

POLA PERTUMBUHAN BAKTERI YANG BERASOSIASI DENGAN SPONS LAUT SEBAGAI PENGHASIL INHIBITOR PROTEASE YANG DIPENGARUH KONSENTRASI NaCl, pH, DAN SUHU

Tali Nurhayati, Desniar dan Intan

Departemen Teknologi Hasil Perairan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan - IPB

ABSTRAK

Spons merupakan salah satu makroorganisme yang paling banyak menghasilkan komponen bioaktif (70 %), diantaranya bersifat sitotoksik, antibiotik, antiviral, antiribiofouling, dan penghambat enzim (termasuk penghambat enzim protease). Keberadaan komponen bioaktif tersebut tidak terlepas dari peran mikroorganisme yang berasosiasi dengan spons, mengingat sebanyak 40-60 % berat spons merupakan mikroorganisme. Beberapa bakteri yang berasosiasi dengan spons dan merupakan penghasil inhibitor protease adalah *u*-proteobacteria, *Chromohalobacter* sp. dan *Acinetobacter baumannii*. Produksi komponen tersebut sangat dipengaruhi oleh pertumbuhan bakteri tersebut. Oleh karena itu tujuan penelitian ini adalah mengamati pengaruh NaCl, pH, dan suhu terhadap pertumbuhan bakteri penghasil inhibitor protease. Berdasarkan hasil penelitian diketahui bahwa *Acinetobacter baumannii* dan *Chromohalobacter* sp. tumbuh baik pada konsentrasi garam 2 ‰, sedangkan *u*-proteobacteria tumbuh baik pada konsentrasi garam 4 ‰, pH 7 dan suhu 30 °C merupakan kondisi yang tepat untuk pertumbuhan ketiga jenis bakteri tersebut.

Kata kunci: bakteri laut, inhibitor protease, spons

I. PENDAHULUAN

Luas wilayah perairan yang dimiliki Indonesia adalah 3,2 juta km² atau seluas ¼ bagian dari keseluruhan wilayah Indonesia. Wilayah perairan yang luas ditambah dengan wilayah pesisir merupakan daerah dengan keanekaragaman hayati dan non hayati. Keberadaan sumberdaya hayati dan non hayati menjadikan pesisir dan bahari sebagai pusat perhatian (Saeful 2005). Salah satu sumber daya hayati yang dimiliki perairan Indonesia adalah spons. Ada sekitar 830 jenis spons di wilayah perairan Indonesia.

Spons merupakan hewan multiselular primitif (metazoa) tanpa jaringan nyata. Hewan ini merupakan salah satu obyek utama dalam penelitian eksplorasi produk alami. Di dunia sendiri jumlah dan penyebaran spons sangat banyak. Sekitar 7.000 jenis spons telah dipublikasi, tetapi berdasarkan perkiraan ada sekitar 15.000 spesies spons hidup tersebar di perairan laut dan danau, namun yang berhasil diisolasi sekitar 730 jenis (Wibowo *et al.* 2004).

Komponen bioaktif spons yang banyak ditemukan, antara lain bersifat sitotoksik, antibiotik, antiviral, antiribiofouling, dan aktivitas inhibitor enzim (Couwelaar *et al.* 2001). Salah satu enzim yang dapat dihambat oleh komponen

PROSIDING

Konferensi Sains Kelautan dan Perikanan Indonesia I
Kampus FPIK - IPB Dramaga, 17-18 Juli 2007

bioaktif spons adalah enzim protease. Nurhayati *et al.* (2004) berhasil menemukan inhibitor protease dari spons. *Jaspis stellifera* merupakan spons penghasil inhibitor protease *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*, sedangkan spons *Plakortis nigra* potensial sebagai inhibitor terhadap protease *S. aureus*.

Penggunaan spons secara terus menerus sebagai penghasil komponen bioaktif tentunya akan membuat spons punah. Sebagai salah satu upaya untuk mencegah terjadinya kepunahan tersebut, maka diperlukan alternatif lain dengan cara mencari mikroorganisme yang berasosiasi dengan spons sebagai penghasil inhibitor protease, yaitu bakteri. Sekitar 60 % dari biomassa spons merupakan bakteri dan sianobakter (Wilkinson 1978 diacu dalam Lee *et al.* 2001).

