

## REVIEW

## CHITINASE AND CHITINOLYTIC MICROORGANISM : ISOLATION, CHARACTERIZATION AND POTENTIAL

*Kitinase dan Mikroorganisme Kitinolitik : Isolasi, Karakterisasi dan Manfaatnya*Nuniek Herdyastuti<sup>1\*</sup>, Tri Joko Raharjo<sup>2</sup>, Mudasir<sup>2</sup>, and Sabirin Matsjeh<sup>2</sup><sup>1</sup>Department of Chemistry, Surabaya State University, Jl. Ketintang Surabaya 60231<sup>2</sup>Department of Chemistry, Gadjah Mada University, Sekip Utara Yogyakarta, 55281

Received May 19, 2008; Accepted March 21, 2009

## ABSTRACT

Chitinase is enzyme that hydrolyzes chitin, a polimer of  $\beta$ -1,4-N-Acetylglucosamine which is the most abundant natural resource after cellulose. Chitinolytic microorganism can be found in environment like soil and water that contain chitin, or in extreme environment which is known as thermophilic microorganism. Chitinolytic microorganism is identified by recognizing the morphological and physiological properties based on Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. The sequence data of the 16S rRNA genes is determined in the GeneBank nucleotide sequence database. Chitinase activity can be qualitatively determined from the clearance zone around the colony formed in agar medium containing colloidal chitin. Chitinase can be utilized as biocontrol agent and derivate chitin as the result of chitinase degradation which can be used in the field of health, food, industry and waste management

**Keywords:** Biocontrol, chitin, chitinase, chitinolytic microorganism

## PENDAHULUAN

Kitinase merupakan glikosil hidrolase yang mengkatalisis degradasi kitin yaitu senyawa polimer dari N-asetilglukosamin yang membentuk ikatan linier  $\beta$ -1,4. Enzim ini ditemukan dalam berbagai organisme, termasuk organisme yang tidak mengandung kitin dan mempunyai peran penting dalam fisiologi dan ekologi. Berdasarkan kesamaan urutan asam amino, kitinase diklasifikasikan dalam famili 18 dan 19 glikosida hidrolase [1]. Kitinase dapat dihasilkan oleh bakteri dan jamur yang diperoleh dari berbagai sumber seperti tanah atau perairan dengan cara menumbuhkan pada media yang mengandung kitin koloidal. Aktivitas kitinase secara kualitatif dapat diuji dengan penentuan zona bening disekitar pertumbuhan koloni pada media agar yang mengandung kitin [2]. Potensi isolat yang menghasilkan kitinase ditentukan berdasarkan perbandingan zona bening terhadap ukuran koloni.

Kitinase banyak dimanfaatkan sebagai agen biokontrol terutama bagi tanaman yang terserang infeksi jamur. Hal ini dikarenakan kitin yang merupakan komponen utama dinding sel jamur dapat didegradasi enzim kitinase menghasilkan produk yang ramah lingkungan dibandingkan penggunaan zat kimia. Dalam dua dekade terakhir banyak dikaji peran enzim kitinase sebagai antifungi. Sebagai contoh *Trichoderma* banyak digunakan sebagai antifungi yang efektif terhadap serangan *Rhizoctonia solani* pada tanaman kapas atau

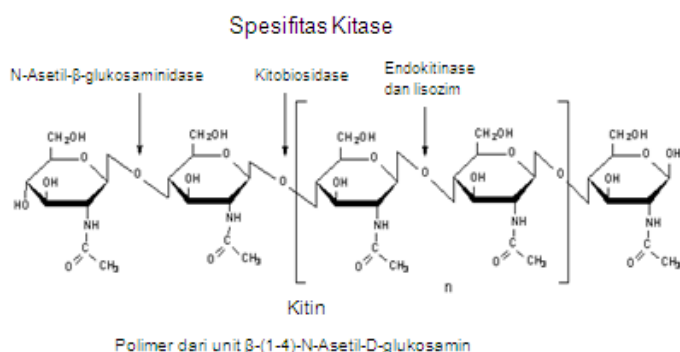
*Fusarium* pada tanaman strawberi, dan tidak toksik terhadap tanaman pada konsentrasi tinggi [3]. *Serratia plymurtica* juga telah dipakai sebagai agen biokontrol terhadap *Plythium ultimum* pada buah ketimun [4], *Bacillus brevis* mengatasi *Fusarium udum* pada tanaman kacang ercis [5]. Selain sebagai agen biokontrol, senyawa turunan kitin yang terbentuk sebagai hasil degradasi kitinase juga banyak dimanfaatkan pada bidang kesehatan, industri, pangan dan lain-lain.

## SENYAWA KITIN

Kitin adalah suatu polisakarida, polimer linier yang tersusun oleh monomernya  $\beta$ -1,4-N-asetilglukosamin. Lingkaran ini membentuk fibril linier seperti pada gambar 1. Kelimpahan kitin di alam menempati urutan terbesar kedua setelah selulosa dan terdistribusi luas di lingkungan biosfer seperti pada kulit *crustaceae* (kepiting, udang dan lobster), ubur-ubur, komponen struktural *eksoskeleton* insekta, dinding sel fungi (22-40%), alga juga dalam *nematoda*, binatang ataupun tumbuhan. Pada binatang, kitin merupakan struktur yang rigid pada eksoskeleton. Hal ini dikarenakan pada rantai polimer N-asetil-glukosamin terdapat ikatan hidrogen antar molekul membentuk mikrofibril menghasilkan struktur yang stabil dan rigid, tidak larut dalam air sehingga dapat mengkristal [6]. Seperti halnya pada fungi, kitin yang ditemukan dalam tanam-

\* Corresponding author.

Email address : nherdyastuti@yahoo.com



**Gambar 1.** Struktur kitin yang terdiri dari monomernya N-asetil-glukosamin dan sisi spesifik pemotongan kitinase

an juga mendukung dinding selnya.

Keberadaan kitin di alam yang sangat melimpah ini dengan cepat terdegradasi, karena adanya beberapa bakteri dan fungi yang mempunyai enzim kitinase yang mampu mendegradasi kitin. Kitin dapat didegradasi dalam dua jalur, pertama adalah degradasi oleh mekanisme kitinolitik yang menghidrolisis ikatan  $\beta$ -1,4-glikosida, atau polimer mengalami deasetilasi pertama yang selanjutnya dihidrolisis oleh kitosanase [7, 8]. Jumlah kitin yang dapat dihasilkan per tahunnya dalam biosfer sangat banyak sekali. Pada tahun 1993 diperkirakan dunia dapat memperoleh kembali kitin dari invertebrata laut sebanyak 37.000 ton dan meningkat menjadi 80.000 ton pada tahun 2000 [9]. Dengan kata lain kitin dapat diproduksi secara murah dan sekaligus membantu menyelesaikan masalah lingkungan serta mempromosikan nilai ekonomis produksi laut.

Pabrik pembekuan udang (*cold storage*) yang mengolah udang untuk ekspor dalam bentuk udang beku *headless* atau *peeled* menghasilkan limbah berupa kulit keras (cangkang) sekitar 50-60% yang dibuang atau hanya digunakan sebagai campuran makanan ternak. Pengolahan limbah untuk mendapatkan kitin dapat dilakukan dengan beberapa cara, pertama secara konvensional, yaitu dengan cara membakar limbah atau mengubur dalam tanah, tetapi cara ini menimbulkan masalah terhadap lingkungan. Akibat pembakaran terjadi pelepasan  $\text{CO}_2$  dan CO ke lingkungan sehingga menambah panas global, sedangkan apabila limbah dikubur di tanah degradasinya sangat lambat dan dapat menghasilkan  $\text{NH}_3$  sebagai salah satu produk akhirnya. Kedua adalah pengolahan secara kimiawi yaitu dengan cara demineralisasi dan deproteinasi melalui penambahan asam atau basa kuat. Ketiga adalah pengolahan dengan metode biokimia untuk deproteinasi dengan penambahan enzim proteolitik atau dengan melibatkan kitinase untuk mendegradasi limbah yang mengandung kitin. Metode ini lebih ekonomis dan ramah terhadap lingkungan [10, 11]. Limbah tersebut

merupakan sumber potensial pembuatan kitin yang secara komersial bisa dimanfaatkan dalam berbagai bidang misalnya biokimia, enzimologi, obat-obatan, pertanian, pangan gizi, mikrobiologi, tekstil, kosmetik dan lain-lain [12].

