

Karakterisasi Bakteri Symbion Spons Penghasil Enzim Protease dari Perairan Sekotong Lombok Barat

Sri Sofiati Umami

Pendidikan IPA Biologi, Fakultas Tarbiyah dan Keguruan
Universitas Islam Negeri Mataram

Email: *sofie.umami@uinmataram.ac.id*

Abstrak

Spons laut merupakan kelompok invertebrata di dalam ekosistem laut yang memiliki nilai ekonomis tinggi, selain memiliki aspek ekologi yang penting di dalam ekosistem laut, spons juga merupakan agen potensial dalam bidang farmasi. Berbagai mikroorganisme kini diketahui memiliki hubungan simbiosis dengan spons dan dapat diisolasi untuk berbagai kepentingan hidup manusia. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengisolasi bakteri yang bersimbiosis dengan Spons dari perairan sekotong, Lombok Barat dan mengetahui aktivitas proteolitiknya. Penelitian ini merupakan penelitian deskriptif dengan pendekatan kualitatif dimana analisis data dijelaskan dalam bentuk gambar dan deskripsi. Karakterisasi bakteri dilakukan berdasarkan hasil pengamatan morfologi, pewarnaan gram dan uji biokimia. Hasil penelitian ini diperoleh 3 isolat bakteri yang semuanya diduga teridentifikasi sebagai *Bacillus sp.* Berdasarkan uji aktifitas proteolitik diketahui bahwa isolat bakteri spons dari perairan Sekotong, Lombok Barat tidak memiliki aktivitas enzim ekstraseluler protease.

Kata kunci : Spons, Bakteri symbion, Protease, Sekotong.

Pendahuluan

Protease tergolong kelompok enzim yang kompleks dan memiliki posisi sentral dalam berbagai industri komersil seperti industri pangan, tekstil, farmasi, hingga pengelolaan limbah. Aplikasi Protease yang sangat luas tersebut menjadikannya sebagai salah satu enzim yang paling banyak diperjualbelikan di seluruh dunia. Keterbatasan kelompok hewan dan tumbuhan mensintesis protease untuk memenuhi kebutuhan manusia telah mendorong para peneliti untuk mengeksplorasi sumber penghasil protease baru dari mikroorganisme (bakteri). Keutamaan bakteri selain memiliki keanekaragaman yang tinggi juga kemampuan reproduksinya yang singkat sehingga mudah dimanipulasi secara genetik. Salah satu bakteri yang potensial dan masih belum banyak dieksplorasi adalah bakteri yang bersimbiosis dengan spons.

Spons merupakan hewan invertebrata berpori yang termasuk dalam Filum Porifera. Spons berperan sebagai filter-feeder yaitu

memiliki cara makan dengan menyaring/ menyerap air laut yang mengandung makanan melalui pori-pori (ostium). Makanan porifera berupa mikroorganisme termasuk bakteri yang hidup di laut atau sisa organisme mati. Jumlah bakteri yang terkandung dalam spons dapat mencapai 40% hingga 60% dari total biomassa spons (Lee dkk, 2001). Fungsi interaksi antara spons dan mikroorganisme tersebut antara lain untuk pertukaran nutrisi, stabilitas struktur spons dan produksi metabolit sekunder (Taylor, 2007).

Di sisi lain, Bakteri yang berasosiasi dengan spons merupakan sumber enzim hidrolitik ekstraseluler yang sangat baik karena permukaan dan ruang internal spons lebih kaya nutrisi (Feby dan Nair, 2010) Selain itu, diketahui bahwa bakteri yang berasosiasi dengan spons mampu menghasilkan metabolit sekunder bagi inangnya yang berfungsi sebagai pertahanan kimia terhadap predator (Juneaus, 2002).

