

Produksi N-asetilglukosamin dari Kitinase Semi Murni *Mucor circinelloides* yang Diimobilisasi dengan Menggunakan Agar

Production of N-acetylglucosamine from Semi Purified Chitinase of *Mucor circinelloides* that Immobilized by using Agar

Lucia Crysanthi Soedirga*, Hardoko & Natasha Vania Widiyanto

Program Studi Teknologi Pangan, Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Pelita Harapan, Karawaci-Tangerang, Indonesia

*Corresponding author, email: lucia.soedirga@uph.edu

Submitted 17 May 2019 Revised 29 October 2019 Accepted 06 December 2019

Abstrak Hidrolisis kitin menjadi N-asetilglukosamin (NAG) dapat dilakukan secara enzimatik dengan menggunakan enzim kitinase yang diperoleh dari fermentasi menggunakan kapang kitinolitik. *Mucor circinelloides* merupakan salah satu contoh kapang kitinolitik yang dapat menghasilkan kitinase semi murni dan berperan dalam fermentasi kitin cangkang udang windu (*Penaeus monodon*). Kitinase semi murni yang dihasilkan pada penelitian ini akan diimobilisasi pada polimer agar untuk mempertahankan kestabilan aktivitasnya dalam memproduksi NAG. Penelitian ini bertujuan untuk menentukan konsentrasi agar (3,4,5, dan 6%) dan jumlah enzim (0,2; 0,4; 0,6; 0,8; dan 1 mL) terbaik dalam produksi NAG. Hasil penelitian menunjukkan bahwa 0,6 ml kitinase semi murni yang diimobilisasi ke dalam 3% polimer agar mampu menghasilkan NAG dengan kadar tertinggi, yakni 1111,667 ppm. Selain itu, aktivitas enzim kitinase sebelum dan sesudah diimobilisasi dengan polimer agar cukup stabil yakni sebesar 4,78 U/mL.

Kata kunci: Agar; imobilisasi; kitin; kitinase; N-asetilglukosamin; udang windu

Abstract Hydrolysis of chitin into N-acetylglucosamine (NAG) can be done enzymatically by using chitinase enzyme that obtained from the fermentation with chitinolytic molds. *Mucor circinelloides* is one example of chitinolytic mold that can produce semi purified chitinase enzyme during the fermentation of chitin from black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) shell. The semi purified chitinase enzyme that obtained in this research will be immobilized into the agar polymer to the extent of its stability during NAG production. This research was aimed to investigated the best concentration of agar (3,4,5, and 6%) and the best amount of added enzyme (0.2; 0.4; 0.6; 0.8; and 1 mL) toward the production of NAG. The result showed 0.6 ml of semi purified chitinase that immobilized into 3% of agar can produced NAG within the concentration 1111.667 ppm. Moreover, this enzyme considerably stable before and after immobilization within the value of 4.78 U/mL.

Keywords: Agar; immobilization; chitin; chitinase; N-acetylglucosamine; black tiger shrimp

PENGANTAR

Udang windu merupakan salah satu komoditas ekspor udang utama di Indonesia, yakni mencapai 138.000 ton pada tahun 2017 (KKP, 2017). Namun, ekspor udang ini biasanya meninggalkan limbah berupa cangkang yang terdiri dari kepala, kulit, kaki, dan ekor. Jumlah limbah dari cangkang ini dapat mencapai hingga sekitar 60-70% dari berat udang. Cangkang udang mengandung kitin hingga sekitar 20-25% dari berat udang. Kitin dapat diubah menjadi turunannya yaitu kitosan dan N-asetilglukosamin (NAG). NAG merupakan senyawa yang terdiri dari glukosa dan asam amino glutamin dan dapat menghasilkan cairan sinovial dalam tubuh yang berfungsi sebagai pelumas pada tulang rawan (Hamed *et al.*, 2016; Herowati, 2014).

