

PRODUKSI N-ASETILGLUKOSAMIN DARI KITIN MENGGUNAKAN CRUDE KITINASE DARI ISOLAT BAKTERI SUMBER AIR PANAS BORA

PRODUCTION OF N-ACETYLGLUCOSAMINE FROM CHITIN BY USING CRUDE CHITINASE FROM BACTERIAL ISOLATE OF BORA HOT SPRING

Jaya Hardi, Ruslan, Syaiful Bahri, Nuranisa H. Sulano

Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Tadulako

E-mail: jr.hardi0803@gmail.com

Abstrak

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui waktu hidrolisis optimum pada pembentukan senyawa N-asetilglukosamin hasil degradasi kitin amorf oleh crude kitinase dari isolat bakteri B1211 asal air panas Bora dan untuk mengetahui karakteristik N-asetilglukosamin. Rancangan penelitian yang digunakan adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) yang terdiri atas lima taraf perlakuan waktu hidrolisis, yaitu 24, 48, 72, 96, dan 120 jam. Konsentrasi N-asetilglukosamin ditentukan menggunakan Spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 420 nm. Waktu hidrolisis optimum yang dihasilkan ditunjukkan pada waktu 48 jam dengan konsentrasi N-asetilglukosamin hasil sintesis 409,67 µg/mL. N-asetilglukosamin yang diperoleh berwujud serbuk kuning pudar, memiliki titik leleh 213°C, kadar air 0,89% dan panjang gelombang maksimum 423 nm.

Kata kunci: kitinase, N-asetilglukosamin, isolat bakteri B1211, air panas bora

Abstract

The objective of this research was to determine optimum hydrolysis times for production and characterization of N-Acetylglucosamine. It was obtained from amorphous chitin degradation by crude chitinase that extracted from the B1211 bacterial isolate of Bora hot spring. Hydrolysis method used Completely Randomized Design by time hydrolysis variable of 24, 48, 72, 96, and 120 hours. N-Acetylglucosamine concentration was determined by spectrophotometer Uv-Vis at a wavelength of 420 nm. The result showed optimum hydrolysis time of 48 hours with the N-Acetylglucosamine concentration of 409.67 µg/mL. The appearance of N-Acetylglucosamine is a pale yellow powder with boiling point, water content and the maximum wavelength of 213°C, 0.89%, and 423 nm, respectively.

PENDAHULUAN

Kitin adalah senyawa homopolisakarida yang dapat dihidrolisis menjadi monomer N-asetilglukosamin (GlcNAc) secara kimiawi maupun enzimatis (Howard *et al.*, 2003). N-asetilglukosamin umumnya dimanfaatkan untuk perawatan kulit, mengontrol fungsi usus, meningkatkan daya ingat, dan memacu perkembangan bifidobakterium yang bermanfaat bagi tubuh manusia (Aiba, 2009). Senyawa kitin dapat dihidrolisis secara kimia menjadi N-asetilglukosamin menggunakan asam

pekat, seperti HCl (Chen *et al.*, 2010). Penggunaan asam menghasilkan rendemen yang cenderung kecil (<65%) dan kurang ramah lingkungan (Sashiwa *et al.*, 2002). Hidrolisis kitin juga dapat dilakukan dengan metode enzimatis menggunakan enzim kitinase. Metode enzimatis lebih menguntungkan dibandingkan metode kimiawi karena ramah lingkungan dan tidak menghasilkan produk samping (Howard *et al.*, 2003).

Enzim kitinase (E.C. 3.2.1.14) dapat diproduksi dari beberapa jenis bakteri kitinolitik yang diisolasi dari berbagai

sumber (Heryastuti *et al.*, 2009), diantaranya dari sumber air panas (Purwani *et al.*, 2008, Muhamni, 2010), tanah dan lumpur (Suryanto *et al.*, 2005), serta dari sumber perairan seperti laut (Chasanah *et al.*, 2009). Beberapa jenis mikroorganisme telah dilaporkan memiliki aktivitas kitinolitik, diantaranya *Bacillus sp.* (Nurdebyandaru *et al.*, 2010), *Serratia marcescens* (Patil *et al.*, 2000), *Staphylococcus sp.* (Basu & Chaudhuri, 2013), dan *Streptomyces sp.* (Uma *et al.*, 2012).