Ekplorasi mengenai bakteri symbion perlu terus dilakukan dalam upaya untuk menemukan strain-strain baru. Lingkungan

yang ekstrim seperti air laut menjadi salah satu tempat pencarian strain baru yang difokuskan oleh peneliti. Pantai merupakan suatu ekosistem yang memiliki tingkat salinitas yang tinggi. Kondisi lingkungan air asin yang ekstrim (salinitas dan ketersediaan nutrisi) menyebabkan bakteri yang hidup pada lingkungan ini tangguh dan kerap melakukan kompetisi dengan bakteri jenis lain sehingga diduga bakteri tersebut memiliki kemampuan dalam menghasilkan metabolit dengan aktivitas yang tinggi, salah satunya adalah protease.

Pemanfaatan enzim dan senyawa metabolit yang dimiliki bakteri simbiosis menjadi solusi untuk memperoleh sumber enzim protease tanpa melakukan eksploitasi spons dalam jumlah besar. Penelitian ini bertujuan menemukan strain bakteri yang digunakan sebagai sumber penghasil protease yang potensial dan enzim proteasenya dapat diproduksi dalam jumlah besar (scaling-up) untuk digunakan oleh masyarakat luas. Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan isolat bakteri yang bersimbiosis dengan spons dari perairan Sekotong, Lombok Barat dan mengetahui kemampuan isolat bakteri tersebut dalam menghasilkan enzim ekstraseluler protease.

Metode Penelitian

Lokasi dan Tempat Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Pendidikan IPA Biologi Universitas Islam Negeri Mataram pada bulan Agustus-November 2017. Sampel diambil di Perairan Sekotong di sekitar Balai Perikanan Budidaya Laut Lombok, Lombok Barat. Sampel spons dibawa ke laboratorium untuk diisolasi bakteri yang bersimbiosis dengan spons laut.

Rancangan Penelitian

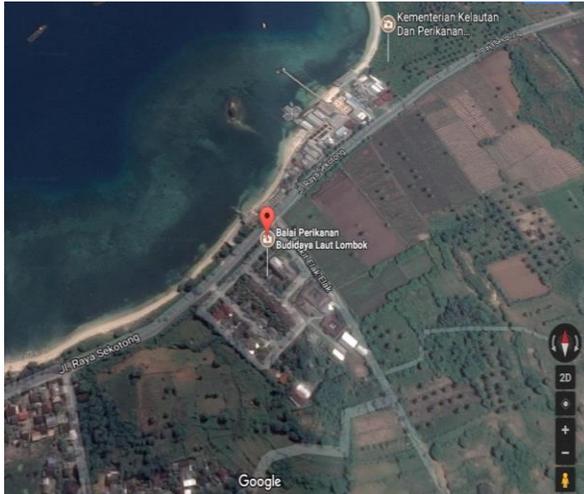
Penelitian ini merupakan penelitian kualitatif dengan menggunakan metode deskriptif, yang bertujuan untuk menggambarkan sifat dari suatu keadaan yang ada pada waktu penelitian dilakukan dan

menjelajahi penyebab dari gejala-gejala yang terjadi (Sevilla dkk., 2006). Metode penentuan titik pengambilan sampel spons dengan metode purposive sampling dengan penentuan titik pengamatan dilakukan dengan memperhatikan berbagai pertimbangan dan kondisi dasar laut yang kaya dengan porifera (spons).

Alat dan Bahan

Alat Snorkling, heater elektrik, timbangan analitik, inkubator, spatula, mikroskop binokuler, beaker glass, gelas ukur, spreader, Bunsen, kertas jagung, aluminium foil, paper disc, rak tabung reaksi, masker, glove, kertas label, plastik, bak plastik, gunting, autoklaf (Hirayama), ose, mikropipet volume 500 μ L, cawan petri, tabung reaksi, erlenmeyer dan volume pipet (Pyrex). Nutrient agar (Oxoid), Nutrien broth (Oxoid), Agar (Bacto), Aquades steril, Susu skim, alkohol 96%, alkohol 70%, air laut.

Lokasi Pengambilan Sampel



Gambar 1. Tampilan Google Earth Titik Sampling Penelitian

Sekotong merupakan salah satu dari sepuluh kecamatan yang terdapat di Kabupaten Lombok Barat yang terletak di bagian paling Selatan. Sebelah Utaranya berbatasan dengan Kecamatan Lembar, Sebelah Timurnya berbatasan dengan Kabupaten Lombok Tengah, Sebelah Selatannya berbatasan langsung dengan Lautan Indonesia dan sebelah Baratnya berbatasan dengan Selat Lombok.

