

## STUDI PENDAHULUAN ENZIM KITINASE EXTRASELULER YANG DIHASILKAN OLEH ISOLAT BAKTERI ASAL MANADO <sup>1)</sup>

[Preliminary Study of Extracellular Chitinase Produced by Bacteria Isolated from Manado]

E.Y. Purwani <sup>2)</sup>, A. Toharisman <sup>2)</sup>, E. Chasanah <sup>2)</sup>, J.F. Laksmi <sup>2)</sup>, V. Welan<sup>2)</sup>, M.T. Suhartono <sup>2)</sup>  
T. Purwadaria <sup>3)</sup>, J.K Hwang dan Y.R. Pyun <sup>4)</sup>

<sup>1)</sup> Makalah dipresentasikan pada Seminar Nasional PATPI, Semarang 9-10 Oktober 2001

<sup>2)</sup> PAU Bioteknologi IPB Jl. Puspa 1 Institut Pertanian Bogor, Bogor 16610

<sup>3)</sup> Balai Penelitian Ternak Ciawi, Bogor

<sup>4)</sup> Bioproduct Research Center, Yonsei University Seoul, Korea

### ABSTRACT

*Chitinolytic bacteria were isolated from several exotic area in Manado Province. The most potential isolate, namely 13.26, was isolated from Tompasso. The isolate was cultured in the thermus medium containing colloidal chitin as a carbon source for 5 days at 55°C to produce chitinase. It was observed that chitinase was most active at 65°C and the optimum pH was 8 in boric acid-borax buffer. Ammonium sulfate (50% saturation) precipitation of the protein increased the specific activity of the enzyme from 0.20 unit/mg protein (in culture supernatant) to 0.28 unit/mg protein. The molecular weight as estimated by zymogram analysis was 180 kDa.*

**Key words :** Chitin, and chitinase

### PENDAHULUAN

Kitin merupakan polimer rantai lurus yang tersusun atas residu N-acetylglucosamine (GLcNAc) melalui ikatan  $\beta$ -1,4. Kitin banyak tersedia di alam, nomor dua setelah selulosa. Kontribusi kitin terbanyak diberikan oleh hasil samping produk laut seperti kepiting, udang, cumi, kerang dan sebagainya. Diperkirakan produksi kitin mencapai sekitar 80000 metrik ton per tahun (Patil et al., 2000).

Kitin dan produk turunannya antara lain berupa oligomer kitin, khitosan dan sebagainya diketahui bernilai ekonomi tinggi sehingga banyak penelitian mulai diarahkan padanya. Produk-produk turunan kitin telah dimanfaatkan pada berbagai bidang, seperti kosmetik, biomedis, farmasi dan pertanian. Produk turunan kitin tersebut makin beragam berkat pemanfaatan enzim-enzim pendegradasi kitin.

Degradasi kitin secara enzimatik oleh kitinase berlangsung secara bertahap. Mula mula polimer kitin dipecah menjadi oligomer kitin (umumnya berupa dimer) dan selanjutnya diuraikan menjadi monomer GLcNAc oleh  $\beta$ -N-asetilglukosaminidase. Kitinase (E.C. 3.2.1.14) dihasilkan oleh berbagai organisme seperti serangga, crustacea, jamur dan bakteri. Bakteri penghasil enzim kitinase dapat dideteksi dan diisolasi melalui terbentuknya zona bening pada medium selektif agar (David dan Eveleigh 1984; Muzzarelli dan Ricardo, 1996).

Pada beberapa dekade terakhir, enzim yang stabil pada kondisi ekstrim (terutama pada suhu tinggi) makin

banyak diminati oleh kalangan industri. Pada suhu tinggi, resiko kontaminasi berkurang dan laju reaksi berjalan lebih cepat sehingga prosesnya dirasa makin efisien. Selain itu enzim yang stabil pada suhu tinggi (termostabil) telah menjadi pusat perhatian banyak peneliti karena struktur dan sifatnya yang unik. Enzim termostabil biasanya dihasilkan oleh mikroorganisme yang hidup pada lingkungan yang bersuhu tinggi pula seperti kawah gunung berapi, sumur hidrotermal dan sebagainya.

