

ISOLASI DAN PENAPISAN FIBRINOLITIK JAMUR TANAH HUTAN MANGROVE WONOREJO SURABAYA

DWI MUISRISTANTO, ACHMAD TOTO POERNOMO, SUGIJANTO

Departemen Kimia Farmasi, Fakultas Farmasi Universitas Airlangga, Surabaya, Jawa Timur

ABSTRACT

Research conducted on twenty soil samples originating from Mangrove Forest Wonorejo, Surabaya taken from ten locations. Sample was diluted to 10⁻³, cultured on media Potatoes Dextrose Agar (PDA) and tested the proteolytic activity on the media Skim Milk Agar (SMA) 2%. Thirteen of twenty samples were tested gave positive results, it is shown by a clear zone around the colonies of fungus growing. Fungus that gives positive results cultured on PDA slant as stocks of proteolytic fungi isolate. The fungus that gives proteolytic activity then determination fibrinolytic activity on fibrin media plate made of fibrin 0.3% and 1.7% agarose and Methylene Blue 400 µL. Nine samples gave positive fibrinolytic activity. Fibrinolytic enzyme activity index was measured by calculating diameter of the clear zone divided by diameter of the colony. Furthermore, fungal isolates that shown fibrinolytic activity chosen to characterize. Characterization of macroscopic fungi by looking directly form of fungal colonies reverse side method. Characterization of microscopic fungus seen in magnification 400-1000x and identified with references Pictorial Atlas of Soil and Seed Fungi (Watanabe, 2002). Pengenalan Kapang Tropik Umum (Gandjar et al., 1999), Illustrated Genera of Imperfect Fungi (Barnett and Hunter, 1998). There are two genera of fungi, *Aspergillus* and *Penicillium*, from Mangrove Eco Tourism Wonorejo, Surabaya, which is capable of producing fibrinolytic enzyme

Keywords : Screening, Soil, Fungi, Proteolytic, Fibrinolytic, Mangrove, *Aspergillus*, *Penicillium*

PENDAHULUAN

Enzim fibrinolitik merupakan enzim protease yang mampu mendegradasi fibrin yang merupakan komponen protein utama bekuan darah yang terbentuk dari fibrinogen melalui proses fibrinolisis oleh trombin. Proses fibrinolisis oleh enzim ini digunakan sebagai agen trombolitik yang dapat mendegradasi bekuan darah. (Yoshiko, et al., 2011). Enzim fibrinolitik yang menghancurkan bekuan darah dan terbukti mampu untuk terapi trombosis telah berhasil diidentifikasi dari berbagai sumber. Berbagai macam mikroorganisme telah ditapisakan untuk melihat khasiat fibrinolitiknya. Beberapa jamur juga ditemukan memiliki aktivitas fibrinolitik yang tinggi, seperti *Aspergillus ochraceus* 513, *Fusarium* sp, *Rhizopus chinensis* 12, dan *Penicillium* sp. (Rashad et al., 2012).

Beberapa penelitian juga menjabarkan bahwa *marine microorganism* dapat menghasilkan enzim dengan aktivitas trombolitik yang tinggi. Namun dari beberapa penelitian yang dilakukan hanya sedikit penelitian yang dilakukan di Indonesia. Satu diantaranya adalah penapisan agen penghasil

enzim fibronolitik dari isolat bakteri di perairan Pantai Papuma Jember (Setiawan, 2013).

Berdasarkan permasalahan yang ada, maka dilakukanlah penelitian ini yang bertujuan untuk memperoleh isolat jamur dari lokasi perairan Tanah Hutan Mangrove Pantai Wonorejo, Surabaya yang mampu menghasilkan enzim fibrinolitik dan untuk mengetahui klasifikasi jamur yang dapat menghasilkan enzim fibrinolitik tersebut.

