinase dan kandungan NAG. Setiap perlakuan substrat dilakukan ulangan sebanyak 3 kali, sehingga diperoleh total 9 perlakuan yang dilakukan dalam optimasi substrat.

Pengukuran Aktivitas Kitinase dan Konsentrasi NAG

Pengujian aktivitas kitinase dilakukan dengan mengambil 2 x 1 mL medium fermentasi, kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm selama 1 menit pada suhu 4°C. Kedua supernatan bebas sel tersebut merupakan sampel dan kontrol negatif. Kontrol negatif diberi perlakuan perebusan dalam suhu 100°C selama 3 menit. Selanjutnya sebanyak 0,5 mL sampel dan 0,5 mL kontrol negatif masing-masing direaksikan dengan 1 mL kitin koloidal 1,3% (dalam buffer fosfat 50 mM pH 7,4) dengan cara diinkubasi selama 30 menit dan dalam waterbath shaker pada suhu 37°C dengan kecepatan agitasi 100 rpm. Kemudian campuran tersebut dipanaskan dalam air suhu 100°C selama 5 menit untuk menghentikan reaksi, kemudian didinginkan dan disentrifugasi 10.000 rpm selama 5 menit (Wang dan Chang, 1997).

Jumlah NAG hasil reaksi kemudian diukur dengan metode Reissig *et al.* (1955). Sebanyak 0,25 mL supernatan hasil reaksi ditambahkan 0,05 mL kalium tetraborat pH untuk mengikat NAG. Untuk mempercepat reaksi pengikatan antara kalium tetraborat dengan NAG, larutan direndam dalam air mendidih selama 3 menit. Setelah dingin, larutan ditambahkan dengan 1,25 mL p-dimetilaminobenzaldehida (DMAB) dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 30 menit dalam *waterbath shaker*. Absorbansi 20 sampel kemudian diukur dengan spektroskop UV-Vis. Pembuatan kurva standar, larutan standar NAG pada berbagai konsentrasi (0-50 µg/mL) diinterpolasikan dengan nilai absorbansi pada panjang gelombang 585 nm untuk mendapatkan persamaan matematis dari dari kurva tersebut. Nilai absorbansi sampel larutan kontrol kemudian dibandingkan dengan nilai absorbansi larutan standar NAG. Kemudian persamaan kurva standar NAG menggunakan rumus $y = ax + b$ dengan y menunjukkan nilai absorbansi dan x menunjukkan nilai konsentrasi NAG dengan a, b sebagai konstanta. Aktivitas kitinase dihitung dengan menggunakan rumus berikut:

$$\text{Aktivitas kitinase (U/mL)} = \frac{(\text{NAG sampel} - \text{NAG kontrol}) \times fp}{\text{Berat molekul NAG} \times t} \dots (1)$$

Keterangan: fp = faktor pengenceran (3); t = waktu reaksi dengan kitin koloidal standar 1,3% (30 Menit)

Satu unit aktivitas kitinase didefinisikan sebagai jumlah enzim yang melepas 1 µmol NAG per menit pada kondisi reaksi enzimatis tersebut.

Konsentrasi NAG diukur dengan menggunakan metode kolorimetri Reissig *et al.* (1955). Pertama Sebanyak 0,25 mL supernatan hasil reaksi ditambahkan 0,05 mL kalium tetraborat pH untuk mengikat NAG. Untuk mempercepat reaksi pengikatan antara kalium tetraborat dengan NAG, larutan direndam dalam air mendidih selama 3 menit. Setelah dingin, larutan ditambahkan dengan 1,25 mL p-dimetilaminobenzaldehida (DMAB) dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 30 menit dalam *waterbath shaker*. Kemudian hasil inkubasi ditera pada spektrofotometer UV-Vis dengan Panjang gelombang 585 nm. Akuades digunakan sebagai blanko.

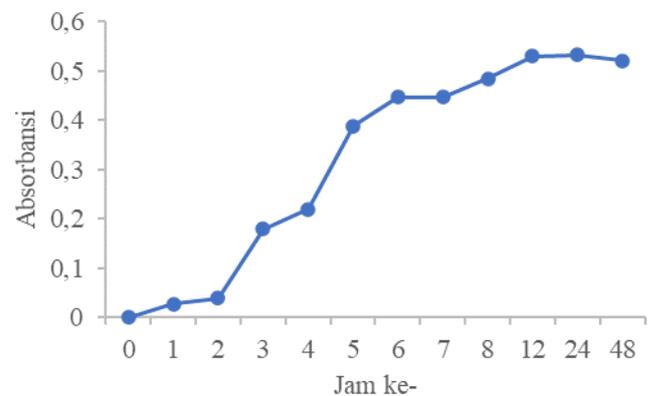
Analisa Data

Analisis data yang digunakan pada penelitian ini adalah analisis deskriptif. Analisis statistik deskriptif adalah statistik yang digunakan dalam menganalisis data dengan cara mendeskripsikan atau menggambarkan data yang telah terkumpul. Analisis ini bertujuan untuk memberikan gambaran atau mendeskripsikan data dalam variabel yang dilihat dari nilai rata-rata (*mean*), minimum, maksimum dan standar deviasi. Statistik deskriptif adalah statistika yang digunakan dalam mendiskripsikan data menjadi informasi yang lebih jelas serta mudah dipahami yang memberikan gambaran mengenai penelitian berupa hubungan dari variabel-variabel independen. Analisis ini dilakukan dengan menggunakan aplikasi *Microsoft Excel*.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pertumbuhan Inokulum *Bacillus* sp. RNT9

Pertumbuhan inokulum *Bacillus* sp. RNT9 pada medium *Nutrient Broth* dalam rentang waktu 48 jam. Angka kekeruhan tertinggi terdapat pada jam 24 dengan nilai absorbansi 0,532 disajikan pada Gambar 1.



Gambar 1. Kurva Pertumbuhan *Bacillus* sp. RNT9 pada Medium *Nutrient Broth*, pada Suhu 37°C, selama 48 jam, dengan Kecepatan Agitasi 100 rpm.

Pertumbuhan Bakteri merupakan pertambahan teratur semua komponen suatu organisme. Bila suatu media cair ditanami sel-sel mikroorganisme maka akan tumbuh sel hidup yang dapat dilihat dalam 6 fase pertumbuhan yaitu: Fase Penyesuaian, Fase Percepatan, Fase Eksponensial, Fase Perlambatan, Fase Nol dan Fase Kemunduran (Ariyadi dan Dewi, 2009). Fase pertumbuhan pada Gambar 1 menunjukkan *Bacillus* sp. RNT9 memasuki fase adaptasi pada jam ke-0 sampai jam ke-4. Mikroba yang dipindahkan ke dalam suatu media, mula-mula akan mengalami fase adaptasi untuk menyesuaikan diri dengan kondisi lingkungan di sekitarnya (Dahlan *et al.*, 2017). Fase adaptasi atau fase lag merupakan tahap dimana mikroba melakukan penyesuaian terhadap lingkungan yang baru. Panjang atau pendeknya fase adaptasi sangat ditentukan oleh jumlah sel yang diinokulasikan, kondisi fisiologis dan morfologis yang sesuai serta media kultivasi yang dibutuhkan (Dahlan *et al.*, 2017).