## MIKROORGANISME KITINOLITIK

### Sumber Mikroorganisme Kitinolitik

Mikroorganisme kitinolitik adalah mikroorganisme yang dapat mendegradasi kitin dengan menggunakan enzim kitinase. Mikroorganisme ini dapat diperoleh dari berbagai sumber seperti *rizosphere*, *phyllosphere*, tanah atau dari lingkungan air seperti laut, danau, kolam atau limbah udang dan sebagainya. Selain lingkungan mesofil, mikroorganisme kitinolitik juga telah berhasil diisolasi dari lingkungan termofilik seperti sumber air panas, daerah geotermal dan lain-lain.

Mikroorganisme penghasil kitinase masih belum banyak diketahui baik tentang jumlah, diversitas maupun fungsi kitinase yang dihasilkan, meskipun kitin merupakan salah satu polimer yang melimpah di alam. Beberapa mikroorganisme kitinolitik dari berbagai sumber telah berhasil diisolasi dan dikarakterisasi. Donderski [13] berhasil mengisolasi bakteri kitinolitik dari danau Jeziorak pada permukaan air dan lapisan bawah sediment diantaranya *Pseudomonas sp*, *Alkaligenes denitrificans*, *Agrobacterium sp*, *Aeromonas hydrophila* yang mendegradasi kitin dan memanfaatkan N-asetilglukosamin sebagai sumber karbon. Berdasarkan analisis *phylogenetic tree* saat ini telah diperoleh beberapa mikroorganisme yang telah diketahui sebagai penghasil kitinase seperti pada Tabel 1. [14]

Selain perairan, tanah adalah sumber nutrient dan mineral bagi mikroorganisme, dimana terdapat hubungan dan interaksi antara mikroorganisme yang sangat kompleks. Diperkirakan 1 gram tanah mengandung  $10^9$  bakteri dengan kemungkinan 4000-7000 spesies yang berbeda [15]. Tanah benar-benar sebagai sumber mikroba dan gen untuk mendegradasi atau mentransformasi bermacam-macam senyawa organik dengan menggunakan enzim yang spesifik untuk melakukan biotransformasi tersebut [16]. Sebagian besar mikroorganisme tanah dan air adalah pendegradasi kitin yang baik dan beberapa mikroorganisme dapat memanfaatkan kitin sebagai sumber karbon dan nitrogen.

### Isolasi Mikroorganisme Kitinolitik

Mikroorganisme penghasil kitinase dapat diperoleh dari sumbernya dengan cara menumbuhkan dalam media yang mengandung kitin. Kitin banyak

**Tabel 1.** Mikroorganisme penghasil kitinase berdasarkan analisis *phylogenetic tree*

Taksonomi	Nama	No.Akses Gene Bank
Eukariot		
Fungi		
Ascomicota		
Eurotiomycetes		
Eurotiales		
Trichocomaceae		
<i>Aspergillus</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i>	AAP23218
Leotiomycetes		
Helotiales		
Sclerotiniaceae		
<i>Botryotinia</i>	<i>Botryotinia fuckeliana</i>	AAM94807
Dothideomycetes		
Pleosporales		
Leptosphaeriaceae		
<i>Coniothyrium</i>	<i>Coniothyrium minitans</i>	AAG00504
Sordariomycetes		
Sordiales		
Sordariaceae		
<i>Neurospora</i>	<i>Neurospora crassa</i>	XP_957924
mitosporic Ascomicota		
<i>Aphanocladium</i>	<i>Aphanocladium album</i>	P32470
Clavicipitacea		
<i>Lecanicillium</i>	<i>Lecanicillium psalliotae</i>	EF203917
<i>Beauveria</i>	<i>Beauveria bassiana</i>	AAN41260
<i>Paecilomyces</i>	<i>Paecilomyces fumosoroseus</i>	AAX19146
<i>Torribiella</i>	<i>Paecilomyces farinosus</i>	ABD64606
<i>Nomuraea</i>	<i>Paecilomyces farinosus</i>	AAV98692
<i>Metarhizium</i>	<i>Torribiella confragosa</i>	AAP04616
<i>Metarhizium</i>	<i>Nomuraea rileyi</i>	AAY32603
<i>Metarhizium</i>	<i>Metarhizium anisopliae</i>	CAB44709
mitosporic Hypocreales		
<i>Verticillium</i>	<i>Metarhizium flavoviride</i>	AAP45631
<i>Trichoderma</i>	<i>Verticillium fungicola</i>	AAC60385
	<i>Trichoderma hamatum</i>	ABD42921
	<i>Trichoderma</i>	AAF19623
	<i>longibrachiatum</i>	AAW31950
	<i>Trichoderma asperellum</i>	AAF19618
	<i>Trichoderma aureoviride</i>	
	<i>Trichoderma viride</i>	

Sumber : Gan Zhongwei, et al, 2007 [14]

digunakan sebagai substrat pada media fermentasi untuk uji enzim *endo tipe-kitinase*. Aktivitas kitinolitik diinduksi dalam media pertumbuhan strain dengan adanya kitin sebagai sumber karbon [17]. Gohel pada tahun 2006 [18] melakukan variasi 19 komponen medium screening yang mengandung kitin dengan menggunakan isolat *Pantoea dispersa* yang diperoleh

dari laut Bhavnagar, India untuk memproduksi kitinase secara optimal.

*Aeromonas sp* dan *Aeromonas schubertii* adalah bakteri yang potensial mempunyai aktivitas kitinolitik yang ditumbuhkan dalam kultur yang mengandung 0,2% koloidal kitin dari kepiting sebagai sumber

karbon. *Aeromonas* adalah bakteri kitinolitik baru dari kolam udang yang berpotensi endokitinase [19, 20].

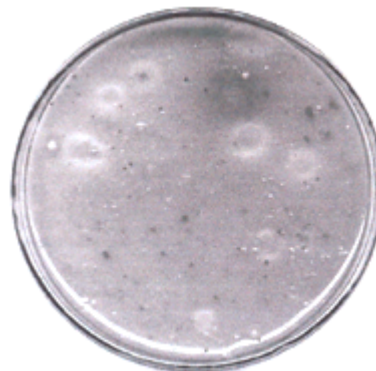
Suspensi koloidal kitin digunakan dalam media agar nutrisi untuk isolasi bakteri. Koloidal kitin adalah kitin yang dilarutkan dalam asam klorida pekat seperti telah dipelajari oleh Hsu dan Lockwood (1975) sebagai media selektif untuk mendapatkan *Actinomycetes* dari air dan tanah [21]. Mikroorganisme kitinolitik dapat diseleksi keberadaannya dengan mendegradasi media agar kitin yang dapat dideteksi dengan adanya zona bening disekitar koloni bakteri seperti terlihat pada gambar 2 [22].