Sebagai negara yang memiliki kekayaan hayati tinggi, Indonesia tentunya merupakan salah satu habitat bagi mikroorganisme penghasil enzim kitinase. Daerah/kawasan sumur hidrotermal merupakan wilayah Indonesia yang belum banyak digali potensinya. Sejalan dengan kondisi di atas, penelitian bertujuan untuk mengisolasi bakteri yang mampu menghasilkan enzim kitinase termostabil dan mempelajari karakteristik enzim kitinase.

### METODOLOGI

#### Bahan kimia

Koloidal kitin dibuat dari kitin komersial, sesuai dengan metoda Arnold dan Solomon (1986). Glikol kitin disiapkan dari glikol kitosan dengan cara yang diuraikan oleh Rudel dan Asselin (1989). Bahan kimia lain diperoleh dan suplier yang ada di Bogor.

### Isolasi dan Seleksi Bakteri Pendegradasi Kitin (Kitinolitik).

Contoh (berupa tanah atau air) disuspensikan dalam akuades steril dan disebar pada cawan agar yang berisi: 0.7% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.1% K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.1% NaCl, 0.01% MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O, 0.05% ekstrak khamir, 1.5% campuran agar dan gel rit, dan 2% koloidal kitin. Cawan diinkubasi selama 3-4 hari pada suhu 55°C. Mikroorganisme yang membentuk zona bening diisolasi dan diseleksi kemampuan kitinolitiknya dengan cara menghitung indeks kitinolitik (rasio antara diameter zona bening dan diameter koloni). Isolat dengan indeks kitinolitik tertinggi dipilih untuk penelitian selanjutnya.

### Produksi Enzim.

Starter disiapkan dengan cara menumbuhkan isolat bakteri di dalam 10 ml medium cair yang mengandung: (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.7%, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.1%, NaCl 0.1%, MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O 0.01%, ekstrak khamir 0.05%, bakto tripton 0.1% dan koloidal kitin 0.5%; pH 7 selama 12-20 jam, pada 55°C. Sepuluh mililiter starter dipindahkan ke dalam 90 ml medium cair serupa, dan diinkubasi selama 96 jam 55°C untuk produksi enzim kitinase.

### Pemekatan Enzim.

Medium disentrifugasi (4000 rpm, 10 menit). Supernatannya dikumpulkan, kemudian ditambah dengan amonium sulfat hingga 50% jenuh secara bertahap, dibiarkan semalam pada 4°C. Setelah sentrifugasi (4000 rpm, 15 menit), endapan diambil dan supernatannya dikumpulkan untuk pengendapan tahap II. Endapan tersebut dilarutkan dalam bufer fosfat 50 mM, pH 7 dan didialisis di dalam bufer yang sama (25 mM) semalam, pada 4°C untuk mendapatkan enzim kasar Fraksi 50 (F50). Supernatan yang tersisa diendapkan lebih lanjut dengan amonium sulfat hingga 80% jenuh seperti tahap sebelumnya. Enzim yang diperoleh disebut sebagai enzim kasar Fraksi 80 (F80). Enzim selanjutnya dipanaskan selama 45 menit pada 55°C untuk mendapatkan enzim kitinase tahan panas.

### Uji Aktifitas Enzim.

Aktifitas khitinase dianalisis dengan menggunakan substrat koloidal kitin (Ueda dan Arai, 1992) dengan beberapa modifikasi. Campuran terdiri dari 300 µl substrat (0.3% koloidal kitin), 150 µl bufer dan 150 µl enzim diinkubasi pada suhu 55°C atau 60°C selama 30 menit.

Campuran segera disentrifugasi (10000 rpm, 4 menit), dan gula reduksi yang berada di dalam supernatan diukur dengan metoda Schales (Imoto dan Yagashita, 1971), dengan GLcNAc sebagai standar. Aktifitas kitinase (dinyatakan dalam unit) didefinisikan sebagai jumlah

GLcNAc (µmol) yang dibebaskan setiap menit pada kondisi analisis yang ditentukan.