Terdapat hubungan simbiotik antara spons dengan sejumlah bakteri dan alga, yaitu spons menyediakan dukungan dan perlindungan bagi simbiotiknya, sedangkan simbion menyediakan tekanan bagi spons. Metabolit yang dihasilkan oleh spons merupakan hasil biosintesis simbiotiknya sehingga bakteri yang bersimbiosis dengan spons tersebut memiliki komponen bioaktif yang hampir mirip dengan yang dimiliki spons. Nurhayati *et al.* (2006a) menyatakan bahwa simbion spons *J. stellifera* (α -Proteobacteria) menghasilkan inhibitor terhadap protease *S. aureus*, simbion spons *Xetospongia testudinaria* (*Chromohalobacter* sp. 6A3) menghasilkan inhibitor protease *Pseudomonas aeruginosa*, sedangkan simbion spons *P. nigra* (*Acinetobacter baumannii*) menghasilkan inhibitor protease *E. coli*. Desniar *et al.* (2006) dan Nurhayati *et al.* (2006b) melaporkan bahwa konsentrasi pepton, yeast extract, NaCl, serta pH berpengaruh terhadap waktu produksi dan aktivitas inhibitor protease *E. coli* yang dihasilkan oleh simbion spons *P. nigra*, yaitu *A. baumannii*, serta kestabilan produksi inhibitor tersebut.

Inhibitor protease dari bakteri akan diproduksi maksimal jika bakteri penghasil produk tersebut ditumbuhkan dalam kondisi pertumbuhan yang tepat. Dalam menunjang pertumbuhannya, bakteri dipengaruhi oleh beberapa faktor seperti suhu dan tekanan osmotik, pH, sumber karbon, nitrogen, oksigen, vitamin, dan mineral. Informasi tentang kondisi pertumbuhan bakteri yang tepat diharapkan dapat dijadikan landasan untuk produksi inhibitor protease yang maksimal.

Tujuan penelitian ini adalah untuk mempelajari pengaruh konsentrasi NaCl, pH dan suhu terhadap pertumbuhan bakteri laut yang berasosiasi dengan spons, yaitu α -Proteobacteria, *Chromohalobacter* sp. dan *A. baumannii*.

II. METODOLOGI

Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah isolat bakteri yang berasosiasi dengan spons yaitu bakteri *Acinetobacter baumannii*, a Proteobacteria, dan *Chromohalobacter* sp. Sampel spons dikoleksi oleh Nurhayati *et al.* (2004) dari perairan Kepulauan Seribu yang hidup pada kedalaman antara 4-12 m. Kemudian isolat bakteri yang berasosiasi dengan spons diisolasi oleh Sabana (2004) dan diidentifikasi oleh Nurhayati (2006a) dengan analisis 16S rRNA. Bahan-bahan lain yaitu media fermentasi, *marine broth*, *marine agar*, NaOH, HCl, dan garam fisiologis.

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini meliputi *waterbath* shaker, spektrofotometer, pH meter, oven, inkubator, laminar, autoklaf, lemari pendingin, vorteks, pipet mikro (Pipetman) beserta tip-nya, serta berbagai alat gelas.

Metode

Metode penelitian ini dibagi menjadi empat tahap yaitu penyegaran mikroba, penentuan waktu propagasi, pembuatan kurva standar pertumbuhan bakteri, dan penentuan NaCl, pH, dan suhu terbaik.

Penyegaran mikroba

Isolat bakteri disegarkan pada media *marine agar* (MA). Kemudian isolat diinkubasi di dalam inkubator dengan suhu 30 °C. Selama penelitian berlangsung, isolat bakteri disegarkan setiap seminggu sekali.

Penentuan waktu propagasi

Isolat bakteri ditumbuhkan pada media propagasi sebanyak 100ml. Sebanyak 1 lup isolat bakteri yang telah disegarkan ditumbuhkan pada media propagasi kemudian diinkubasi dalam *waterbath shaker* pada suhu 30°C dan kecepatan agitasi 150 rpm. Pengukuran nilai *Optical Density* (OD) dilakukan setiap 4 jam menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 660 nm selama 48 jam. Nilai OD tersebut kemudian diplotkan terhadap waktu untuk mengetahui waktu yang tepat saat pemindahan inokulum ke media fermentasi.