Kekeruhan bakteri mulai meningkat secara signifikan pada jam ke-5. Ini menandakan bahwa bakteri telah memasuki fase eksponensial atau telah menyesuaikan dengan lingkungannya lalu melakukan pembelahan sel secara cepat. Pada fase logaritmik mikroba membelah dengan cepat dan

konstan dan pada fase ini kecepatan pertumbuhan sangat dipengaruhi oleh media tempat tumbuhnya seperti pH dan kandungan nutrisi, juga kondisi lingkungan termasuk suhu dan kelembaban udara. Periode ini adalah keadaan pertumbuhan yang seimbang atau mantap dengan laju pertumbuhan spesifik (μ) konstan, komposisi selular tetap, sedangkan komposisi kimiawi media biakan berubah akibat terjadinya sintesis produk dan penggunaan substrat (Dahlan *et al.*, 2017).

Tepat pada jam 12 hingga pada jam-jam selanjutnya, tingkat kekeruhan pada media tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan, maka dari itu dapat diartikan mikroba telah memasuki fase stasioner, dimana jumlah sel yang mati sama dengan jumlah sel yang hidup. Dahlan *et al.* (2017) menyatakan bahwa ukuran sel pada fase stasioner menjadi lebih kecil-kecil karena sel tetap membelah meskipun zat-zat nutrisi sudah habis. Pada fase ini laju pertumbuhan akhirnya menurun yang biasanya disebabkan karena kekurangan faktor pertumbuhan seperti vitamin dan unsur mineral. Mulai pada jam ke-24, kekeruhan mulai menurun, yang menandakan bakteri telah memasuki fase kematian. Hal ini dikarenakan jumlah sel bakteri yang mati lebih banyak daripada jumlah sel yang hidup dan membelah. Berdasarkan pembahasan diatas maka waktu yang tepat untuk memanen inokulum bakteri adalah pada fase logaritmik, yaitu pada jam ke-12 sampai jam ke-24.

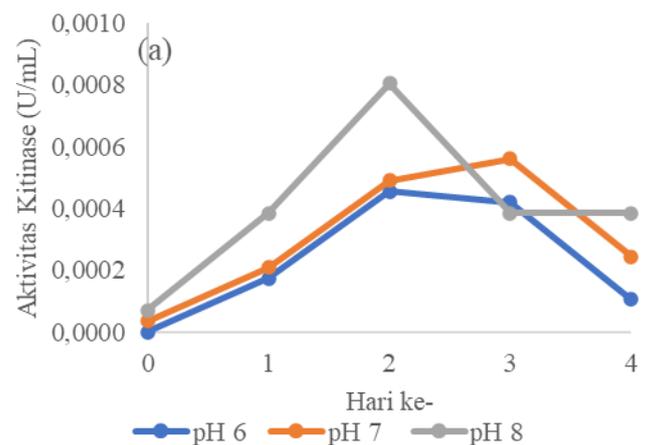
Pengaruh pH Terhadap Aktivitas Kitinase *Bacillus sp.* RNT9

Berdasarkan hasil pengamatan selama 5 hari fermentasi, terlihat bahwa *Bacillus sp.* RNT9 mampu menghasilkan kitinase dengan aktivitas yang bervariasi pada berbagai kondisi medium. Pada hari ke-2, tercatat bahwa aktivitas kitinase *Bacillus sp.* RNT9 mencapai puncak tertingginya dengan nilai aktivitas sebesar 0,0008 U/mL pada medium dengan pH 8. Selanjutnya, pada hari ke-3, aktivitas kitinase *Bacillus sp.* RNT9 tercatat masih cukup tinggi pada medium dengan pH 7 dengan nilai aktivitas sebesar 0,0006 U/mL. Pada hari ke-2 pada kondisi pH 6, aktivitas kitinase *Bacillus sp.* RNT9 juga menunjukkan hasil yang baik dengan nilai 0,0005 U/mL. Dapat disimpulkan bahwa *Bacillus sp.* RNT9 menunjukkan aktivitas kitinase tertingginya pada medium dengan pH 8 seperti yang terlihat pada Gambar 2a.

Aktivitas enzim maksimum tercapai pada pH tertentu, sehingga penyimpangan dari pH atau tingkat keasaman media sangat mempengaruhi aktivitas enzim (Hidayat, 2005). Hal ini dapat disebabkan oleh pertumbuhan mikroorganisme yang mengkatalisis reaksi yang melibatkan enzim dalam proses kehidupan dipengaruhi oleh berbagai kondisi fisik dan kimiawi (Zhang *et al.*, 2006). Selain itu, perubahan pH menyebabkan terjadinya perubahan pada daerah katalitik dan konformasi dari enzim, dimana sifat ionik dari gugus karboksil dan gugus amino enzim tersebut sangat mudah dipengaruhi oleh pH (Pelczar dan Chan, 1986).

Enzim sebagai biokatalisator berstruktur protein, dalam mekanisme kerja aktivitasnya dipengaruhi oleh beberapa faktor antara lain pH. Perubahan pH lingkungan akan berpengaruh terhadap efektivitas sisi aktif enzim dalam membentuk kompleks enzim substrat. pH dapat mempengaruhi aktivitas enzim dengan mengubah struktur atau dengan mengubah muatan residu fungsional pada pengikatan substrat

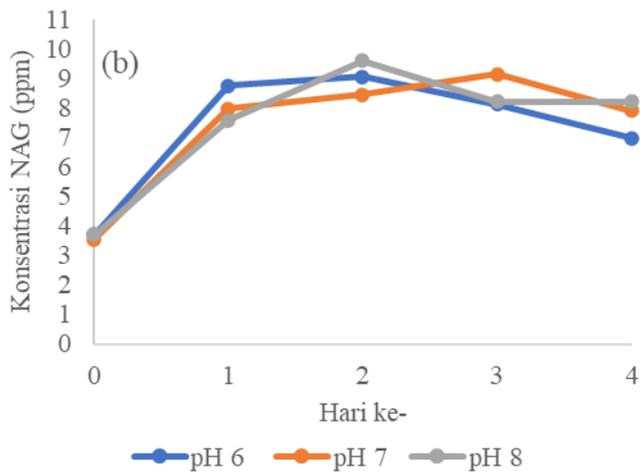
atau katalisis (Sarnia *et al.*, 2017). pH berpengaruh terhadap kecepatan aktivitas enzim dalam mengkatalis suatu reaksi. Hal ini disebabkan konsentrasi ion hidrogen mempengaruhi struktur dimensi enzim dan aktivitasnya. Setiap enzim memiliki pH optimum di mana pada pH tersebut struktur tiga dimensinya paling kondusif dalam mengikat substrat. Bila konsentrasi ion hidrogen berubah dari konsentrasi optimal, aktivitas enzim secara progresif hilang sampai pada akhirnya enzim menjadi tidak fungsional (Yusriah dan Kuswyatari, 2013). Pernyataan ini diperkuat dengan pernyataan Dick *et al.* (2000), bahwa perubahan pH dapat menyebabkan denaturasi enzim sehingga dapat menimbulkan hilangnya fungsi katalitik enzim. Oleh karena itu dapat disimpulkan bahwa pH merupakan salah satu faktor yang sangat berpengaruh dalam mempengaruhi aktivitas enzim, serta sangat erat kaitannya dengan fungsi aktif enzim, kelarutan substrat dan ikatan enzim-substrat (Pelczar dan Chan, 1986).



Gambar 2a. Aktivitas Kitinase pada Kultur *Bacillus sp.* RNT9 pada Medium Kitin Koloidal dengan pH yang Berbeda, selama 5 Hari, pada Suhu 37°C.

