

## IMOBILISASI KITINASE INTRASELULER *Providencia stuartii* DENGAN KALSIUM ALGINAT DAN APLIKASINYA DALAM PRODUKSI N-ASETILGLUKOSAMIN

### [IMMOBILIZATION OF INTRACELLULER CHITINASE FROM *Providencia stuartii* USING CALCIUM ALGINATE AND ITS APPLICATION FOR N-ACETYLGLUCOSAMINE PRODUCTION]

Yuniwaty Halim<sup>1\*</sup>, Benedictus D. Hendarlim<sup>1</sup>, Hardoko<sup>1,2</sup>, Ratna Handayani<sup>1</sup>, dan Dela Rosa<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Program Studi Teknologi Pangan, Universitas Pelita Harapan  
Jl. M.H. Thamrin Boulevard, Tangerang 15811, Banten

<sup>2</sup>Prodi Teknologi Hasil Perikanan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Brawijaya  
Jl. Veteran No. 1 Malang, Jawa Timur

<sup>3</sup>Program Studi Farmasi, Universitas Pelita Harapan  
Jl. M.H. Thamrin Boulevard, Tangerang 15811, Banten

\*Korespondensi penulis : yuniwaty.halim@uph.edu

#### ABSTRACT

*Chitin, a linear polymer of  $\beta$ -1,4-N-acetylglucosamine units, is found naturally in shrimp shells and can be derived into glucosamine, which has a wide range of use, especially in the therapeutic field to treat joint damage. N-acetylglucosamine (NAG), one of the forms of glucosamine, can be produced by fermentation of chitin using chitinolytic microorganisms, such as mold or bacteria. Chitinase production by *Providencia stuartii* has been studied. However, immobilization of chitinase towards production of NAG has not been directly evaluated. The aims of this research were to determine the effect of ratio between intracellular chitinase and support using alginate, and the effect of fermentation cycles on immobilized intracellular chitinase activity and NAG production from chitin obtained from *Penaeus monodon* shrimp shells. The ratio of chitinase:support used were 1:1, 1.5:1 and 2:1. Ratio of 2:1 resulted in the highest enzyme activity of  $2.03 \pm 0.04$  U/ml. The highest NAG production was achieved from the first cycle of fermentation, resulting in total NAG concentration of  $1347.78 \pm 50.18$  ppm. Intracellular chitinase immobilized using alginate can be used up to 4 fermentation cycles which retained about 66.91% of its activity.*

**Keywords :** alginate, chitinase, enzyme, immobilization, N-acetylglucosamine

#### ABSTRAK

Kitin, polimer linier yang terdiri dari unit  $\beta$ -1,4-N-asetilglukosamin, ditemukan secara alami pada cangkang udang dan dapat diubah menjadi glukosamin, yang memiliki fungsi yang luas, khususnya di bidang kesehatan untuk mengobati penyakit pada sendi. N-asetilglukosamin (NAG), salah satu bentuk glukosamin, dapat dihasilkan melalui fermentasi kitin menggunakan mikroorganisme kitinolitik seperti kapang atau bakteri. Produksi kitinase oleh *Providencia stuartii* telah dipelajari, namun imobilisasi kitinase untuk produksi NAG belum secara langsung dievaluasi. Penelitian ini bertujuan untuk menentukan pengaruh rasio antara kitinase intraseluler dan *support* menggunakan alginat dan pengaruh banyaknya siklus fermentasi terhadap aktivitas enzim kitinase intraseluler yang diimobilisasi dan produksi NAG dari kitin yang diperoleh dari cangkang udang *Penaeus monodon*. Rasio kitinase: *support* yang digunakan adalah 1:1, 1,5:1,

dan 2:1. Rasio 2:1 menghasilkan aktivitas enzim tertinggi, yaitu sebesar  $2,03 \pm 0,04$  U/ml. produksi NAG tertinggi diperoleh dari siklus fermentasi pertama yang menghasilkan konsentrasi NAG sebesar  $1347,78 \pm 50,18$  ppm. Kitinase intraseluler yang diimobilisasi dengan alginat dapat digunakan hingga 4 siklus fermentasi dengan aktivitas enzim yang dipertahankan adalah sebesar 66,91%.