### Kadar protein.

Kadar protein diukur dengan metoda Bradford (1976) dengan standar serum albumin (Bovine Serum Albumin= BSA).

### Elektroforesis.

Elektroforesis gel Poliakrilamida (SDS-PAGE: Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electroforesis) dikerjakan menurut metoda Laemli (1970) dengan beberapa modifikasi. Analisis zimogram dikerjakan mengikuti metoda Morimoto et al., (1997). Langkah yang dilakukan sebagai berikut: contoh protein dicampur dengan bufer contoh (Tris-HCl 60 mM, gliserol 25%, SDS 2%, 2-merkaptotanol 14,4 mM, bromophenol blue 0.1%), kemudian dipanaskan 70°C selama 30 menit. Protein dipisahkan dengan cara elektroforesis di dalam gel poliakrilamida (8%) yang berisi substrat glikol kitin 0.1%, dilanjutkan dengan renaturasi protein semalam (4°C) di dalam bufer renaturasi yang berisi Tris-HCl 50 mM [pH 7.5], merkaptotanol 5 mM dan EDTA 1mM. Gel dipindahkan ke dalam bufer serupa (segar), diinkubasi selama 1 jam untuk memberi kesempatan enzim mencerna substrat, kemudian diwarnai dengan Congo Red 0.1% (15 menit) dan dicuci dengan NaCl 1M.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Isolasi dan Seleksi Isolat Bakteri Pendegradasi Kitin

Contoh berasal dari daerah sumur hidrothermal yang ada di Propinsi Sulawesi Keempat lokasi tersebut berbeda terutama dalam hal keasamannya (Tabel 1).

Tompaso mewakili daerah agak asam (pH 4- 7), Lahendong daerah asam (pH 1-4), Karumenga daerah netral (pH 7) dan Likupang daerah agak basa (pH 8). Bakteri termofilik berhasil dikulturkan dari contoh asal Tompaso dan Lahendong. Diantara ratusan bakteri termofilik asal Tompaso, hanya 41 koloni saja (sekitar 10%) yang menunjukkan aktifitas kitinolitik. Penapisan lebih lanjut menghasilkan lima isolat dengan indeks kitinolitik tinggi (lebih dari 1.5). Dari Tabel 2. tampak bahwa isolat 13.26 memiliki indeks khitinolitik terbesar dan oleh karenanya isolat ini dikulturkan lebih lanjut di dalam medium cair untuk menghasilkan enzim kitinase ekstra selular.

Tabel 1. Jumlah isolat bakteri asal Menado yang berhasil dikulturkan pada suhu 55°C

Asal isolat	Jumlah koloni		Kondisi lingkungan
	Isolat termofilik non kitinolitik	Isolat termofilik kitinolitik	
Tompaso	335	41	pH 4-7, suhu 40-90°C
Lahendong	8	-	pH 1-4, suhu 35-85°C
Karumenga	-	-	pH 7, suhu 30-85°C
Likupang	-	-	pH 8, suhu 30-85°C

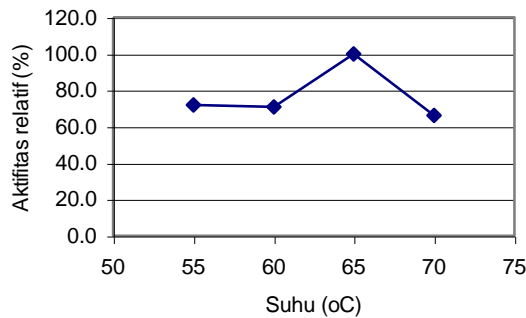
Tabel 2. Indeks kitinolitik beberapa isolat bakteri termofilik