Kitin dapat diubah menjadi NAG melalui reaksi kimia dan enzimatik. Metode enzimatik merupakan salah satu metode yang paling sering digunakan karena lebih ramah lingkungan, sederhana, dan cepat menghasilkan senyawa

turunan kitin. Metode ini dilakukan dengan menggunakan kitinase yang dihasilkan dari mikroba kitinolitik. Beberapa contoh mikroba kitinolitik yang dapat menghasilkan kitinase diantaranya adalah *Mucor circinelloides* (kadar NAG = 2,915 ppm) dan *Providencia stuartii* (kadar NAG = 2,084 ppm) (Febrianto, 2018; Teja, 2018). Produksi NAG dengan menggunakan kitinase yang dihasilkan oleh *Mucor circinelloides* tersebut cukup tinggi sehingga merupakan salah satu cara yang dapat dilakukan untuk mengurangi produksi limbah. Namun, produksi enzim cukup sulit karena prosesnya cukup lama dan cenderung tidak stabil (Zdarta *et al.*, 2015; Prakash *et al.*, 2018).

Salah satu cara yang digunakan untuk meningkatkan kestabilan enzim adalah dengan imobilisasi karena enzim dapat dipisahkan pada bagian akhir reaksi sehingga dapat digunakan kembali pada reaksi berikutnya (Thirumavalavan & Lee, 2015). Salah satu faktor yang mempengaruhi imobilisasi enzim adalah media pengimobilisasinya. Salah satu contoh media penjerat yang dapat digunakan adalah

polimer agar. Polimer agar memiliki sifat inert sehingga ideal digunakan sebagai media pengimobil enzim (Prakash & Jaiswal, 2011).

Penelitian yang dilakukan oleh Veronica (2018) telah menentukan kondisi optimal dalam produksi NAG dengan menggunakan enzim ekstraseluler semi murni yang dihasilkan oleh *Mucor circinelloides*, namun imobilisasi enzim tersebut belum dilakukan sehingga pada penelitian ini polimer agar akan digunakan sebagai media pengimobil dalam imobilisasi enzim kitinase semi murni yang dihasilkan oleh *Mucor circinelloides* dengan menentukan konsentrasi agar dan jumlah enzim terbaik dalam produksi NAG.

BAHAN DAN METODE

Bahan

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah cangkang udang windu (*Penaeus monodon*) yang diperoleh dari PT. Lola Mina Jakarta Utara, isolat kapang *Mucor circinelloides* dari penelitian Veronica (2018), agar bubuk (Agarpac), standar NAG (Sigma Aldrich Pte, Lid), 3-5-dinitrosalicylic acid/DNS (Sigma Aldrich), media *Potato Dextrose Agar* (Merck), media *Potato Dextrose Broth* (Merck), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (Merck), NaOH 10N (Merck), HCl 1M (Smart Lab), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Merck), $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (Merck), Na-K-Tartrat 4% (Sigma Aldrich), CaCl_2 3% (Merck), *coomassie brilliant blue Blue G-250 Dye* (ThermoFisher Scientific), *Bovine Serum Albumin* (Sigma Aldrich), K_2PO_4 (Merck), KH_2PO_4 (Merck). Sedangkan alat yang digunakan adalah blender kering (Panasonic, MX-GX-1462), pH meter (Methrohm, 913), *heater* (Cimarex), spektrofotometer visible (Thermoscientific Genesys 20), spektrofotometer UV-Visible (Thermoscientific Genesys 10), tanur (Thermolyne, 48000), *centrifuge* (MPW, 223e), hemasitometer (Neubauer), mikroskop cahaya (Olympus, CX 31), kamera mikroskop (Olympus, DP 21), alat-alat gelas (Iwaki Pyrex), timbangan analitik (Ohaus U-1800 AR 2140), kuvet kuartz (Helma Analytic).