Pembuatan kurva standar pertumbuhan bakteri (Hadisoetomo 1993)

Pembuatan kurva standar pertumbuhan bakteri dilakukan dengan menghitung jumlah populasi bakteri yang hidup dengan metode agar sebar dan pengukuran OD dengan menggunakan spektrofotometer.

Metode sebar dilakukan dengan menyebarkan 100 µl biakan bakteri ke media MA. Bakteri terlebih dahulu ditumbuhkan dalam 100 ml media MB.

PROSIDING

Konferensi Sains Kelautan dan Perikanan Indonesia I
Kampus FPIK – IPB Dramaga, 17-18 Juli 2007

Kemudian bakteri diinkubasi dalam *waterbath shaker* pada suhu 30 °C dan kecepatan agitasi 150 rpm hingga mencapai fase eksponensial. Setelah mencapai fase eksponensial, sebanyak 100 µl biakan bakteri tersebut dimasukkan ke dalam 900µl garam fisiologis. Setelah itu dilakukan serangkaian pengenceran dan biakan bakteri disebar pada media MA. Jumlah koloni bakteri yang tumbuh pada metode sebar dihitung dengan menggunakan rumus:

$$\Sigma \text{ koloni bakteri} = \frac{1}{\text{faktor pengenceran}} \times \frac{\Sigma \text{ bakteri yang tumbuh}}{\text{volume yang disebar (ml)}}$$

Pengukuran OD dilakukan dengan mengukur langsung sampel cairan kultur menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 660 nm.

Data yang diperoleh kemudian diolah menggunakan program regresi untuk mendapatkan jumlah log populasi.

Penentuan konsentrasi NaCl, pH, dan suhu terbaik

Penentuan konsentrasi NaCl, pH, dan suhu terbaik dilakukan secara bertingkat. Sebagai awalan, dilakukan penentuan konsentrasi NaCl terbaik kemudian dilanjutkan penentuan pH terbaik serta penentuan suhu terbaik.

Penentuan konsentrasi NaCl terbaik dilakukan dengan memfermentasikan 10 % dari kultur propagasi yang telah mencapai fase eksponensial ke dalam media fermentasi. Media fermentasi yang digunakan adalah sebanyak 150 ml. Komposisi media fermentasi sama dengan media yang digunakan untuk penentuan propagasi yang telah ditambah NaCl dengan konsentrasi yang berbeda yaitu 2 %, 4 %, 6 %, 8 %, 10 %, 20 %, 30 %, dan 40 %. Untuk bakteri α Proteobacteria, konsentrasi NaCl yang digunakan 2 %, 4 %, 6 %, 8 %, dan 10 %. Selanjutnya, fermentasi dilakukan dalam *waterbath shaker* pada suhu 30 °C dengan kecepatan agitasi 150 rpm selama 48 jam. Setiap 4 jam sekali dilakukan pengukuran OD.

Penentuan pH awal terbaik dilakukan dengan memfermentasikan 10 % dari kultur propagasi yang telah mencapai fase eksponensial ke dalam media fermentasi. Media fermentasi yang digunakan adalah sebanyak 150 ml. Komposisi media fermentasi sama dengan media yang digunakan untuk penentuan propagasi ditambah konsentrasi NaCl terbaik berdasarkan penentuan konsentrasi NaCl dengan pH awal media adalah pH 4, 7, dan 9. Selanjutnya, fermentasi dilakukan dalam *waterbath shaker* pada suhu 30 °C dengan kecepatan agitasi 150 rpm selama 48 jam. Setiap 4 jam sekali dilakukan pengukuran OD.

Penentuan suhu terbaik dilakukan dengan memfermentasikan 10 % dari kultur propagasi yang telah mencapai fase eksponensial ke dalam media fermentasi. Media fermentasi yang digunakan adalah sebanyak 150 ml. Media

yang digunakan untuk fermentasi sama dengan media untuk propagasi yang telah ditambah NaCl terbaik berdasarkan penentuan konsentrasi NaCl dan pH awal media terbaik berdasarkan penentuan pH. Selanjutnya, fermentasi dilakukan dalam *waterbath shaker* pada suhu 10 °C, 30 °C, dan 55 °C dengan kecepatan agitasi 150 rpm selama 48 jam. Setiap 4 jam sekali dilakukan pengukuran OD.

