

## ANALISIS POTENSI PROTEASE EKTRASELULER TANAH HUTAN MANGROVE PANTAI SUWUNG KAUH BALI

Inten Hardianti Nizar, I Nengah Wirajana, A.A.I.A Mayun Laksmiwati  
Jurusan Kimia FMIPA Universitas Udayana, Bukit Jimbaran, Bali-Indonesia  
E-mail: [hardiantiinten@yahoo.com](mailto:hardiantiinten@yahoo.com)

**ABSTRAK:** Potensi tanah hutan mangrove pantai Suwung Kauh Bali sebagai sumber protease dapat diketahui dengan melakukan uji aktivitas protease ekstraseluler. Pada penelitian ini telah dilakukan pengukuran aktivitas protease ekstraseluler dan penentuan pengaruh waktu inkubasi serta penambahan toluena terhadap aktivitas protease. Sampel yang digunakan sebagai sumber enzim berupa *slurry* dan direaksikan dengan substrat kasein 0,3% selama 3,6,9 dan 24 jam dengan dan tanpa penambahan toluena 1% (v/v). Produk reaksi enzimatik diukur dengan metode kolorimetri. Aktivitas protease tertinggi yang diperoleh sebesar  $1,9 \times 10^{-4}$  U/mL dengan penambahan toluena pada waktu inkubasi 6 jam dan sebesar  $1,2 \times 10^{-4}$  U/mL tanpa penambahan toluena pada waktu inkubasi 9 jam. Hasil ini menunjukkan bahwa protease ekstraseluler pada tanah hutan mangrove yang dihasilkan oleh mikroba proteolitik memiliki potensi digunakan untuk eksplorasi enzim. Waktu inkubasi dan penambahan toluena tidak berpengaruh signifikan terhadap aktivitas protease.

**Kata kunci:** protease, tanah mangrove, inkubasi, toluena

**ABSTRACT:** The potency of mangrove soil in Suwung Kauh Bali as a source of protease has been determined by protease activity assay. This research has been done to determine protease activity and the effect of incubation time and the addition of toluene to the protease activity. The slurry of soil was used as a source of extracellular enzyme for protease assay, which was reacted with casein 0,3% for 3, 6, 9, and 24 hours with and without the addition of toluene 1% (v/v). The enzymatic reaction product was measured by colorimetric method. The highest protease activity with addition of toluene was  $1,9 \times 10^{-4}$  U/mL at 6 hours incubation and without toluene was  $1,2 \times 10^{-4}$  U/mL at 9 hours incubation. These results showed extracellular protease on mangrove soil produced by proteolytic microorganisms had a potency to be used in enzyme exploration. Furthermore, the incubation time and addition of toluene had no significant effect to protease activity.

**Keywords:** protease, mangrove soil, incubation, toluene

### 1. PENDAHULUAN

Hutan mangrove sebagai salah satu ekosistem yang memiliki keanekaragaman mikroorganisme tinggi saat ini mulai dilakukan penelitian untuk sumber eksplorasi enzim. Di dalam ekosistem mangrove

ditemukan adanya enzim proteolitik, kitinolitik, dan selolitik yang berperan mengurai serasah sehingga dihasilkan mineral serta nutrisi yang dibutuhkan bagi organisme [1]. Hutan mangrove di Bali tercatat seluas 2.215,50 ha [2], salah satunya

terletak di pantai Suwung Kauh, kabupaten Badung.

Beberapa penelitian telah membuktikan adanya aktivitas enzim selulolitik tetapi belum ada yang membuktikan adanya aktivitas enzim proteolitik pada tanah hutan mangrove pantai Suwung Kauh-Bali. Pada tanah hutan mangrove telah ditemukan adanya aktivitas selulase yang berpotensi sebagai pendegradasi selulosa [3]. Aktivitas selulase dalam tanah hutan mangrove ini diketahui dapat meningkat dengan penambahan substrat janur seiring dengan lama waktu inkubasi [4]. Selulase dari tanah hutan mangrove pantai Suwung Kauh ini digunakan sebagai sumber enzim dalam menghidrolisis substrat sekam padi [5]. Selain adanya selulase, pada tanah hutan mangrove ini juga ditemukan adanya lipase yang mampu mendegradasi lipida [6].