Metode

Metode yang digunakan pada penelitian ini adalah metode eksperimental yang terdiri dari penelitian pendahuluan dan penelitian utama. Penelitian pendahuluan terdiri dari pembuatan dan karakterisasi tepung cangkang udang windu, karakterisasi kitin, pembuatan kultur stok kapang *Mucor circinelloides*, pembuatan media fermentasi, produksi enzim kitinase dari kapang *Mucor circinelloides*, dan pemurnian enzim kitinase sehingga didapatkan enzim kitinase semi murni yang mengacu pada penelitian Jenifer *et al.* (2014) dengan modifikasi. Pada penelitian utama, imobilisasi enzim kitinase semi murni akan dilakukan pada berbagai variasi konsentrasi agar dan jumlah enzim dalam proses fermentasi untuk mendapatkan kadar NAG tertinggi.

Pembuatan dan karakterisasi tepung cangkang udang windu
Karakterisasi tepung cangkang udang windu yang digunakan pada penelitian ini diawali dengan pembuatan tepung dari cangkang udang windu yang mengacu pada Agustina *et al.* (2007) dengan modifikasi. Cangkang udang windu yang sudah dibersihkan akan dikeringkan dibawah

sinar matahari selama dua hari. Cangkang udang windu yang sudah kering kemudian dikecilkan ukurannya dengan blender kering hingga diperoleh tepung. Selanjutnya, tepung ini akan dikarakterisasi yang meliputi rendemen, kadar air, kadar abu, dan kadar protein

Pembuatan dan karakterisasi kitin

Tepung cangkang udang yang dihasilkan akan mengalami proses demineralisasi dan deproteinasi secara bertahap untuk menghilangkan mineral dan protein. Proses ini mengacu pada Agustina *et al.* (2007) dengan modifikasi. Proses demineralisasi dilakukan dengan mencampur tepung cangkang udang dengan larutan HCl 37% 1M (1:10). Campuran dipanaskan pada suhu 75°C selama 2 jam lalu dicuci hingga pH nya netral dan dikeringkan selama 24 jam pada suhu 60°C. Tepung cangkang udang yang sudah mengalami demineralisasi kemudian akan direndam dalam NaOH 3,5% (1:10) dan dipanaskan pada suhu 80°C selama 2 jam. Endapan yang terbentuk kemudian akan dicuci menggunakan air demin hingga pH nya netral. Serbuk kitin diperoleh setelah proses pengeringan dengan selama 24 jam pada suhu 60°C. Kitin yang diperoleh kemudian akan dianalisis dengan menggunakan FTIR (*Fourier Transform Infrared*).

Perhitungan jumlah spora kapang *Mucor circinelloides*

Perhitungan jumlah spora kapang dilakukan berdasarkan metode Ishmayana *et al.* (2012), yakni dengan mengambil 1 mL sel kapang yang sudah ditumbuhkan di dalam PDB (*Potato Dextrose Broth*), lalu dicampur dengan biru metilen dengan rasio 1:5. Sebanyak 60 μL campuran tersebut kemudian diambil dan dimasukkan ke dalam hemasitometer untuk dihitung jumlah spora kapangnya. Perhitungan jumlah spora kapang dilakukan dengan menggunakan rumus sebagai berikut:

$$\text{Jumlah spora kapang (spora/mL)} = \text{rata-rata jumlah spora} \times 25 \text{ kotak} \times 10^4$$

Pembuatan media fermentasi

Media fermentasi yang digunakan pada penelitian ini bertujuan untuk menghasilkan enzim kitinase yang mengacu pada Jenifer *et al.* (2014), yakni terdiri dari PDB, 1,5% kitin, 0,5% MgSO_4 , dan 0,5% Na_2HPO_4 yang kemudian akan disterilisasi dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit.