Berdasarkan data pada Gambar 2a, secara umum pH 6 memiliki aktivitas kitinase yang lebih rendah jika dibandingkan dengan pH 7 dan pH 8. Ini menunjukkan bahwa *Bacillus sp.* RNT9 kurang optimal dalam menghasilkan enzim kitinase pada medium yang asam. Pada pH yang rendah, membran sel menjadi jenuh oleh ion hidrogen sehingga membatasi transport membran. Keracunan yang terjadi pada pH rendah disebabkan oleh zat asam tertentu yang tidak tercerna yang masuk ke dalam sel dan terionisasi, menyebabkan pH sel berubah. Perubahan ini menyebabkan proses pengiriman asam-asam amino dari RNA terhambat sehingga menyebabkan terhambatnya pertumbuhan mikroba dan bahkan dapat membunuh mikroba (Agustiyani *et al.*, 2004).

Berdasarkan Gambar 2b, terlihat perbandingan konsentrasi NAG yang dihasilkan oleh isolat *Bacillus sp.* RNT9 pada berbagai macam pH selama 5 hari proses fermentasi pada medium kitin koloidal cair. Konsentrasi tertinggi didapat pada pH 8 hari ke-2, yaitu 9,5968 ppm.



Gambar 2b. Kandungan NAG pada Kultur *Bacillus* sp. RNT9 pada Medium Kitin Koloidal dengan pH yang berbeda, selama 5 hari, pada Suhu 37°C.

Konsentrasi NAG perhari secara umum mengalami kenaikan yang konstan pada setiap parameter pH yang berbeda. Kenaikan kadar NAG paling signifikan dapat dilihat pada pergantian dari hari 0 ke hari 1. Konsentrasi NAG mencapai nilai tertinggi pada hari ke-2 dengan kondisi pH 8, yaitu sebesar 9,5968 ppm. Konsentrasi NAG tertinggi selanjutnya terdapat pada kondisi pH 7 di hari ke-3 dengan nilai dengan nilai sebesar 9,1317 ppm. Pada kondisi pH 6 konsentrasi NAG tertinggi didapat di hari ke-2 sebesar 9,0542 ppm. Menurut Hidayat (2005), semakin tinggi aktivitas enzim, maka semakin tinggi pula jumlah gula reduksi yang dihasilkan. Penurunan kadar NAG mulai dapat dilihat pada hari ke-4 untuk pH 6 dan 7 setelah mencapai kadar NAG tertinggi pada hari ke-3. Donderski dan Trzebiatowska (1999) menyatakan bahwa kelimpahan jumlah NAG dapat menghambat aktivitas kitinase bakteri yang diakibatkan oleh terbentuknya inhibitor katabolik pada saat sintesa kitinase berlangsung.

pH media pertumbuhan yang sesuai akan membuat pertumbuhan *Bacillus* sp. juga dapat berjalan dengan optimal. Menurut Hogg (2005), aktivitas metabolisme mikroorganisme sering berubah-ubah sesuai dengan pH lingkungan ketika mengalami pertumbuhan. Pada penelitian Anggraini (2003), diketahui bahwa *Bacillus* sp. merupakan mikroorganisme alkalofilik. Mikroorganisme alkalofilik dapat tumbuh pada pH basa, namun pertumbuhannya lambat pada pH netral. Hal ini juga tergantung pada kondisi pertumbuhan, lainnya seperti nutrisi, ion logam dan suhu. Menurut Sumardi *et al.* (2019), *Bacillus* juga merupakan jenis bakteri neutrofilik yang dapat hidup dalam kisaran pH netral. Bakteri netrofilik pada umumnya tidak dapat tumbuh pada pH yang terlalu asam atau terlalu basa, namun bakteri ini dapat tetap bertahan hidup dengan melakukan homeostasis pH atau kemampuan mikroba untuk mengontrol pH internalnya agar dapat bertahan. pH lingkungan rendah akan membuat membran sel menjadi jenuh oleh ion hidrogen sehingga membatasi transport membran dan dapat menyebabkan keracunan (Imas *et al.*, 1989).

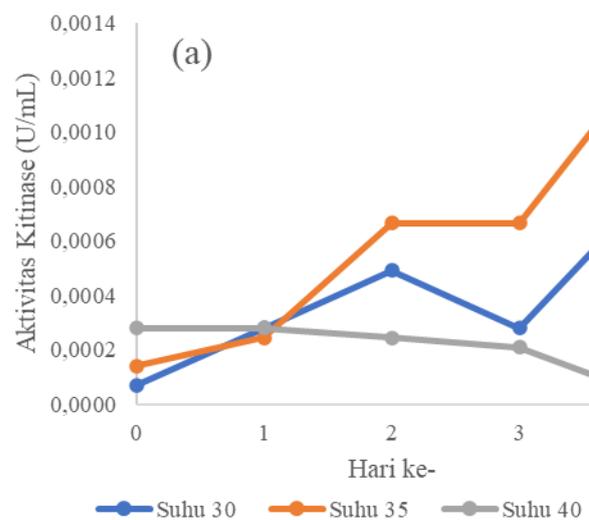
Bertumbuhnya bakteri dengan kondisi pH yang sesuai akan mengoptimalkan produksi enzim kitinase yang dihasilkan oleh bakteri. Menurut Illanes (2008), produksi enzim dapat ditingkatkan dengan meningkatkan karakteristik struktural atau elemen-elemen yang mempengaruhi sintesis di dalam sel suatu strain dan menyesuaikan kondisi fermentasi (substrat, pH, atau

suhu fermentasi). Patil *et al.* (2000) mengatakan bahwa bakteri mengeluarkan enzim untuk pengambilan nutrisi.

Berdasarkan hasil penelitian diatas, dapat disimpulkan bahwa penelitian ini memiliki hasil yang tidak jauh berbeda dengan penelitian lainnya. Penelitian yang dilakukan oleh Gomaa (2012), menyebutkan aktivitas kitinase optimum pada *Bacillus thuringiensis* dan *Bacillus licheniformis* dapat dihasilkan pada pH 7 dan 8. *Bacillus cereus* isolat 11UJ yang diteliti oleh Suryadi *et al.* (2013) mendapatkan aktivitas optimum di pH 8. Penelitian yang dilakukan oleh Prakash (2015) mengenai optimasi kondisi kultur untuk produksi kitinase oleh *Bacillus* spp. menyatakan bahwa *Bacillus cereus* dan *Bacillus subtilis* mampu menghasilkan aktivitas kitinase tertinggi pada perlakuan pH 8. Kitinase *Bacillus cereus* L5 yang diteliti oleh Rahmawati *et al.* (2011) menunjukkan aktivitas tertinggi pada pH 7,0 meskipun enzim juga menunjukkan aktivitasnya pada pH 5,0-9,0. Penelitian yang dilakukan oleh Bhushan (2000) menemukan pH 8,5 sebagai pH optimum aktivitas kitinase *Bacillus* sp. BG-11. Aktivitas spesifik enzim kitinase *Bacillus* sp. 13.26 yang diteliti oleh Yuli *et al.* (2004) mendapatkan nilai optimum pada kondisi pH 7.

Pengaruh Suhu Terhadap Aktivitas Kitinase *Bacillus* sp. RNT9

Berdasarkan hasil penelitian, terlihat bahwa aktivitas kitinase tertinggi terdapat pada kondisi suhu 35°C pada hari ke-4 dengan nilai aktivitas kitinasenya sebanyak 0,0013 U/mL. Aktivitas kitinase tertinggi selanjutnya terdapat pada kondisi suhu 30°C pada hari ke-4 dengan nilai aktivitas kitinase sebesar. 0,0008 U/mL. Pada kondisi suhu 40°C tidak terjadi kenaikan aktivitas kitinase secara signifikan perharinya, dengan aktivitas tertinggi terdapat pada hari 0 dan hari 1 yaitu bernilai 0,0003 U/mL dan pada hari ke-4 aktivitas kitinase pada suhu 40°C sudah turun dengan signifikan. Berdasarkan data tersebut, dapat kita simpulkan bahwa aktivitas kitinase tertinggi *Bacillus* sp. RNT9 dapat ditemukan pada kondisi suhu 35°C (Gambar 3a).