Sekotong memiliki luas wilayah sekitar 330,45 km². Dilihat dari segi tekstur geografisnya, wilayah sekotong memiliki banyak perbukitan dan lembah terletak di Dusun Gili Genting, Desa Sekotong Barat, Kecamatan Sekotong Barat, Kabupaten Lombok Barat, Provinsi Nusa Tenggara Barat, posisi geografis terletak pada 115^o46' – 116^o28' BT dan 8^o12' – 8^o55' LS dengan ketinggian tempat 5 meter di atas permukaan laut. Stasiun Sekotong berbatasan dengan Dusun Pengawisan di sebelah timur, Desa Kedaru di sebelah selatan Dusun Gili Genting di sebelah barat dan Selat Lombok di sebelah utara.

Sterilisasi Alat dan Bahan

Proses sterilisasi menggunakan autoclave

dilakukan pada suhu 121^oC selama 15 menit dengan tekanan sebesar satu atm (Donnelly, 2008). Alat dan bahan penelitian yang disterilisasi menggunakan *autoclave* diantaranya petridisk, mikrotube, pipet volume, tabung reaksi, tabung Erlenmeyer yang telah berisi air laut serta media yang digunakan untuk mengisolasi, menumbuhkan dan menguji aktivitas bakteri simbion. Peralatan akan dikeluarkan dari autoclave setelah proses sterilisasi selesai, kemudian disimpan di dalam lemari pendingin.

Pengambilan Sampel

Teknik pengambilan sampel didasarkan pada penelitian Abubakar dkk (2011). Pengambilan sampel ini dilakukan secara purposif, yaitu dengan menyusuri dasar laut. Pengambilan sampel spons dilakukan dengan cara *snorkling* di perairan Sekotong, Lombok Barat pada kedalaman sekitar 1–2 m. Spons diambil dengan dipotong menggunakan pisau kemudian dimasukkan ke dalam kantong plastik *poly-ethylen* yang sebelumnya telah diisi air laut, kemudian disimpan dalam *cool box* berisikan suhu 4^oC untuk dianalisis selanjutnya di laboratorium.

Persiapan Media Isolasi dan Uji Aktivitas

Media yang digunakan untuk mengisolasi bakteri yang bersimbiosis dengan spons laut adalah media NA dengan menggunakan air laut sebagai pelarut. Penggunaan media NA untuk isolasi bakteri yang bersimbiosis dengan spons laut didasarkan pada penelitian Rua *et al* (2014). Media yang digunakan untuk menguji aktivitas bakteri penghasil enzim ekstraseluler proteolitik adalah Skim Milk Agar (SMA) yang dilarutkan dengan air laut. Media SMA digunakan sebagai media untuk menguji aktivitas bakteri yang bersimbiosis dengan spons laut didasarkan pada penelitian Feby dan Nair (2010).

Isolasi Bakteri

Spons dibersihkan terlebih dahulu dengan air laut yang mengalir sebelum diisolasi bakteri. Jaringan diambil dengan cara memotong bagian spons sebanyak satu gram kemudian digerus dengan mortar yang sebelumnya telah

disterilkan. Hasil penggerusan dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang diencerkan dengan sembilan mL air laut steril (10^0), kemudian dikocok hingga homogen. Selanjutnya dari pengenceran 10^0 diambil 1ml dengan mikropipet kemudian dimasukkan ke dalam 9 ml air laut steril dan diperoleh pengenceran 10^{-1} . Pengenceran dilanjutkan hingga nilai pengenceran 10^{-3} .