Produksi dan pemurnian kitinase

Produksi enzim kitinase dari kapang *Mucor circinelloides* mengacu pada penelitian Jenifer *et al.* (2014) dengan modifikasi. Inokulum kapang *Mucor circinelloides* akan dicampur ke dalam media *Potato Dextrose Broth* (PDB) yang mengandung kitin, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ dan $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Setelah diinkubasi selama 48 jam pada suhu ruang, kemudian media produksi disentrifugasi dengan kecepatan 3500 rpm selama 10 menit. Supernatan yang dihasilkan merupakan ekstrak kasar dari kitinase yang selanjutnya akan dimurnikan dengan menggunakan ammonium sulfat 70% melalui metode pengendapan selama 3 jam pada suhu 4°C. Endapan yang didapat setelah proses sentrifugasi merupakan endapan kitinase semi murni. Endapan ini kemudian ditimbang dan dinyatakan sebagai berat endapan kitinase semi murni. Endapan ini kemudian dicampur dengan *buffer* fosfat hingga pH optimum larutannya mencapai pH 8. Rendemen enzim diperoleh

dengan membagi berat endapan kitinase semi murni dengan total media fermentasi lalu dikalikan 100%.

Imobilisasi enzim kitinase semi murni

Proses imobilisasi enzim kitinase mengacu pada penelitian [Prakash & Jaiswal \(2011\)](#). Larutan agar dengan berbagai konsentrasi (3,4,5,dan 6%) yang sudah didinginkan hingga 40°C kemudian ditambahkan larutan enzim (0,2; 0,4; 0,6; 0,8 dan 1 mL) dan buffer fosfat pH 8 hingga volume total larutan enzimnya mencapai 1 mL. Campuran larutan tersebut kemudian dimasukkan ke dalam suntikan dan diteteskan ke dalam larutan CaCl₂ 3% hingga terbentuk manik-manik dengan diameter ±0,4 mm. Manik-manik yang terbentuk kemudian disaring dan dicuci dengan akuades steril lalu dicampurkan dengan media fermentasi kitin dan *buffer fosfat* pH 8. Fermentasi dilakukan selama 2 jam pada suhu 40°C yang merupakan suhu optimum aktivitas enzim. Supernatan yang terbentuk dari hasil fermentasi kemudian diuji kadar NAG nya.

Pengukuran kadar NAG

Pengukuran kadar NAG mengacu pada penelitian yang dilakukan oleh [Rahmansyah & Sudiana \(2003\)](#) berdasarkan metode DNS (3,5-dinitrosalicylic-acid). Tahapan yang dilakukan untuk menghitung kadar N-asetilglukosamin terdiri dari pembuatan kurva standar glukosamin dan analisis kadar N-asetilglukosamin dengan spektrofometri UV-Vis pada panjang gelombang 540 nm. Selain itu, pengukuran aktivitas kitinase sebelum dan sesudah imobilisasi dilakukan berdasarkan metode Miller. Metode Miller dilakukan dengan cara melarutkan 1,5 % substrat kitin ke dalam 1 mL *buffer*. Campuran ini kemudian direaksikan dengan 1 mL kitinase yang belum diimobilisasi atau dengan 1 mL kitinase yang sudah terimobilisasi dalam manik-manik penjerat, lalu diinkubasi selama satu jam pada suhu 40°C. Sebanyak 1 mL dari larutan hasil inkubasi pada kondisi optimum ini kemudian dicampur dengan 2 mL DNS (3-5-dinitrosalicylic acid) dan 1 mL Na-Ka-tartrat 4%. Campuran selanjutnya dipanaskan pada suhu 100°C selama 5 menit untuk mempercepat reaksi. Campuran kemudian diencerkan dengan akuades (1:4) lalu dilakukan pengukuran absorbansi pada panjang gelombang 540 nm. Aktivitas enzim kitinase sejumlah 1 unit menyatakan jumlah enzim yang dibutuhkan untuk menghasilkan 1 µmol N-asetilglukosamin dalam 1 jam.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil

Proses demineralisasi dan deproteinasi yang dilakukan pada tepung cangkang udang akan menyebabkan penurunan kadar abu dan kadar protein pada kitin yang dihasilkan. Berdasarkan Tabel 1, kadar abu dan kadar protein dari kitin (0,23±0,02 % dan 0,8±0,02 %) lebih rendah daripada kadar abu dan kadar protein tepung cangkang udang (38,52 ±0,02% dan 17,64±0,02 %). [BSN \(2013\)](#) menyatakan bahwa kadar abu maksimal pada kitin adalah 5% dan semakin rendah kadar abu yang dihasilkan maka menunjukkan proses demineralisasinya berjalan dengan baik. Hasil yang didapat pada penelitian ini telah sejalan dengan teori yang ada.