Penggunaan bakteri termofil dari air panas banyak mendapatkan perhatian karena mampu menghasilkan kitinase yang tahan pada suhu termofil. Hardi *et al.*, (2016) telah mengisolasi bakteri termofil kitinolitik dan menghasilkan isolat B1211 yang dapat menghasilkan kitinase dengan akivitas 0,75 U/ml. Aktivitas tersebut cukup tinggi dan sangat potensial untuk dimanfaatkan pada produksi N-asetilglukosamin.

Proses produksi N-asetilglukosamin dari senyawa kitin menggunakan kitinase dipengaruhi oleh beberapa faktor diantaranya waktu inkubasi, suhu, pH, dan konsetrasi substrat (Kamil *et al.*, 2007). Jamialahmadi *et al.*, (2011), memproduksi N-asetilglukosamin dari *Aeromonas sp.* PTCC1691 pada waktu 24 jam, sedangkan Widhyastuti (2007) menggunakan waktu 48 jam untuk produksi N-asetilglukosamin dengan enzim dari *Aspergillus rugulosus* 501. Waktu inkubasi digunakan sebagian kajian awal untuk produksi N-Asetilglukosamin dari isolat B1211 asal air panas Bora.

METODE

Bahan dan Alat

Bahan dasar yang digunakan dalam penelitian ini adalah isolat bakteri B1211

hasil isolasi dari sumber air panas Bora, buffer fosfat pH 7, N-asetil-D-glukosamin standar, kitin amorf, media MSM (Media Sintetik Minimum) (0.08% KH₂PO₄, 0.4% (NH₄)₂SO₄, 1% NaCl, dan 1% ekstrak ragi), sodium dodesil sulfat (SDS), akuades, aseton, dan etanol 96%.

Peralatan yang digunakan berupa spektrofotometer UV-Vis (PerkinElmer), inkubator (POL-EKO Aparatura), Laminar Air Flow (Esco Class II BSC), thermoshake (Gerhardt), spektrofotometer FT-IR (Platinum-ATR), autoklaf (Hirayama), mikropipet (Labopette), tabung eppendorf, pH meter (Lamotte), sentrifugator (Eppendorf Centrifuge 5810), penangas air (Memmert), neraca analitik (Ohaus Corp. Pine Brook), tip, melting point apparatus (Stuart), dan alat-alat gelas yang umum digunakan dalam Laboratorium Kimia.

Rancangan Penelitian

Penelitian ini dilakukan menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) pada proses produksi N-asetilglukosamin. Variabel bebas yang digunakan adalah waktu inkubasi yang terdiri atas 5 taraf, yaitu 24, 48, 72, 96, dan 120 jam, sedangkan variabel terikat berupa konsentrasi N-asetilglukosamin.

Prosedur Kerja

Produksi crude kitinase dari isolat bakteri B1211

Produksi enzim kitinase menggunakan metode Hardi *et al.* (2016) yang diawali dengan mengambil sebanyak 1 mL inokulum dan dipindahkan pada media starter yaitu media MSM cair (tanpa koloidal kitin) dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Langkah selanjutnya diambil sebanyak 1 mL dan dipindahkan pada media produksi (MSM cair diperkaya koloidal kitin 1,0 %).