**Kata kunci :** alginat, enzim, imobilisasi, kitinase, N-asetilglukosamin

## PENDAHULUAN

Cangkang udang mengandung banyak komponen bioaktif, seperti pigmen, asam amino, asam lemak, dan kitin. Kitin banyak dimanfaatkan untuk berbagai aplikasi dalam bidang medis, terapi, kosmetik, industri kertas, *pulp*, dan tekstil, serta aplikasi dalam bidang pangan dan bioteknologi (Kandra *et al.*, 2011).

Kitin merupakan kopolimer N-asetilglukosamin dan D-glukosamin yang terhubung melalui ikatan  $\beta$ -(1-4) glikosidik, dengan N-asetilglukosamin merupakan senyawa yang dominan dalam rantai polimer tersebut (Muzzarelli, 2013).

Kitinase merupakan grup enzim yang mampu mendegradasi kitin menjadi senyawa-senyawa dengan berat molekuler rendah, salah satunya adalah glukosamin (GlcN). Glukosamin (GlcN) atau D-glukosamin (2-amino, 2-deoksi-D-glukosa) adalah gula amino yang terdapat pada kitin yang terasetilasi atau kitin dalam bentuk polimer. Glukosamin telah banyak digunakan secara terpisah maupun melalui kombinasi dengan kondroitin sulfat untuk

menyembuhkan atau mencegah osteoarthritis. Glukosamin diklaim dapat meningkatkan pembentukan tulang rawan, sedangkan kondroitin sulfat dapat mengurangi penguraian tulang rawan (Sardesai, 2011).

*Providencia stuartii* merupakan salah satu bakteri penghasil kitinase. Penggunaan metode enzimatik dapat menghasilkan N-asetilglukosamin lebih cepat dan efisien jika dibandingkan dengan metode fermentasi maupun kimiawi (Torchilin, 2012). Selain itu untuk alasan efisiensi, imobilisasi enzim dapat dilakukan agar enzim dapat digunakan kembali setelah reaksi. Ada beberapa teknik yang dapat digunakan untuk imobilisasi enzim, antara lain adsorpsi, kovalen, enkapsulasi, pemerangkapan (*entrapment*), dan ikatan silang (Salman *et al.*, 2008).

Salah satu senyawa pengikat yang dapat digunakan untuk imobilisasi enzim dengan metode *entrapment* adalah alginat. Alginat merupakan polimer linier dari ekstrak rumput laut yang terdiri dari  $\alpha$ -L asam guluronat dan  $\beta$ -D asam manuronat

(Taqieddin and Amiji, 2003). Alginat merupakan biopolimer yang tersedia secara komersil dan paling sering digunakan dalam teknologi imobilisasi dan enkapsulasi (Dwevedi, 2016).

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh rasio enzim: *support* dan pengaruh banyaknya siklus fermentasi terhadap aktivitas enzim kitinase yang diimobilisasi menggunakan alginat dan produksi N-asetilglukosamin.

## BAHAN DAN METODE

### Bahan dan Alat

Bahan-bahan utama yang digunakan dalam penelitian ini adalah kitin dari cangkang udang *Penaeus monodon* yang diperoleh dari PT. Lola Mina, Muara Baru, Jakarta, kultur *Providencia stuartii* yang diperoleh dari penelitian sebelumnya (Josephine, 2018), media *Nutrient Broth* dan *Nutrient Agar*, air destilata, natrium alginat, kalsium klorida ( $\text{CaCl}_2$ ), DNS (3,5-*Dinitrosalicylic acid*) (Sigma Aldrich), dan standar N-asetilglukosamin (Sigma Aldrich).

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah spektrofotometer UV-VIS (Hitachi U-1800), *incubator shaker* (Heidolph 22 Unimax 1010), mikropipet (Finnpipette F2 ThermoScientific), pH meter Metrohm 913), pH indikator universal

(Merck), kuvet Quartz (Hellma Analytics), mikroskop (Olympus), dan alat-alat gelas.