Kode isolat	Indeks kitinolitik	Kondisi Lingkungan
Isolat 13.26	2.40	Suhu 50°C, pH 6
Isolat 12.2	2.25	Suhu 80°C, pH 6
Isolat 13.30	2.20	Suhu 50°C, pH 6
Isolat 13.5	1.90	Suhu 50°C, pH 6
Isolat 13.9	1.75	Suhu 50°C, pH 6

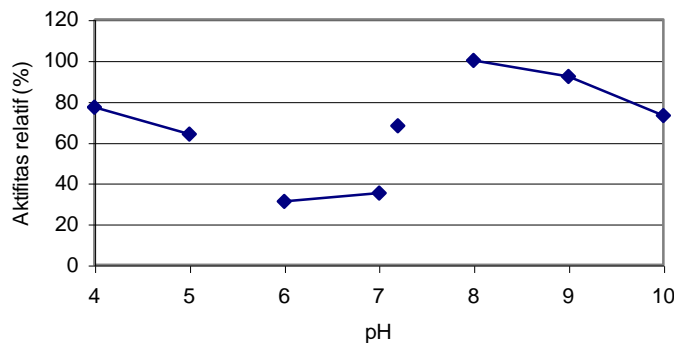
**Karakteristik Enzim Kitinase**

Suhu dan pH optimum enzim kitinase ditentukan pada contoh yang berupa kultur bebas sel (broth). Hasil analisis menunjukkan bahwa enzim kitinase yang

dihasilkan oleh isolat 13.26 sangat aktif pada suhu 65°C (Gambar 1) dan pH 8 dalam bufer asam borat borax (Gambar 2).



Gambar 1. Aktifitas enzim kitinase yang diuji pada berbagai suhu



Gambar 2. Aktifitas kitinase di dalam berbagai pH pada suhu 65°C: bufer citrat 50 mM (pH 4,5), bufer phospat 50 mM (pH 6,7), bufer Mc Ilvaine (pH 7,2), bufer asam borat-borax (pH 8,9), bufer Glisin-NaOH 50 mM (pH10).

Suhu optimum enzim kitinase yang dihasilkan oleh isolat 13.26 ini sebanding dengan laporan sebelumnya. Rahayu et al., (2000) melaporkan bahwa enzim kitinase yang dihasilkan oleh kelompok *Bacillus sp* yang diisolasi dari kawah Kamojang aktif pada suhu 55°C, sedangkan enzim kitinase yang dihasilkan oleh isolat bakteri dari kawah Tangkuban Perahu aktif pada suhu 70°C. Enzim kitinase bakterial pada umumnya aktif pada kisaran suhu 40-60°C (Hiraga et al., 1997).

Enzim kitinase yang dihasilkan oleh isolat di atas aktif pada kondisi agak basa (pH 8), dan ini mirip dengan enzim serupa yang dihasilkan oleh *Alteromonas sp* strain O7 (Tsuji et al., 1992 disitir oleh Hiraga et al., 1997). Namun kondisi tersebut sangat berbeda dengan enzim kitinase yang dihasilkan oleh isolat bakteri yang diperoleh dari Kawah Kamojang yang aktif di pH 7 (Rahayu et al., 2000) atau isolat yang diperoleh dari Kawah Tangkuban Perahu yang aktif di pH 5 (Natsir et al., 2000).

**Pemekatan Protein**

Protein (enzim) dipekatkan dengan metoda "salting out", dengan menambahkan amonium sulfat pada tingkat kejenuhan 50% (F50) dan 80% (F80) yang dikombinasikan dengan pemanasan selama 45 menit pada 55°C. Hasil analisis menunjukkan bahwa aktifitas spesifik enzim kitinase pada F50 tanpa atau dengan pemanasan meningkat sekitar 1.4 kali lebih tinggi dibanding aktifitas enzim serupa yang ada di dalam kultur bebas sel (broth), sedangkan pada F80 aktifitas spesifiknya relatif sama dengan yang ada di broth (Tabel 3).

Dari hasil tersebut tampak bahwa penambahan amonium sulfat sebanyak 50% belum mampu mengendapkan semua protein yang memiliki aktifitas kitinase.