Pengukuran OD dilakukan menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 660 nm. Sampel yang tidak terbaca (OD lebih dari 1) diencerkan menggunakan media *marine broth* steril sebelum pengukuran. Untuk blanko digunakan media *marine broth* steril. Konsentrasi sel dihitung sebagai perbedaan antara nilai absorbansi sampel dan blanko dikalikan dengan faktor pengenceran.

$$\text{Nilai absorbansi} = (A-B) \times fp$$

A=nilai absorbansi sampel; B=nilai absorbansi blanko; fp=faktor pengenceran

Pengumpulan data untuk analisis meliputi :

- (1) Pengukuran pH cairan selama fermentasi.
- (2) Pengukuran pertumbuhan sel menggunakan nilai OD sampel pada panjang gelombang 660 nm yang dikonversi ke dalam kurva standar pertumbuhan bakteri (log sel/ml).

Analisis Data

Data yang didapat dianalisa secara deskriptif yang menggambarkan pola pertumbuhan bakteri *Acinetobacter baumannii*, α Proteobacteria, dan *Chromohalobacter* sp. pada perlakuan yang diberikan.

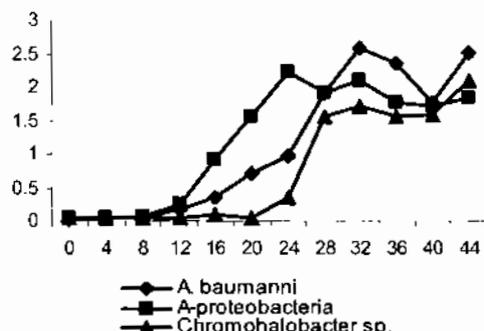
III. HASIL DAN PEMBAHASAN

Penentuan Waktu Propagasi

Gambar 1 menunjukkan kurva pertumbuhan bakteri α -proteobacteria, *A. baumannii*, dan *P. nigra*. Berdasarkan penentuan waktu propagasi ditetapkan bahwa waktu propagasi untuk bakteri *A. baumannii* adalah pada jam ke-24 dengan nilai absorbansi sebesar 0,96; bakteri α Proteobacteria adalah pada jam ke 16 dengan nilai absorbansi sebesar 0,92; dan bakteri *Chromohalobacter* sp. adalah pada jam ke-28 dengan nilai absorbansi sebesar 1,11.

Fase adaptasi yang terjadi untuk ketiga bakteri cenderung singkat, yaitu sekitar 8-12 jam. Fase adaptasi yang singkat menunjukkan bahwa bakteri cepat menyesuaikan diri dengan lingkungannya. Lama tidaknya fase adaptasi

tergantung dari media yang digunakan, faktor lingkungan, dan keadaan inokulum (Fardiaz 1992).



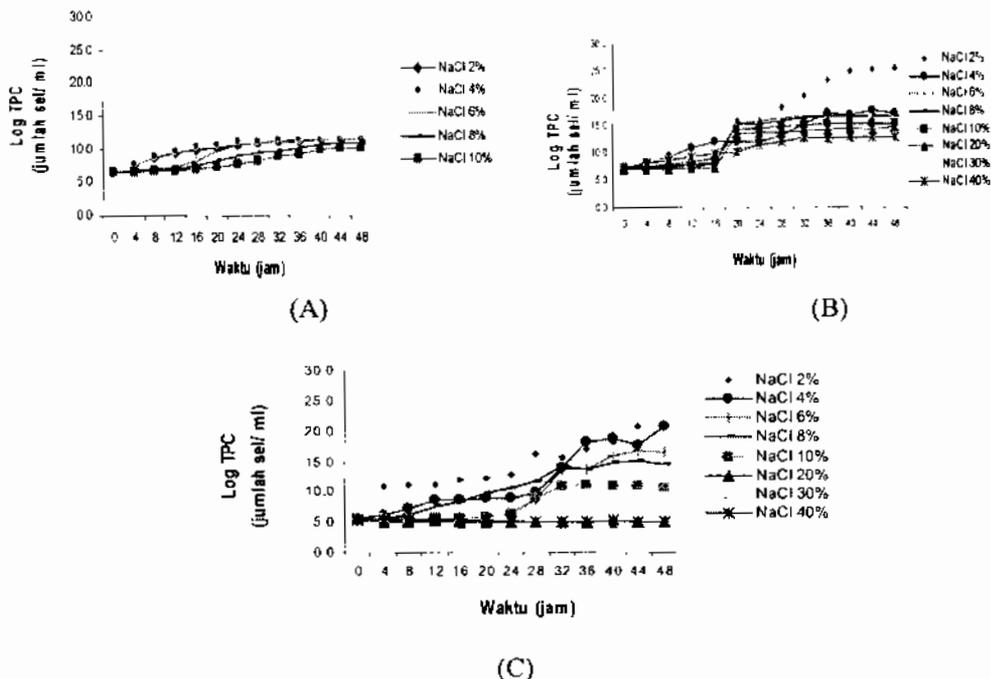
Gambar 1. Kurva pertumbuhan bakteri laut