### Metode Penelitian

#### Produksi Enzim Kitinase Intraseluler

Produksi enzim kitinase intraseluler dilakukan menurut metode Karunya *et al.* (2011), Lestari *et al.* (2017), dan Takaya *et al.* (1998). Kitinase diproduksi oleh kultur *Providencia stuartii* dalam media *Nutrient Broth* 300 ml yang mengandung kitin 1% dan mineral, yaitu  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,03%,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0,07%,  $\text{MgSO}_4$  0,01% dan  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0,7%. Sebanyak 60 ml kultur kerja *Providencia stuartii* ditambahkan ke dalam media dan diinkubasi pada suhu 40°C selama 24 jam.

Setelah itu, media hasil inkubasi disentrifugasi dengan kecepatan 3500 rpm, pada suhu 40°C selama 15 menit. Supernatant yang diperoleh merupakan kitinase ekstraseluler dan endapan yang diperoleh dilarutkan dalam larutan *buffer* sebanyak 4 ml per 80 ml kultur yang digunakan. Lisis terhadap sel dilakukan menggunakan gelombang ultrasonik pada panjang gelombang 47 KHz selama 10 menit, kemudian dilakukan sentrifugasi pada kecepatan 3500 rpm selama 15 menit. Supernatant yang diperoleh dilarutkan kembali dalam larutan amonium sulfat 70% sambil diaduk pada suhu rendah, dan

kemudian didiamkan pada suhu 4°C selama 18 jam. Campuran ini kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 3500 rpm selama 15 menit. Endapan yang diperoleh kemudian dilarutkan dalam buffer fosfat pH 8 0,05 M sebanyak 8 ml per 150 ml volume kultur awal. Enzim kitinase intraseluler yang diperoleh ini kemudian diukur aktivitas enzimnya menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 540 nm.

### **Imobilisasi Kitinase Intraseluler**

Imobilisasi kitinase intraseluler dilakukan menggunakan metode Wang (2009) dengan modifikasi. Larutan alginat 3% sebagai *support* untuk imobilisasi kitinase dibuat dengan mencampurkan 1,5 gram natrium alginat dengan 50 ml air destilata sambil diaduk. Kitinase ditambahkan dengan rasio antara kitinase: *support* sebanyak 1:1, 1,5:1, dan 2:1. Campuran ini kemudian dibuat ke dalam bentuk *beads* dengan cara meneteskan campuran ke dalam larutan 0,2 M CaCl<sub>2</sub> sebanyak 50 ml menggunakan jarum suntik pada suhu ruang.

Campuran kemudian diinkubasi dalam media fermentasi pada suhu 40°C selama 6 jam dan diaduk setiap 1 jam menggunakan *vortex*. Media fermentasi yang digunakan adalah sebanyak 5 ml dan ditambahkan dengan 1% kitin. Setelah

inkubasi, *beads* kemudian dipisahkan, dan sisa campuran dipanaskan di dalam air mendidih. Campuran didinginkan dan ditambahkan dengan 2 ml DNS 1% dan 1 ml larutan Na-K tartarat, kemudian dipanaskan selama 15 menit dalam air mendidih. Setelah itu, campuran didinginkan pada suhu ruang dan dianalisis aktivitas enzimnya mengacu metode Liang *et al.* (2014). Analisis aktivitas enzim dilakukan untuk menentukan rasio kitinase: *support* terbaik.

Rasio kitinase: *support* terbaik kemudian digunakan untuk menentukan pengaruh siklus reaksi fermentasi dari kitinase yang diimobilisasi terhadap konsentrasi N-asetilglukosamin yang dihasilkan. Kitinase yang diimobilisasi ditambahkan ke dalam media fermentasi yang mengandung 1% kitin dan kemudian diinkubasi pada suhu 40°C selama 6 jam. Setelah inkubasi, *beads* yang mengandung kitinase dipisahkan dari media, filtrat yang diperoleh ditambahkan dengan 1 ml DNS 1% dan diinkubasi pada air mendidih selama 15 menit untuk menghentikan reaksi enzimatik. Filtrat yang diperoleh kemudian dianalisis aktivitas enzim dan konsentrasi N-asetilglukosamin yang dihasilkan.

### **Analisis Aktivitas Enzim Kitinase**

Aktivitas kitinase diukur menggunakan metode Miller (Rahmansyah

dan Sudiana, 2003). Sebanyak 1% kitin dilarutkan dalam larutan *buffer* dan sebanyak 1 ml larutan diambil untuk direaksikan dengan kitinase. Kitinase dan substrat kemudian diinkubasikan pada suhu 40°C selama 1 jam. Hasil reaksi kemudian disentrifugasi pada kecepatan 3500 rpm selama 15 menit.