Aktifitas spesifik enzim kitinase yang dihasilkan oleh isolat 13.26 di dalam medium kultivasi (0.20 unit/mg protein) ini relatif lebih tinggi dibandingkan aktifitas spesifik enzim serupa yang dihasilkan *Pseudomonas aerogonosa* (0.15 unit/mg protein) seperti yang dilaporkan oleh Wang

dan Chang (1997). Namun demikian, teknik pemekatan protein yang diterapkan masih belum efektif dibanding teknik yang dilaporkan oleh peneliti sebelumnya. Wang dan Chang (1997) mampu meningkatkan aktifitas kitinase dan 0.15 unit/mg protein menjadi 0.25 unit/mg protein dengan penambahan amonium sulfat hingga kejenuhan 80%. Sedangkan Ohishi et al., (1996) memanfaatkan teknik ultra filtrasi untuk memekatkan protein (enzim) kitinase.

**Stabilitas Panas**

Enzim kasar tahan panas, F50, diuji stabilitasnya pada suhu 55°C dan 65°C selama beberapa jam. Hasil analisis menunjukkan bahwa setelah pemanasan selama 3 jam pada suhu 55°C, aktifitas enzim masih tersisa lebih dan 80% (Gambar 3). Sebaliknya, hanya dalam tempo satu jam saja, pemanasan pada suhu 65°C telah merusak aktifitas enzim hingga 90% (data tidak disajikan). Implikasi dari hasil eksplorasi ini adalah bahwa isolat 13.26 dapat dijadikan alternatif sumber gen bagi enzim kitinase tahan panas. Di lain pihak, masih diperlukan upaya lain untuk meningkatkan stabilitas panas enzim kitinase pada suhu lebih dari 55°C.

**SDS-PAGE dan Analisis Zimogram**

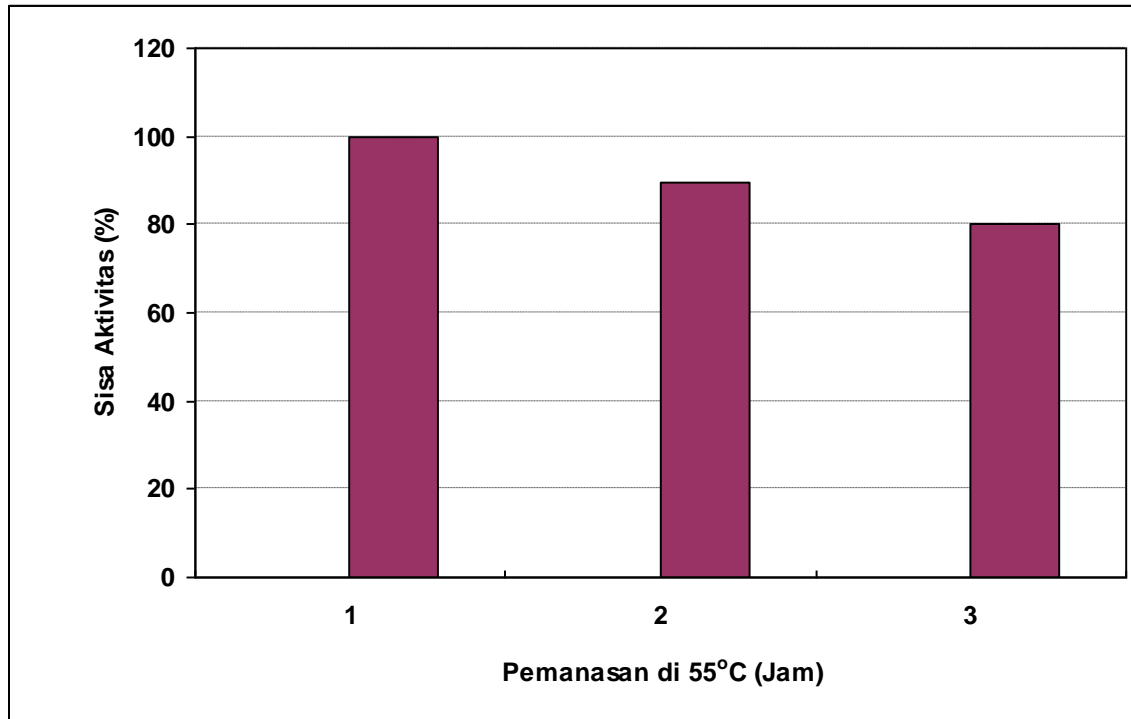
Hasil pemisahan protein dengan SDS-PAGE menunjukkan bahwa berat molekul dari kitinase yang dapat dari broth bervariasi antara kurang 53 kDa hingga sekitar 116 kDa. Dengan kata lain tingkat kemurniannya sangat rendah. Perlakuan panas tidak mempengaruhi protein fraksi F50.