Selanjutnya diinkubasi menggunakan termoshake pada kecepatan 60 rpm selama 3 hari pada suhu 50°C. Larutan hasil pengocokan selanjutnya disentrifugasi pada kecepatan 10.000 rpm selama 15 menit. Supernatan yang diperoleh merupakan ekstrak kitinase yang digunakan pada produksi N-asetilglukosamin. Aktivitas kitinase ditentukan dengan menggunakan metode Ueda & Arai (1992) dengan menggunakan reagen Schales. Aktivitas ekstrak enzim ditentukan berdasarkan jumlah N-Asetilglukosamin yang dibebaskan selama hidrolisis substrat kitin. Satu unit aktivitas kitinase didefinisikan sebagai jumlah enzim yang dibutuhkan untuk menghasilkan 1 μmol residu N-Asetilglukosamin permenit setelah diinkubasi dengan larutan kitin.

Produksi N-asetilglukosamin

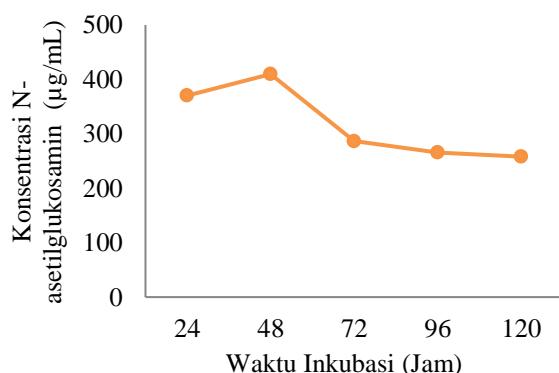
Produksi N-asetil-D-glukosamin dilakukan dengan menggunakan metode Setthakaset *et al.*, (2008) dengan beberapa modifikasi. Suspensi Kitin amorf 1% dilarutkan dalam buffer fosfat pH 7 dan ditambahkan dengan crude kitinase kemudian diinkubasi selama 24, 48, 72, 96, dan 120 jam dengan pengocokan 120 rpm pada suhu 50°C. Setelah diinkubasi, larutan dididihkan selama 15 menit, kemudian dinginkan pada suhu kamar. Setelah itu, larutan disentrifugasi selama 10 menit pada kecepatan 4000 rpm dan diambil supernatannya. Supernatan selanjutnya dicuci dengan etanol 96% selama 30 menit sambil diaduk dengan pengaduk magnetik dan selanjutnya disaring. Endapan yang diperoleh selanjutnya dikeringkan dalam oven vakum dan ditentukan konsentrasi N-asetilglukosamin, spektrum UV-Vis, FTIR, kadar air, dan titik lelehnya.

HASIL DAN PEMBAHASAN

N-Asetilglukosamin Hasil Sintesis

Deteksi kinerja ekstrak kitinase terlihat dari pengukuran aktivitas selama mendegradasi substrat(koloidal kitin). Aktivitas kitinase merupakan ukuran jumlah produk yang dihasilkan dari suatu pemecahan substrat kitin. Satu unit aktivitas kitinase didefinisikan sebagai pelepasan 1 μmol gula reduksi (N-asetilglukosamin) per menit (Ueda & Arai, 1992). Aktivitas kitinase yang dihasilkan pada cukup tinggi, yaitu 0,67 U/mL atau sedikit lebih rendah dibandingkan penelitian Hardi *et al.*, (2016) dengan isolat yang sama.

Substrat yang digunakan pada produksi N-asetilglukosamin adalah kitin jenis amorf. Kitin amorf memiliki morfologi yang lebih terbuka, sehingga lebih mudah berinteraksi dengan kitinase dan pada akhirnya dapat memberikan aktivitas kitinase yang lebih tinggi dibandingkan dengan substrat jenis lainnya (Herdyastuti *et al.*, 2015). Pembentukan N-asetilglukosamin (GlcNAc) mengalami peningkatan hingga pada waktu 48 jam dan menurun setelahnya (Gambar 1).



Gambar 1. Konsentrasi N-asetilglukosamin Pada Variasi Waktu Inkubasi

Konsentrasi N-asetilglukosamin tertinggi terjadi pada waktu inkubasi 48

jam yaitu sebesar 409,67 µg/mL. Hal ini dikarenakan enzim mulai mendegradasi kitin dengan memutus ikatan glikosida yang menghubungkan antar monomer pada kitin sehingga terbentuk senyawa yang lebih sederhana dalam bentuk oligomer kitin dan monomer N-asetilglukosamin. Menurut Wulandari (2009), pada saat hidrolisis berlangsung sebagian kitin hanya terhidrolisis dalam bentuk oligomer dan belum terdegradasi secara sempurna menjadi monomer (N-asetilglukosamin).