Penelitian mengenai penentuan aktivitas protease secara langsung pada tanah hutan mangrove belum pernah dilakukan. Aktivitas protease dari bakteri hasil isolasi ditemukan berasal dari tanah kawasan mangrove di kabupaten Cilacap dan kabupaten Indramayu. Uji aktivitas proteolitik bakteri hanya dilakukan secara kualitatif dengan waktu inkubasi bakteri selama 5 hari dalam media *Skim Milk* agar. Isolat bakteri yang memiliki kemampuan hidrolisis protein yang tinggi diperoleh dari sampel yang diambil dari lokasi yang berdekatan dengan pemukiman penduduk, tambak dan sungai [7]. Aktivitas proteolitik juga ditemukan pada 33 isolat bakteri yang berasal dari sedimen mangrove kabupaten Rembang dan Cilacap [8].

Pengukuran aktivitas protease secara langsung pada tanah tundra kutub utara dilakukan pada waktu inkubasi 0, 3, 6, 12, 24 dan 48 jam. Hasil penelitiannya menunjukkan bahwa waktu inkubasi

memberikan pengaruh linier terhadap aktivitas protease pada waktu inkubasi hingga 6 jam, namun tidak berpengaruh setelah 6 hingga 24 jam [9].

Beberapa penelitian tentang pengukuran aktivitas enzim menambahkan toluena untuk meningkatkan aktivitasnya. Penambahan toluena memberikan pengaruh terhadap aktivitas selulase tanah hutan mangrove pantai Suwung Bali, yang mana sampel tanah yang ditambahkan toluena memiliki aktivitas enzim yang lebih tinggi dibandingkan dengan sampel tanah tanpa penambahan toluena [10]. Penambahan konsentrasi toluena yang bervariasi (0%; 1%; 3,33% dan 5%) menunjukkan bahwa penambahan toluena dengan konsentrasi yang bervariasi ini tidak memberikan pengaruh terhadap aktivitas protease kecuali penambahan 0% toluena tidak menunjukkan aktivitas protease pada tanah tundra kutub utara [9]. Sebelumnya pernah dibuktikan bahwa penambahan toluena 1% (v/v) memberikan pengaruh pada penentuan aktivitas enzim proteolitik pada tanah tundra [11].

Pada penelitian ini dilakukan analisis potensi protease ekstraseluler pada tanah hutan mangrove pantai Suwung Kauh-Bali sebagai langkah awal eksplorasi protease. Sampel tanah yang digunakan sebagai sumber protease ekstraseluler berupa *slurry* tanah, karena berdasarkan penelitian sebelumnya bahwa aktivitas enzim lain seperti selulase ekstraseluler [3,4], dan lipase ekstraseluler [6] hanya dapat dideteksi pada *slurry* tanah. Mengingat waktu inkubasi dan penambahan toluena diduga akan berpengaruh terhadap aktivitas enzim berdasarkan pemaparan di atas, maka pada penelitian ini dikaji pengaruh waktu inkubasi dan penambahan toluena pada saat penentuan aktivitas protease.

## 2. PERCOBAAN

### 2.1 Bahan dan Peralatan

Bahan yang digunakan adalah *slurry* tanah hutan mangrove, L-Tirosin 1,1 mM, susu-skim, buffer fosfat 0,05 M pH 7, serta bahan-bahan pro analisis yang diperoleh dari produsen Merk diantaranya toluena, kasein 0,3%, TCA (*Trichloroacetic Acid*) 0,11 M, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0,5 M dan reagen Folin Ciocalteu. Alat yang digunakan yaitu pipet tetes, gelas piala (*Beaker glass*), gelas ukur, labu ukur, pipet volume (5 mL; 10 ml), tabung sentrifugasi, tabung reaksi, kuvet, spatula, pipet mikro, tip mikro biru, dan penangas es. Instrumen yang digunakan dalam penelitian ini adalah: pH meter, neraca analitik, stirer, autoklaf, vorteks, *Shaker incubator ES-20, Hettich EBA III Centrifuge*, dan spektrofotometer *UV-Vis Double Beam (Shimadzu/UV-1800)*.