Gambar 3a. Aktivitas Kitinase pada Kultur *Bacillus* sp. RNT9 pada Medium Kitin Koloidal dengan Suhu Inkubasi yang berbeda, selama 5 hari, dengan Kondisi pH 8.

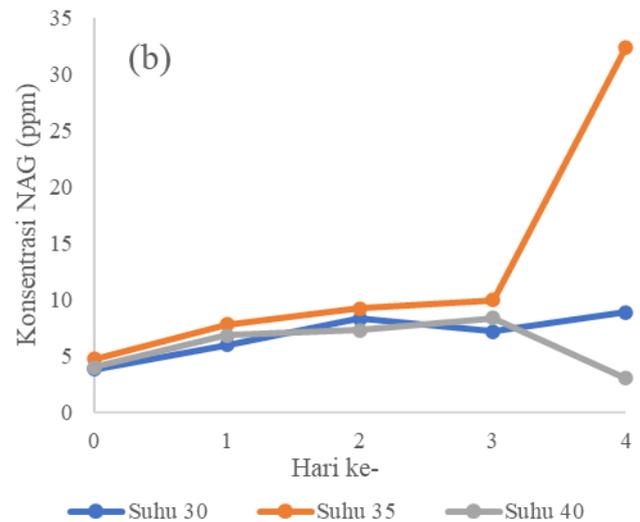
Menurut Elias *et al.* (2014), suhu merupakan faktor fisik yang berpengaruh pada laju pertumbuhan melalui pengaruhnya diantaranya terhadap reaksi kimia dan stabilitas struktur molekul protein. Aktivitas enzim akan meningkat dengan meningkatnya suhu sampai mencapai suhu optimumnya, tetapi setelah melewati suhu optimumnya aktivitas enzim akan menurun (Rudiger *et al.*, 1994). Peningkatan suhu akan meningkatkan energi kinetik, sehingga menambah intensitas tumbukan antara substrat dan enzim. Peningkatan suhu lebih lanjut akan menurunkan aktivitas enzim yang disebabkan oleh adanya enzim yang terdenaturasi oleh suhu ekstrim. Enzim merupakan suatu protein sehingga kenaikan suhu dari batas reaksi selanjutnya akan menyebabkan terjadinya denaturasi yaitu berubahnya struktur tiga dimensi yang khas dari suatu enzim (Sarnia *et al.*, 2017).

Berdasarkan Gambar 3a, dapat dilihat bahwa pada suhu 40°C aktivitas kitinase yang dihasilkan oleh *Bacillus* sp. RNT9 paling rendah jika dibandingkan dengan kedua suhu lainnya. Ini dapat terjadi karena suhu lingkungan yang meningkat di sekitar enzim menyebabkan putusannya ikatan hidrogen, ikatan ion atau interaksi hidrofobik sehingga struktur tersier enzim berubah, yang menyebabkan struktur lipatan enzim membuka pada bagian permukaan sehingga sisi aktif enzim berubah mengakibatkan terjadi penurunan aktivitas enzim (Whitaker, 1994). Pernyataan ini juga didukung oleh Harper *et al.* (1984) yang mengatakan penurunan aktivitas kitinase pada suhu ekstrim dapat disebabkan oleh kerusakan kitinase akibat putusannya ikatan sekunder enzim karena adanya energi kinetik akibat suhu yang tinggi melampaui energi pada protein untuk mempertahankan bentuk sisi aktif. Enzim mengalami perubahan konformasi pada suhu yang terlalu tinggi, sehingga substrat terhambat dalam memasuki sisi aktif enzim (Yusriah dan Kuswyatasari, 2013).

Aktivitas kitinase yang lebih rendah pada suhu selain 35°C juga dapat disebabkan oleh kurang optimalnya suhu pertumbuhan *Bacillus* sp. RNT9. Bakteri yang tumbuh pada kondisi yang tidak optimal seperti suhu juga akan mempengaruhi pertumbuhannya serta metabolismenya. Suhu mempengaruhi reaksi kimiawi, laju pertumbuhan dan jumlah total pertumbuhan organisme. Suhu juga dapat mengubah proses metabolik tertentu serta morfologi sel (Pelczar dan Chan, 1986). Proses metabolisme sel didukung oleh penyediaan nutrisi yang berasal dari luar sel. Proses yang terkait dengan *uptake* nutrient dengan suhu adalah bahwa molekul-molekul yang berukuran besar harus dihidrolisis terlebih diluar sel. Proses ini dikatalisis oleh enzim ekstraseluler yang aktivitasnya juga dipengaruhi oleh suhu. Banyak protein membran dan protein dinding sel yang berperan dalam proses *uptake* nutrient yang secara fungsional juga dipengaruhi oleh suhu terutama terkait dengan stabilitas strukturalnya (Margino *et al.*, 2015). Dapat kita simpulkan bahwa tanpa kondisi suhu yang optimal, metabolisme yang terjadi pada bakteri tidak akan terjadi dengan baik, yang akhirnya juga berdampak terhadap produksi enzim kitinase bakteri sendiri.

Konsentrasi NAG perhari secara umum mengalami kenaikan yang konstan pada setiap parameter suhu yang berbeda. Dilihat pada Gambar 3b, kenaikan kadar NAG paling signifikan dapat dilihat pada pergantian dari hari 3 ke hari 4 di suhu 35°C. Konsentrasi NAG mencapai nilai tertinggi pada hari

ke-4 dengan kondisi suhu 35°C, yaitu sebesar 32,387 ppm. Konsentrasi NAG tertinggi selanjutnya didapat pada suhu 30°C di hari ke-4 yaitu sebesar 8,8217 ppm. Pada suhu 40°C, konsentrasi NAG terbesar didapat di hari ke-3 sebesar 7,1162 ppm.



Gambar 3b. Kandungan NAG pada Kultur *Bacillus* sp. RNT9 pada Medium Kitin Koloidal dengan Suhu Inkubasi yang berbeda, selama 5 hari, dengan Kondisi pH 8.

Produksi NAG ini sangat dipengaruhi oleh aktivitas kitinase bakteri. Menurut Hidayat (2005), semakin tinggi aktivitas enzim, maka semakin tinggi pula jumlah gula reduksi yang dihasilkan. Pernyataan ini juga didukung oleh Donderski dan Trzebiatowska (1999), bahwa aktivitas enzim kitinase yang meningkat menyebabkan jumlah monomer-monomer N-Asetilglukosamin meningkat. Penurunan kadar NAG mulai dapat dilihat pada hari ke-4 untuk suhu 40°C setelah mencapai kadar NAG tertinggi pada hari ke-3. Pada kondisi suhu inkubasi 30°C belum terlihat terjadi penurunan kadar NAG, dapat dilihat kadar NAG tertinggi didapat pada hari ke-4 sebesar 8,821 ppm. Suhu inkubasi merupakan salah satu faktor fisik yang penting dalam biokonversi kitin menjadi N-Asetilglukosamin (NAG). Suhu inkubasi memberikan pengaruh yang berbeda terhadap konsentrasi NAG yang dihasilkan oleh setiap bakteri (Sari *et al.*, 2017).