Sebanyak 1 ml supernatan ditambahkan dengan 2 ml larutan DNS dan 1 ml larutan Na-K-tartarat 4%. Campuran kemudian diaduk dan dipanaskan pada suhu 100°C selama 15 menit. Campuran ini kemudian didinginkan, diencerkan dengan rasio 1:4, dan diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 540 nm. Aktivitas kitinase (1 unit) dinyatakan sebagai jumlah enzim yang diperlukan untuk menghasilkan 1 µmol N-asetilglukosamin (NAG) dalam 1 jam. Rumus yang digunakan untuk mengukur aktivitas kitinase adalah sebagai berikut:

$$\text{Aktivitas kitinase (U/ml)} = \frac{\text{konsentrasi NAG} \times 1000 \times \text{jumlah enzim yang digunakan (ml)}}{\text{berat molekul NAG (221.2)} \times \text{lama inkubasi (h)}}$$

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Aktivitas Kitinase Intraseluler

Penelitian ini menggunakan kitinase intraseluler yang dihasilkan oleh bakteri *Providencia stuartii*. berdasarkan penelitian oleh Teja (2018), kitinase intraseluler

*Providencia stuartii* bekerja optimum pada suhu 40°C selama 18 jam, pH 8, dan pada kondisi pH 8. Aktivitas kitinase yang diperoleh pada penelitian ini adalah sebesar  $4,95 \pm 0,19$  U/ml. Hasil ini lebih rendah dibandingkan dengan penelitian sebelumnya oleh Sadhya *et al.* (2004) yang mendapatkan kitinase dengan aktivitas sebesar 7,4 U/ml. Hal ini dapat dikarenakan Sadhya *et al.* (2004) menggunakan kitinase yang dihasilkan oleh kapang *Trichoderma harzianum* dan jenis enzim yang digunakan adalah enzim ekstraseluler.

### Pengaruh Rasio Kitinase : *Support* terhadap Aktivitas Kitinase dan Produksi N-asetilglukosamin

Alginat digunakan sebagai *support* dalam imobilisasi karena membutuhkan preparasi yang sederhana, non toksik, murah, dan efektif (Blandino *et al.*, 2001). Rasio kitinase dengan *support* yang digunakan dalam proses imobilisasi adalah sebesar 1:1, 1,5:1, dan 2:1. Ketiga rasio ini dipilih berdasarkan penelitian sebelumnya oleh Zufahair *et al.* (2017). Aktivitas kitinase dan N-asetilglukosamin yang dihasilkan dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1 menunjukkan bahwa rasio kitinase: *support* sebesar 2:1 menghasilkan aktivitas enzim tertinggi, yaitu sebesar  $2,03 \pm 0,04$  U/ml dan konsentrasi N-

asetilglukosamin tertinggi, yaitu  $1347,78 \pm 27,22$  ppm. Rasio kitinase: *support* yang lebih besar dari 2:1 tidak dapat menghasilkan *beads* pada saat ditambahkan ke dalam larutan  $\text{CaCl}_2$ , tetapi imobilisasi enzim dengan menggunakan rasio hingga 2:1 menghasilkan aktivitas enzim yang lebih kecil jika dibandingkan dengan enzim yang tidak diimobilisasi. Hasil penelitian yang diperoleh ini berbeda dengan Miletic *et al.* (2012) yang menyatakan bahwa salah satu cara untuk meningkatkan aktivitas enzim adalah dengan melakukan imobilisasi.