Kitin pada penelitian ini tergolong dalam standar mutu 1 karena kadar protein yang dihasilkan dibawah 1,5%, yakni 0,8% ([Waltam, 2009](#)). Hasil ini juga menunjukkan bahwa proses deproteinasi telah berjalan dengan baik sehingga menghasilkan kadar protein yang semakin rendah. Proses demineralisasi dan deproteinasi ini juga akan mengakibatkan terjadinya penurunan rendemen menjadi 20±0,02 %.

Tepung cangkang udang akan mengalami penurunan kadar air selama proses preparasi hingga menjadi kitin karena adanya penguraian komponen kalsium karbonat selama proses demineralisasi ([Younes & Rinaldo, 2015](#)). Hasil kadar air kitin pada Tabel 1 juga telah sesuai dengan [BSN \(2013\)](#), yakni maksimal sebesar 12%.

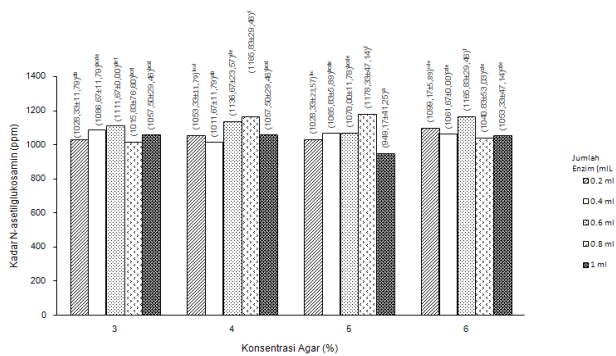
Tabel 1. Karakteristik tepung cangkang udang dan kitin.

Parameter	Tepung cangkang udang	Kitin
Kadar air (%)	9,53±0,24	5,63±0,10
Kadar abu (%)	38,52±0,28	0,23±0,02
Kadar protein (%)	17,64±0,81	0,8±0,02
Rendemen (%)	31,76±0,10	20,2±0,18
Derajat asetilasi (%)	-	67,15

Pengukuran derajat asetilasi hanya dilakukan pada kitin untuk memastikan kitin yang dihasilkan setelah proses demineralisasi dan deproteinasi memiliki tingkat kemurnian tinggi dan bukan termasuk kitosan ([Li et al., 2016](#)). Nilai derajat asetilasi yang diperoleh sudah sesuai dengan standar [BSN \(2013\)](#), yakni diantara 10-65% sehingga dapat disimpulkan bahwa kitin yang dihasilkan pada penelitian ini sudah mengalami proses demineralisasi dan deproteinasi yang optimal.

Kitin ini selanjutnya akan digunakan sebagai media fermentasi yang akan diinokulasikan dengan kapang *Mucor circinelloides*. Sebelum digunakan, jumlah spora kapang dihitung terlebih dahulu untuk memastikan bahwa kapang tersebut dapat menghasilkan enzim kitinase. Penelitian yang dilakukan oleh [Jenifer et al. \(2014\)](#) menunjukkan bahwa 8x10⁶ spora/mL sudah mampu menghasilkan enzim kitinase, sedangkan pada penelitian ini, jumlah spora kapangnya adalah 1,39x10⁸ spora/mL.