Waktu inkubasi 72 jam terjadi penurunan jumlah N-asetilglukosamin. Turunnya konsentrasi N-asetilglukosamin dimungkinan karena enzim terdenaturasi selama reaksi berlangsung atau terjadi penghambatan saat proses pembentukan N-asetilglukosamin (Jamialahmadi *et al.*, 2011). Menurut Widayastuti (2007), senyawa oligomer dan N-asetilglukosamin hasil hidrolisis kitin oleh kitinase pada konsentrasi yang tinggi dapat menyebabkan inhibisi umpan balik, oleh karena N-asetilglukosamin yang terbentuk berlebih sebagai produk akhirnya.

Hasil uji sidik ragam pada taraf kepercayaan 95% menunjukkan bahwa waktu hidrolisis berpengaruh nyata terhadap konsentrasi N-asetilglukosamin yang dihasilkan. Uji lanjut Duncan menunjukkan konsentrasi N-asetilglukosamin pada waktu hidrolisis 120 jam berbeda nyata dengan waktu hidrolisis 24, 48, 72, dan 96 dengan konsentrasi N-asetilglukosamin tertinggi 409,67 µg/mL.

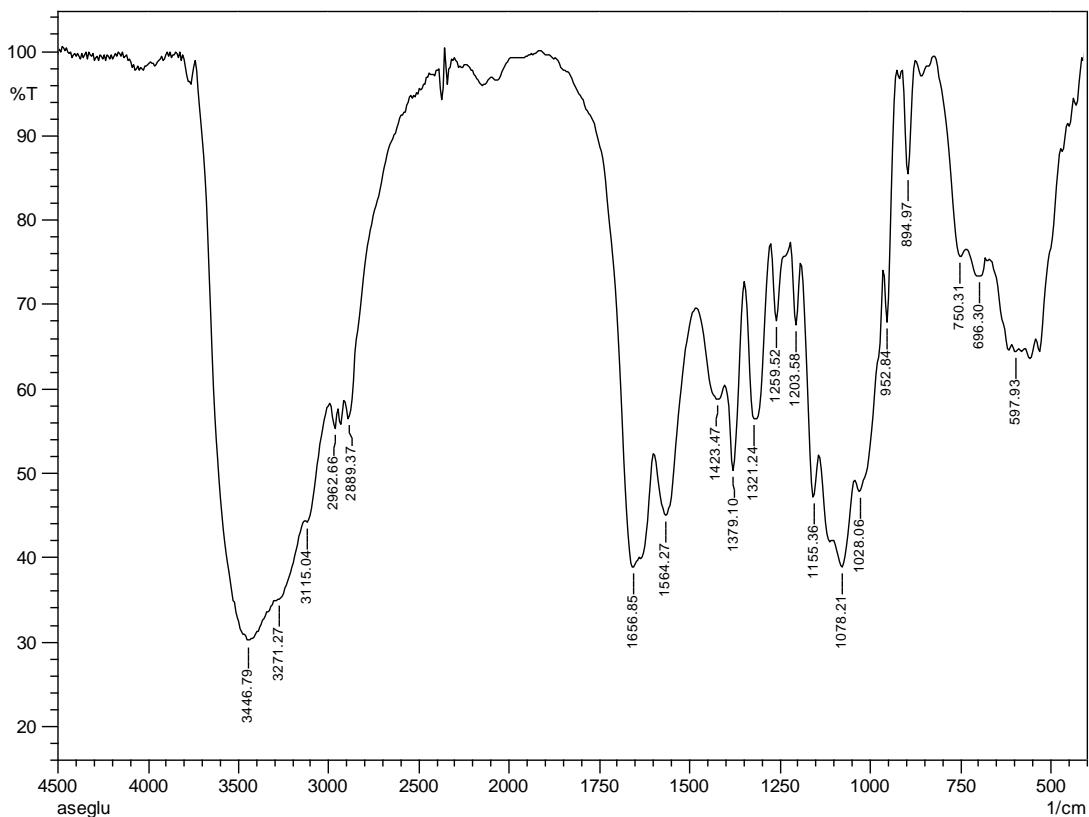
Penelitian Jamialahmadi *et al.* (2011) tentang produksi N-asetilglukosamin dari kitin menggunakan *crude* kitinase dari *Aeromonas sp.* PTCC1691 dan menghasilkan N-asetilglukosamin tertinggi (42%) pada