Metode konvensional yang menggunakan koloidal kitin sebagai substrat ditemukan sangat efektif untuk menentukan aktivitas kitinase. *Enterobacter sp NRG4* menunjukkan aktivitas tinggi terhadap kitin *swollen*, kitin koloidal, kitin yang diregenerasi dan glikol kitin dibandingkan dengan serbuk kitin. *Enterobacter sp G-1* juga dilaporkan menskresi endokitinase yang ditunjukkan dengan aktivitas tinggi terhadap kitin koloidal dan etilen glikol kitin daripada serbuk kitin atau yang dilarutkan dalam *carboximetil cellulose* (CMC). Kitinase yang berasal dari *A.fumigatus* NCPF 2140 diinduksi dalam medium yang mengandung kitin koloidal, tetapi tidak dapat terdeteksi pada serbuk kitin. Studer [23] juga menemukan pada *Aphamocladium album* dapat memproduksi 9 jenis kitinase saat ditumbuhkan dalam kitin koloidal, tetapi dalam serbuk kitin hanya menghasilkan 3 jenis kitinase. Diduga karena konformasi kitin serta *cross-linking* pada polisakarida berbeda dengan kitin koloidal dalam medium pertumbuhannya.

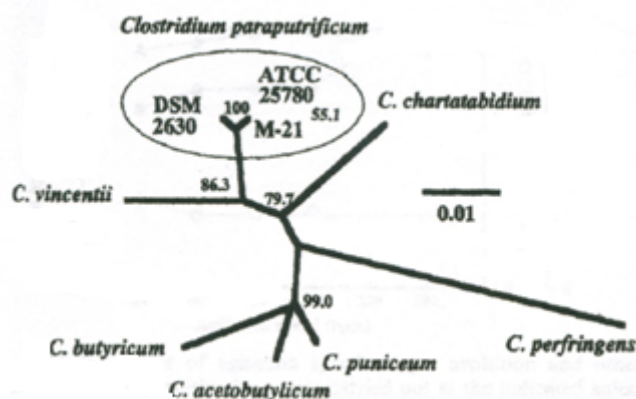
### Identifikasi Mikroorganisme Kitinolitik

Penentuan spesies mikroorganisme dapat dilakukan berdasarkan sistem klasifikasi fenetik klasik atau secara molekular dengan sistem filogenetik. Sistem fenetik klasik didasarkan pada kesamaan karakteristik fenotipik yang meliputi karakteristik morfologi (bentuk, ukuran koloni dan reaksi pewarnaan), karakteristik fisiologi (kebutuhan CO<sub>2</sub>, O<sub>2</sub>, vitamin, tes biokimia), karakteristik ekologi dan serologi. Hasilnya kemudian dibandingkan dengan *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* untuk menentukan spesies mikroorganisme. Adapun sistem filogenetik didasarkan terjadinya evolusi pada keturunan melalui gen 16s-rRNA.

Mikroba dengan strain M-21 yang diisolasi dari tanah setelah diuji morfologi dan fisiologi ternyata mempunyai karakteristik gram positif, mempunyai flagela dan membentuk spora. Setelah dibandingkan dengan *Bergey's manual*, isolat diidentifikasi sebagai *Clostridium paraputrificum*. Hasil *sequence* 16s-rRNA sebanyak 1435 bp yang dianalisis dengan program



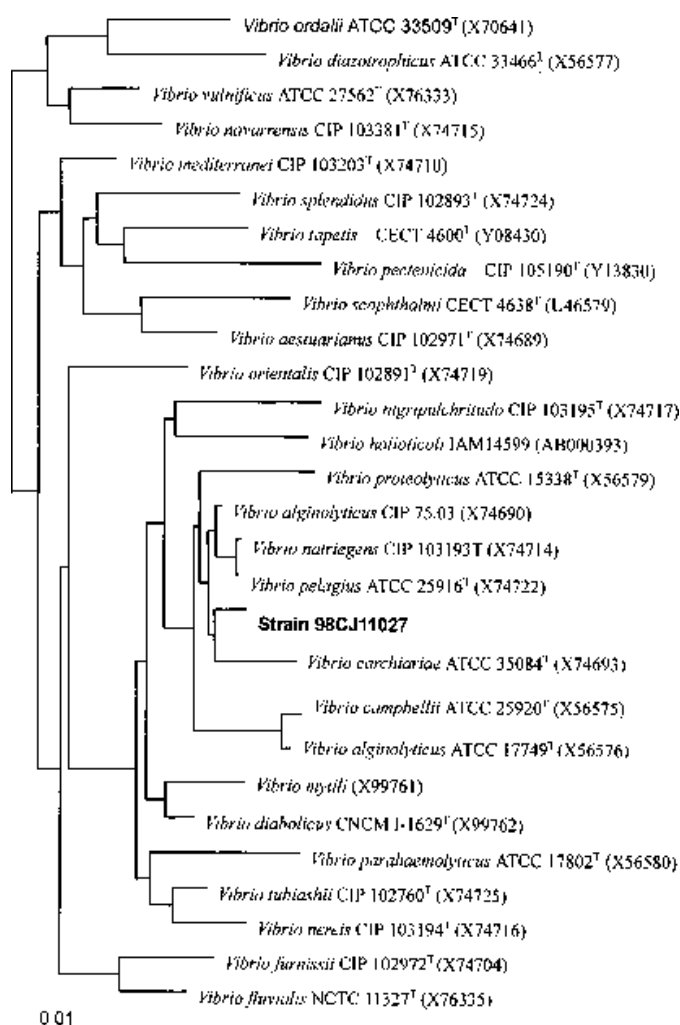
**Gambar 2.** Zona bening yang menunjukkan adanya bakteri kitinolitik yang diisolasi dari Danau Jeziorak dan ditumbuhkan pada media yang mengandung substrat koloidal kitin (Donderski, W., 2003) [13]



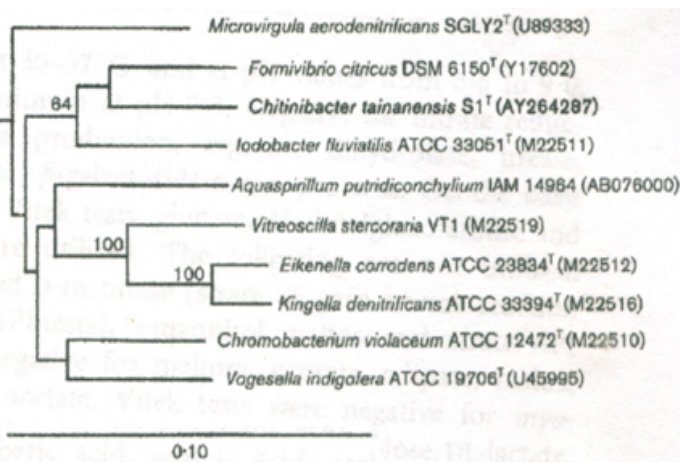
**Gambar 3.** Pohon Filogenetik *C.paraputrificum* strain M-21 berdasarkan *sequence* r-DNA yang diperoleh dari Gen Bank/EMBL/DBJ mempunyai hubungan kekerabatan dengan *C.paraputrificum* ATCC 25780, X75907 dan DSM 2630, *C.butyricum* DSM 2478, *C.vncentii* X97432, *C.chartatabidium* DSM 5482, X71850 (Evvyernie Dwierra, 2000) [24]

BLAST dan PHYLIP menunjukkan bahwa strain M-21 mempunyai hubungan kekerabatan dengan ATCC 25780 dan DSM 2630 *Clostridium paraputrificum* seperti pada gambar 3, sehingga disimpulkan bahwa strain M-21 merupakan *C.paraputrificum*. Mikroba ini telah dilaporkan sebagai mikroba pertama yang dapat memanfaatkan kitin menghasilkan N-asetil-glukosamin sebagai sumber karbon penghasil gas Hidrogen [24].