Tabel 1. Pengaruh rasio kitinase: *support* terhadap aktivitas kitinase dan konsentrasi N-asetilglukosamin

Rasio kitinase: <i>support</i>	Aktivitas Kitinase (U/ml)	Konsentrasi N-asetilglukosamin (ppm)
1:1	$0,81 \pm 0,02$	$1070,00 \pm 27,89$
1,5:1	$1,39 \pm 0,03$	$1225,56 \pm 25,09$
2:1	$2,03 \pm 0,04$	$1347,78 \pm 27,22$

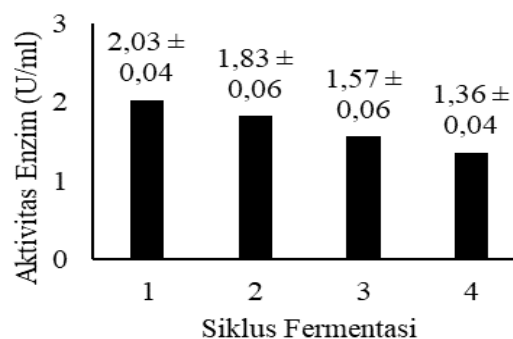
Menurut Öztürk (2001), *support* yang digunakan untuk imobilisasi memiliki kapasitas maksimum. Penambahan volume enzim pada konsentrasi *support* yang sama dapat meningkatkan aktivitas enzim hingga konsentrasi tertentu. Setelah itu, *support* tidak mampu lagi untuk memerangkap enzim yang ditambahkan. Oleh karena itu, rasio kitinase: *support* yang digunakan

untuk tahap penelitian selanjutnya adalah 2:1.

### Pengaruh Siklus Reaksi Fermentasi terhadap Aktivitas Kitinase dan Produksi N-asetilglukosamin

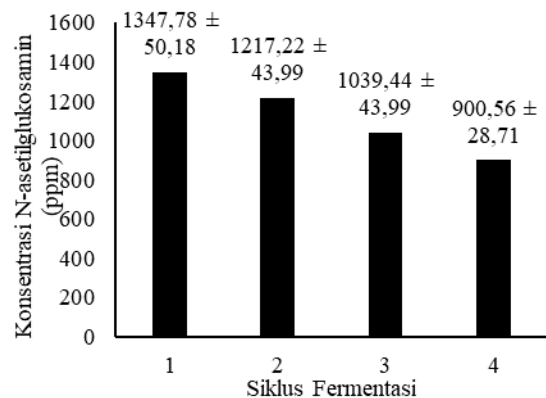
Untuk mengetahui efisiensi imobilisasi kitinase intraseluler, pada penelitian ini juga dilakukan reaksi fermentasi sebanyak 4 siklus. Pemilihan 4 siklus ini berdasarkan pernyataan Won *et al.* (2005) yang menyatakan bahwa 4-15 siklus fermentasi diperlukan untuk mengetahui stabilitas dari enzim yang diimobilisasi.

Setiap siklus fermentasi berlangsung selama 6 jam. Pengaruh siklus fermentasi terhadap aktivitas enzim dan produksi N-asetilglukosamin dapat dilihat pada Gambar 1 dan Gambar 2.



Keterangan: notasi yang berbeda menunjukkan perbedaan signifikan ( $p < 0,05$ )

Gambar 1. Pengaruh siklus fermentasi terhadap aktivitas enzim kitinase



Keterangan: notasi yang berbeda menunjukkan perbedaan signifikan ( $p < 0,05$ )

Gambar 2. Pengaruh siklus fermentasi terhadap konsentrasi N-asetilglukosamin

Hasil uji statistik dengan ANOVA menunjukkan bahwa ada pengaruh signifikan antara banyaknya siklus fermentasi terhadap aktivitas kitinase dan juga konsentrasi N-asetilglukosamin yang dihasilkan. Konsentrasi N-asetilglukosamin dan aktivitas kitinase tertinggi dihasilkan dari siklus reaksi pertama, dan terus mengalami penurunan pada siklus-siklus reaksi berikutnya.

Penelitian sebelumnya oleh Viet *et al.* (2013) dan Won *et al.* (2005) menunjukkan bahwa efisiensi enzim yang diimobilisasi akan menurun setelah beberapa siklus reaksi. Aktivitas enzim yang menurun berarti konsentrasi N-asetilglukosamin yang dihasilkan juga akan menurun. Penggunaan enzim berkali-kali dapat menyebabkan kebocoran enzim dari *beads* yang terbentuk

bersama alginat atau kerusakan *beads* karena pemakaian berulang dalam reaksi.

Untuk mengetahui efisiensi kitinase setelah 4 siklus fermentasi, persentase aktivitas enzim dihitung dengan menggunakan aktivitas enzim pada siklus fermentasi pertama dianggap sebagai 100%. Tabel 2 menunjukkan persentase aktivitas kitinase pada setiap akhir siklus fermentasi.