waktu inkubasi 24 jam. Wirawan & Herdyastuti (2013) melaporkan bahwa waktu inkubasi terbaik untuk produksi N-asetilglukosamin secara enzimatis menggunakan kitinase dari isolat bakteri *Pseudomonas sp.* TNH-54 adalah 36 jam dengan konsentrasi N-asetilglukosamin hasil sintesis 0,164 mg/mL.

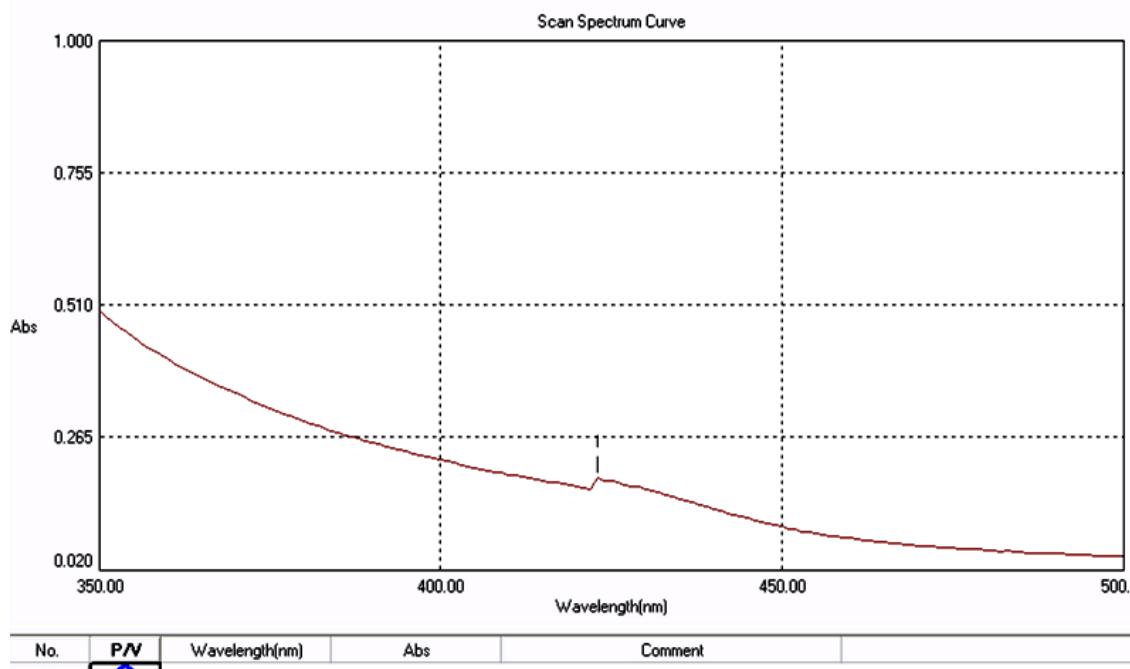
Karakteristik N-asetilglukosamin

a. Spektrum Infra Merah

Gugus fungsional N-asetilglukosamin hasil sintesis diidentifikasi menggunakan spektrofotometer infra merah (FT-IR) pada bilangan gelombang yang digunakan 4000-500 cm⁻¹. Hasil spektrum FTIR pada N-asetilglukosamin sintesis (Gambar 2) menunjukkan adanya serapan gugus -OH pada bilangan gelombang 3446,79 cm⁻¹ dan serapan vibrasi N-H ulur pada 3271,27 cm⁻¹. Serapan pada 2962,66 dan 2889,37 cm⁻¹ adalah vibrasi ulur gugus C-H metil dan metilen. Serapan pada bilangan gelombang 1656,85 cm⁻¹ dan 1564,27 cm⁻¹ menunjukkan adanya vibrasi ulur gugus C=O dan vibrasi tekuk N-H pada gugus fungsi amida senyawa N-asetilglukosamin hasil sintesis. Menurut Pavia *et al.* (2009), spektrum gugus C=O amida berada pada bilangan gelombang 1680-1630 cm⁻¹ dan N-H tekuk amida pada 1640-1550 cm⁻¹. Spektrum N-asetilglukosamin hasil sintesis sama dengan N-asetilglukosamin standar, utamanya serapan khas pada rentang bilangan gelombang 1680-1500 cm⁻¹ yang menunjukkan adanya dua pita kuat untuk serapan vibrasi ulur C=O amida dan vibrasi tekuk N-H amida (Mukti & Herdyastuti, 2016). Pita serapan pada bilangan gelombang 1078,21 dan 1028,06 cm⁻¹ menunjukkan adanya ikatan C-O-C atau ikatan glikosidik dengan kata lain masih terdapat oligomer atau dimer dari kitin.



Gambar 2. Spektrum IR N-asetilglukosamin Sintesis



Gambar 3. Spektrum UV-Vis N-asetilglukosamin Sintesis