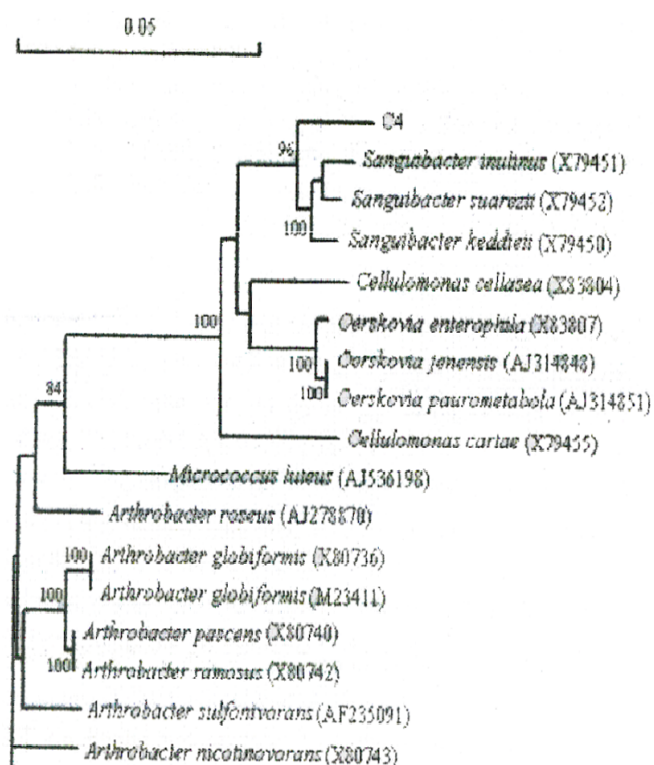
Shin Hye (2000) berhasil mengisolasi bakteri kitinolitik dari perairan laut di Korea dengan strain 98CJ11027 yang diidentifikasi morfologi dan fisiologi menurut *Bergey's*. Hasil *sequence* 16s-rDNA dibandingkan dalam ribosomal *Database project* menggunakan *Sequence Matc* dan di BLAST pada *Gen Bank*. Hubungan pohon Filogenetik diestimasi dengan PHYLIP versi 3,57c strain 98CJ11027 mempunyai kemiripan dengan *Vibrio alginolyticus* CIP 75.03 (99,55%); *V.pelaging* ATCC (99,24%); *V.natrigens*



**Gambar 4.** Pohon filogenetik yang didasarkan pada urutan 16s-rDNA menunjukkan posisi strain 98CJ11027 pada genus *Vibrio* (Park, Lee, and Lee, 2000)



**Gambar 5.** Pohon filogenetik yang didasarkan pada urutan gen 16s-rRNA menunjukkan isolat baru mempunyai kedekatan dengan kelas *Betaproteobacter* (Chern Lih-Ling, 2004)



**Gambar 6.** Pohon filogenetik yang didasarkan 1385 nukleotida pada urutan 16s-RNA menunjukkan posisi strain C4 pada genus *Sanguibacter* (Yong Tao, 2005)

*CIP 103193T* (99,24%) ; *V.carchariae* ATCC 35084T (98,86%) seperti pada gambar 4. Sehingga disimpulkan bahwa strain 98CJ11027 termasuk genus *Vibrio* [25].

Penelitian lain memperoleh 5 strain yang mempunyai aktivitas kitinolitik dan diisolasi dari tanah di Taiwan selatan. Berdasarkan komposisi asam lemak dan karakteristik Biokimia serta analisis gen 16s-rRNA menunjukkan bahwa isolat termasuk klas *Betaproteobacteria* yang merupakan keturunan *Formivibrio citricus* DSM6150 dan *Iodobacter fluviatilis*. Berdasarkan pohon Filogenetik yang diperoleh seperti pada gambar 5 dan hasil fenotipiknya disimpulkan bahwa isolat merupakan genus baru yang mendegradasi kitin, *Chitinobacter* dan diusulkan sebagai *Chitinobactertainanensis* dengan strain BCRC17254<sup>T</sup> = DSM15459<sup>T</sup> [25].

Bakterium C4 yang dapat memproduksi kitinase telah diisolasi dari tanah dan diidentifikasi secara molekular. Menurut perbandingan *sequence* yang didasarkan pada gen 16s-rRNA dan dibandingkan dengan 18 *sequence* yang lain, strain C4 mempunyai hubungan kedekatan dengan genus *Sanguibacter*. Hal ini sesuai dengan uji Taxonomi yang dibandingkan dengan Bergey's *Manual of Systematic Bacteriology*. Pada gambar 6 tampak bahwa *Sanguibacter keddiei* mempunyai kedekatan 96,2% dengan strain C4 [27].

## ENZIM KITINASE

Enzim kitinase (EC.3.2.1.14) adalah enzim yang mampu menghidrolisis kitin menjadi monomernya N-asetil-glukosamin. Kitinase dapat dihasilkan oleh beberapa mikroorganisme dan mempunyai peran penting pada fisiologi dan ekologi. Semua enzim yang dapat mendegradasi kitin disebut sebagai kitinase total atau kitinase non spesifik. Enzim kitinase dibagi menjadi tiga, yaitu : (i) *Eksokitinase* atau *kitobiosidase*, mengkatalisis pembebasan N-asetil-glukosamin atau unit dimmer kitobiosa ( $\beta$ -1,4-N-asetil-glukosamin); (ii) *Endokitinase* (EC.3.2.1.14) enzim yang mendegradasi kitin secara acak dari dalam menghasilkan oligomer pendek N-asetil-glukosamin; (iii) *N-asetil-glukosaminidase* (EC.3.2.1.30) bekerja pada pemutusan diasetilkitobiosa menghasilkan N-asetil-glukosamin [28]. Kitinase mempunyai famili 18 dan 19 glikosil hidrolase. Famili 18 mengandung enzim dari jenis organisme prokariotik dan eukariotik, sedangkan famili 19 hanya ditemukan pada tumbuhan tingkat tinggi dan bakteri gram positif, *Streptomyces* dan kedua famili mengandung *endokitinase* [29]. Baru-baru ini ditemukan famili 19 dari nematode *Caenorhabditis elegans*.

### Struktur Enzim Kitinase

Struktur kitinase mempunyai lebih dari satu domain sehingga strukturnya dikenal sebagai multi-domain, yaitu domain katalitik, domain pengikatan kitin dan domain fibronectin III. Seperti dijelaskan di depan bahwa *S.marcescens* adalah mikroba kitinase yang telah banyak dipelajari baik struktur maupun fungsinya. *S.marcescens* dapat menghasilkan 3 gen yang mengkode kitinase disebut sebagai gen *ChiA* (kitinase A), *ChiB* (kitinase B) dan *ChiC* (kitinase C) dan baru-baru ini telah ditentukan struktur tiga dimensi dari ketiga gen tersebut. Gen *ChiA*, *ChiB* dan *ChiC* yang masing-masing mengkode 563, 479 dan 325 residu asam amino [29]. Gen *ChiA Aeromonas caviae* sepanjang 4,5 kb yang diklon pada strain XLI-Blue menghasilkan *complete sequence* dengan *open reading frame* (ORF) sepanjang 2595 nukleotida yang mengkode 865 asam amino mempunyai kesamaan urutan dengan *S.marcescens* [30]. *A.caviae* yang diisolasi dari tanah di pulau Bangka juga telah berhasil dikloning dan *sequence* nukleotida menunjukkan bahwa 2748 bp tersebut tidak mempunyai *promotor*, mempunyai urutan yang sama dengan gen *ChiA A.caviae* [31].