METODE PENELITIAN

Alat dan Bahan

Alat yang digunakan: Timbangan analitik (Alep; Adventura OHAUS), autoclave (Huxley HL-340 Speedy), Laminair Air Flow Cabinet (Dalton), spektrofotometer (Bausch and Lomb Spectronic 20), inkubator (Memmert), mikropipet (Socorex calibra 822), rotavapor, rotary shaker, jangka sorong dan alat gelas

Pembuatan Media Potato Dextrose Broth (PDB) Untuk membuat 1L media PDB, membutuhkan kentang 200 g dan dextrose 20 g. Kentang yang sudah dikelupas kulitnya dipotong dadu kecil-kecil. Kemudian ditimbang, dan direbus dengan akuades. Proses perebusan dihentikan hingga air rebusan kentang berwarna

putih dan kentang melunak. Kentang dan airnya dipisahkan dengan cara disaring. Air rebusan kentang diambil dan direbus kembali dengan menambahkan dextrose. Setelah mendidih dan larut, pindahkan ke dalam beaker glass. Masukkan ke dalam tabung reaksi masing-masing tabung sebanyak 8 mL. Tutup ujung tabung dan sterilisasi dengan *autoclave* 1210C selama 30 menit. (Modifikasi Susniahti *et al.*, 2002).

Pengambilan Sampel

Pengambilan sampel dilakukan pada bulan Maret 2015 di Kawasan Tanah Hutan Mangrove Pantai Wonorejo Surabaya pada sepuluh titik. Titik lokasi diambil secara acak, lima lokasi berada di sekitar lepas pantai dan lima lokasi berada pada hutan mangrove. Penandaan titik koordinat lokasi dilakukan dengan menggunakan *Global Positioning System* (GPS) dengan koordinat yang tertera pada tabel dengan masing-masing titik dilakukan dua kali replikasi. Kemudian dilakukan pemetaan lokasi dengan bantuan aplikasi *Google Earths* seperti terlihat pada table 1. Sampel yang diambil berupa tanah atau sedimen.

Pengambilan sampel dilakukan secara aseptis dengan memijar terlebih dahulu spatel logam, yang akan digunakan untuk mengambil sampel, di atas api pembakar spiritus. Sampel tanah tersebut kemudian di masukkan ke dalam tabung yang telah berisi media *Potato Dextrose Broth* (PDB). Kemudian sampel disimpan di dalam lemari es (suhu 4°C).

Tabel 1. Titik Koordinat Pengambilan Sampel

Sampel	Koordinat Pengambilan Sampel
JM1	7°18'11"S, 112°51'5"E
JM2	7°18'16"S, 112°50'58"E
JM3	7°18'14"S, 112°50'54"E
JM4	7°18'8"S, 112°50'46"E
JM5	7°18'24"S, 112°50'40"E
JM6	7°18'26"S, 112°50'41"E
JM7	7°18'27"S, 112°50'41"E
JM8	7°18'24"S, 112°50'44"E
JM9	7°18'21"S, 112°50'40"E
JM10	7°18'2"S, 112°50'51"E



Gambar 1. Peta Koordinat Lokasi Pengambilan Sampel di Sepuluh Titik Lokasi Tanah Hutan Mangrove Pantai Wonorejo, Surabaya.

Pengenceran Sampel

Pengenceran sampel dilakukan dengan cara mengambil 1mL sampel menggunakan mikro pipet dan memasukkannya ke dalam tabung berisi 9ml larutan buffer Salin (NaCl 0,9%) sehingga didapatkan pengenceran sebesar 10^{-1} . Kemudian dari larutan dengan pengenceran 10^{-1} tersebut diambil kembali sebanyak 1mL dengan mikro pipet dan dimasukkan ke dalam tabung berisi 9mL salin sehingga didapatkan pengenceran 10^{-2} dan seterusnya hingga didapatkan pengenceran 10^{-3} .

Masing-masing pengenceran diukur transmittannya dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 580nm dengan blanko larutan NaCl 0,9% steril hingga didapatkan nilai transmittan 25% (Depkes RI, 1995). Jumlah mikroba (jamur) yang terkandung dalam suspensi tersebut diperkirakan ekuivalen dengan $3,0 \times 10^8$ CFU/ml (Rojas *et al.*, 2012).

Pembuatan Media *Potato Dextrose Agar* (PDA)

Untuk membuat 1L media PDA, membutuhkan kentang 200 g, dextrose 20 g, dan agar 15 g. Kentang yang sudah dikelupaskulitnya dipotong dadu kecil-kecil. Kemudian ditimbang sebanyak yang diperlukan, direbus dengan akuades. Proses perebusan dihentikan hingga air rebusan kentang berwarna putih dan kentang melunak. Kentang dan airnya dipisahkan dengan cara disaring. Air rebusan kentang diambil dan direbus kembali dengan menambahkan agar serta dextrose. Setelah mendidih dan larut, pindahkan ke dalam beaker glass. Masukkan ke dalam tabung reaksi masing-masing tabung sebanyak

12 mL. Tutup ujung tabung dan sterilisasi dengan *autoclave* 121°C selama 30 menit, kemudian divorteks sebelum dimiringkan. Media didiamkan hingga memadat. (Modifikasi Susniahti *et al.*, 2002)

Uji Aktivitas Proteolitik dengan Media *Skim Milk Agar*.