### 2.2 Metode

#### 2.2.1 Preparasi *slurry* tanah sebagai sumber enzim

*Slurry* tanah yang digunakan sebagai sumber enzim dibagi menjadi dua yaitu *slurry* tanah tanpa dan dengan penambahan susu-skim. *Slurry* tanah dimasukkan ke dalam erlenmayer sebanyak 50 mL, kemudian ditambahkan susu-skim kurang lebih 1 g. Campuran *slurry* tanah dan susu-skim diaduk hingga merata kemudian diinkubasi hingga 24 jam pada suhu ruang.

#### 2.2.2 Pembuatan larutan standar

Pembuatan larutan standar dilakukan dengan mengencerkan L-Tirosin 1,1 mM sebanyak 200 µL ditambah buffer fosfat pH 7, TCA 0,11 M dan *slurry* tanah, masing-masing sebanyak 1132 µL; 476; µL dan 192 µL sehingga diperoleh konsentrasi tirosin 0,11 mM. Setelah itu, dilakukan penambahan Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0,5 M sebanyak 5 mL

dan dilanjutkan dengan penambahan 1 mL reagen Folin Ciocalteu. Pada pembuatan blanko, dimasukkan buffer fosfat pH 7, TCA 0,11 M dan *slurry* tanah, masing-masing sebanyak 1332 µL; 476 µL; 192 µL; 5 mL Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0,5 M dan 1 mL reagen Folin Ciocalteu tanpa penambahan larutan standar L-Tirosin. Absorbansi larutan standar diukur pada panjang gelombang 400-800 nm sehingga diperoleh  $\lambda_{maks}$  yang akan digunakan untuk pengukuran selanjutnya.

#### 2.2.3 Uji aktivitas protease

Pengujian tanpa penambahan toluena dan dengan penambahan toluena dilakukan dengan mereaksikan 2,5 mL kasein 0,3% (b/v) dengan 1 mL *slurry* tanah. Pada sampel dengan penambahan toluena ditambahkan 0,8 mL toluena (1% v/v). Kemudian ditambah bufer fosfat pH 7 sampai volume akhir 8 mL [9]. Selanjutnya dicampur dengan alat vorteks dan diinkubasi pada suhu 30°C selama 3, 6, 9 dan 24 jam. Pengukuran aktivitas protease mengikuti metode Anson [12].

#### 2.2.4 Analisis Data

Pengolahan data dilakukan dengan menggunakan *Two Way-ANOVA*. Pengaruh yang signifikan ditentukan pada sig. < 0,05. Data diolah menggunakan IBM SPSS Statistics 22.

## 3. HASIL DAN PEMBAHASAN

### 3.1 Pengukuran Aktivitas Protease Ekstraseluler

Kasein yang dihidrolisis oleh protease menghasilkan polipeptida rantai pendek dan asam amino. Salah satunya adalah tirosin yang dapat diukur secara kolorimetrik menggunakan reagen Folin Ciocalteu. Prinsipnya adalah reaksi oksidasi dan reduksi yang mana gugus fenolik-hidroksil pada tirosin bereaksi dengan reagen

Folin Ciocalteu membentuk kompleks fosfotungstat-fosfomolibdat menghasilkan larutan berwarna biru [13]. Hasil ini diukur absorbansinya pada  $\lambda_{maks}$  yang diperoleh yaitu 718,6 nm.

Besarnya aktivitas protease akan sebanding dengan jumlah tirosin yang dihasilkan per menit. Aktivitas protease dengan penambahan toluena pada Tabel 1 lebih tinggi dibandingkan tanpa penambahan toluena. Penambahan toluena pada pengukuran aktivitas protease ini dapat mengurangi penggunaan produk enzimatis berupa asam amino oleh mikroba sebagai nutrisi untuk pertumbuhannya [9].

Penambahan toluena mengakibatkan aktivitas protease lebih tinggi, yang mana hasil ini menunjukkan bahwa penambahan toluena mampu mengurangi penyerapan produk enzimatis oleh bakteri. Namun, efektivitas penambahan toluena ini terbatas berdasarkan hasil aktivitas protease dengan maupun tanpa penambahan toluena yang diperoleh tidak jauh berbeda. Hal ini mungkin disebabkan oleh rendahnya aktivitas protease keseluruhan sampel tanah hutan mangrove ini. Rendahnya aktivitas protease diantaranya dapat disebabkan oleh rendahnya jumlah mikroba proteolitik yang ada. Jika bakteri proteolitik yang tumbuh tidak optimum maka protease yang dihasilkan sedikit. Untuk meningkatkan aktivitas protease dalam tanah, maka mikroba proteolitik harus dikondisikan dahulu (waktu, suhu, dan media induksi, pH optimum) agar dapat tumbuh dengan optimum dan terinduksi menghasilkan protease.