b. Spektrum Uv-Vis senyawa N-asetilglukosamin hasil sintesis

Spektrum UV-Vis N-asetilglukosamin sintesis menghasilkan

panjang gelombang maksimum 423 nm (Gambar 3).

Hardi *et al.* (2016) melaporkan bahwa panjang gelombang maksimum N-

asetilglukosamin standar adalah 420 nm dengan menggunakan reagen Schales. Pergeseran panjang gelombang pada N-asetilglukosamin hasil sintesis yang berbeda dari panjang gelombang maksimum N-asetilglukosamin standar ini disebabkan karena N-asetilglukosamin hasil sintesis yang diperoleh masih mengandung oligomer dari kitin.

c. Sifat Fisik N-asetilglukosamin

Sifat fisik N-asetilglukosamin hasil sintesis ditinjau pada titik leleh, kadar air, bentuk, warna (Tabel 1).

Tabel 1. Sifat fisik N-asetilglukosamin Sintesis

Parameter	N-asetilglukosamin Sintesis	N-asetilglukosamin Standar*
Warna	Kuning Pudar	Putih
Bau	Tidak Berbau	Tidak Berbau
Titik Leleh	213°C	212°C
Kadar air	0,89%	0,77%

*Sumber: (Mukti & Herdyastuti, 2016)

Warna N-asetilglukosamin sintesis yang diperoleh berwarna kuning pudar. Hal ini tidak lepas dari sumber kitin yang digunakan berbeda. Kitin yang digunakan memiliki warna kuning pucat sehingga N-asetilglukosamin juga memiliki warna tersebut. Timbulnya wana dipengaruhi oleh pigmen udang yang masih terdapat pada kitin dalam jumlah kecil.

Titik leleh yang dihasilkan N-asetilglukosamin hasil hidrolisis enzimatis sebesar 213°C. Titik leleh yang dihasilkan berbeda dengan N-asetilglukosamin standar dikarenakan adanya senyawa lain yang mempengaruhi titik leleh. Perbedaan titik leleh N-asetilglukosamin hasil sintesis berbeda dengan N-asetilglukosamin standar dapat menandakan bahwa Nasetilglukosamin hasil sintesis yang diperoleh masih mengandung oligomer (Wardani *et al.*, 2010 diacu dalam Dewi *et al.*, 2016).