Sampel diinokulasi dengan metode *surface plate*, dengan cara mengambil pengenceran suspensi bakteri sebanyak $50\mu\text{l}$ menggunakan mikropipet untuk diinokulasikan pada media NA air laut secara aseptik. Selanjutnya diratakan menggunakan *spreader* dan diinkubasikan selama 24-48 jam dalam inkubator suhu 30°C (Anand, 2006). Koloni bakteri diamati setiap 24 jam. Setiap koloni bakteri yang tumbuh dipisahkan berdasarkan warna dan bentuk koloni, serta dimurnikan (dipurifikasi) dengan media yang sama (Abu Bakar dkk, 2011)

Purifikasi Isolat Bakteri

Pemurnian isolat bakteri dilakukan dengan metode goresan (*streak method*). Koloni bakteri yang diambil untuk dimurnikan adalah koloni yang dominan (Pastra, dkk., 2012). Koloni-koloni bakteri yang tumbuh pada masing-masing petridisk diambil, selanjutnya koloni bakteri tersebut digoreskan pada permukaan media NA, kemudian diinkubasi dalam inkubator pada suhu 30°C selama 2×24 jam. Pengamatan pertumbuhan isolat bakteri dilakukan setiap 24 jam.

Uji Aktivitas Penghasil Enzim Ekstraseluler Selulitik

Uji aktivitas produksi enzim protease dilakukan berdasarkan penelitian Feby dan Nair (2010). Tiap isolat murni pada media NA diambil menggunakan ose kemudian diinokulasikan ke dalam 1 ml media NB air laut dalam mikrotube yang berbeda. Isolat dalam

mikrotube kemudian diinkubasi dalam incubator selama 24 jama pada suhu 30°C . isolate yang tumbuh terlihat dari warna yang berubah keruh pada mikrotub. Isolate kemudian diinokulasikan pada *paper disc*, dengan cara mencelupkan *paper disc* pada isolate bakteri dalam media NB. Inokulat kemudian di tanam pada media NA dengan penambahan 5% skim milk yang dilarutkan dengan air laut steril. Isolate kemudian diinkubasi pada suhu 30°C selama 24-48 jam.

Identifikasi aktivitas proteolitik dilakukan dengan mengukur zona bening yang terbentuk disekitar *paper disc*.

Analisis Data

Data penelitian hasil uji aktivitas enzim ekstraseluler proteolitik dari bakteri yang bersimbiosis dengan spons disajikan dalam bentuk uraian teks bersifat naratif, tabel dan gambar.

Hasil dan Pembahasan

Identifikasi Spons

Spons yang diambil dari perairan Sekotong dibawa ke laboratorium untuk diidentifikasi. Terdapat 4 sampel Spons yang diberi kode Sp1, Sp 2, Sp 3 dan Sp 4. Keempat sampel tersebut diidentifikasi secara morfologi. Hasilnya menunjukkan spesies 2 memiliki kemiripan dengan Spons *Petrosiasp*. Ketiga spesies lainnya tidak dapat diidentifikasi disebabkan pada proses pengambilannya tidak utuh dan teroksidasi saat dibawa ke laboratorium.

Spons ini termasuk ke dalam famili yang sama dengan *Xestospongia* yaitu *Petrosiidae*. Skeleton ektosomal spesies ini berupa potongan spikula yang seragam (isotropic), dengan skeleton choanosomal yang tersusun atas saluran spikula yang padat dan terikat dengan sedikit spongin, sehingga membentuk tekstur yang keras. Spesies ini memiliki sekitar 2 jenis ukuran *oxeote* atau spikula *strongylote* (Hooper, 2000).

Isolat Bakteri Symbion Spons

Bakteri yang bersimbiosis dengan spons dari perairan Sekotong berhasil ditumbuhkan

pada media SNA air laut yang ditandai dengan kekeruhan media setelah media yang diinokulasi dengan sampel diinkubasi pada suhu 30°C selama 48 jam. Kemudian ketiga isolat yang menunjukkan ciri morfologi yang berbeda dipindahkan ke media SNA baru dengan cara goresan sinambung/kuadran seperti terlihat pada gambar 3A dan diberi kode SK2, SK3 dan SK5.