Setelah pengenceran serial, 100µL larutan dengan pengenceran 10^{-3} disebar pada skim lempeng agar (susu skim 2% ditambah media *potato dextrose agar*) menggunakan *spreader* dan diinkubasi selama 4 hari pada suhu kamar. Adanya aktivitas enzim proteolitik ditandai dengan adanya zona jernih disekitar koloni jamur. (Vijayaraghavan & Vincent, 2013)

Kultur Jamur Proteolitik pada Media PDA

Koloni jamur yang memberikan hasil positif pada uji aktivitas proteolitik diinokunalsikan pada media PDA secara aseptis dalam *laminar air flow*. Ujung jarum ose dilewatkan di atas api pembakar spiritus kemudian ose digoreskan ke koloni (setelah terlebih dahulu ose sudah dalam keadaan dingin agar koloni jamur tidak mati, dilakukan dengan cara menempelkan terlebih dahulu ose pada media tanpa mengenai koloni jamur). Kemudian ujung ose digoreskan pada media PDA. Inokulum disimpan dalam inkubator pada suhu kamar selama 7 hari, lalu disimpan dalam lemari pendingin bersuhu 4°C.

Uji Aktivitas Fibrinolitik dengan Lempeng Fibrin

Lempeng fibrin dibuat dengan menambahkan 1,7% agar dan 0,3% fibrin, dalam larutan dapar borat pH 7,8. Setelah penambahan agar larut dengan pemanasan, media (12ml) dituangkan ke dalam tabung reaksi dan ditutup dengan kapas lemak. Media disterilisasi pada suhu 121°C selama 30 menit. Tambahkan metilen blue sebanyak 400 µL pada plate dengan tujuan agar zona jernih fibrinolitik terlihat dengan jelas. Media dituangkan ke dalam cawan petri dan kemudian dibiarkan memadat. Lempeng yang telah memadat tersebut dilubangi untuk aplikasi sampel. Setelah inkubasi pada 37°C selama satu hari jamur penghasil enzim fibrinolitik akan menghasilkan zona jernih di sekitar koloni. Aktivitas fibrinolitik isolat jamur

ditentukan dengan mengukur indeks aktivitas enzim (IAE) fibrinolitik dengan cara menghitung diameter zona jernih dibagi dengan diameter koloni. Selanjutnya, satu isolat jamur yang memiliki aktivitas fibrinolitik tertinggi dipilih untuk dikarakterisasi. (Modifikasi dari Ashipala & He, 2007).

Pengamatan Makroskopis

Karakterisasi jamur secara makroskopis dilakukan dengan melihat secara langsung bentuk dari koloni jamur. Bentuk koloni dapat berupa *yeast* (khamir) ataupun *mold* (kapang). Serta dilihat pula warna dari koloni tersebut (Gandjar *et al.*, 1999).

Pengamatan Mikroskopis

Pengamatan ciri mikroskopis mencakup hifa, spora, sporangium, konidia dan konidiofor dan ciri khusus yang akan menentukan jenis jamur tersebut. Identifikasi dilakukan dengan mengacu pada buku *Pictorial Atlas of Soil and Seed Fungi* (Watanabe, 2002), Pengenalan Kapang Topik Umum (Gandjar *et al.*, 1999), dan *Illustrated Genera of Imperfect Fungi* (Barnett & Hunter, 1998).