Berdasarkan suhu pertumbuhannya mikroba digolongkan menjadi lima kelompok yaitu psikrofil yang tumbuh pada suhu -5–20° C, mesofil yang tumbuh pada suhu 20–45° C, termofil pada suhu 45– 65° C, termofil ekstrim pada suhu 65–85° C dan hipertermofil pada suhu 85–100° C (Rudiger *et al.*, 1994). Hasil aktivitas kitinase *Bacillus* sp. RNT9 yang optimum pada suhu 35°C ini sesuai dengan pernyataan Rahayu *et al.* (2003) dalam penelitiannya menggunakan *Bacillus* sp. yang berasal dari rumen sapi yang diproduksi pada media koloidal kitin 0,5%, optimum pada suhu 35 °C dengan aktivitas kitinase sebesar 7,1 U/mL. Penelitian Cheba *et al.* (2016) menemukan aktivitas kitinase yang dihasilkan oleh *Bacillus* sp. R2 mencapai kondisi optimum

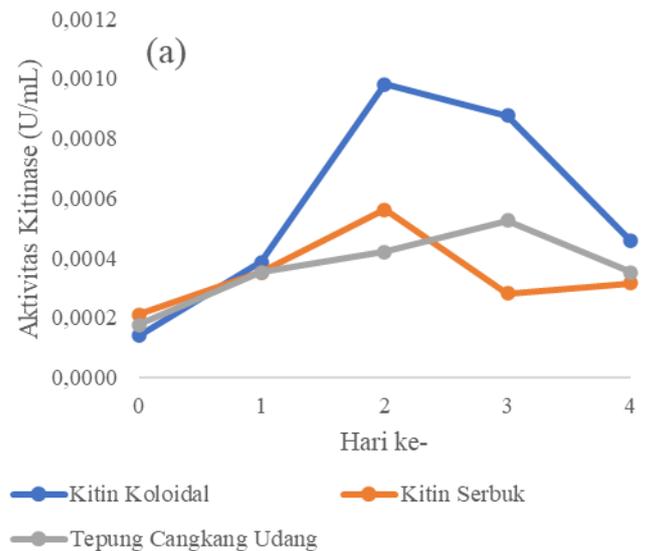
pada suhu 40°C. Penelitian oleh Suryadi *et al.* (2013) menyebutkan kitinase dari isolat *Bacillus cereus* 11 UJ memiliki aktivitas sebesar 0,070 U/mL pada pH 8 dan suhu 37°C. Berdasarkan perbandingan ini, diketahui bahwa *Bacillus* sp. dapat tumbuh dan menghasilkan enzim kitinase di rentang suhu yang cukup bervariasi dan besar, walaupun pada penelitian ini didapat aktivitas kitinase terbaik ada pada suhu 35°C untuk *Bacillus* sp. RNT9.

Pengaruh Jenis Substrat Terhadap Aktivitas Kitinase *Bacillus* sp. RNT9

Berdasarkan hasil penelitian, aktivitas kitinase tertinggi terdapat pada jenis substrat kitin koloidal pada hari ke-2 dan 3 dengan nilai aktivitas kitinasenya sebanyak 0,0010 U/mL dan 0,0009 U/mL. Aktivitas kitinase tertinggi selanjutnya terdapat pada jenis substrat kitin serbuk hari ke-2 dengan nilai aktivitas kitinase sebesar 0,0006 U/mL. Pada substrat tepung cangkang udang, aktivitas kitinase tertinggi diperoleh pada hari ke-3 sebesar 0,0005 U/mL. Berdasarkan data tersebut, maka dapat kita simpulkan bahwa substrat kitin koloidal merupakan substrat yang paling baik untuk menghasilkan aktivitas kitinase dari *Bacillus* sp. RNT9 (Gambar 4a).

Substrat yang umum digunakan dalam memproduksi enzim kitinase yaitu koloidal kitin. Menurut Ilankovan *et al.* (2006), koloidal kitin merupakan kitin serbuk yang telah dimodifikasi bentuknya menjadi bentuk koloid (pasta) dan telah mengalami proses pembengkakan pada strukturnya. Proses pembengkakan struktur kitin dapat dilakukan dengan penambahan asam, basa atau dengan menggunakan detergen berupa *sodium dodecyl sulfate* (SDS). Herdyastuti *et al.* (2015) menyatakan bahwa struktur kitin yang lebih terbuka akan mempermudah enzim untuk bereaksi dan meningkatkan interaksi antara enzim dengan substrat. Koloidal kitin memiliki struktur yang lebih terbuka dibandingkan jenis substrat lainnya, disebabkan oleh perlakuan pembengkakan pada strukturnya, sehingga meningkatkan interaksi enzim substrat sehingga menghasilkan aktivitas kitinase yang lebih tinggi. Koloidal kitin adalah kitin yang dilarutkan dalam asam klorida pekat seperti yang telah dipelajari oleh Hsu dan Lockwood (1975) sebagai media selektif untuk mendapatkan *Actinomyces* dari air dan tanah. Metode konvensional yang menggunakan koloidal kitin sebagai substrat ditemukan sangat efektif untuk menentukan aktivitas kitinase (Haedar *et al.*, 2017).

Hasil penelitian menunjukkan bahwa jenis substrat yang terbaik untuk menghasilkan aktivitas kitinase *Bacillus* sp. RNT9 adalah dengan menggunakan substrat koloidal kitin sebagai sumber kitinnya. Hasil penelitian ini sesuai dengan penelitian oleh Toharisman *et al.* (2005), yang melaporkan bahwa *Bacillus licheniformis* memiliki waktu produksi maksimum setelah diinkubasi selama 5 hari dalam medium 1% koloidal kitin. Kuk *et al.* (2005) melaporkan *Aeromonas* sp. GJ-18 memiliki aktivitas kitinolitik tinggi, memproduksi enzim kasar yang terdiri atas N-Asetilglukosaminidase dan N-Diasetilkitobiosidase. Hidrolisis koloidal kitin dengan enzim tersebut menghasilkan N-Asetilglukosamin sebagai produk utama dengan rendemen 74% dalam inkubasi 5 hari. Dari pernyataan tersebut dapat kita simpulkan bahwa koloidal kitin juga menjadi substrat terbaik untuk menghasilkan aktivitas kitinase tidak hanya pada *Bacillus* spp. saja, tetapi juga menjadi pada spesies bakteri kitinolitik yang lain juga.



Gambar 4a. Aktivitas Kitinase pada Kultur *Bacillus* sp. RNT9 pada berbagai Medium dengan Jenis Substrat yang berbeda, Menggunakan suhu 35°C dan pH 8.