Pengaruh Konsentrasi NaCl terhadap Pertumbuhan Bakteri yang Berasosiasi dengan Spons

Berdasarkan Gambar 2 dapat diketahui bahwa konsentrasi NaCl berpengaruh terhadap pola pertumbuhan ketiga bakteri. Secara umum pola pertumbuhan ketiga jenis bakteri sama, yaitu diawali dengan fase adaptasi dilanjutkan fase eksponensial, kemudian mencapai fase stasioner. Konsentrasi NaCl 2 % dan 4 % pada media awal media menyebabkan bakteri tumbuh langsung menuju fase eksponensial. Hal ini diduga karena media inokulasi yang digunakan hampir sama kandungannya dengan media fermentasi (konsentrasi NaCl yang digunakan hampir sama). Konsentrasi NaCl 6 % dan 8 % pada media menunjukkan perbedaan lamanya fase adaptasi pada ketiga jenis bakteri, sedangkan pada konsentrasi NaCl yang lebih tinggi (10 %) lebih memperpanjang fase adaptasi. Selanjutnya peningkatan konsentrasi NaCl dalam media di atas 10 % (hingga 40 %) menyebabkan tidak tumbuhnya *Acinetobacter baumannii* dan α Proteobacteria, namun menyebabkan pertumbuhan yang langsung menuju fase eksponensial bagi *Chromohalobacter sp.*

Bakteri *Acinetobacter baumannii* dan α Proteobacteria yang masih dapat tumbuh hingga penambahan konsentrasi NaCl 10 % pada media menyebabkan kedua bakteri ini termasuk kelompok bakteri halofilik moderat, sedangkan masih dapat tumbuhnya bakteri *Chromohalobacter sp.* hingga penambahan konsentrasi NaCl 40 % pada media, menyebabkan bakteri ini termasuk kelompok bakteri ekstrim halofilik. Radrigucz (2000) menyatakan bahwa bakteri halofilik moderat merupakan bakteri yang masih dapat tumbuh dengan konsentrasi NaCl antara 5-20 %, sedangkan bakteri ekstrim halofilik merupakan bakteri yang masih dapat tumbuh dengan konsentrasi NaCl antara 20-30 %. Berdasarkan Gambar 2 juga dapat diketahui bahwa kedua jenis bakteri, yaitu *Chromohalobacter sp.* dan *A. baumannii* dapat tumbuh baik pada media dengan

konsentrasi NaCl 2 %, sedangkan α -Proteobacteria dapat tumbuh baik pada media dengan konsentrasi NaCl 4 %.