Kazushi Suzuki (2002) mencoba untuk mempelajari peran masing-masing gen *ChiA*, *ChiB* dan *ChiC S.marcescens 2170* terhadap degradasi kitin. Gen *ChiA* dan *ChiB* tersebut diklon pada *E.coli DH5 $\alpha$*  sedangkan gen *ChiC* diklon pada *E.coli JM109*. Masing-masing hasil kloning dimurnikan dengan gel filtrasi dan ditentukan berat molekulnya, sifat enzim serta sinergisme terhadap degradasi kitin. Hasil yang

diperoleh menunjukkan sinergisme yang jelas pada saat menghidrolisis kitin terjadi kombinasi antara *ChiA* dan *ChiB* atau *ChiC* dan disebutkan bahwa sisi serangan substrat *ChiA* diduga berbeda dari *ChiB* dan *ChiC* [32]. Gen *ChiA*, *ChiB* dan *ChiC* juga ditemukan pada *Pseudomonas aeruginosa* yang mempunyai aktivitas kitinase diklon pada *E.coli* menghasilkan *sequence* dimana *ChiA* mempunyai urutan yang mirip dengan *Vibrio harveyi*, urutan *ChiB* mirip dengan *B.circulans* dan urutan *ChiC* mirip dengan urutan *S.marcescens* [33]. Fragmen 17 kb DNA *Arthrobacter sp* strain TAD20 yang mengandung *ChiA* dan *ChiB* yang telah diklon di *E.coli XL1-Blue*. Analisis DNA *sequencing* ORF mengkode *ChiA* 881 asam amino dan *ChiB* 578 asam amino. Domain katalitik *ChiA* mempunyai kemiripan 55% dengan *Chitodextrinase Vibrio furnisii*. Adapun domain katalitik *ChiB* mempunyai kemiripan 33% dengan kitinase *B.circullans*, domain kitin-binding *ChiA* homolog dengan domain *ChiB* [34]. Tao menggunakan primer yang spesifik untuk mendeteksi keberadaan gen *ChiA* dari *Sanguibacter sp*. Hasilnya di-BLAST dengan database *Gen Bank* dan menunjukkan kemiripan (88,9 - 99,6%) dengan *ChiA* dari *Serratia* [35].

Selain *Serratia*, bakteri genus *Bacillus* juga banyak dipelajari sebagai penghasil kitinase. Matsumoto telah melakukan analisis struktur tiga dimensi domain katalitik *ChiA B.circulans WL-12* yang mempunyai sedikitnya 6 jenis kitinase. Kitinase A pada bakteri ini mempunyai kemampuan yang kuat dalam mendegradasi kitin dibandingkan lima kitinase yang lainnya. Berdasarkan homologi urutan asam amino pada domain katalitik, *ChiA* adalah kelompok famili 18 glikosil hidrolase [36]. Rekayasa genetika terhadap gen-gen kitinase telah banyak dilakukan dengan menggunakan *E.coli* sebagai inangnya. *B.circulans 4.1* yang telah diklon pada *E.coli* menghasilkan *sequence* gen 2,6 kb diperoleh ORF 1794 bp yang mengkode 598 residu asam amino terdiri dari domain katalitik dan domain binding-protein yang terdiri dari 57 dan 40 residu asam amino [37]. Demikian pula gen yang mengkode kitinase pada *Bacillus sp DAU 101* telah diklon pada *E.coli* dengan menggunakan *plasmid pUC18* dan *pGEX-GP-1* sebagai *vector*. Diperoleh urutan nukleotida yang mengandung 1781 bp yang mengkode 597 asam amino. Kitinase tersebut mengandung 3 domain yaitu domain katalitik, domain kitin-binding dan domain fibronectin [38].

### Isolasi dan Karakterisasi Kitinase

Kitinase dapat diisolasi dari mikroorganisme dengan cara menumbuhkan pada media yang mengandung kitin sebagai substrat dan diinkubasi pada waktu dan suhu tertentu. *Aeromonas schubertii* yang mempunyai aktivitas kitinolitik ditemukan oleh Guo pada tahun 2004 dari tanah bagian selatan

Taiwan. Setelah melalui pengendapan ammonium sulfat dan dimurnikan dengan gel filtrasi mikroorganisme ini mempunyai aktivitas spesifik 0,85 U/mg. Kitinase dari *Aeromonas schubertii* bersifat asam dengan pH 4,8 dan harga  $K_M$  2,9 mM, memberikan pita tunggal dan diperkirakan mempunyai berat molekul 75 kDa pada SDS-PAGE.

Genus *Trichoderma* diketahui mampu memproduksi kompleks enzim multikitinolitik. *Trichoderma viride* TNJ 63 berhasil diisolasi dari tanah perkebunan jeruk dan coklat di daerah Riau dan hasil deteksi menunjukkan adanya tiga tipe kitinase. Endokitinase berhasil dipisahkan dari *N-asetil- $\beta$ -glukosaminidase* dan *1,4- $\beta$ -kitobiosidase* melalui dialisis dan gel filtrasi setelah dipekatkan dengan polietilen glikol dan mempunyai pH dan suhu optimum berturut-turut 5,5 dan 30°C [39]. *Usukizyme* adalah enzim komersial dari *T. viride* yang telah dimurnikan dengan DEAE Sepharose CL-6B, Q-Sepharose PF dan kromatografi kolom Sephacryl S-100 HR dengan suhu dan pH optimum 50-55 °C dan 3,5 serta mempunyai stabilitas pH pada kisaran 3,5 - 6,0 pada suhu 45 °C. Pemurnian enzim tersebut dengan CM-Sephadex-25 dan analisis HPLC enzim untuk berat molekul 28 kDa dapat digunakan untuk mempelajari deasetilasi parsial pada substrat kitin [40].

*Serratia marcescens* merupakan salah satu bakteri yang paling banyak dipelajari karena sangat efektif mendegradasi kitin. Sedikitnya ada empat jenis enzim dan satu protein pengikat kitin yang terlibat. *S. marcescens* telah dipelajari secara enzimologi dan struktural serta aplikasinya sebagai biokontrol fungi dan insekta. *S. marcescens* NK1 yang diisolasi dari tanah telah dipelajari aktivitas kitinolitiknya berdasarkan pelepasan gula reduksi dengan menggunakan asam dinitrosalisilat (DNS). Setelah melalui pemurnian *Sephadex G-100*, bakteri ini menunjukkan aktivitas spesifik 1,07 U/mg stabilitas pada range pH dan suhu yang lebar dengan suhu dan pH optimum masing-masing 47 °C dan 6,2. Enzim dengan berat molekul 57 kDa mempunyai pola yang mirip dengan *S. marcescens* QMB1466 yang diperoleh oleh Monreal Reese (1969) atau *S. marcescens* 2170 yang diperoleh Watanabe (1997) [41].

Kitinase yang diperoleh dari mikroorganisme perairan telah berhasil diisolasi dan dikarakterisasi. Sumber kitinase dari perairan dapat diperoleh dari danau, laut, dari kolam atau limbah udang. Seperti yang kita ketahui bahwa pada lingkungan biosfer banyak didapatkan kitin, sehingga kemungkinan akan didapatkan mikroorganisme penghasil kitinase. Bakteri strain 98CJ11027 telah diisolasi oleh Park pada tahun 2000 dari pantai di pulau Cheju, Korea dan diidentifikasi merupakan anggota dari genus *Vibrio*. Bakteri ini menghasilkan kitinase tipe *kitobiosidase* yang mengkatalisis sintesis tetraasetilkitotetraosa dan

diperkirakan mempunyai berat molekul 98 kDa dengan kondisi optimal pH 6,0 dan suhu 45 °C. Enzim ini diinhibisi oleh adanya ion  $Fe^{2+}$  dan  $Cu^{2+}$ .

Limbah pengolahan pabrik udang juga merupakan sumber kitinase karena banyak didapatkan kitin sebagai substratnya. Limbah udang mempunyai kandungan jumlah jamur lebih sedikit daripada bakteri, tetapi jamur dapat menghasilkan kitinase lebih banyak daripada bakteri [42]. *Sphingomonas sp* CJ-5 telah diisolasi dari kulit udang pabrik pengolahan udang di Cina dan merupakan kitinolitik baru karena belum pernah dilaporkan. Dengan pemurnian gel filtrasi G-200 dan DEAE Sepharose diperoleh berat molekul 230 kDa, suhu optimum 36 °C, pH optimum 7 dan berpotensi pada aplikasi industri serta pengolahan limbah [43].