Di lain pihak perbedaan pola pita protein justru terdeteksi pada fraksi F80 tanpa dipanaskan dengan F80 yang dipanaskan. Pita protein berukuran sekitar 116 kDa tampak pada contoh F80 yang dipanaskan (Gambar 4). Gejala ini masih perlu diteliti dan dikonfirmasi lebih lanjut.

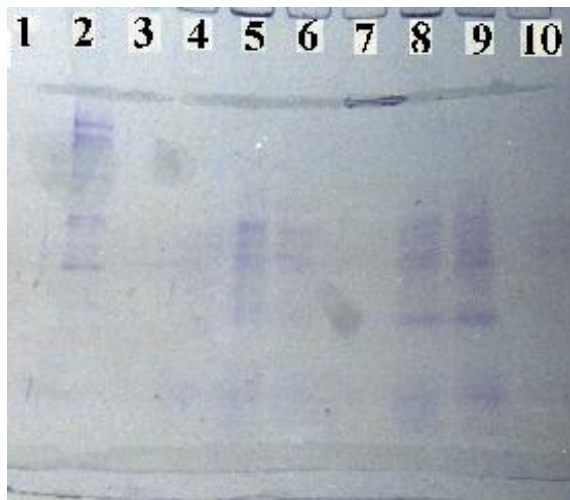
Tabel 3. Aktifitas enzim kitinase yang dihasilkan oleh isolat 13.26 pada tahap pemekatan

Tahap	Protein	Aktifitas		Kelipatan
	mg/ml	unit/ml	unit/mg protein	
Broth	0.02	3.94 x 10 <sup>-3</sup>	0.20	1
Amonium sulfat 50% (F50)	0.12	3.40 x 10 <sup>-2</sup>	0.28	1.4
F50, dipanaskan 55°C, 45 menit <sup>a)</sup>	0.08	2.16 x 10 <sup>-2</sup>	0.27	1.4
Amonium sulfat 80% (F80)	0.16	3.11 x 10 <sup>-2</sup>	0.19	1
F80 dipanaskan 55°C, 45 menit	0.097	2.05 x 10 <sup>-2</sup>	0.21	1

<sup>a)</sup> Disebut sebagai enzim kasar F50



Gambar 3. Stabilitas panas fraksi F 50 tahan panas pada suhu 55°C. Sisa aktifitas kitinase diukur pada suhu 65°C di dalam bufer borat pH 8.



Gambar 4. Hasil pemisahan protein dengan SDS-PAGE

Ukuran protein yang memiliki aktifitas kitinase diukur dengan menggunakan teknik zimogram. Dalam teknik ini

protein dipisahkan dengan cara elektroforesis di dalam gel poliakrilamida yang berisi substrat glikol kitin.

Hasil pemisahan menunjukkan bahwa pewarnaan dengan comassie blue tidak memberikan pita protein yang cukup jelas, meskipun total protein yang dimasukkan di dalam sumur cukup tinggi (lebih dari 0.2 µg). Hal ini diduga akibat adanya glikol kitin di dalam gel yang menghalangi pewarnaan protein oleh Comassie Blue.