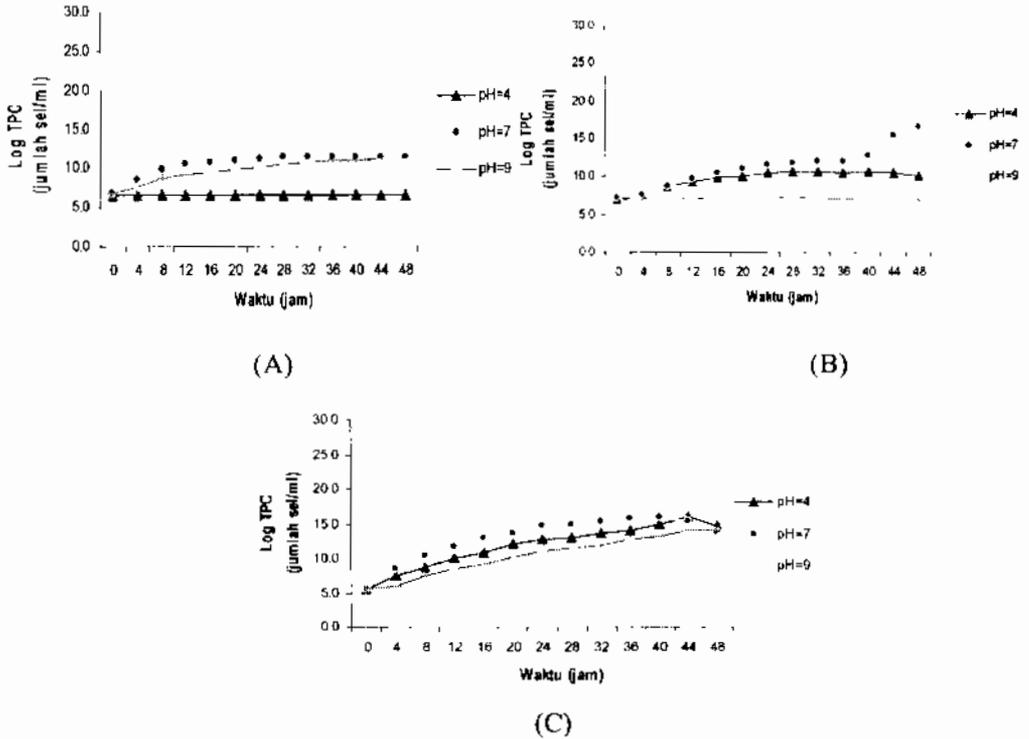


Gambar 2. Kurva pertumbuhan bakteri (A) α -Proteobacteria, (B) *Chromohalobacter* sp., dan (C) *A. baumannii* pada konsentrasi NaCl berbeda

Pengaruh pH Awal terhadap Pertumbuhan Bakteri yang Berasosiasi dengan Spons

Berdasarkan Gambar 3 dapat diketahui bahwa pH awal media berpengaruh terhadap pola pertumbuhan ketiga jenis bakteri. Bakteri α Proteobacteria tidak dapat tumbuh pada pH awal 4 dan bakteri *Chromohalobacter* sp. tidak dapat tumbuh pada pH awal 9, namun keduanya dapat tumbuh pada pH awal media 7. *Acinetobacter baumannii* dapat tumbuh pada semua perlakuan pH yang diujikan (pH 4, 7, dan 9). Tidak tumbuhnya α Proteobacteria pada pH awal media 4 menunjukkan bahwa bakteri tersebut tidak dapat hidup pada kondisi asam. Hal ini sesuai dengan pernyataan Cho dan Giovannoni (2003) bahwa kisaran pertumbuhan bakteri tersebut adalah antara 6,0-9,0; dengan pH optimum 8,0. Sementara itu bakteri *Chromohalobacter* sp. tidak dapat tumbuh pada pH awal media 9. *Acinetobacter baumannii* pada semua pH awal yang diujikan diduga karena kisaran pH pertumbuhan bakteri ini luas. Seperti dikutip Holt *et al.* (1994) bahwa semua jenis dari *Acinetobacter* sp. dapat tumbuh baik pada semua jenis media. Berdasarkan

Gambar 3 dapat disimpulkan bahwa pH yang tepat untuk pertumbuhan ketiga jenis bakteri tersebut adalah pH 7.