Penambahan media induksi berupa susu-skim terhadap aktivitas protease pada Tabel 2 menunjukkan aktivitas protease tanpa penambahan toluena lebih tinggi

dibandingkan dengan penambahan toluena. Jika dibandingkan dengan hasil pada Tabel 1,

Tabel 1. Data Aktivitas Protease Ekstraseluler Tanah Hutan Mangrove dengan dan Tanpa Penambahan Toluena

Waktu Inkubasi (Jam)	Aktivitas Protease (U/mL)	
	T <sub>0</sub>	T <sub>1</sub>
3	$3 \times 10^{-6}$	$3 \times 10^{-5}$
6	$8 \times 10^{-5}$	$1,9 \times 10^{-4*}$
9	$1,2 \times 10^{-4*}$	$1,2 \times 10^{-4}$
24	$1,2 \times 10^{-4*}$	$1,2 \times 10^{-4}$

T<sub>0</sub> : Tanpa penambahan toluena

T<sub>1</sub> : Dengan penambahan toluena

\* : Aktivitas protease tertinggi

Tabel 2. Data Aktivitas Protease Ekstraseluler Tanah Hutan Mangrove yang Diinduksi Susu-Skim Dengan dan Tanpa Penambahan Toluena

Waktu Inkubasi (Jam)	Aktivitas Protease (U/mL)	
	T <sub>0</sub>	T <sub>1</sub>
3	$1,3 \times 10^{-4}$	$1 \times 10^{-5}$
6	$1,28 \times 10^{-4}$	$4 \times 10^{-5}$
9	$1,83 \times 10^{-4*}$	$8 \times 10^{-5*}$
24	$1,27 \times 10^{-4}$	$6 \times 10^{-5}$

T<sub>0</sub> : Tanpa penambahan toluena

T<sub>1</sub> : Dengan penambahan toluena

\* : Aktivitas protease tertinggi

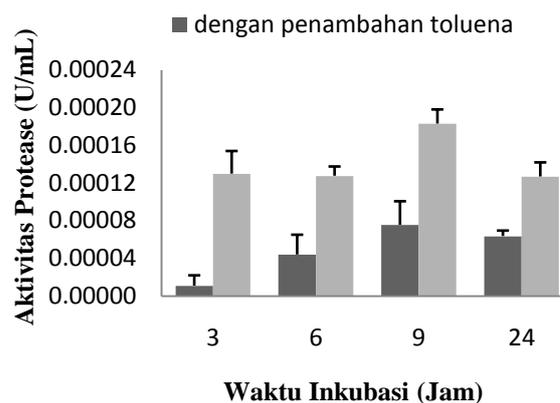
Penambahan induser susu-skim mampu meningkatkan aktivitas protease tanpa penambahan toluena. Namun, aktivitas protease dengan penambahan toluena yang tidak diinduksi susu-skim lebih tinggi dibandingkan yang diinduksi susu-skim. Hal ini dapat terjadi kemungkinan karena adanya penambahan toluena yang berfungsi menghambat pertumbuhan mikroba serta menyebabkan enzim terdenaturasi sehingga dapat menurunkan aktivitas enzim.

Jika dibandingkan dengan aktivitas protease yang diperoleh dari hewan maupun tumbuhan, aktivitas protease ekstraseluler yang disekresikan oleh mikroba dari tanah hutan mangrove ini cukup memiliki potensi untuk dijadikan sebagai sumber protease. Seperti protease dari cacing (*Lumbricus rubellus*) memiliki aktivitas sebesar  $9,55 \times 10^{-1}$  U/mL [14], serta protease pada tumbuhan yang salah satunya diperoleh dari labu siam memiliki aktivitas sebesar  $5,13 \times 10^{-3}$  U/mL [15].