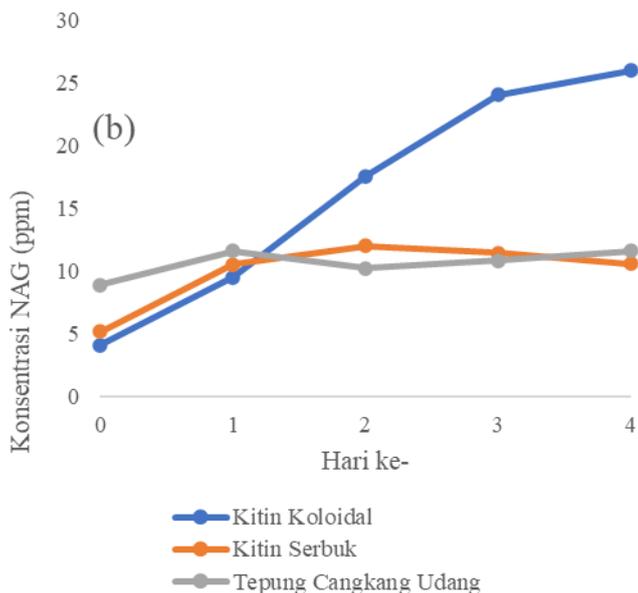
Pada penelitian ini, semua jenis media fermentasi menggunakan jumlah substrat sebanyak 2% sesuai dengan metode Hsu dan Lockwood (1975). Penggunaan konsentrasi 2% ini sesuai dengan pernyataan Bhattacharya *et al.* (2012), dimana konsentrasi kitin yang disarankan untuk penelitian aktivitas enzim kitinase berkisar 1% sampai 2%. Menurut Rahayu (2000), pada konsentrasi substrat yang sangat rendah, kecepatan reaksi yang dikatalisis enzim juga sangat rendah. Sebaliknya, kecepatan reaksi akan meningkat dengan meningkatnya konsentrasi substrat sampai tercapai titik tertentu, yaitu titik batas kecepatan reaksi maksimum. Melewati titik batas, enzim menjadi jenuh oleh substratnya, sehingga tidak dapat berfungsi lebih cepat. Suryadi *et al.* (2013) menyatakan bahwa peningkatan konsentrasi substrat tidak meningkatkan kecepatan laju reaksi, karena saat semua enzim telah terjenuh oleh substrat, kecepatan enzim menjadi tetap. Menurut Hardi *et al.* (2016), kejenuhan ini terjadi karena seiring dengan meningkatnya konsentrasi substrat, semakin banyak enzim bebas yang diubah menjadi kompleks substrat-enzim ES. Pada konsentrasi rendah, substrat hanya sedikit yang terikat pada bagian aktif enzim, sedangkan jika konsentrasi diperbesar, maka semakin banyak substrat yang berinteraksi dengan sisi aktif enzim. Pembatas kecepatan enzimatik ini adalah kecepatan penguraian kompleks enzim-substrat menjadi produk dan enzim bebas.

Beberapa penelitian tentang pengaruh konsentrasi substrat kitin terhadap produksi kitinase telah dilakukan. Penelitian Haedar *et al.* (2017) menyatakan aktivitas kitinase tertinggi yang dihasilkan oleh bakteri kitinolitik asal kerang *Anadara granosa* didapatkan pada konsentrasi substrat kitin koloidal 0,5% dengan nilai aktivitas 3 U/mL, lebih tinggi jika dibandingkan dengan konsentrasi 0,1% hingga 0,4%. Bhattacharya *et al.* (2012) menemukan aktivitas kitinase *Serratia marcescens* terbesar diantara konsentrasi substrat 0,1% hingga 10% terletak pada konsentrasi 1%, dengan nilai aktivitas 9,47 U/mL. Kemudian penelitian oleh Hardi *et al.* (2016) menyatakan aktivitas kitinase tertinggi yang dihasilkan oleh isolat bakteri termofilik B1211 terdapat dengan kondisi konsentrasi substrat 0,4% diantara rentang 0,1% hingga 1%,

dengan nilai aktivitas 0,72 U/mL. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai pengaruh jumlah atau konsentrasi substrat terhadap aktivitas kitinase *Bacillus* sp. RNT9.

Berdasarkan data pada Gambar 4a, diketahui bahwa jenis substrat tepung cangkang memiliki aktivitas yang cenderung lebih rendah jika dibandingkan dengan kedua jenis substrat yang lain. Nikolov *et al.* (2011) menyatakan bahwa senyawa kitin berada pada bagian dalam kompleks cangkang yang masih terlapis dan terikat oleh senyawa protein dan mineral. Pembuatan kitin telah dilakukan perlakuan yaitu penambahan asam maupun basa. Menurut Anggraini (2015), NaOH merupakan suatu senyawa yang dapat bersifat sebagai pucuni untuk menghilangkan zat pengotor dan dapat memutus gugus asetamida. Muzzarelli (1977) menyatakan bahwa tepung cangkang dan kitin serbuk memiliki rantai polimer yang sangat panjang dan kompleks sehingga menyebabkan sifat kelarutan yang rendah dalam air.

Kitin diidentifikasi sebagai sumber karbon terbaik. Bentuk kitin yang rapat dan kompak karena adanya bentuk - α dengan rantai antipararel yang menstabilkan bentuk polimorfiknya secara alami dapat menyebabkan kitin tidak larut dalam pelarutnya (Majtán, 2007). Kondisi ini dapat menyebabkan kesulitan pada reaksi enzim dan substrat, sehingga dilakukan modifikasi terhadap kitin, menjadi bentuk alternatif seperti kitin koloidal.



Gambar 4b. Kandungan NAG pada Kultur *Bacillus* sp. RNT9 pada berbagai Medium dengan jenis Substrat yang berbeda, menggunakan Suhu 35°C dan pH 8.

Konsentrasi NAG perhari secara umum mengalami kenaikan yang konstan hanya pada media kitin cair dengan substrat koloidal kitin, dapat kita lihat pada gambar 4b. Kenaikan kadar NAG paling signifikan dapat dilihat pada media dengan jenis substrat koloidal kitin. Konsentrasi NAG pada substrat koloidal kitin belum terlihat mengalami penurunan perharinya, dikarenakan kadar tertingginya didapat pada hari ke-4, yaitu sebesar 26,031 ppm. Menurut Hidayat (2005), semakin tinggi aktivitas enzim, maka semakin tinggi

pula jumlah gula reduksi yang dihasilkan. Pada substrat kitin serbuk tidak mengalami kenaikan kadar NAG yang signifikan, serta nilai kadar NAG maksimum tidak sebesar kadar NAG substrat koloidal kitin. Nilai kadar NAG tertinggi pada substrat kitin serbuk didapat pada hari ke-2 dengan nilai 12 ppm, kemudian mulai mengalami penurunan kadar NAG di hari ke-3 dan ke-4. Media dengan substrat tepung cangkang udang tidak memiliki kenaikan kadar NAG yang signifikan, dengan kadar maksimum dicapai pada hari ke-1 dan ke-4 sebesar 11,6124 ppm.

KESIMPULAN

Kondisi terbaik untuk menghasilkan aktivitas enzim kitinase pada *Bacillus* sp. RNT9 adalah dengan medium pH 8, suhu inkubasi 35°C dan jenis substrat medium dari kitin koloidal. Aktivitas kitinase tertinggi terdapat pada kondisi medium pH 8 pada hari ke-2 dengan nilai aktivitas kitinasenya sebanyak 0,0008 U/mL. Aktivitas kitinase tertinggi terdapat pada kondisi suhu 35°C pada hari ke-4 dengan nilai aktivitas kitinasenya sebanyak 0,0013 U/mL. Aktivitas kitinase tertinggi terdapat pada jenis substrat kitin koloidal pada hari ke-2 dan-3 dengan nilai aktivitas kitinasenya sebanyak 0,0010 U/mL dan 0,0009 U/mL.