*Enterobacter sp.* NRG4 yang diproduksi dalam media mengandung *swollen* kitin dan dimurnikan dengan kromatografi penukar ion DEAE Sephadex mempunyai aktivitas spesifik 4090,9 U/mg. Pemurnian enzim dengan kromatografi gel filtrasi *Sephadex G-200* diperoleh aktivitas spesifik 7783,3 U/mg. Berat molekul enzim diperkirakan 60 kDa, mempunyai pH optimum 5,5 dan suhu optimum 45 °C, stabil pada suhu 40 °C selama 3 jam. Enzim mempunyai harga  $K_M$  1,43 mg/mL,  $V_{maks}$  83,33  $\mu M/\mu g$  jam dan diaktifkan oleh ion logam  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$  dan  $K^+$  tetapi dihambat oleh ion  $Cu^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Ag^+$  dan  $Hg^+$  [44].

Isolat *Pseudomonas aeruginosa* strain 385 diperoleh dari kultur mikroba yang diambil dari air liur pasien yang menderita "cystic fibrosis" menghasilkan enzim ekstraseluler yang mempunyai aktivitas kitinase dan lysozym. Enzim diidentifikasi dengan *Western blotting* menggunakan antibodi yang diproduksi pada kelinci dengan gen kitinase sebagai antigennya. Pemurnian enzim dengan SDS-PAGE diperoleh berat molekul 58 kDa, pI 5,2, pH optimum 6,75, mempunyai kestabilan pada pH 5-10 selama 3 jam dan suhu 50 °C selama 30 menit [45].

Aktivitas kitinolitik tidak hanya dihasilkan oleh mikroba mesofilik tetapi juga dihasilkan oleh mikroba termofilik. *Bacillus sp* BG-11 telah diisolasi dari lingkungan alkali termal dan telah dikarakterisasi mempunyai berat molekul 41 kDa, pH 8,5 dan suhu 50 °C pada kondisi optimum. Kitinase tersebut kemudian diimobilisasi dengan menggunakan *bead* kitosan. Karakterisasi enzim imobil tersebut adalah stabil pada pH 5-10, suhu 45-55 °C dan mempunyai stabilitas termal pada suhu 70, 80 dan 90 °C selama 90, 70 dan 60 menit serta aktivitasnya bertambah 35% dibandingkan dengan enzim bebas [46]. *Bacillus sp* 13.26 yang diperoleh dari sumber air panas di Tomposo Sulawesi Utara telah dikarakterisasi secara morfologi maupun gen 16s-rRNA mempunyai aktivitas kitinase dalam media yang mengandung kitin. Bakteri termofilik dapat memproduksi kitinase ekstraseluler

setelah inkubasi selama 72 jam. Kitinase yang telah dimurnikan dengan fraksinasi ammonium sulfat, dialisis dan kromatografi *DEAE Sepahrose CL-6B* mempunyai aktivitas spesifik 268 U/mg. Karakterisasi enzim menunjukkan suhu dan pH optimum 60°C dan 7-8, berat molekul 60 kDa serta stabilitas termal 5 jam pada suhu 70 °C dan 1 jam pada suhu 80 °C yang dikonfirmasi dengan analisis *zymogram*. Enzim diaktivasi oleh  $Mg^{2+}$  dan diinhibisi oleh ion  $Ca^{2+}$ , sangat sensitif dengan adanya ion  $Mn^{2+}$  dan  $Co^{2+}$  [47]. Bakteri termofilik strain A-471 berdasarkan analisis molekular merupakan genus *Ralstonia* telah diisolasi dari limbah yang mengandung kitin. Karakterisasi kitinase yang dihasilkan diperkirakan mempunyai berat molekul 70 kDa, titik isoelektrik 4,7 dengan suhu dan pH optimum 70 °C dan 5. Mempunyai urutan N-terminal asam amino ADPYLKVAYYP, 66% homolog dengan *ChiA B.circulans WL-12* [48].

#### PENENTUAN AKTIVITAS ENZIM KITINASE

Aktivitas kitinase merupakan ukuran jumlah produk yang dihasilkan dari suatu pemecahan substrat kitin. Satu unit aktivitas kitinase didefinisikan sebagai pelepasan 1  $\mu$ mol gula reduksi (N-asetil-glukosamin) per menit. Beberapa metode penentuan aktivitas kitinase yang sering dipergunakan adalah :

##### **Penentuan secara kolorimetri**

Penentuan secara kolorimetri didasarkan pada pelepasan produk hasil degradasi koloidal kitin berupa N-asetil-D-glukosamin ke dalam supernatan dengan menggunakan metode Reissig. Produk tersebut dikomplekskan dengan reagen tertentu seperti *p-dimetilamino-benzaldehid* atau reagen asam *dinitrosalisilat* menghasilkan serapan pada panjang gelombang 540 nm. Substrat lain yang bisa digunakan pada metode ini adalah kitin *azure*, yaitu kitin yang direaksikan dengan pewarna *Remazol Brilliant Violet 5R* dan serapan yang dihasilkan dapat diukur pada panjang gelombang 420 nm. Untuk menentukan konsentrasi produk digunakan N-asetil-D-glukosamin sebagai standart [41, 43, 49].

##### **Spektrometer Assay**

Metode ini dapat ditentukan dengan menggunakan senyawa kromogen seperti 4-Nitrofenil- $\beta$ -D-N-N'-diasetilkitobiosa dan 4-Nitrofenil- $\beta$ -D-N-N'-N"-triasetilkitotriosida yang disiapkan dalam larutan stok dimetil sulfoksida (DMSO) seperti yang dilakukan oleh Imoto dan Yagishita (1977) dan ditentukan serapannya pada panjang gelombang 410 nm [32, 36].

##### **Pembentukan Floresens**

Uji ini digunakan untuk menentukan perbedaan aktivitas degradasi kitin dengan menggunakan substrat

4-metilumbeliferil-N-asetil- $\beta$ -D-glukosaminida, 4-metil umbeliferil N-asetil- $\beta$ -D-N-N'-diasetil kitobiosa, 4-metil umbeliferil N-asetil- $\beta$ -D-N-N'-N"-triasetil kitotriosida dan 4-metil umbeliferil N-asetil- $\beta$ -D-N-N'-N"-N"'-tetraasetil kitotetraosida dalam larutan DMSO menurut metode McCreath dan Gooday. Pembentukan fluoresens diakibatkan karena pelepasan 4-metil umbeliferil yang tereksitasi pada panjang gelombang 390 nm dan diemisikan pada panjang gelombang 485 nm.

##### **Zymogram dengan Menggunakan Etilen Glikol**

Metode ini didasarkan pada degradasi substrat etilen glikol pada media padat yang mengandung glikol kitin oleh aktivitas kitinase yang ditunjukkan oleh halo bening di sekitar bakteri. Glikol kitin yang disintesis dengan cara Trudel dan Aselin (1989) juga bisa digunakan pada metode *zymogram*, suatu teknik yang melibatkan 2 tahapan, yaitu pemisahan dengan elektroforesis kemudian diikuti dengan deteksi penentuan aktivitas kitinase. Pada proses ini terjadi kopolimerisasi antara gel poliakrilamid dengan glikol kitin, kitin yang didegradasi oleh kitinase akan membentuk zona bening. Gel kemudian distaining dengan *Coomassie Brilliant Blue R-250*, dimana muatan positif glikol kitin akan berinteraksi dengan *Coomassie blue* membentuk ikatan elektrostatik. Setelah dilakukan *destaining* dengan air, maka warna glikol kitin akan hilang karena aksi kitinase. Menurut beberapa peneliti bahwa metode ini lebih mudah untuk mendeteksi aktivitas kitinolitik, tetapi metode ini mempunyai keterbatasan karena tidak dapat digunakan untuk staining protein lebih lanjut dan mobilitas kitinase dalam gel terganggu karena adanya polisakarida dalam gel [50, 51].