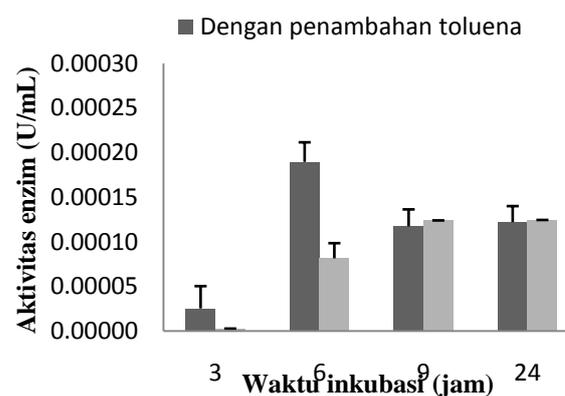
Potensi protease pada tanah hutan mangrove ini merupakan langkah awal dalam eksplorasi protease. Cara yang dapat dilakukan untuk menghasilkan protease khususnya dari mikroba yaitu isolasi mikroba. Namun sekarang ini, terobosan baru yang dapat dilakukan dalam eksplorasi enzim yaitu metagenomik [16].

### 3.2 Pengaruh Waktu Inkubasi dan Penambahan Toluena Terhadap Aktivitas Protease

Berdasarkan nilai aktivitas protease dengan dan tanpa penambahan toluena pada waktu inkubasi 3, 6, 9, dan 24 jam, diperoleh grafik pada Gambar 1. Pada grafik terlihat adanya peningkatan aktivitas protease dengan dan tanpa penambahan toluena dari waktu inkubasi 3 jam sampai 6 jam. Selanjutnya pada waktu inkubasi 9 jam terjadi penurunan aktivitas protease dengan penambahan toluena dan tidak berubah hingga waktu inkubasi 24 jam. Sebaliknya aktivitas protease tanpa penambahan toluena terus meningkat hingga waktu inkubasi 9 jam. Grafik hubungan aktivitas protease terhadap waktu inkubasi pada Gambar 2. menunjukkan bahwa aktivitas protease dengan dan tanpa penambahan toluena terus meningkat hingga waktu inkubasi 9 jam dan mulai menurun hingga waktu inkubasi 24 jam.



**Gambar 1.** Pengaruh waktu inkubasi terhadap aktivitas protease tanpa dan dengan penambahan toluena yang tidak diinduksi susu-skim



**Gambar 2.** Pengaruh waktu inkubasi terhadap aktivitas protease tanpa dan dengan penambahan toluena yang diinduksi susu-skim

Diduga mikroba mengalami fase adaptasi untuk menyesuaikan diri dengan lingkungannya. Selanjutnya mikroba akan mengalami fase pertumbuhan. Aktivitas protease yang teramati tetap atau tidak mengalami perubahan pada saat mikroba proteolitik diduga mengalami fase stasioner. Namun, pada aktivitas protease tanpa penambahan toluena terlihat aktivitasnya tetap dari waktu inkubasi 3 jam hingga 6 jam. aktivitas protease yang disekresikan

bakteri proteolitik akan meningkat seiring bertambahnya waktu inkubasi hingga waktu optimumnya tercapai.

Pada Gambar 1. dapat dilihat adanya perbedaan waktu optimum protease dengan dan tanpa penambahan toluena. Waktu optimum protease dengan penambahan toluena tercapai pada waktu inkubasi 6 jam dan tanpa penambahan toluena pada 9 jam sampai 24 jam yang menunjukkan aktivitas protease tetap. Waktu inkubasi 6 jam pada umumnya merupakan waktu optimum untuk aktivitas protease, tetapi hasil lain juga menyatakan bahwa aktivitas optimum protease dapat diperoleh pada waktu inkubasi yang lebih lama [9]. Pada Gambar 2. diketahui waktu optimum protease dengan dan tanpa penambahan toluena pada 9 jam. Penurunan aktivitas enzim dapat terjadi karena pengaruh produk enzimatik berupa asam amino yang terlalu banyak. Asam amino dapat terikat pada protease namun tidak turut berperan dalam proses katalitik sehingga menghambat aktivitas enzim itu sendiri [17].