Tabel 2. Persentase aktivitas enzim pada siklus fermentasi yang berbeda

Siklus	Aktivitas enzim (U/ml)	Aktivitas enzim (%)
1	2,03	100
2	1,83	90,31
3	1,57	77,18
4	1,36	66,91

Tabel 2 menunjukkan adanya penurunan aktivitas enzim pada setiap siklus fermentasi, namun kitinase intraseluler yang diimobilisasi dengan alginat masih dapat mempertahankan 66,91% setelah 4 siklus fermentasi. Penelitian oleh Kumar *et al.* (2017) menunjukkan bahwa enzim silanase dari *Bacillus licheniformis* yang diimobilisasi menggunakan alginat dengan metode *cross-linking* dapat mempertahankan 50% aktivitas enzimnya setelah digunakan dalam 5 siklus fermentasi. Penelitian lainnya oleh Dai *et al.* (2018) menunjukkan bahwa pektinase yang diimobilisasi dengan

komposit natrium alginat dan *graphene* oksida dapat mempertahankan 73% aktivitas enzimnya setelah 6 siklus fermentasi.

Hasil penelitian yang telah dilakukan menunjukkan bahwa kitinase intraseluler dari *Providencia stuartii* yang diimobilisasi dengan alginat masih dapat digunakan hingga 4 siklus fermentasi, tetapi untuk lebih optimal maka diperlukan metode imobilisasi lain, misalnya *cross-linking* atau kovalen, atau menggunakan senyawa lain yang dikombinasikan dengan alginat, misalnya  $\kappa$ -karagenan.

### KESIMPULAN

Aktivitas enzim kitinase intraseluler *Providencia stuartii* pada kondisi fermentasi dengan pH 4 dan suhu 40°C adalah  $4,95 \pm 0,20$  U/ml. Rasio kitinase: *support* memengaruhi aktivitas enzim kitinase hasil imobilisasi menggunakan alginat dengan rasio 2:1 menghasilkan aktivitas enzim tertinggi, yaitu sebesar  $2,03 \pm 0,04$  U/ml. Banyaknya siklus fermentasi juga memengaruhi aktivitas kitinase yang diimobilisasi dan konsentrasi N-asetilglukosamin yang dihasilkan, dengan konsentrasi N-asetilglukosamin tertinggi dihasilkan dari reaksi siklus pertama, yaitu sebesar  $1347,78 \pm 50,18$  ppm dengan aktivitas enzim sebesar  $2,03 \pm 0,04$  U/ml. Kitinase intraseluler yang diimobilisasi

dengan alginat dapat digunakan hingga 4 siklus fermentasi dengan mempertahankan 66,91% aktivitas enzimnya.

### UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis ingin mengucapkan terima kasih kepada kepada Lembaga Penelitian dan Pengabdian Masyarakat (LPPM), Universitas Pelita Harapan yang telah mendanai penelitian ini berdasarkan skema penelitian No. P-008-FaST/VI/2018.

### DAFTAR PUSTAKA

- Blandino, A., Macias, M., and Cantero, D. 2001. Immobilization of glucose oxidase within calcium alginate gel capsules. *Process Biochemistry* 36 : 601-606.
- Dai, X.Y., Kong, L.M., Wang, X.L, Zhu, Q., Chen, K., and Zhou, T. 2018. Preparation, characterization and catalytic behavior of pectinase covalently immobilized onto sodium alginate/graphene oxide composite beads. *Food Chemistry* 253 : 185-193.
- Dwevedi, A. 2016. *Enzyme Immobilization: Advances in Industry, Agriculture, Medicine, and the Environment*. New Delhi : Springer International Publishing.
- Josephine, C. 2018. Uji indeks kitinolitik bakteri yang diisolasi dari kulit udang windu (*Penaeus monodon*). *Teknologi Pangan, Tangerang, Indonesia* : Universitas Pelita Harapan, Skripsi.
- Kandra, P., Challa, M.M., and Jyoti, H.K.P. 2011. Efficient use of shrimp waste:



- present and future trends. *Applied Microbiology and Biotechnology* 93 (1): 17-29.
- Karunya, S.K., Reetha, D., Saranraj, P., and Milton, D.J. 2011. Optimization and purification of chitinase produced by *Bacillus subtilis* and its antifungal activity against plant pathogens. *International Journal of Pharmaceutical & Biological Archives* 2(6) : 1680-1685.
- Kumar, S., Haq, I., Prakash, J., and Raj, A. 2017. Improved enzyme properties upon glutaraldehyde cross-linking of alginate entrapped xylanase from *Bacillus licheniformis*. *International Journal of Biological Macromolecules* 98 : 24-33.
- Lestari, P., Prihatiningsih, N., and Djatmiko, H.A. 2017. Partial biochemical characterization of crude extract extracellular chitinase enzyme from *Bacillus subtilis* B298. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering* 172.
- Liang, T.W., Yue-Yin, C., Po-Shen, P., and San-Lang, W. 2014. Purification of chitinase/chitosanase from *Bacillus cereus* and discovery of an enzyme inhibitor. *International Journal of Biological Macromolecules* 63 : 8-14.
- Miletic, N., Nastasovic, A., and Loos, K. 2012. Immobilization of biocatalysts for enzymatic polymerizations: possibilities, advantages, applications. *Bioresource Technology* 115 : 126-135.
- Muzzarelli, R.A.A. 2013. *Chitin*. Amsterdam : Elsevier.
- Öztürk, B. 2001. Immobilization of lipase from *Candida rugosa* on hydrophobic and hydrophilic supports. *Biotechnology and Bioengineering*, İzmir, Turkey : İzmir Institute of Technology, Master Thesis.
- Rahmansyah, M. dan Sudiana, I.M. 2003. Optimasi analisis amilase dan glukukanase yang diekstrak dari miselium *Pleurotus ostreatus* dengan asam 3,5 dinitrosalisilat. *Berkala Penelitian Hayati* 9: 7-12.
- Sadhya, C., Adapa, L. K., Nampoothiri, M., Binod, P., Szakacs, G., and Pandey A. 2004. Extracellular chitinase production by *Trichoderma harzianum* in submerged fermentation. *Journal of Basic Microbiology* 44 (1) : 49-58.
- Salman, S., Srimathi, S., Safina, G., Satoh, I, and Danielsson, B. Hydroxyapatite as a novel reversible in situ adsorption matrix for enzyme thermistor based FIA. *Talanta* 77 (2): 468–472.
- Sardesai, V. 2011. *Introduction to Clinical Nutrition*, Third Edition. Boca Raton : CRC Press.
- Takaya, N., Yamazaki, D., Horiuchi, H., Ohta, A., and Takagi, M. 1998. Intracellular chitinase gene from *Rhizopus oligosporus*: molecular cloning and characterization. *Microbiology* 144: 2647-2654.
- Taqieddin, E. and Amiji, M. 2004. Enzyme immobilization in novel alginate-chitosan core-shell microcapsules. *Biomaterials* 25 (10): 1937-1945.

- 
- Teja, E. 2018. Optimasi produksi N-Asetil-Glukosamin dari kulit udang windu menggunakan enzim kitinase intraseluler semi murni *Providencia stuartii*. Teknologi Pangan, Tangerang, Indonesia : Universitas Pelita Harapan, Skripsi.
- Torchilin, V.P. 2012. Immobilized Enzymes in Medicine. Berlin: Springer Science & Business Media.
- Viet, T.Q., Minh, N.P., and Dao, D.T.A. 2013. Immobilization of cellulase enzyme in calcium alginate gel and its immobilization stability. American Journal of Research Communication 1 (12) : 254-267.
- Wang, N.S. 2009. Enzyme Entrapment in Alginate Gel. Department of Chemical & Biomolecular Engineering, Maryland, USA: University of Maryland, Laboratory Protocol.
- Won, K., Kim, S., Kim, K. J., Park, H. W. and Moon, S.J. 2005. Optimization of lipase entrapment in Ca-Alginate gel beads. Process Biochemistry 40(6) : 2149-2154.
- Zusfahair, Ningsih, D.R., Kartika, D., Fatoni, A., and Zuliana, A.L. 2017. *Bacillus thuringiensis* HCB6 amylase immobilization by chitosan beads. IOP Conf. Series: Materials Science and Engineering 172: 1-9.