Enzim kitinase yang dihasilkan kemudian diendapkan dengan garam ammonium sulfat hingga diperoleh ekstrak semi murni kitinase. Rendemen enzim yang didapat adalah sebesar 0,0084±0,0004%. Enzim kitinase semi murni yang dihasilkan selanjutnya akan diimobilisasi dengan polimer agar berdasarkan metode penjeratan. Sebelum diimobilisasi, aktivitas enzim kitinase semi murni ini adalah 4,78 U/mL.



Gambar 1. Pengaruh konsentrasi agar dan jumlah enzim dalam imobilisasi terhadap kadar NAG.

Keterangan: Notasi huruf superskrip berbeda pada diagram batang menunjukkan adanya perbedaan nyata ($p < 0,05$)

Hasil statistik ANOVA menunjukkan bahwa konsentrasi agar tidak berpengaruh signifikan ($p > 0,05$) terhadap kadar N-asetilglukosamin yang dihasilkan. Namun, jumlah enzim dan interaksi antara konsentrasi agar dan jumlah enzim berpengaruh nyata ($p < 0,05$) terhadap kadar N-asetilglukosamin. Berdasarkan Gambar 1, dapat dilihat bahwa 3% agar yang diimobilisasi ke dalam 0,6 ml enzim kitinase semi murni mampu menghasilkan NAG sebesar 1111,667 ppm.

Larutan enzim dan agar pada metode penjeratan ini akan membentuk ikatan silang sehingga akan terbentuk struktur yang mampu menjerat gel. Konsentrasi agar yang terlalu tinggi dapat menurunkan efisiensi matriks gel yang terbentuk dan membatasi enzim yang dapat keluar, sedangkan konsentrasi agar yang terlalu rendah ($< 1\%$, b/v) dapat menyebabkan kerusakan pada gel karena rendahnya kekuatan mekanis lapisan dan dapat memicu kebocoran dinding sel matriks sehingga proses imobilisasi tidak dapat berjalan dengan baik.

Metode penjeratan ini memiliki kelebihan yakni dapat mengurangi pelepasan enzim dan meningkatkan kestabilan enzim. Pada penelitian ini, aktivitas enzim, kitinase semi murni setelah diimobilisasi, khususnya pada konsentrasi agar 3% adalah 4,78 U/mL. Nilai aktivitas enzim ini setara dengan sebelum imobilisasi. Hal ini menunjukkan bahwa proses imobilisasi enzim kitinase semi murni pada agar dalam penelitian ini dapat menjaga stabilitas enzimnya. Hasil penelitian ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Minter (2017), bahwa kemampuan agar dalam dalam menjerat gel mampu meningkatkan kestabilan enzim. Selain itu, hasil dari penelitian ini juga mengindikasikan adanya potensi penggunaan enzim kitinase semi murni terimobil pada proses fermentasi berulang dalam menghasilkan NAG.

KESIMPULAN DAN SARAN

Kesimpulan

Kadar N-asetilglukosamin yang paling tinggi, yakni sebesar 1111,667 ppm didapatkan pada penggunaan 0,6 ml enzim kitinase semi murni dari kapang *Mucor circinelloides* yang

diimobilisasikan dengan polimer agar pada konsentrasi 3%. Proses imobilisasi dengan polimer agar ini dapat menjaga stabilitas enzim. Hal ini terlihat dari aktivitas enzim sebelum dan sesudah imobilisasi menunjukkan nilai yang sama yakni sebesar 4,78 U/mL.