Pada perlakuan optimasi pH, konsentrasi NAG mencapai nilai tertinggi pada hari ke-2 dengan kondisi pH 8, yaitu sebesar 9,5968 ppm. Kemudian pada optimasi suhu, konsentrasi NAG tertinggi didapat pada kondisi suhu 35°C di hari ke-4 fermentasi, yaitu sebesar 32,387 ppm. Pada perlakuan optimasi jenis substrat, didapat konsentrasi NAG tertinggi pada jenis substrat koloidal kitin yaitu sebesar 26,031 ppm di hari ke-4.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terimakasih kepada Departemen Perikanan, Fakultas Pertanian, Universitas Gadjah Mada serta Laboratorium Mutu dan Keamanan Hasil Perikanan. Penulis juga mengucapkan terimakasih kepada dosen pembimbing (Pak Ustadi dan Ibu Indun Dewi Puspita) serta pihak yang terlibat dalam keberhasilan penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Anggraini, W. (2015). Pengaruh pH terhadap aktivitas enzim kitinase dari isolat *Actinomyces* dengan metode Somogyi-Nelson. *Jurnal Ilmiah Pendidikan Fisika Al Biruni*, 4(2), 217-228. <https://doi.org/10.24042/jipfalbiruni.v4i2.94>
- Anggraini, M. (2003). Isolasi Bakteri Penghasil Protease Alkalin dan Karakterisasi Enzim. Skripsi Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Ariyadi, T., Dewi, S. (2009). Pengaruh sinar ultra violet terhadap pertumbuhan bakteri *Bacillus* sp. sebagai bakteri kontaminan. *Jurnal Kesehatan UNIMUS*, 2(2), 20-25.
- Arnold, N., Solomon. (1986). Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology. American Society for Microbiology. Washington.

- Bhushan, B. (2000). Production and characterization of a thermostable chitinase from a new alkalophilic *Bacillus* sp. BG-11. *Journal of applied microbiology*, 88(5), 800-808.
- Cheba, B. A., Zaghoul, T. I., EL-Mahdy, A. R., & EL-Massry, M. H. (2016). Effect of pH and temperature on *Bacillus* sp. R2 chitinase activity and stability. *Procedia Technology*, 22, 471-477.
<https://doi.org/10.1016/j.protcy.2016.01.092>
- Dahlan, A., Wahyuni, S., Ansharullah. (2017). Morfologi dan karakterisasi pertumbuhan bakteri asam laktat (UM 1.3A) dari proses fermentasi wikau maombo untuk studi awal produksi enzim amilase. *Jurnal Sains dan Teknologi Pangan (JSTP)*, 2(4), 657-663.
<http://dx.doi.org/10.33772/jstp.v2i4.3557>
- Dick, W. A., Cheng, L., & Wang, P. (2000). Soil acid and alkaline phosphatase activity as pH adjustment indicators. *Soil Biology and Biochemistry*, 32(13), 1915-1919.
[https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(00\)00166-8](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(00)00166-8)
- KKP (Kementrian Kelautan dan Perikanan Republik Indonesia). (2015). MEA Center "Maritime and Sector Fisheries".
- Dhananjaya, I. G. (2018). Pengaruh pH, Suhu dan Jenis Substrat Terhadap Aktivitas Kitinase *Bacillus cereus* SMG 1.1. Skripsi Sarjana Universitas Gadjah Mada. Yogyakarta.
- Donderski, W., & Trzebiatowska, M. (1999). Chitinase activity production by planktonic, benthic and epiphytic bacteria inhabiting the Moty Bay of the Jeziorak Lake (Poland). *Polish Journal of Environmental Studies*, 8, 215-220.
- Elias, M., Wiczorek, G., Rosenne, S., & Tawfik, D. S. (2014). The universality of enzymatic rate-temperature dependency. *Trends in Biochemical Sciences*, 39(1), 1-7.
<https://doi.org/10.1016/j.tibs.2013.11.001>
- Gomaa, E. Z. (2012). Chitinase production by *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus licheniformis*: their potential in antifungal biocontrol. *The journal of Microbiology*, 50(1), 103-111.
<https://doi.org/10.1007/s12275-012-1343-y>
- Haedar, N., Fahrudin, F., Aryanti, W., & Natsir, H. (2017). Produksi dan karakterisasi enzim kitinase dari bakteri kitinolitik asal kerang *Anadara granosa*. *Jurnal Ilmu Alam dan Lingkungan*, 8(1).
<https://doi.org/10.20956/jal.v8i15.2996>
- Hardi, J., Ruslan, R., Razak, A. R., & Silva, S. (2017). Karakterisasi Enzim Kitinase dari Isolat Bakteri Termofilik B1211 Asal Air Panas Bora. *KOVALEN: Jurnal Riset Kimia*, 3(2), 172-179.
- Haryogya, A. M. (2020). Isolation and Molecular Identification of Chitinolytic Bacteria from Ronto. In *E3S Web of Conferences* (Vol. 147, p. 03030). EDP Sciences.
<https://doi.org/10.1051/e3sconf/202014703030>
- Harini, I. N., Winarni, S., & Setyaningsih, E. (2004). Pemanfaatan Teknologi Pengolahan Limbah Kulit/Kepala Udang Menjadi Chitosan untuk Ingredient Pembuatan Permen di Home Industri Kebon Agung Kepanjen Malang. *Jurnal Dedikasi*, 1(2).
- Harper, H.A., Rodwel, V.W., Mayer, P.A. (1984). Review of Physiological Chemistry. Lange Medical Publication. California.
- Herdyastuti, N., Raharjo, T. J., Mudasir, M., & Matsjeh, S. (2009). Chitinase and chitinolytic microorganism: Isolation, characterization and potential. *Indonesian Journal of Chemistry*, 9(1), 37-47.
<https://doi.org/10.22146/ijc.21580>
- Herdyastuti, N., Cahyaningrum, S. E., Tamimi, M., & Wirawan, A. (2015). Modification of chitin as substrates for chitinase. *African Journal of Biotechnology*, 14(18), 1590-1595.
<https://doi.org/10.5897/AJB2014.14178>
- Hidayat, I. (2005). Pengaruh pH terhadap Aktivitas Endo-1, 4-β-Glucanase *Bacillus* sp. AR 009. *Biodiversitas*, 6(4), 242-244.
- Hogg, S. (2005). Essential Microbiology. John Wiley and Sons, Inc. England. 528 hlm.
- Hsu, S. C., & Lockwood, J. (1975). Powdered chitin agar as a selective medium for enumeration of actinomycetes in water and soil. *Applied microbiology*, 29(3), 422-426.
<https://doi.org/10.1128/am.29.3.422-426.1975>
- Imas, T., Hadioetomo, R.S., Gunawan, A. G., Setiadi, Y. (1989). Mikrobiologi Tanah II. PAU IPB. Bogor. 68 hlm.
- Ilnkovan, P., Hein, S., Ng, C. H., Trung, T. S., & Stevens, W. F. (2006). Production of N-acetyl chitobiose from various chitin substrates using commercial enzymes. *Carbohydrate Polymers*, 63(2), 245-250.
<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2005.08.060>
- Illanes, A. (2008). Enzyme biocatalysis. Principles and Applications. Editorial Springer-Verlag New York Inc. United States. 56pp.
- Islam, S., Rahman Bhuiyan, M.A., & Islam, M.N. (2017). Chitin and Chitosan: Structure, Properties, and Applications in Biomedical Engineering. *J Polym Environ*, 25, 854-866.
- Kuk, J. H., Jung, W. J., Hyun Jo, G., Ahn, J. S., Kim, K. Y., & Park, R. D. (2005). Selective preparation of N-acetyl-D-glucosamine and N, N'-diacetylchitobiose from chitin using a crude enzyme preparation from *Aeromonas* sp. *Biotechnology letters*, 27(1), 7-11.
<https://doi.org/10.1007/s10529-004-6300-3>
- Majtán, J., Biliková, K., Markovič, O., Gróf, J., Kogan, G., & Šimúth, J. (2007). Isolation and characterization of chitin from bumblebee (*Bombus terrestris*). *International journal of biological macromolecules*, 40(3), 237-241.
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2006.07.010>
- Margino, S., & Ari Setyati, W. (2015). Pengaruh pH, Suhu Dan Salinitas Terhadap Pertumbuhan dan Produksi Asam Organik Bakteri Asam Laktat Yang Diisolasi Dari Intestinum Udang Penaeid. *Indonesian Journal of Marine Sciences/Ilmu Kelautan*, 20(4), 187-194.
- Muharni, M., & Nurawati, E. (2017). Pengujiann Aktivitas Kitinase dari *Bacillus Circulans* Untuk Dikembangkan Sebagai Agen Biokontrol pada Penyakit Tanaman. *Jurnal Penelitian Sains*, 10(1).
<https://doi.org/10.56064/jps.v10i1.433>
- Muzzarelli, R.A.A. (1977). Chitin. Pergamon Press Ltd. England.
- Nikolov, S., Fabritius, H., Petrov, M., Friák, M., Lymperakis, L., Sachs, C., ... & Neugebauer, J. (2011). Robustness and optimal use of design principles of arthropod exoskeletons studied by ab initio-based multiscale