Ketiga Isolat SK2, SK3 dan SK5 teridentifikasi sebagai bakteri gram positif dan memperlihatkan ciri morfologi koloni dan sel yang sama yaitu bentuk basil. Kemudian dilakukan uji biokimia sebagai tahapan identifikasi selanjutnya. Hasil uji biokimia yang dapat diamati bahwa koloni SK2, SK3 dan SK5 tidak dapat memproduksi gas/ H₂S, oksidase dan katalase positif. Reaksi negatif ditampakan pada ketiga isolat untuk pengujian malonate, inositol, sorbitol, rhamnose, arabinose, adonitol, raffinose, salicin, dan arginin.

Tabel 1. Karakteristik Morfologi Isolat Bakteri Symbion Spons Perairan Sekotong

No	Isolat	Morfologi Koloni			Morfologi Sel
		Warna	Tepi	Tekstur	
1	SK2	bening	rata	Berlendir mengkilat	Basil/ Gr (+)
2	SK3	bening	rata	Berlendir mengkilat	Basil/ Gr (+)
3	SK5	bening	rata	Berlendir mengkilat	Basil/ Gr (+)

Berdasarkan karakteristik morfologi dan biokimia tersebut, ketiga isolat tersebut diduga teridentifikasi sebagai bakteri *Bacillus sp.* Namun karena terdapat perbedaan hasil pada beberapa uji biokimia, jika diidentifikasi sampai ke tingkat spesies menggunakan kunci identifikasi *Bergeys Manual of Determinative Bacteriology*, ketiga isolat tersebut diduga merupakan spesies yang berbeda. SK2 *Bacillus badius*, SK3 *Bacillus alvei* dan SK5 *Bacillus*

macquariensis.

Spesies *Bacillus* dikenal sebagai penghasil enzim ekstraseluler protease, bahkan dalam skala industri spesies ini merupakan spesies yang paling sering dikultur untuk memproduksi berbagai macam enzim adalah (Pant, dkk., 2014). Penelitian ini selanjutnya menguji kemampuan ketiga isolat tersebut memproduksi enzim ekstraseluler protease.

Aktivitas Proteolitik Bakteri Simbion Spons

Isolat-isolat bakteri yang teridentifikasi, selanjutnya diuji aktivitas proteolitiknya. Namun dari ketiga isolat bakterisimbion spon tersebut, tidak ada yang menunjukkan aktivitas proteolitik. Aktivitas hidrolisis secara kualitatif merupakan gambaran dari kemampuan isolat bakteri proteolitik merombak proteindengan membandingkan besarnya zona jernih di sekitar koloni dengan besarnya diameter koloni. Dari hasil pengujian aktifitas enzim protease diketahui bahwa tidak ada koloni yang mampu mendegradasi enzim protease pada media SNA. Hal ini diduga disebabkan isolat bakteri tidak memiliki enzim ekstraseluler protease, sehingga pada media yang ditambahkan susu skim tidak menunjukkan adanya pembentukan zona bening. Selain itu, ketidakmampuan bakteri mendegradasi diduga disebabkan konsentrasi susu skim yang ada di media terlalu tinggi yaitu 5%. Untuk penelitian selanjutnya perlu dilakukan optimasi terhadap media susu skim dengan konsentrasi yang lebih rendah.

Pada gambar 2B dapat diamati bahwa tidak ditemukan aktivitas proteolitik. Koloni yang diambil berasal dari isolat SK2, SK3 dan SK5. Ketiadaan aktifitas enzim proteolitik pada isolat bakteri pada penelitian ini diduga disebabkan karena media tumbuh bakteri yang digunakan kurang berisi nutrisi tambahan bagi pertumbuhan bakteri sehingga bakteri tersebut tidak menunjukkan kemampuan menghasilkan enzim protease. Sedangkan Penelitian lain serupa membuktikan hal yang berbeda yaitu bakteri simbion spons laut lain jenis *Haliclona* sp. Yang teridentifikasi sebagai bakteri *Enterobacter* sp memiliki aktivitas proteolitik yang tinggi (Andriyono dkk, 2016).