Analisis Data

Analisis data dilakukan secara deskriptif dan ditampilkan dalam bentuk tabel ataupun foto. Analisis positif dari uji penapisan proteolitik dan fibrinolitik ditandai dengan terbentuknya zona jernih di sekitar koloni jamur. Indeks aktivitas enzim diperoleh dari perbandingan diameter zona jernih dibagi dengan diameter koloni yang terbentuk. Analisis karakterisasi jamur secara morfologi secara makroskopis dengan melihat langsung koloni jamur dan juga mikroskopis.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Uji Aktivitas Enzim Proteolitik

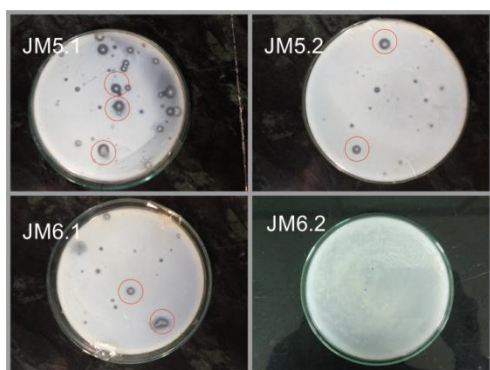
Penelitian awal dilakukan uji kualitatif aktifitas enzim proteolitik untuk mengetahui kemampuan sampel dalam mendegradasi protein. Metode yang digunakan untuk mendeteksi adanya aktivitas jamur proteolitik adalah dengan menggunakan medium yang mengandung kasein yaitu *Skim Milk Agar*. Kasein adalah salah satu jenis protein. Hidrolisis kasein digunakan untuk memperlihatkan

aktivitas hidrolitik protease yang memutuskan ikatan peptida CO-NH. Hidrolisis protein ditunjukkan dengan adanya zona bening di sekeliling pertumbuhan bakteri. Dari dua puluh sampel tanah yang diuji, tiga belas sampel yang menghasilkan enzim proteolitik yaitu JM1.1, JM1.2, JM2.1, JM2.2, JM4.1, JM4.2, JM5.1, JM5.2, JM6.1, JM8.1, JM8.2, JM9.2, dan JM10.1. Enzim proteolitik yang dihasilkan berpotensi sebagai enzim fibrinolitik. Jamur proteolitik ditumbuhkan pada media agar miring PDA (Potatoes Dextrose Agar).

Tabel 2. Hasil Uji Aktivitas enzim proteolitik

Kode Sampel	JM 1.1	JM 1.2	JM 2.1	JM 2.2	JM 3.1	JM 3.2	JM 4.1	JM 4.2	JM 5.1	JM 5.2
Aktivitas Proteolitik	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+

Kode Sampel	JM 6.1	JM 6.2	JM 7.1	JM 7.2	JM 8.1	JM 8.2	JM 9.1	JM 9.2	JM 10.1	JM 10.2
Aktivitas Proteolitik	+	-	-	-	+	+	-	+	+	-



Gambar 2. Hasil Uji Aktivitas Proteolitik JM5.1*, JM5.2*, JM6.1*, JM6.2 (tanda * menunjukkan hasil positif)

Kultur Jamur Proteolitik

Jamur yang menunjukkan aktivitas enzim proteolitik diinokulasikan pada tabung yang berisi 10 mL media PDA miring kemudian diinkubasi pada suhu kamar selama 4 – 7 hari hingga tumbuh koloni.

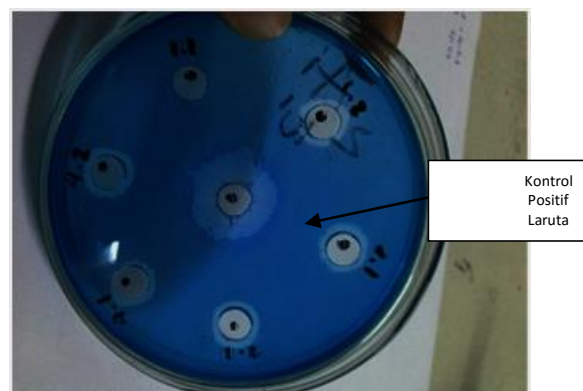
Uji Aktivitas Enzim Fibrinolitik melalui Fibrin Plate

Uji aktivitas enzim fibrinolitik dengan fibrin plate dilakukan untuk membuktikan adanya aktivitas fibrinolitik pada sampel yang positif menghasilkan enzim proteolitik. Pada uji

aktivitas iniditambahkan pewarna yaitu metilen blue. Penambahan metilen blue bertujuan untuk memperjelas zona jernih yang terbentuk. Aktivitas enzim fibrinolitik diperkirakan dengan mengukur diameter zona jernih yang terbentuk pada fibrin plate. Zona jernih yang terbentuk pada fibrin plate merupakan indikasi dari kemampuan enzim mendegradasi fibrin dan diameter yang terbentuk proporsional dengan potensi aktivitas fibrinolitiknya (Rovati *et al.*, 2009). Zona jernih yang telah terbentuk diukur diameternya dengan menggunakan jangka sorong dengan ketelitian 0,05 mm. Indeks Aktivitas Enzim (IAE) fibrinolitik dihitung dari diameter zona jernih dibagi dengan diameter lubang. Hasil uji aktivitas fibrinolitik serta perhitungan indeks aktivitas disajikan dalam tabel 3.