Di lain pihak, aktifitas protein dapat dikembalikan di dalam bufer renaturasi yang mengandung merkaptoetanol 5 mM maupun 50 mM, yang ditunjukkan oleh munculnya daerah bening (pita). Aktifitas total protein yang dimasukkan ke dalam setiap sumur gel tampaknya ikut menentukan ada tidaknya pita protein aktif. Pita protein tidak terdeteksi di dalam broth. Hasil evaluasi menunjukkan bahwa aktifitas protein di dalam gel dapat terdeteksi apabila protein mempunyai aktifitas total minimal sebesar 10 unit (Tabel 4). Hasil evaluasi lebih lanjut menunjukkan bahwa perubahan glikol kitin dari 0.1% menjadi 0.05% di dalam gel tidak mempengaruhi pemisahan pita protein (Gambar tidak disajikan).

Berat molekul protein dengan aktifitas kitinase ditentukan dari berbagai contoh (Gambar 5). Berdasarkan

data tersebut, diduga enzim kitinase memiliki berat molekul sekitar 180 kDa. Berat molekul enzim kitinase bervariasi tergantung pada sumbernya. Ueda dan Arai (1992) melaporkan bahwa *Aeromonas* sp menghasilkan enzim kitinase dengan berat molekul antara 112-115 kDa, sedangkan Ueda et al., (1995) menyatakan bahwa mikroorganisme serupa mampu menghasilkan enzim kitinase yang berat molekulnya berukuran antara 89 hingga 115 kDa.

Berat molekul enzim kitinase diduga mencapai lebih dan 180 kDa.

**UCAPAN TERIMA KASIH**

Penelitian ini merupakan bagian dari kerjasama antara PAU Bioteknologi IPB dengan Bioproduct Research Center Yonsei University, Seoul, Korea.

Tabel 4. Pemisahan pita protein di dalam gel poliakrilamida yang diwarnai dengan comassie blue dan zymogram

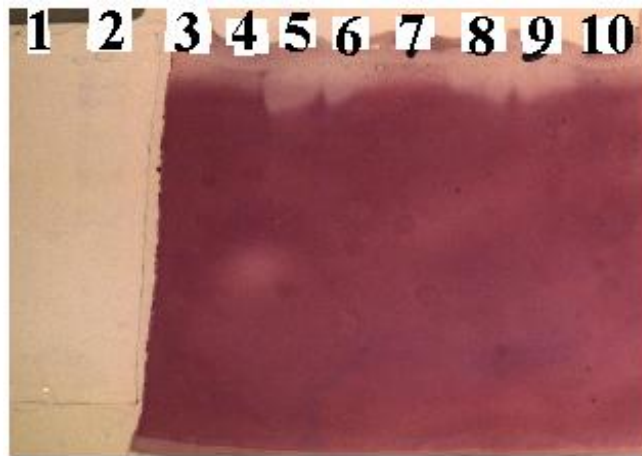
Contoh	Protein total (µg)	Aktifitas total (unit)	Gel I		Gel II	
			CB	Zimogram 1	CB	Zimogram 1
Broth	0.40	8 x 10 <sup>-5</sup>	tidakjelas	-	tidakjelas	-
F50	2.40	6.72 x 10 <sup>-4</sup>	tidakjelas	+	tidakjelas	+
F50 , dipanaskan	1.50	4.05 x 10 <sup>-4</sup>	tidakjelas	+	tidakjelas	+

Keterangan:

CB : Gel diwarnai dengan Comassie Blue

Zimogram 1 : Renaturasi dalam bufer renaturasi berisi merkaptotanol 5 mM

Zimogram 2 : Renaturasi dalam bufer renaturasi berisi merkaptotanol 50 mM



Gambar 5. Zimogram enzim khitinase yang dihasilkan oleh Isolat 13.26.

**KESIMPULAN**

Lima isolat bakteri pendegradasi khitin berhasil diisolasi daerah Menado, satu diantaranya (Isolat 13.26) dikulturkan di dalam medium cair untuk menghasilkan enzim kitinase.