Penambahan toluena pada percobaan ini menyebabkan aktivitas protease pada tanah yang sebelumnya tidak ditambahkan susu-skim lebih tinggi dibandingkan aktivitas protease tanpa penambahan toluena. Sebaliknya penambahan toluena pada tanah yang ditambahkan susu-skim menyebabkan aktivitas proteasenya lebih rendah dibandingkan tanpa penambahan toluena. Pengujian aktivitas protease pada tanah hutan mangrove pantai Suwung Kauh Bali memberikan hasil yang lebih baik dengan perlakuan tanpa penambahan toluena, meskipun tujuan penambahan toluena pada pengukuran aktivitas enzim adalah untuk mengurangi penggunaan produk enzimatik oleh mikroba sebagai nutrisi untuk pertumbuhannya. Disisi lain, penambahan toluena berdampak menyebabkan enzim terdenaturasi sehingga dapat menurunkan aktivitas enzim.

Berdasarkan hasil uji menggunakan analisis varian, diketahui penambahan toluena tidak berpengaruh signifikan terhadap aktivitas protease yang tidak

Tabel 3. Efek penambahan toluena, waktu inkubasi dan induksi susu skim terhadap aktivitas protease

Sample	Source	Type III Sum				
		of Squares	Df	Mean Square	F	<i>p</i>
Tanpa diinduksi susu-skim	Toluena	6,146E-9	1	6,146E-9	3,065	,104
	Waktu	4,349E-9	3	1,450E-9	,723	,556
	Toluena * Waktu	1,266E-8	3	4,220E-9	2,105	,149
Dengan diinduksi susu-skim	Toluena	4,197E-8	1	4,197E-8	28,548	,000
	Waktu	7,723E-9	3	2,574E-9	1,751	,200
	Toluena * Waktu	1,651E-9	3	5,503E-10	,374	,773
Tanpa penambahan toluena	Induksi	8,003E-9	1	8,003E-9	5,981	,028
	Waktu	8,212E-9	3	2,737E-9	2,046	,154
	induksi * Waktu	2,640E-9	3	8,802E-10	,658	,591
Dengan penambahan toluena	Induksi	3,304E-8	1	3,304E-8	15,886	,001
	Waktu	4,176E-9	3	1,392E-9	,669	,585
	induksi * Waktu	8,920E-9	3	2,973E-9	1,430	,276

diinduksi susu skim ( $p > 0,05$ ) namun, berpengaruh signifikan terhadap aktivitas protease yang diinduksi susu-skim ( $p < 0,05$ ). Variasi waktu inkubasi yang dilakukan pada penelitian ini tidak memberikan pengaruh signifikan terhadap aktivitas protease dengan dan tanpa penambahan toluena baik yang diinduksi maupun tidak diinduksi susu-skim ( $p >$

$0,05$ ). Penambahan susu-skim sebagai inducer dapat disimpulkan memberikan pengaruh yang signifikan terhadap aktivitas protease dengan dan tanpa penambahan toluena ( $p < 0,05$ ).

#### 4. KESIMPULAN

Aktivitas protease tertinggi dari tanah hutan mangrove tanpa penambahan toluena mencapai  $1,2 \times 10^{-4}$  U/mL pada waktu inkubasi 9 jam dan dengan penambahan toluena mencapai  $1,9 \times 10^{-4}$  U/mL pada waktu inkubasi 6 jam. Aktivitas protease tertinggi dari tanah hutan mangrove yang diinduksi susu-skim tanpa penambahan toluena mencapai  $1,83 \times 10^{-4}$  U/mL dan dengan penambahan toluena mencapai  $8 \times 10^{-5}$  U/mL pada waktu inkubasi 9 jam. Variasi waktu inkubasi tidak memberikan pengaruh yang signifikan terhadap aktivitas protease, begitu juga penambahan toluena.

#### 5. UCAPAN TERIMAKASIH

Penulis mengucapkan terimakasih kepada Kepala UPT Laboratorium Forensik dan Laboratorium Bersama FMIPA Universitas udayana beserta staf, serta seluruh pihak yang telah membantu dalam penelitian ini.