Gambar 3. Kultur Jamur Proteolitik Pada Media Slant PDA



Gambar 4. Hasil Uji Aktivitas Fibrinolitik JM1.1, JM1.2*, JM2.1*, JM2.2*, JM4.1*, JM4.2* (tanda * menunjukkan hasil positif)

Pada penelitian ini, indeks aktivitas enzim yang dihasilkan tidak cukup tinggi jika dibandingkan dengan kontrol positif natto, hal ini

dikarenakan dalam penelitian ini belum dilakukan optimasi lingkungan untuk dapat mencapai produksi enzim yang optimal. Sehingga dalam penelitian lanjut diperlukan optimasi kondisi lingkungan.

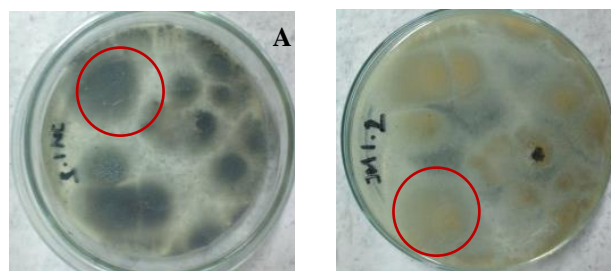
Karakterisasi Jamur yang Menghasilkan Enzim Fibrinolitik

Karakterisasi dilakukan untuk determinasi jamur yang positif menghasilkan enzim fibrinolitik. Dilakukan dengan melihat secara langsung koloni yang ditumbuhkan dalam media PDA pada cawan petri (secara makroskopis) maupun dilihat karakteristik khusus jamur menggunakan mikroskop (secara mikroskopis).

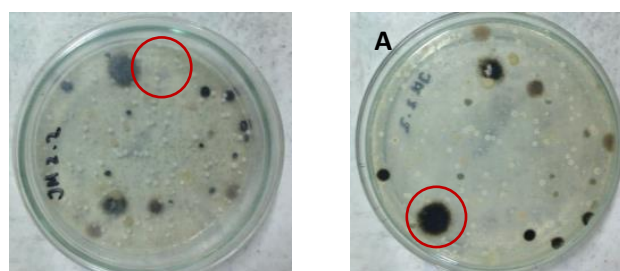
Tabel 3. Hasil Uji Aktivitas Jamur Proteolitik

Kode Sampel	Aktivitas Enzim Fibrinolitik	Diameter Zona Jernih (mm)	Diameter Lubang (mm)	Indeks Fibrinolitik
JM1.1	-	-	7,80	-
JM1.2	+	11,20	7,80	1,44
JM2.1	+	10,40	7,80	1,33
JM2.2	+	10,90	7,80	1,40
JM4.1	+	10,40	7,80	1,33
JM4.2	+	12,35	7,80	1,58
JM5.1	+	11,30	7,80	1,45
JM5.2	+	11,20	7,80	1,44
JM6.1	-	-	7,80	-
JM8.1	-	-	7,80	-
JM8.2	+	13,40	7,80	1,72
JM9.2	+	13,00	7,80	1,60
JM10.1	-	-	7,80	-

Dalam pengamatan secara makroskopis, isolat jamur fibrinolitik didapatkan dua macam karakteristik, yang pertama (pada JM1.2, JM4.1, JM4.2, dan JM5.2) memiliki warna depan (*top side*) hijau keabuan dan warna bagian belakang (*reverse side*) berwarna putih kekuningan, serta memiliki sedikit tetes-tetes eksudat. Sedangkan untuk karakteristik yang kedua (pada JM2.1, JM2.2, JM5.1, JM8.2, dan JM9.2) memiliki warna depan (*top side*) abu-abu gelap dan warna bagian belakang (*reverse side*) berwarna hitam. Dari hasil ini diperoleh kemungkinan bahwa isolate jamur berasal dari dua genus yang berbeda.