Sejalan dengan penelitian sebelumnya, Setyati, dkk (2016) berhasil mengisolasi bakteri simbion spons dari kedalaman 1-2 meter yang teridentifikasi sebagai *Bacillus* sp., *Acinetobacter* sp., dan *Pseudomonas* sp. Ketiganya terbukti memiliki

aktivitas proteolitik, amilolitik, lipolitik dan selulolitik.

Ketidakmampuan aktivitas proteolitik isolat bakteri dari perairan Sekotong diduga disebabkan oleh habitat Spons yang hidup sekitar Balai Perikanan Budidaya Laut. Dari sisi jumlah dapat diamati telah mengalami penurunan. Penurunan jumlah spons ini diduga karena dipengaruhi pembuangan limbah/sampah hasil aktivitas dari Balai. Hal ini dapat berdampak pada sisi ekologi dari bakteri yang bersimbiosis pada Spons tersebut karena bakteri merupakan mikroorganisme yang hidupnya sangat bergantung pada kondisi lingkungan. Semakin dalam habitat spons akan berbanding lurus dengan jumlah dan kelimpahannya karena kondisi perairan yang makin jauh dari sentuhan aktifitas manusia.

Faktor-faktor lain yang dapat memengaruhi aktivitas dari bakteri adalah cahaya, pH dan salinitas air. Semakin dalam habitatnya, semakin berkurang terpapar sinar matahari yang pada beberapa spesies bakteri, sinar matahari dapat membunuh sel bakteri karena pengaruh sinar ultraviolet dan umumnya cahaya memengaruhi daya rusak kepada sel bakteri yang tidak mempunyai pigmen fotosintesis, pH juga dapat memengaruhi aktivitas bakteri, batas pH untuk pertumbuhan bakteri merupakan gambaran dari batas pH bagi kegiatan enzim.

Bakteri memerlukan nilai pH antara 6,5-7,5. Umumnya asam mempunyai pengaruh buruk terhadap pertumbuhan bakteri. Namun pada penelitian tidak dilakukan pengukuran pH sehingga tidak diketahui apakah pH merupakan faktor yang memengaruhi aktivitas enzim ekstraseluler bakteri. Hasil penelitian Feby and Nair, (2010), menjelaskan bahwa bakteri yang berasosiasi dengan spons merupakan sumber yang sangat baik untuk enzim ekstraseluler seperti amilase, protease gelatinase, lipase, deoksiribonuklease, dan fosfatase. *Bacillus subtilis* diketahui merupakan produsen enzim ekstraseluler proteolitik dan telah digunakan untuk aplikasi industri (Pant dkk, 2014).

Enzim protease yang diperoleh akan bervariasi tergantung dari temperatur dan pH

yang juga dipengaruhi oleh jenis medium yang berisi komponen nutrisi penting bagi bakteri. Pant dkk (2014) menyebutkan bahwa tingginya produksi protease dapat diamati pada suhu 45°C setelah 36 jam inkubasi dan pH 10. Selain itu diduga ada pengaruh dari metabolisme spesies bakteri yang menyebabkan bervariasinya aktifitas enzim proteolitik.

Jenis media tumbuh yang digunakan ini erat kaitannya dengan metabolisme nutrisi yang terjadi di dalam sel bakteri. Gelatin merupakan substrat yang dapat ditambahkan pada media agar untuk menyeleksi (screening) aktifitas enzim proteolitik. Keberadaan media tumbuh yang berisi galaktosa dan pepton dilaporkan dapat menaikkan produksi enzim protease hingga 0.5% jika dibandingkan menggunakan sumber Karbon dan Nitrogen di dalam media (Karadag dkk, 2009).

Pada penelitian ini media tumbuh yang digunakan adalah Starch Nitrate Agar (SNA) yang merupakan media umum untuk isolasi bakteri dan media SNA yang digunakan tidak diberi tambahan nutrisi yang berperan sebagai substrat dari aktifitas enzim protease. Hal tersebut diduga yang menyebabkan tidak adanya aktifitas enzim protease saat diamati di laboratorium. Penelitian lanjutan masih perlu dilakukan untuk mengetahui jenis bakteri yang bersimbiosis dengan spons pada tingkat spesies dan menguji dengan media yang tepat mengenai aktifitas enzim proteolitik tersebut.