Saran

Penelitian lebih lanjut perlu dilakukan penggunaan berulang selama proses fermentasi dari enzim kitinase semi murni terimobil pada agar dalam menghasilkan NAG.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih ditujukan kepada Lembaga Penelitian dan Pengabdian kepada Masyarakat Universitas Pelita Harapan (LPPM-UPH) karena telah mendanai penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Agustina, S., I.M.D. Swantara & I.N. Suartha. 2015. Isolasi kitin, karakterisasi, dan sintesis kitosan dari kulit udang. *Jurnal Kimia* 9. (2): 271-278
- Badan Standarisasi Nasional [BSN]. 2013. SNI 7948:2013. "Kitin: Syarat Mutu dan Pengolahan." Badan Standarisasi Nasional, Jakarta
- Febrianto, R. 2018. Optimum condition for N-Acetylglucosamine production from tiger shrimp (*Penaeus monodon*) shell using extracellular crude chitinase enzyme from *Mucor circinelloides*. Skripsi, Universitas Pelita Harapan, Tangerang
- Hamed, I., F. Özogul & J.M. Regenstein. 2016. Industrial applications of crustacean by-products (chitin, chitosan, and chitooligosaccharides): A review. *Trends in Food Science & Technology*. 48: 40-50
- Herowati, R. 2014. Obat dan suplemen untuk *osteoarthritis*. *Jurnal Pharmacy*. 11 (1): 40-48
- Ishmayana, S., Alfitri, D. Sadiyah, D.R. Saadah & S. Agus. 2012. Kinerja fermentasi ragi *Saccharomyces cerevisiae* pada media VHG dengan variasi konsentrasi ekstrak ragi sebagai sumber nitrogen untuk produksi bioetanol. *Seminar Nasional Kimia dan Pendidikan Kimia* (312-317)
- Jenifer, S., J. Jeyasree, Kezia, D. Laveena & K. Manikandan. 2014. Purification and characterization of chitinase from *Trichoderma viride* N9 and its antifungal against phytopathogenic fungi. *World Journal of Pharmacy Sciences*. 3 (12): 1604-1611
- Kementrian Kelautan dan Perikanan (KKP). 2017. MEA Centre. Sektor Kelautan dan Perikanan
- Li, J., F. Yao, Y. Yin & K. De Yao. 2016. From chitin to chitosan. In *Chitosan-Based Hydrogels*. CRC Press. 7-43
- Minter, S.D. 2017. Enzyme Stabilization and Immobilization. New York, NY: Springer New York
- Prakash, J., R.K. Gupta, X.X. Priyanka & V.C. Kalia. 2018. Bioprocessing of biodiesel industry effluent

- by immobilized bacteria to produce value-added products. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 185 (1): 179-190
- Prakash, O.N & Jaiswal. 2011. Immobilization of a thermostable α -Amylase on agarose and agar matrices and its application in starch stain removal. *World Applied Science Journal*. 13: 572-577
- Rahmansyah, M., & Sudiana, M. 2003. Optimasi analisis amilase dan glukonase yang diekstrak dari miselium *Pleurotus ostreatus* dengan asam 3,5 dinitrosalisilat. *Jurnal Penelitian Hayati* 9 (1) : 7-12
- Teja, E. 2018. Optimasi Produksi N-Asetilglukosamin dari Kulit Udang Windu dengan Menggunakan Enzim Kitinase Intraseluler Semi Murni *Providencia stuartii*. Skripsi. Universitas Pelita Harapan, Tangerang
- Thirumavalavan, M & J.F. Lee. 2015. A short review on chitosan membrane for biomolecules immobilization. *Journal of Molecular and Genetic Medicine*. 9 (178): 1747-0862
- Veronica. 2018. Isolasi dan Identifikasi Kapang Penghidrolisis Kitin yang Diisolasi dari Kitin Kulit Udang Windu (*Penaeus monodon*). Skripsi, Universitas Pelita Harapan
- Waltam, D.R. 2009. Demineralisasi dan Deproteinasi Kulit Udang Secara Kontinyu pada Tahapan Ekstraksi Kitin Secara Biologis. Skripsi, Universitas Indonesia, Depok
- Younes, I & Rinaudo. 2015. Chitin and chitosan preparation from marine sources. Structure, Properties and Application. *Marine Drugs*. 13: 1133-1174
- Zdarta, J., L. Klapiszewski, M. Wysokowski, M. Norman, A, Kołodziejczak-Radzimska, D. Moszyński & T. Jesionowski. 2015. Chitin-lignin material as a novel matrix for enzyme immobilization. *Marine Drugs*. 13 (4): 2424-2446