Gambar 5a. warna koloni JM1.2 tampak depan (*top side*) berwarna hijau keabuan dan 4b. warna koloni JM1.2 bagian belakang (*reverse side*) berwarna putih kekuningan



Gambar 5b. warna koloni JM2.2 memiliki warna depan (*top side*) abu-abu gelap dan 5b. warna koloni bagian belakang (*reverse side*) berwarna hitam.

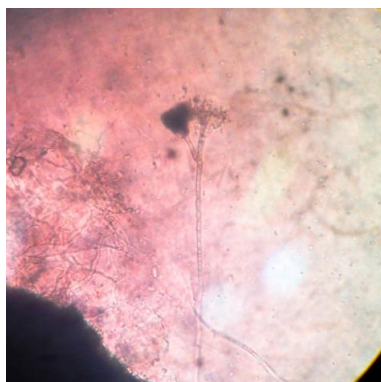
Tabel 4. Karakteristik Makroskopis

Kode Sampel	Bentuk	Warna Koloni	
		Tampak Depan	Tampak belakang
JM1.2	Kapang	Hijau Keabuan	Putih Kekuningan
JM2.1	Kapang	Abu-abu	Hitam
JM2.2	Kapang	Abu-abu	Hitam
JM4.1	Kapang	Hijau Keabuan	Putih Kekuningan
JM4.2	Kapang	Hijau Keabuan	Putih Kekuningan
JM5.1	Kapang	Abu-abu	Hitam
JM5.2	Kapang	Hijau Keabuan	Putih Kekuningan
JM8.2	Kapang	Abu-abu	Hitam
JM9.2	Kapang	Abu-abu	Hitam

Pengamatan secara mikroskopis dilakukan dengan cara mengambil sedikit bagian dari koloni jamur dengan pinset kemudian meletakkannya di atas kaca objek yang telah ditetesi air kemudian ditutup dengan kaca penutup sambil sedikit ditekan. Pada kelompok jamur JM1.2, JM4.1, JM4.2, dan JM5.2 memiliki

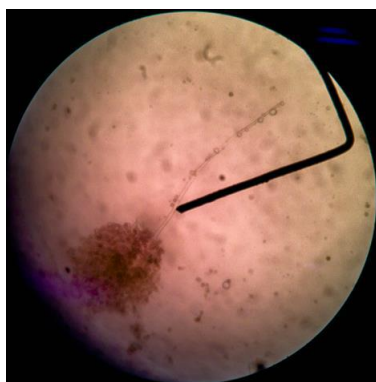
B kesamaan ciri yaitu *hifa asepta* atau tidak

bersekat, dengan konidiofor memiliki percabangan, terdapat *phialid*, dan konidia tersusun memanjang. Berdasarkan panduan kunci identifikasi Pengenalan Kapang Tropik Umum (Gandjar *et al.*, 1999), *Illustrated Genera of Imperfecti Fungi* (Barnett, 1969) dan *Pictorial Atlas of Soil and Seed Fungi* (Watanabe, 2002) kelompok jamur ini termasuk dalam genus *Penicillium* sp.



Gambar 6. Karakteristik Mikroskopis Jamur JM5.2 Perbesaran 400x

Pengamatan secara mikroskopis pada kelompok jamur JM2.1, JM2.2, JM5.1, JM8.2, dan JM9.2 terlihat memiliki hifa yang tidak bersekat dan konidia berbentuk bulat. Berdasarkan panduan kunci identifikasi Pengenalan Kapang Tropik Umum (Gandjar *et al.*, 1999), *Illustrated Genera of Imperfecti Fungi* (Barnett, 1969) dan *Pictorial Atlas of Soil and Seed Fungi* (Watanabe, 2002) kelompok jamur ini termasuk dalam genus *Aspergillus* sp.



Gambar 7. Karakteristik Mikroskopis Jamur JM8.2 Perbesaran 400x

KESIMPULAN

1. Dari dua puluh sampel yang diambil dari sepuluh lokasi di Tanah Hutan Mangrove Pantai Wonorejo, Surabaya, tiga belas sampel menghasilkan aktivitas enzim proteolitik. Sembilan dari tiga belas isolat jamur proteolitik mampu menghasilkan enzim Fibrinolitik.
2. Terdapat dua genus jamur, *Aspergillus* sp. dan *Penicillium* sp. dari Tanah Hutan Mangrove Pantai Wonorejo, Surabaya yang mampu menghasilkan enzim fibrinolitik.