Enzim kitinase yang dihasilkan oleh isolat 13.26 sangat aktif pada suhu 65°C, pH 8 di dalam bufer fosfat 50 mM, meskipun demikian stabilitasnya justru terjadi pada suhu 55°C. Inkubasi enzim selama 3 jam pada suhu tersebut masih menyisakan aktifitas lebih dan 80%.

Ucapan terima kasih juga disampaikan kepada Ir. Ika Malikha dan Sdr. Eni atas bantuan teknis dalam pelaksanaan penelitian.

**DAFTAR PUSTAKA**

Arnold, L. D., and NA. Solomon. 1986. Manual of industrial microbiology and biotechnology. American Society for Microbiology.

- Bradford, M.M., 1976.** A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248-254.
- David, B. and Eveleigh, D.E. 1984.** Chitosanase: The occurrence, production and immobilization. In Zikakis JP editor. *Chitin, chitosan and related enzymes.* Academic Press. Orlando. P. 161-179.
- Hiraga, K., L. Shou, M. Kita S. Takahashi, M. Shimada, R. Sato and K. Oda. 1997.** Isolation and characterization of chitinase from a fiake-chitin degrading marine bacterium, *Aeromonas hydrophila* H-2330. *Biosci. Biotech. Biochem.* 6 1(1): 174-176.
- Imoto, 1. and Yagashita, K. 1971.** A simple activity measurement of lysozyme. *Agric. Biol. Chem.*, 35:1154-1156.
- Laemli, U.K. 1971.** Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.
- Morimoto, K., S. Karita, T. Kimura, K. Sakka and K. Ohmiya. 1997.** Cloning, sequencing and expression of the gene encoding *C. paraputrificum* chitinase ChiB and analysis of the functions of novel cadherin-like domains and a chitin-binding domain. *Journal of Bacteriology*, 7306-7314.
- Muzzarelli and Ricardo, A.A. 1996.** Chitosan based dietary foods. *Carbohydrate polymers*, 29: 309-316.
- Natsir, H., D. Tjandra, Y. Rukayadi, M.T. Suhartono, J.K. Hwang and P.R. Pyun. 2000.** Characterization and purification of the chitinase enzymes from the acidophilic bacteria of Kamojang Crater Indonesia. *Prosiding Seminar Nasional Rekayasa Kimia dan Proses, Kimpunan Mahasiswa Teknik Kimia UNDIP Semarang.*
- Ohishi, K., M. Yamagishi, T. Ohta, M. Suzuki, H. Izumida, H. Sano, M. Nishijima and T. Miwa. 1996.** Purification and properties of two chitinases from *Vibrio alginolyticus* H-8. *Journal of Fermentation and Bioengineering* 82(6):598-600.
- Rahayu, S., F. Tanuwidjaja, P. Lestari, I. Malikha, Y. Rukayadi, A. Suwanto, M.T. Suhartono, J.K. Hwang and YR. Pyun. 2000.** Biochemical characterization of the thermostable chitinase enzymes from the Indonesian thermophilles. *Prosiding Seminar Nasional Rekayasa Kimia dan Proses, Himpunan Mahasiswa Teknik Kimia UNDIP Semarang.*
- Trudel, J. and Asselin. 1989.** Detection of chitinase activity after polyacrilamide gel electrophoresis. *Analytical Biochemistry.* 178:302-306.
- Ueda, M. and M. Arai. 1992.** Purification and some properties of chitinases from *Aeromonas* sp. No. 10S-24. *Biosci. Biotech and Biochem.* 56(3):460-464.
- Ueda, M., A. Fujiwara, T. Kawaguchi and M. Arai. 1995.** Purification and some properties of six chitinases from *Aeromonas* sp No. 10S-24. *Biosci. Biotech. Biochem.* 59(11):21262-2164.
- Wang, S.L. and W.T. Chang. 1997.** Purification and characterization of two bifunctional chitinases/lysozyme extracellularly produced by *Pseudomonas aeruginosa* K-187 in a shrimp and crab shell medium. *Appl. Environ. Microbial* 63(2):380-386.