Kadar air N-asetilglukosamin hasil sintesis dipengaruhi oleh proses pengeringan, lama pengeringan, jumlah yang dikeringkan, dan luas permukaan tempat pengeringan (Agustina *et al.*, 2015). Kadar air N-asetilglukosamin hasil sintesis yang diperoleh adalah 0,89%. Nilai tersebut masih berada di bawah 1% atau batas maksimum produk sintesis untuk industri obat dan makanan.

SIMPULAN

Waktu hidrolisis terbaik untuk N-asetilglukosamin menggunakan crude kitinase isolat bakteri B1211 adalah 48 jam dengan konsentrasi N-asetilglukosamin yang diperoleh sebesar 409,66 µg/mL. Karakteristik senyawa N-asetilglukosamin berwarna kuning pudar, titik leleh 213°C, tidak berbau, memiliki kadar air 0,89% dan panjang gelombang maksimum 423 nm.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terimakasih dihaturkan kepada pihak DRPM Kemenristek Dikti yang telah memberikan hibah penelitian.

DAFTAR PUSTAKA

- Agustina, S., Swantara, I D., Suartha, I. (2015). Isolasi Kitin, Karakterisasi dan Sintesis Kitosan dari Kulit udang. *Jurnal Kimia*. 9 (2): 271-278.
- Aiba, S. (2009). Chemical and enzymatic modification of chitin and chitosan towards functional materials. *Laporan Penelitian*. Ibaraki: Environmentally Degradable Polymer Research Group, Institute for Biological Resources and Functions-AIST.
- Basu, D., Chaudhuri, A N. (2013). Purification and Characterization of Chitinase from Thermophilic

- Staphylococcus sp. *International Journal of Environmental Sciences.* 4(4):458-467.
- Chasanah, E., Zilda, D S., Uria, A R. (2009). Screening and Characterization of Bacterial Chitosanase From Marine Environment. *Journal of Coastal Development.* 12(2): 64 – 72.
- Chen J. K., Shen C. R., & Liu C. L. (2010). N-Acetylglucosamine: Production and Applications. *Mar. Drugs,* 8(9): 2493-2516.
- Dewi, N. L., Bahri, S., & Hardi, J. (2016). Penggunaan Berbagai Tekanan dan Waktu Hidrolisis pada Produksi Glukosamin Hidroklorida dari Kitosan Cangkang Bekicot (*Achatina fulica*). *KOVALEN*, 2(1): 22-32.
- Hardi, J., Jusman, J., Razak, A. R., & Silva, S. (2016). Produksi dan Uji Aktivitas Enzim Kitinase dari Isolat Bakteri Termofilik B1211 Asal Air Panas Bora. *KOVALEN*, 2(3): 67-72.
- Herdyastuti, N., Raharjo, T. J., Mudasir., & Mastjeh, S. (2009). Chitinase and Chitinolytic Microorganism: Isolation, Characterization And Potential (Review). *Indo. J. Chem.*, 9 (1): 37 – 47.
- Herdyastuti, N., Cahyaningrum, S. E., Tamimi, M., Wirawan, A. (2015). Modification of chitin as substrates for chitinase. *Afr. J. Biotechnol.*, 14(18): 1590-1595.
- Howard, R.L., E. Abotsi, J.E.L. van Rensburg, & S. Howard. (2003). Lignocellulose biotechnology: Issues of bioconversion and enzyme production. *Afr. J. Biotechnol.*, 2(12): 602– 619.
- Jamialahmadi, Behravan, J., Najafi, M. F., Yazdi, M. T., Shahverdi, A. R., & Faramarzi M. A. (2011). Enzymatic Production of N-Acetyl-D-Glucosamine from Chitin Using Crude Enzyme Preparation of *Aeromonas* sp. PTCC1691. *Biotechnology*, 10 (3): 292- 297.
- Kamil, Z., Rizk, M., Saleh, M., & Moustafa, S. (2007). Isolation and Identification of Rhizosphere Soil Chitinolytic Bacteria and their Potential in Antifungal Biocontrol. *Global Journal of Molecular Sciences*, 2(2): 57-66.
- Muharni. 2010. Isolasi dan Identifikasi Bakteri Penghasil Kitinase dari Sumber Air Panas Danau Ranau Sumatera Selatan. *Jurnal Penelitian Sains*, 10 (D): 06-09.
- Mukti, M. I., & Herdyastuti, N. (2016). Karakterisasi N-asetilglukosamin Hasil Hidrolisis Kitin Secara Kimia. *Prosiding Seminar Nasional dan Pembelajarannya*. Surabaya, 17 September 2016. Surabaya: Jurusan Kimia FMIPA Universitas Negeri Surabaya. Hlm 61-64.
- Nurdebyandaru, N., Mubarik N. R., Prawasti, T. (2010). Chitinolytic Bacteria Isolated from Chili Rhizosphere: Chitinase Characterization and Application as Biocontrol for *Aphis gossypii*. *Ind. J. Microbiol*, 4(3): 103-107.
- Patil, R. S., Ghormade, V., Despande, M.V. (2000). Chitinolytic enzymes: an exploration. *Enzyme and Microbial Technology*, 26: 473-483.
- Pavia, D. L., Gary, M. L., George, S. K. J. (2009). *Introduction to Spectroscopy* edition IV. Washington: Departement of Chemistry. Western Washington University, Bellingham.
- Purwani, E. Y., Toharisman, A., Chasanah, E., Laksmi, J. F., Welan, V., Suhartono, Purwadaria, T., Hwang, J. K., Pyun, Y. R. (2002). Studi Pendahuluan Enzim Kitinase