Kesimpulan

Isolat bakteri symbion spons teridentifikasi sebagai bakteri *Bacillus sp*, dan hasil uji aktivitas proteolitik menunjukkan bahwa ketiga isolat bakteri symbion spons tidak memiliki aktivitas proteolitik.

Ucapan Terimakasih

Penulis mengucapkan ucapan terimakasih kepada Lembaga Penelitian dan Pengabdian Kepada Masyarakat Universitas Islam Negeri

Mataram yang telah memberikan hibah penelitian sehingga penelitian ini dapat terlaksana.

Daftar Pustaka

- Akhdiya, A. 2003. Isolasi Bakteri Penghasil Enzim Protease Alkalin Termotabil. *Buletin Plasma Nutfah* Vol.09. 02. Hlm 39-40.
- Anand, P. T., Bhat A. W., Shoushe Y. S., Roy U., Siddharth J., and Sarma S. P. 2006. Antimicrobial activity of marine bacteria associated with sponges from the waters off the coast of South East India. *Microbiol. Res.*, 161:252-262.
- Andriyono, S. Jalasena, B. Tjahtjaningsih, W. Pramono, H. 2015. Characterisation Of Symbiotic Bacteria Isolated From Sponge *Haliclona Sp.* *The First International Conference On Life Sciences and Biotechnology*. Jember, September 28-29, 2015.
- Anisa, 2014. Skripsi : Potensi Senyawa Antiparasit Dari Bakteri Symbion Spons *Spirastrella Hartmani* Di Pulau Pramuka Kepulauan Seribu Jakarta. IPB-Bogor.
- Cappucino, J.G. and Sherman Natalie. 1999. *Microbiology: A Laboratory Manual-5th Ed.* Benjamin/Cummings Science Publishing, California, 477p.
- Choi, N.S., and S.H., Kim. 2000. The Effect of Sodium Chloride on The Serine-type Fibrinolytic Enzymes and the Thermostability of Extracellular Protease from *Bacillus amyloliquefaciens* DJ4, *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 34(2).
- D. Karadag, A.E. Makinen, E. Efimova, J.A. Puhakka, 2009. Thermophilic biohydrogen production by an anaerobic heat-treated-hot spring culture, *Bioresour. Technol.* 100. 5790–5795.
- Faisal, M.R., Potensi Antelmintika Ekstrak Bakteri Symbion Spons Laut Terhadap Trichostrongylidae (Nematoda)