##### **Metode Staining pada Plate Agar Kitin dan Elektroforesis Gel Poliakrilamid**

Pada awalnya dikembangkan *screening* hiperkitinase yang diproduksi bakteri dengan menggunakan *Calcofluor white M2R* dalam plate yang mengandung kitin *swollen*. *Calcofluor white M2R* berikatan dengan rantai glukukan membentuk lingkaran linier  $\beta$ -(1,4)-glikosidik dengan masing-masing unit N-asetil-glukosamin. Pada pengikatan dengan polisakarida seperti kitin akan mengeluarkan cahaya fluorokrom saat dideteksi di bawah sinar ultra violet. Mikroorganisme yang berpotensi kitinolitik akan memberikan zona bening di bawah sinar UV seperti yang telah dilakukan pada hiperkitinase mutan *Alcaligenes xylosoxydans* [52]. Metode ini kemudian dikembangkan oleh Gohel dengan cara memisahkan kitinase pada gel poliakrilamid dan ditransfer pada cawan petri yang mengandung agar kitin. Metode ini sederhana, *reproducible*, sensitif, mudah bagi pengguna, dapat dipercaya, dan harganya efektif untuk



deteksi kitinase natural dan terdenaturasi pada gel poliakrilamid [53].

Pemilihan terhadap metode mana yang akan dipakai didasarkan pada kepentingan peneliti. Bila akan menentukan aktivitas kitinase secara kuantitatif, maka dapat digunakan metode kolorimetri dengan menggunakan substrat tertentu. Pembentukan fluoresens juga dapat digunakan secara langsung untuk menentukan jenis kitinase yang dihasilkan dengan menggunakan beberapa substrat. Sedangkan *zymogram* dan agar kitin dapat digunakan untuk penentuan kualitatif kitinase, yaitu untuk mengidentifikasi mikroorganisme tertentu sebagai penghasil kitinase dan sekaligus dapat melihat berat molekul kitinase yang dihasilkan.

### PEMANFAATAN KITINASE

Kitinase merupakan salah satu enzim yang menarik untuk diisolasi karena kemampuannya untuk menghidrolisis kitin menjadi turunan kitin yang sangat banyak manfaatnya. Salah satu aplikasi kitinase dalam bidang bioteknologi adalah sebagai biokontrol. Pada tumbuhan enzim ini digunakan sebagai pertahanan dalam melawan serangan organisme patogen yang mengandung kitin. Hal ini dikarenakan kitin yang merupakan komponen utama dinding sel jamur dapat didegradasi enzim kitinase yang dihasilkan oleh mikroorganisme, hewan dan tumbuhan.

*Serratia plymuthica C48* yang diisolasi dari tanah berpotensi sebagai agensia biokontrol yang mampu menekan pertumbuhan jamur *Verticillium dahliae* [54]. Bruerberg melaporkan bahwa gen *ChiA* dan *ChiB* dari *Serratia marcescens* yang telah ditransformasi ke bakteri lain seperti *Pseudomonas fluorescens* dan *E.coli* mempunyai kemampuan untuk mengontrol jamur tanaman yang patogen atau sebagai senyawa biokontrol yang baru juga telah dilaporkan dapat mengurangi penyakit yang disebabkan oleh *Sclerotium rolfsii* dalam kedelai dan *Rhizoctonia solani* dalam kapas. *ChiA* yang dikombinasikan dengan *Bacillus thuringiensis* secara sinergis dapat mengurangi efek toksik pada larva insekta.

Genus *Trichoderma* merupakan jamur non patogen dengan beberapa strain yang sangat efektif berperan sebagai biokontrol. Gen antifungi dari *T. harzianum* yang mempunyai aktivitas kitinase telah diidentifikasi dan dikloning [55]. Penelitian yang lain melaporkan bahwa pemberian senyawa biokontrol *T. harzianum* mampu memperlambat masa inkubasi, menurunkan intensitas penyakit, menurunkan tingkat kevirulenan, menurunkan jumlah konidia akhir pada 9 isolat *Fusarium oxysporum f.sp.zingiberi* dan meningkatkan hasil rimpang kencur [56]. Harighi mencoba untuk mengevaluasi aktivitas antifungi gen *Chit42* dari *T.atroviride PTCC5220* yang telah dimurnikan dengan kromatografi penukar ion

menggunakan *CM-Sepharose* dan *DEAE-Sepharose*. Dengan menggunakan *bioassay* sebagaimana dijelaskan oleh Broglie (1991) *Chit42* menunjukkan inhibisi terhadap pertumbuhan *mycelia* dan juga aktivitas yang mampu mendegradasi dinding sel *R.solani* yang menyebabkan membusuknya akar dalam tanaman tebu. Kitinase yang dihasilkan oleh *P.aeruginosa K-187* yang diisolasi dari tanah di Taiwan diuji antimikroba dengan menggunakan 15 mikroorganisme sebagai pembanding. Pada media agar nutrient diberi *paper dish* yang mengandung enzim pada permukaannya. Setelah diinkubasi 3 hari pada 37 °C terdapat zona bening yang menunjukkan penghambatan kitinase pada pertumbuhan semua mikroorganisme yang diuji kecuali *P. aeruginosa M-1001* dan *P. aeruginosa K-187* [57].

Kitinase juga dapat dimanfaatkan dalam penanganan limbah terutama limbah yang mengandung kitin seperti pabrik pembekuan udang. Pabrik tersebut menghasilkan limbah cangkang udang yang bila dibiarkan dapat menyebabkan pencemaran lingkungan sehingga meningkatkan BOD dan COD. *Trichoderma virens* UKM1 yang ditumbuhkan dalam medium yang mengandung koloidal kitin sebagai sumber karbon dapat mendegradasi limbah udang dengan menghasilkan 86% N-asetilglukosamin [58]. Senyawa-senyawa hasil degradasi kitinase pada kitin membentuk senyawa turunan kitin seperti karboksimetil kitin, hidroksietil kitin dan etil kitin dapat dimanfaatkan dalam berbagai bidang. Dalam bidang kedokteran senyawa-senyawa tersebut dapat digunakan sebagai bahan dasar pembuatan benang operasi yang mempunyai keunggulan dapat diserap dalam jaringan tubuh, tidak toksik dan dapat disimpan dalam waktu yang lama. Monomer dari kitin yaitu N-Asetil-D-glukosamin dapat dimanfaatkan dalam bidang farmasi, diantaranya dapat digunakan sebagai obat untuk mengontrol kadar gula dalam darah, sebagai suplemen, anti *inflamatory* dan sebagainya. Untuk kosmetik senyawa gula ini dapat membantu mengurangi hilangnya hiperpigmentasi karena N-asetil-D-glukosamin dapat membantu mengurangi aktivitas enzim *tirosinase* yang berperan dalam produksi melanin.

### KESIMPULAN

Mikroorganisme kitinolitik dapat diperoleh dari berbagai tempat di alam ini seperti lingkungan air ataupun tanah dan juga pada daerah dengan suhu ekstrim dengan menggunakan kitin sebagai substrat. Kitin dapat diperoleh setiap saat pada semua industri pengolahan daging kepiting, udang dan sejenisnya dengan menghasilkan limbah yang mengandung kitin dalam jumlah besar. Penelitian lebih lanjut masih diperlukan untuk mendapatkan enzim kitinase dari

mikroorganisme dan perlu dikaji kembali manfaatnya selain sebagai agen biokontrol atau untuk mendapatkan N-Asetil glukosamin.