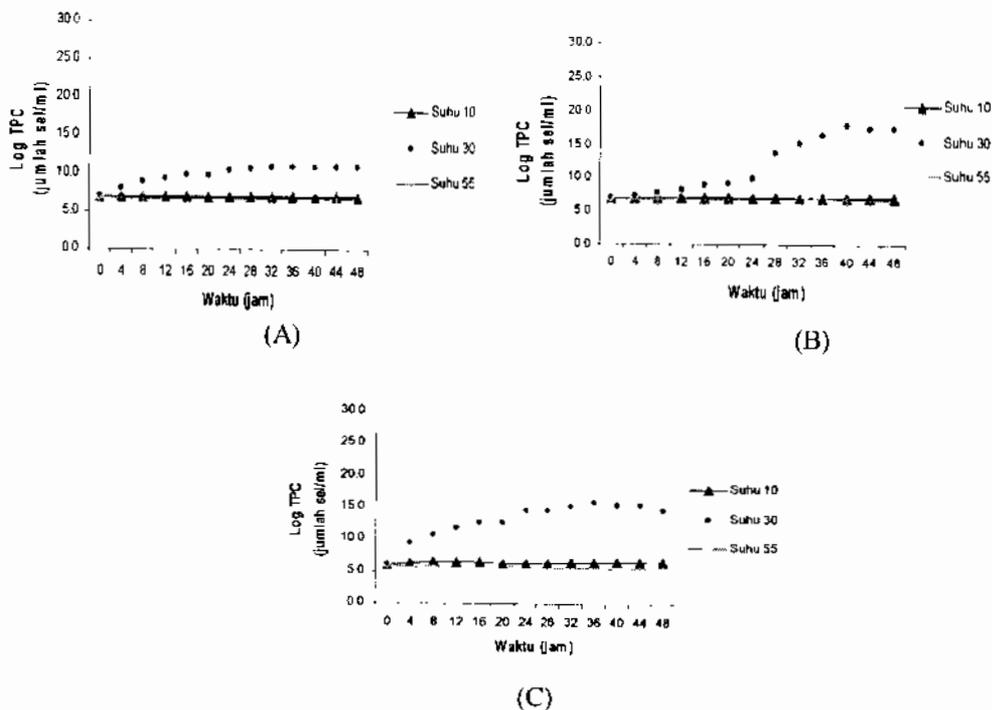


Gambar 3. Kurva pertumbuhan bakteri (A) α -Proteobacteria, (B) *Chromohalobacter* sp., dan (C) *A. baumannii* pada pH awal media yang berbeda

Selama inkubasi terjadi perubahan nilai pH. Perubahan nilai pH berhubungan dengan (1) degradasi protein dan senyawa protein lain dengan membentuk amonia/produk alkalin lain; (2) pengambilan kation dan anion tertentu; (3) metabolisme substrat karbon dengan membentuk asam organik (Jenkins 1992). Sewaktu bakteri mengalami pertumbuhan, pH dalam media mempengaruhi pertumbuhan (enzim dan sistem transpor) yang terdapat dalam membran sel. Struktur protein akan berubah bila pH dalam media berubah. Bakteri memiliki enzim yang berfungsi sempurna pada pH tertentu (Lay 1994). Bila terjadi penyimpangan pH, pertumbuhan dan metabolisme bakteri akan terhenti. Jika pH asam, maka akan terjadi kenaikan ion hidrogen. Akibatnya sel tidak dapat menghasilkan ATP dan terjadi kegagalan respirasi. Pertumbuhan menjadi lambat sehingga bakteri tersebut akhirnya mati (Wang *et al.* 1979). *Acinetobacter baumannii* dengan pH awal 4 terus mengalami kenaikan pH sampai akhir proses fermentasi. Hal yang sama terjadi pula pada pengamatan nilai pH media pada bakteri *Chromohalobacter* sp.

Pengaruh Suhu terhadap Pertumbuhan Bakteri yang Berasosiasi dengan Spons

Berdasarkan Gambar 4 dapat diketahui bahwa pada suhu 30°C menunjukkan pola pertumbuhan ketiga bakteri yang cenderung sama, yaitu tidak mengalami fase adaptasi, dan langsung menuju fase eksponensial dilanjutkan fase stasioner.



Gambar 4. Kurva pertumbuhan bakteri (A) α -proteobacteria, (B) *Chromohalobacter* sp., dan (C) *A. baumannii* pada suhu inkubasi yang berbeda

Penggunaan suhu pertumbuhan 10 °C dan 55 °C menyebabkan tidak terjadinya pertumbuhan. Berdasarkan hasil tersebut dapat disimpulkan bahwa *A. baumannii* dapat tumbuh baik pada suhu 30 °C. Hal ini menandakan bahwa bakteri tersebut termasuk kedalam golongan mesofilik. Hal ini sesuai dengan pernyataan Radriguez (2000) bahwa bakteri golongan *Acinetobacter* dapat tumbuh pada suhu 25-40 °C. *Chromohalobacter* sp. dan α -Proteobacteria juga dapat tumbuh baik pada suhu 30 °C. Suhu yang terlalu tinggi dapat menyebabkan kerusakan pada membran dan organel sel bakteri yang mengandung protein. Semakin tinggi suhu maka perusakan sel semakin cepat (Tjitrosomo 1984). Sementara pada suhu rendah akan mengurangi aktivitas enzim hingga pertumbuhan organisme tidak terjadi (Wynn 1974).