- Extraseluler yang Dihasilkan oleh Isolat Bakteri Asal Manado. *Jurnal Teknologi dan Industri Pangan*, 8(2): 111-117.
- Sashiwa, H., Fugishima, S., Yamono, N., Nakayama, A., Muraki, E., Hiraga, K., Oda, K., Aiba, S. (2002). Production of N-acetyl-D-glucosamine from alpha-chitin by crude enzymes from *Aeromonas hydrophila* H-2330. *Carbohydr. Res*, 337:761-763.
- Setthakaset, P., Rath, P., Anawat, A., Mongkol, S. (2008). Preparation of N-acetyl-D-glucosamine using enzyme from *Aspergillus sp*. *Journal of Metals, Materials and Minerals*, 18: 53-57.
- Suryanto, D., Munir, E., & Yunarliza. (2005). Eksplorasi Bakteri Kitinolitik: Keragaman Gen Penyandi Kitinase pada Berbagai Jenis Bakteri dan Pemanfaatannya. *Laporan Hasil Penelitian Hibah Bersaing Perguruan Tinggi*. Medan: Universitas Sumatra Utara.
- Ueda, M., Arai, M. (1992). Purification and Some Properties of Chitinases from *Aeromonas sp*. No. 1OS-24. *Biosci. Biotech and Biochem*, 56(3): 460-464.
- Uma, C., Arulraj, C., Ravikumar, G., et.al. (2012). Production and Purification of Chitinase by *Streptomyces sp*. from soil. *J. Adv. Sci. Res*, 3(3): 25-29.
- Wirawan, A., & Herdyastuti, N. (2013). Penentuan Waktu Inkubasi pada Pembentukan Senyawa N-asetilglukosamin yang didegradasi secara Enzimatis dari Kitin. *UNESA Journal of Chemistry*, 2(3): 11-13.
- Widhyastuti, N. (2007). Produksi Kitinase Ekstraseluler *Aspergillus rugulosus* 501 Secara Optimal Pada Media Cair. *Berita Biologi*, 8(6).
- Wulandari, F. (2009). Optimasi Produksi N-asetilglukosamina dari Kitin Melalui Fermentasi oleh *Aspergillus rugulosus* 501. *Skripsi Diterbitkan*. Bogor: Institut Pertanian Bogor.