- simulations. *Journal of the mechanical behavior of biomedical materials*, 4(2), 129-145.
<https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2010.09.015>
- Patil, R. S., Ghormade, V., & Deshpande, M. V. (2000). Chitinolytic enzymes: an exploration. *Enzyme and microbial technology*, 26(7), 473-483.
[https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(00\)00134-4](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(00)00134-4)
- Pelczar, M.J., Chan, E.C.S. (1986). *Dasar-dasar Mikrobiologi*. UI Press. Jakarta.
- Prakash, B., Perumai, P., Gowrishankar, J., Sivasankari, P., Ashokkumar, L., Tamilman. (2015). Optimization of Cultural Conditions for Production of Chitinase by *Bacillus* sp. Isolated from Agriculture Soil using Substrate as Marine Crab Shell Waste. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 4, 192-198.
- Rahayu, S. (2000). Pemurnian dan Karakterisasi Kitinase dan Kitin Deasetilase Termotabil dari Isolat *Bacillus* K-29-14 Asal Kawah Lamojang, Jawa Barat. Thesis Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Rahayu, S., Suhartati, F. M., Rimbawanto, E. A., & Iriyanti, N. (2003). Isolation and Identification of the Chitinolytic Bacteria from Rumen Ecosystem. *Animal Production*, 5(2), 73-78.
- Rahmawati, D. (2011). Penentuan pH dan Suhu Optimum Aktivitas Kitinase *Bacillus cereus* I.5 dan Pengujian Kitinase dalam Mendegradasi Eksoskeleton Kutu Bertepung Putih (*Ferrisia virgata* Cockerel). Skripsi Sarjana Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Reissig, J. L., Strominger, J. L., & Leloir, L. F. (1955). A modified colorimetric method for the estimation of N-acetylamino sugars. *The Journal of Biological Chemistry*, 217, 959-966.
- Rudiger, A., Sunna, A., Antranikian, G. (1994). Enzymes from Extreme Thermophilic and Hyperthermophilic Archea and Bacteria. Di dalam: Carbohydrases, Handbook of Enzyme Catalysis in Organic Synthesis. VCH Verlagsgesellschaft. Weinheim.
- Sari, B.W., Isnaini, N.B., Puspita, I.D., Husni, A., Ustadi. (2017). Pembentukan N-Asetilglukosamin dari Kitin Cangkang Udang oleh *Serratia marcescens* PT-6 yang dikultur pada berbagai pH dan Suhu. *Jurnal Perikanan Universitas Gadjah Mada*, 19(1), 53-59.
<https://doi.org/10.22146/jfs.25961>
- Sarnia, S., Natsir, H., & Dali, S. (2017). Produksi dan Karakterisasi Enzim Kitosanase Dari Isolat Bakteri *Klebsiella* sp. *Techno: Jurnal Penelitian*, 4(02), 08-15.
<http://dx.doi.org/10.33387/tk.v4i02.339>
- Soeka, Y. S., & Sulistiani, S. (2012). Seleksi, Karakterisasi, dan Identifikasi Bakteri Penghasil Kitinase yang Diisolasi dari Gunung Bromo Jawa Timur. *Jurnal Natur Indonesia*, 13(2), 155-161.
<http://dx.doi.org/10.31258/jnat.13.2.155-161>
- Souza, C.P., Almeida, B.C., & Colwell, R.R. (2011). The importance of chitin in the marine environment. *Mar Biotechnol*, 13: 823.
<https://doi.org/10.1007/s10126-011-9388-1>
- Sumantha, A., Larroche, C., & Pandey, A. (2006). Microbiology and industrial biotechnology of food-grade proteases: a perspective. *Food Technology and Biotechnology*, 44, 211-220.
- Sumardi, S., Farisi, S., Ekowati, C. N., & Oktalia, S. A. (2019). Co-Culture Anoxygenic Photosynthetic Bacteria With *Bacillus* sp. Isolated From Hanura Beach Against *Vibrio* sp. *Jurnal Ilmiah Biologi Eksperimen dan Keanekaragaman Hayati (J-BEKH)*, 6(2), 62-70.
<https://doi.org/10.23960/jbekh.v6i2.43>
- Suryadi, Y., Priyatno, T. P., Susilowati, D. N., Samudra, I. M., Yudhistira, N., & Purwakumuh, E. D. (2013). Isolasi dan karakterisasi kitinase asal *Bacillus cereus* 11 UJ. *Jurnal Biologi Indonesia*, 9(1), 51-62.
- Suryadi, Y., Priyatno, T. P., Samudra, I., Susilowati, D. N., Lawati, N., & Kustaman, E. (2013). Pemurnian parsial dan karakterisasi kitinase asal jamur entomopatogen *Beauveria bassiana* isolat BB200109. *J. Agro Biogen*, 9(2), 77-84.
- Toharisman, A., Suhartono, M. T., Spindler-Barth, M., Hwang, J. K., & Pyun, Y. R. (2005). Purification and characterization of a thermostable chitinase from *Bacillus licheniformis* Mb-2. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 21(5), 733-738.
<https://doi.org/10.1007/s11274-004-4797-1>
- Wang, S. L., & Chang, W. T. (1997). Purification and characterization of two bifunctional chitinases/lysozymes extracellularly produced by *Pseudomonas aeruginosa* K-187 in a shrimp and crab shell powder medium. *Applied and environmental microbiology*, 63(2), 380-386.
<https://doi.org/10.1128/aem.63.2.380-386.1997>
- Whitaker, J. R. (1994). Principle of enzymology for the food science. Marcel Decker. New York.
- Widhyastuti, N. (2010). Purifikasi N-Asetil-D-glukosamina Hasil Sintesa Secara Enzimatis untuk Bahan Obat dan Pangan Fungsional. Laporan Akhir Program Insentif Peneliti dan Perakayasa LIPI. Pusat Penelitian Biologi Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia. Bogor.
- Yuli, P. E., Suhartono, M. T., Rukayadi, Y., Hwang, J. K., & Pyun, Y. R. (2004). Characteristics of thermostable chitinase enzymes from the Indonesian *Bacillus* sp. 13.26. *Enzyme and Microbial Technology*, 35(2-3), 147-153.
<https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2004.03.017>
- Yusriah, Y., & Kuswytasari, N. D. (2013). Pengaruh pH dan Suhu Terhadap Aktivitas Protease *Penicillium* sp. *Jurnal Sains dan Seni ITS*, 2(1), 2337-3520.
[10.12962/j23373520.v2i1.2744](https://doi.org/10.12962/j23373520.v2i1.2744)
- Zhang, Y. H. P., Himmel, M. E., & Mielenz, J. R. (2006). Outlook for cellulase improvement: screening and selection strategies. *Biotechnology advances*, 24(5), 452-481.
<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2006.03.003>