IV. KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian ditetapkan waktu propagasi untuk *A. baumannii* adalah pada jam ke-24 dengan nilai absorbansi sebesar 0,96; α Proteobacteria adalah pada jam ke-16 dengan nilai absorbansi sebesar 0,92; dan *Chromohalobacter* sp. adalah pada jam ke-28 dengan nilai absorbansi sebesar 1,11. *Acinetobacter baumannii* dan *Chromohalobacter* sp. tumbuh baik pada media berkonsentrasi NaCl 2 %, pH 7, dan suhu 30 °C. α -Proteobacteria tumbuh baik pada media berkonsentrasi NaCl 4 %, pH 7, dan suhu 30 °C.

DAFTAR PUSTAKA

- Cho JC, Giovannoni SJ. 2003. *Pavularcula bermudensis* gen. nov., sp. nov., a marine bacterium that forms a deep branch in the α -proteobacteria. *J Sys and Evol Microbiol* 53:1032-1036.
- Couwelaar MV, Soest RV, Kluijver MD, Gomez R. 2001. Symbiosponge Web. [Http://www.zma.bio.uva.nl/departments/coel/symbiosponge](http://www.zma.bio.uva.nl/departments/coel/symbiosponge) [1 Februari 2004].
- Desniar, T. Nurhayati, M.T. Suhartono, E.M. Isa. 2006. Modifikasi media *marine broth* pada produksi inhibitor protease dari bakteri *Acinetobacter baumannii* yang hidup bersimbiosis dengan sponge *Plakortis nigra*. *Buletin THP* IX(1):67-76.
- Fardiaz S. 1988. *Fisiologi Fermentasi*. Bogor: Pusat Antar Universitas, Institut Pertanian Bogor.
- Hadioctomo RS.1993. *Mikrobiologi Dasar dalam Praktek: Teknik dan Prosedur Dasar Laboratorium*. Jakarta: Gramedia.
- Jenkins RO. 1992. Control of Environment Factors Influencing Growth. Di dalam: Cartledge TG, editor. *In Vitro Cultivation of Microorganism*. London: Butterworth Ltd.
- Lay BW. 1994. *Analisis Mikroba di Laboratorium*. Jakarta: PT Raja Grafindo Persada.
- Lee, Y.K., J.H. Lee, H.K. Lee. 2001. Microbial symbiosis in marine sponges. *J Microbiol* 30:254-264.
- Tjitrosomo SS. 1984. *Dunia Mikroba II*. Jakarta: Bharata Karya Aksara.

PROSIDING

Konferensi Sains Kelautan dan Perikanan Indonesia I
Kampus FPIK - IPB Dramaga, 17-18 Juli 2007

- Nurhayati, T., M.T. Suhartono, L. Nuraida, S.B. Poerwanto. 2006a. Karakterisasi awal inhibitor protease dari bakteri yang berasosiasi dengan spons asal Pulau Panggang, Kepulauan Seribu. *Hayati* 13(2):58-64.
- Nurhayati, T., M.T. Suhartono, Desniar, R. Suwardinni. 2006b. Pengaruh variasi pH dan NaCl terhadap produksi inhibitor protease yang dihasilkan oleh *Acinetobacter baumannii* (bakteri yang berasosiasi dengan spons *Plakortis nigra*). *Buletin THP* IX(2):56-69.
- Nurhayati T, Suhartono MT, Suptijah P, Febrian I. 2004. *Screening* inhibitor protease dari sponge, Kepulauan Seribu. *Buletin THP* VII(2): 72-83.
- Radriguez M. 2000. Halofilos organimos. <http://www.bahamaswildlife.fsnet.co.uk/sponge.html> [24 Februari 2006].
- Sabana A. 2005. *Screening* dan karakterisasi bakteri laut penghasil inhibitor protease pada sponge dari Kepulauan Seribu Jakarta [skripsi]. Bogor: Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Institut Pertanian Bogor.
- Wang *et al.* 1979. *Fermentation and Enzyme Technology*. New York: John Wiley and Sons.
- Wynn CH. 1974. *The Structure and Function of Enzymes*. London: Edward Arnold Ltd.