#### DAFTAR PUSTAKA

- Tomokazu, K., Saito, S., Sato, S., Kanai, K., Fujii, F., Nikaidou, N., and Watanabe, W., 2004, *American Society for Microbiology*, **70**(2) : 1135-1144.
- Wirth, S.J. and Wolf, G.A., 1990, *J. Microbiol. Meth.* **12**, 197-205.
- Wang, Y., Kausch, A.P., Chandlee, J.M., Luo, H., and Ruemmele, B.A., 2003, *Plant Sci.*, **165**, 497-506
- Benhamou, N., Gagne S., Quere, D.L., and Dehbi, L., 2000, *Phytopathology*, **90**, 45-56.
- Bapat, S., Shah, A.K., 2000, *Canada. Journal Microbiol.* **46**, 125-132.
- Emma, F., 1997, Doctor's dissertation, ISSN 1401-6249
- Gooday, G.W., 1990, *Physiology of Microbial Degradation of Chitin and Chitosan*, Biodegradation, **1**, 177-190
- Yurnaliza, 2002, FMIPA-USU.
- Kihachiro, O., Yoshida, Y., Kariya, K., Ohnishi, O., and Ryuichiro, I., 2002, *Journal Genetica. Appl. Microbiol.*, **48**, 25-33.
- Marganof, 2003, IPB
- Gohel, V., Singh, S., Vimal, V., Ashwini, A., and Chhatpar, C., 2006, *African Journal of Biotechnology*, **5** (2), 54 -72
- Rattanakit, N., Plikomol, A., Yano, S., Wakayama, M., and Tachiki, T., 2002, *Evaluation of a culture based on chitinase formation which is necessary for chitin-assimilation. J.*
- Donderski, W. and Brzezinska, M.S., 2003, *Polish Journal of Enviromental Studies*, **12** (6), 685-692.
- Zhongwei, G., Jinkui, Y., Nan, T., Zefen, Y., and Zhang, Z., 2007, *The Journal of Microbiology*, **45** (5), 422-430.
- Dubey, S.K., Tripathi, A.K., and Upadhyay, S.N., 2006, *Biosource Technology*, **97**, 2217-2224.
- Sajidan, A., Farouk, A., Greiner, R., Jungblut, P., Müller, E.C., and Borris, R., 2004, *Appl. Microbiology Biotech.*, **65**, 10-18.
- Chernin, L.S., Winson, M.K., Thompson, J.M., 1998, *Journal of Bacteriology*, **180** (17).
- Gohel, V., Chaudhary, C., Vyas, V., and Chhatpar, C., 2006, *Biochemical Engineering Journal*, **28**, 50-56.
- Guo, S.H., Chen, J.K., and Lee, W.C., 2004, *Enzyme and Microbial Technology*, **35**, 550-556.
- Huang, J.H. and Chen, J.J., 2005, *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*.
- Hsu, S.C. and Lockwood, J.L., 1975, *Applied Microbiology*, **29** (3), 422-426.
- Ulrike K. and Elkin, B., 2000, *Isolation of Native Fungal and Bacterial Antaginists Against Plant Diseases*.
- Escott, G.M., Hearn, V.M., and Adams, D.J., 1998, *Microbiology*, **144**, 1575-1581.
- Dwierra, E., Yamazaki, S., Morimoto, K., Karita, S., Kimura, T., Sakka, K., and Ohmiya, K., 2000, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **89** (6), 596-601.
- Park, S.H., Lee, J.H., and Lee, H.K., 2000, *The Journal of Microbiology*, **38** (4), 224-229.
- Lih-Ling, C., Stackebrandt, S., Lee, F., Lee, L., Chen, K., and Fu, M., 2004, *International J. System Evol. Microbiol.*, **54**, 1387-1391.
- Tao, Y., Jin, H., Zhangfu, Z., Zhang, L., Xiudiong, X., Ke, T., Ge, S., and Liu, S., 2005, *Annals of Microbiology*, **55** (3), 213-218.
- Tronsmo, A., and Harman, G.E., 1993, *Anal. Biochem*, **208**, 74-79.
- Brurberg, M.B., Synstad, S., Klemsdal, K., Aalten, V., Sundheim, S., and Eijsink, V.G.H., 2000, Manuscript' Recent Research Developments in Microbiology.
- Yaron, S., Vorgias, V., Ilan, C., and Oppenheimer, O., 1995, *Journal of Bacteriology*, **177** (14), 4187-4189.
- Amarilla, M., 2003, *Cloning, Molecular Biotechnology*, **23** (1), 1-10.
- Suzuki, K., Sugawara, N., Suzuki, M., Uchiyama, T., Katouno, F., Nikaidou, N., and Watanabe, T., 2002, *Bioci. Biotechnol. Biochem.*, **66** (5), 1075-1083.
- Jindra, F., Jon, A., Marc S.F., and Wilbert, B., 2001, *Journal of Bacteriology*, **183** (24).
- Thierry, L., Mavromatis, M., Vorgias, V., Buchon, B., Gerday, G., and Bouriotis, B., 2001, *Cloning, Journal of Bacteriology*, **183** (5) : 1773-1779.
- Tao, Y., 2006, *Yi Chuan Xue Bao*, **33** (11), 1037-1046.
- Watanabe, T., Oyanagi, O., Suzuki, S., and Tanaka, T., *Journal Bacteriology*, **172**, 4017-4022
- Chanpen, W., Thepouyporn, T., Siwayaprahm, S., and Bhumiratana, 2004, *Journal Current Microbiology*, Vol. 44 (3), 167-172.
- Yong-Seok, L., Park, P., Yoo, Y., Lee, C., Cho, S., Ahn, C., Kim, M., and Choi, L., 2007, *Biosource Technology*, **98**, 2734-2741.
- Nugroho, T., 2003, *Jurnal Natur Indonesia*, **5** (2), 101-106.
- Omumashaba, C.A., Yoshida, N., and Ogawa, K., 2001, *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **47**, 53-61.
- Nawani, N.N., and Kapadnis, B.P., 2001, *Journal of Applied Microbiology*, **90**, 803-808.
- Brzezinska, M.S, Porczyk, E.K., and Donderski, W., 2007, *International Journal of Oceanography and Hydrobiology*, Vol. XXXVI (3), 101-111.

43. Xu-fen, Z., Ying, Z., and Jun-li, F., 2007, *Journal Zhejiang Univ. Sci. B*, **8** (11), page 831-838.
44. Dahiya, N., Tewari, T., and Hoondai, H., 2005, *Electronic Journal of Biotechnology*, **8** (2).
45. Thompson, S.E., Mark, S., Wilkinson, M.C., and Keith, P., 2001, *American Society for Microbiology*.
46. Bushan, B., 2000, *Journal of Applied Microbiology*, **8** (5), 800.
47. Yuli, P.E., Suhartono, M.T., Rukayadi, R., Hwang, J.K., and Pyun, Y.R., 2004, *Enzyme and Microbial Technology*, **35**, 147-153.
48. Sutrisno, A., Ueda, U., Abe, A., Nakazawa, N., and Miyatake, M., 2004, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **63** (4), 398-406.
49. Harighi, M.J., Zamani, M.R., and Motallebi, M., 2007, *Biotechnology*, **6** (1), 28-33.
50. Siwayaprahm, P., Audtho, M., Ohmiya, K., and Wiwat, C., 2006, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, **22**, 331-335.
51. Donzelli, B.G.G. and Harman, G.E., 2001, *Applied Environmental Microbiology*, **67** (12), 5643-5647.
52. Vaidya, R.J., Macmil, S.L.A., Vyas, P.R., and Chhatpar, H.S., 2003, *Journal of Applied Microbiology*, **36** (3), 129-134.
53. Gohel, V., Pranav, V., and Chhatpar, C., 2004, *African Journal of Biotechnology*, **4** (1), 87-90.
54. Gabriele, B., Frankowski, F., and Bahl, H., 1999, *Microbiology*, University of Rostock, German.
55. Minarsih, M. dan Santoso, S., 2003, Indonesian Biotechnology Research.
56. Edi A.K.P., Prihatiningsih, N., dan Soesanto, L., 2006, *Jurnal Ilmu-Ilmu Pertanian Indonesia*, **8** (2), 76-84.
57. San-Lang, W. and Wen-Tsu, C., 1997, *Applied and Environmental Microbiology*, 380-386
58. Suraini, A.A., Sin T.L., Alitheen, N., Shahab, N., and Kamaruddin, K., 2008, *Journal of Biological Science*, **8** (1), 52-59.