#### 6. DAFTAR PUSTAKA

[1] Lyla, P.S. and Ajmal, K.S., 2006, Marine Microbial Diversity and Ecology:

Importance and Future Perspectives, *Current Science*, 90 : 1325-1335

[2] Darmadi, A.A.K. dan I.P.G. Ardhana, 2010, Komposisi Jenis-jenis Tumbuhan Mangrove di Kawasan Hutan Prapat Benoa Desa Pemogan, Kecamatan Denpasar Selatan, Kodya Denpasar, Propinsi Bali, *Ilmu Dasar*, 11 (2) : 167-171

[3] Wirajana, I.N., Yuliana, D.A., dan Ratnayani, K., 2013, Isolasi DNA Metagenomik dari tanah Hutan Mangrove Pantai Suwung Bali, *Jurnal Kimia*, 7 (1) : 19-24

[4] Kurniawati, I., Wirajana, I.N., dan Mahardika, I.G., 2013, Peningkatan Aktivitas Selulase Pada Tanah Hutan Mangrove Pantai Suwung Bali dengan Pengayaan Substrat Selulosa Janur Kelapa (*Cocus nucifera*), *Jurnal Kimia*, 7 (1) : 75-81

[5] Widayantini, N.L.M., Wirajana, I.N., dan Suarya, P., 2014, Kemampuan Tanah Hutan Mangrove Sebagai Sumber Enzim dalam Hidrolisis Enzimatik Substrat Sekam Padi, *Jurnal Kimia*, 8 (1) : 35-41

[6] Purwanti, N.K.D.S., 2015. Pengaruh Waktu Inkubasi Terhadap Aktivitas Lipase yang Diinduksi dengan Minyak Jelantah pada Tanah Hutan dari Hutan Mangrove Pantai Suwung Kauh Bali, *Skripsi*, Universitas Udayana, Bukit Jimbaran

- [7] Triyanto, Isnansetyo, A., Irfan, D.P., Jaka, W. dan Afi, T., 2008, Isolasi, Karakterisasi dan uji Infeksi Bakteri Proteolitik dari Lumpur Kawasan Hutan Bakau, *J. Fish. Sci.*, 1 : 13-18
- [8] Setyati, W.A. dan Subagiyo, 2012, Isolasi dan Seleksi Bakteri Penghasil Enzim Ekstraseluler (proteolitik, amilolitik, lipolitik dan selulolitik) yang Berasal dari Sedimen Kawasan Mangrove, *Ilmu Kelautan*, 17 (3) : 164-168
- [9] Reiskind, J.B., Martin L., and Michelle C.M., 2011, Kinetic Studies of Proteolytic Enzyme Activity of Arctic Soils Under Varying Toluene Concentration, *Soil Biology and Biochemistry*, 43 : 70-77
- [10] Wahyuni, N.K.L., Wirajana, I.N., dan Suyasa, I.W.B., 2014, Pengaruh Toluena dan Waktu Inkubasi Terhadap Aktivitas Selulase dari Tanah Hutan Mangrove, *Cakra Kimia*, 2 : 14-19
- [11] Weintraub, M.N., and Schimel, J.P., 2005. Seasonal protein dynamics in Alaskan arctic tundra soils. *Soil Biology & Biochemistry*, 37 : 1469-1475
- [12] Sigma, 1999, Enzymatic Assay of Protease Casein as a Substrat, Sigma Quality Control Test Procedur
- [13] Singleton, V.L. and Rossi, J.A., 1965, Colorimetry of Total Phenolic with Phosphomolybdic-Phospotungstic Acid Reagent, *Am. J. Enol. Vitic*, 16 : 147
- [14] Sutandi, C., 2003, Analaisis Potensi Enzim Protease Lokal, *Skripsi*, Institut Pertanian Bogor, Bogor
- [15] Kusumaningrum, N.W.L., 2015, Isolasi Protease dari Buah Labu Siam (*Sechium edule*(Jacq.) Sw.) dengan Teknik *Salting Out* Menggunakan Garam Amonium Sulfat, *Skripsi*, Universitas Udayana, Bukit Jimbaran
- [16] Handelsman, J. 2004. Metagenomics: Application of Genomics to Uncultured Microorganisms. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 68 (4) :669
- [17] Pelczar, M.J. dan Chan, E.C.S., 2005, *Dasar-dasar Mikrobiologi 1*, a.b. : Hadioetomo, R.S., Imas, T., Tjitrosomo, S.S., dan Angka, S.L., UI Press, Jakarta