- Parasit Domba, 2016. *Jurnal Ilmu Pertanian Indonesia (JIPI)*, Vol. 21 (1): 41-47.
- Febby, A. and Nair S. 2010. Sponge-associated bacteria of Lakshadweep coral reefs, India: resource for extracellular hydrolytic enzymes. *Adv. Biosci. Biotechnol.* 1: 330-337.
- Fitrianto, N. 2009. Laju pertumbuhan dan sintasan spons *Aaptos aaptos* dikolom buatan terkontrol. Skripsi. Institut Pertanian Bogor: Bogor.
- Juneius, C. E. R. and Selvin J. 2012. Identification, phylogenetic characterization and preliminary screening of primary and secondary metabolites producing bacteria associated with marine sponge *Axinella donani*. *Indian J. Drugs Dis.*, 1(1):20-26.
- Lee, Y.K, Jung H.L, dan Hong K.L. 2001. Microbial Symbiosis in Marine Sponges. *The Journal of Microbiology*, December 2001, p.254-264.
- Lukie, T. 2007. Karakteristik Protein Serupa Silicatein Dari Sponge Asal Perairan Nias Dan Lombok. *Tesis*, Sekolah Pasca Sarjana IPB : Bogor.
- Muniarsih T., Rachmaniar R. 1999. Isolasi Substansi Bioaktif Antimikroba Dari Spons Asal Pulau Pari Kepulauan Seribu. *Prosiding Seminar Bioteknologi Kelautan Indonesia I*, Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia : Jakarta.
- Naiola, E., dan Widhyastuti, N. 2002. Isolasi, Seleksi, dan Optimasi Produksi Protease dari Beberapa Isolat Bakteri. *Jurnal Hayati*. 6:467-473.
- Pant G, Prakash A, Pavani J.V.P., Bera S, Deviram G.V.N.S., Kumar A, Panchpuri M, Prasuna RG. 2015 Production, optimization and partial purification of protease from *Bacillus subtilis*. *Journal of Taibah University for Science 9 India*: 50–55.
- Pakpahan, R. 2009. Isolasi bakteri dan uji aktivitas protease termofilik dari sumber air panas sipoholon tapanuli utarasumatera utara. Tesis Universitas Sumatera Utara: Medan.
- Pringgenies. 2009. Bioprospeksi Bakteri Symbion Dari Gastropoda *Conus miles* Terhadap Strain Bakteri MDR (*Multi Drug Resistant*). *Jurnal Ilmu Kelautan*, Vol. 14, No.1, hlm.42-45.
- Rao, M.B., Tanksale, A.M., Ghatge, M.S., and Deshpande, V.V., 1998. Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteases. *Microbiology and Molecular Biology Rev. Sci Am.* 62:597-635.
- Ribes, M, Coma, R., Atkinson, M.J., Kinzie, R.A. 2003. Particle removal by coral reef communities: picoplankton is a major source of nitrogen. *Marine Ecology Progress Series* 212, 3643-3650.
- Sabdono. 2009. Karakterisasi dan Identifikasi Bakteri Symbion Karang *Goniastrea aspera* Resisten terhadap Logam Berat Copper (Cu) dari P. Panjang, Jepara. *Jurnal Ilmu Kelautan*. Vol. 14, No. 3., hlm. 118
- Setyati, W.A. dan Subagiyo. 2012. Isolasi dan Seleksi Bakteri Penghasil Enzim Ekstraseluler (Proteolitik, Amilolitik, Lipolitik, dan Selulolitik) yang berasal dari Sedimen Kawasan Mangrove. *Jurnal Ilmu Kelautan*., 17(3):164-168.
- Setyati, W.A., dkk, 2006. Skrining Dan Seleksi Bakteri Symbion Spons Penghasil Enzim Ekstraseluler Sebagai Agen Bioremediasi Bahan Organik Dan Biokontrol Vibriosis Pada Budidaya Udang. *Jurnal Kelautan Tropis Maret* Vol.19(1):11–20.
- Son, E.S., and J.I., Kim, 2003, Multicatalytic Alkaline Serine Protease from the Psychrotropic from *Bacillus amyloliquefaciens* S94. *The Journal of Microbiology*, 41(1), Korea.
- Suryati E, Parenrengi A, dan Rosmiati. 1999. Penapisan Serta Analisis Kandungan Bioaktif Sponge *Clathria sp.* yang

Efektif Sebagai Antibiofouling Pada Teritif (*Balanus amphitrit*). *Jurnal Penelitian Perikanan Indonesia*. Vol.5, Nomor 3.

- Taylor, M.W., Radax, R., Steger, D., Wagner, M. 2007. Sponge-associated microorganisms: evolution, ecology, and biotechnological potential. *Microbiology and Molecular Biology Rev* 71, 295-347.
- Thomas, T.R.A., D. P. Kavlekar, P.A. LokaBharathi. 2010. Marine Drugs from Sponge-Microbe Association A Review. *Mar. Drugs* 2010, 8,14171468.
- Unson, M.D., Holland, N.D., Faulkner, D.J. 1994. A brominated secondary metabolite synthesized by the cyanobacterial symbiont of a marine sponge and accumulation of the crystalline metabolite in the sponge tissue. *Marine Biology*. 119,1-11.
- V. Maghsoodi, A. Kazemi, P. Nahid, S. Yaghmaei, M.A. Sabzevari, Alkaline protease production by immobilized cells using *B. licheniformis*, *Sci. Iran*. 20 (2013) 607–610.