DAFTAR PUSTAKA

- Andriyadi, R.D. 2011. Isolasi Dan Identifikasi Kapang Tanah Dari Kawasan Wonorejo, Surabaya. *Skripsi*. Surabaya: Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Institut Teknologi Sepuluh November.
- Ashipala, O. K., He, Q. 2007. Optimization of fibrinolytic enzyme production by *Bacillus subtilis* DC 02 in aqueous two-phase system (poly-ethylene glycol 4000 and sodium sulfate). *Biosource Technology* 99, pp. 4112-4119
- Astrup, T., Müllertz, S. 1952. The fibrin plate method for estimating fibrinolytic activity. *Arch. -iochem. Biophys.* 40:346-51.
- Barnett, H.L. Hunter, B.B. 1998. *Illustrated genera of imperfect fungi*. 4th ed. USA: Prentice-Hall, Inc.
- Chung-Lu, L., Shiu-Nan, C. 2012. *Fibrinolytic Enzymes from Medicinal Mushrooms*. Taiwan : College of Life Science, National Taiwan University
- Departemen Kesehatan Republik Indonesia. 1995. **Farmakope Indonesia. Ed. IV**. Departemen Kesehatan Republik Indonesia
- El-Aassar, S. A., El-Badry, H. M., Abdel-Fattah, A. F. 1990. The biosynthesis of proteases with fibrinolytic activity in immobilized cultures of *Penicillium chrysogenum* H9. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Volume 33, Number 1, Page 26.
- Gandjar, I., Robert, A.S., Karin, V.D., Ariyanti, O., Iman S., 1999. **Pengenalan Kapang Tropik Umum**. Jakarta: Yayasan Obor Indonesia.
- Kurniawan, F. 2012. Keanekaragaman Jenis Fungi Pada Serasah Daun *Avicennia Marina* Yang Mengalami Dekomposisi

- Pada Berbagai Tingkat Salinitas. *Edu-Bio*; Vol. 3
- Lerner, R. A., Barbas III, C. F., Janda, K. D. 1996-1997. Making Enzymes. **Harvey Lect.** 92, 1-40.
- Madaniyah. 2013. Skrining Bakteri Fibrinolitik Asal Tanah pada Pembuangan Limbah Tahu. *Skripsi*. Jember: Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Universitas Jember
- Mótyán, J.A., Tóth, F., Tózsér, J. 2013. Research Applications of Proteolytic Enzymes in Molecular Biology. **Biomolecules** 2013, 3, 923-942; doi:10.3390
- Poernomo, B. 2005. **Dasar-Dasar Mikrobiologi**. PS. IHPT. Fakultas Pertanian Universitas Bengkulu.
- Rao, M.B., Aparna, M.T., Ghatge, M.S., Vasanti, V. 1998. Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteases Deshpande. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62(3):597.
- Rashad, M.M., Mahmoud, A.E., Al-Kashef, A.S., and Nooman, M.U., 2012. Purification and Characterization of a novel fibrinolytic enzyme by *Candida guilliermondii* grown on sunflower oil cake. *Journal of Applied Sciences Research*, 8 (2): 635-645.
- Setiawan, A. 2013. Skrining Agen Fibrinolitik Isolat Bakteri dari Perairan Pantai Papuma Kabupaten Jember. *Skripsi*. Jember: Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.
- Susniahti, N., Nasahi, H.C., Dewi, V.K. 2002 Virulensi jamur entomopatogen *Verticillium Lecanii* (Zimmerman) Viegs terhadap *Myzus Persicae* Sulzer (*Homoptera* ; Aphididae) Pada tanaman cabai merah (*capsicum annum* l) **di rumah kaca**. Lembaga Penelitian Universitas Padjajaran.
- Vijayaraghavan, P., Vincent, S.G.P. 2014. Statistical optimization of fibrinolytic enzyme production by *Pseudoalteromonas* IND11 using cow dung substrate by response surface methodology. **Springerplus**. 3: 60
- Watanabe, T. 2002. *Pictorial atlas of soil and seed fungi: morphologies of cultured fungi and key to species*. 2nd Ed, Florida: CRC Press LLC.
- Yoshiko, U., Hirokazu, U., Masaki, I., Tadashi, H. 2011. Highly Potent Fibrinolytic Serine Protease from *Streptomyces*, **Enzyme and Microbial Technology** 48 (2011) 7–12