

Identifikasi Isolat *Aspergillus* sp. KRM 43 dari Madura dan Produksi Enzim Protease dengan Variasi pH dan Waktu Inkubasi

Nopvita Windi Astuti, MG Isworo Rukmi, Wijanarka
Laboratorium Mikrobiologi, Jurusan Biologi, Fakultas Sains dan Matematika.
Universitas Diponegoro
Jalan Prof. H. Sudarto, SH Tembalang Telp. (024) 76480923; Fax (024) 76480690
Email: nopvitawindi@gmail.com

ABSTRACT

Proteases is an enzyme that has a high economic value, because they widely used for application in the field of industry. Protease can be generated from microorganisms, one of protease producer is derived from the genus *Aspergillus*. *Aspergillus* sp. KRM 43 that has isolated from alkaline soil can be predicted capable to produce alkaline protease. The purpose of this study was to know the optimum of pH and incubation time for enzyme production from the mould. This research was conducted using a factorial Randomized Complete Block Design with two factor i.e. a pH of 7, 8, 9 and incubation time of 5, 6, 7 days. Data collected were analyzed using Anova ($\alpha = 0,05$). The mould isolate were identified by observing its macroscopic and microscopic morphology. The result showed that *Aspergillus* sp. KRM 43 was identified as *Aspergillus parasiticus*. In this study showed pH treatment hadn't been able to affect the production of protease. The highest proteases alkaline production of *A. parasiticus* KRM 43, found at 7 days incubation with proteases activity 2.24 U/mL and the specific activity 7.23 U/mg.

Key words: *Proteases, Aspergillus parasiticus, pH, incubation time*

ABSTRAK

Protease merupakan enzim yang memiliki nilai ekonomi tinggi, karena aplikasinya yang luas dalam bidang industri. Protease dapat dihasilkan dari mikroorganisme, salah satu penghasil protease berasal dari genus *Aspergillus*. Isolat *Aspergillus* sp. KRM 43 yang diisolasi dari tanah alkali diduga mampu menghasilkan protease alkali. Tujuan dari penelitian ini mendapatkan pH dan waktu inkubasi paling optimum untuk produksi enzim. Penelitian dilakukan menggunakan Rancangan Acak Kelompok (RAK) pola faktorial. Percobaan melibatkan dua faktor yaitu pH 7, 8, 9 dan waktu inkubasi 5, 6, 7 hari. Data yang didapat dianalisis menggunakan ragam Anova ($\alpha = 0,05$). Identifikasi kapang dilakukan dengan mengamati morfologi makroskopis dan mikroskopis. Hasil pengamatan menunjukkan *Aspergillus* sp. KRM 43 sebagai *Aspergillus parasiticus*. Hasil penelitian menunjukkan pemberian perlakuan pH belum mampu mempengaruhi produksi protease. *A. parasiticus* mampu memproduksi protease alkaline tertinggi pada perlakuan waktu inkubasi 7 hari dengan nilai aktivitas protease sebesar 2,24 U/mL dan aktivitas spesifik protease sebesar 7,23 U/mg.

Kata kunci : *Protease, Aspergillus parasiticus, pH, waktu inkubasi*

PENDAHULUAN

Enzim merupakan suatu protein yang berfungsi sebagai katalis, yaitu agen kimiawi yang mempercepat laju suatu reaksi, tetapi tidak ikut

bereaksi. Dewasa ini permintaan pasar akan enzim semakin meningkat setiap tahunnya. Sifat enzim yang efisien, selektif, dapat diprediksi dan ramah lingkungan membuat konsumen melirikinya guna menekan biaya produksi. Salah satu jenis enzim komersial yang banyak digunakan, yakni protease.

Protease mengacu pada sekelompok enzim yang berfungsi dalam menghidrolisis protein (Suhartono, 2000).

Besarnya kebutuhan industri akan protease memicu banyaknya penelitian untuk mencari sumber alternatif enzim tersebut. Mikroorganisme merupakan sumber enzim yang lebih menguntungkan karena pertumbuhannya cepat, dapat tumbuh pada substrat yang murah, lebih mudah ditingkatkan hasilnya melalui pengaturan kondisi pertumbuhan dan rekayasa genetika (Ibrahim, 2007).

Mikroorganisme yang diketahui mampu menghasilkan protease, yakni bakteri dari genus *Bacillus* dan kapang dari genus *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Endhotia* dan *Mucor* (Sandhya *et al.*, 2005; Ibrahim, 2007). Protease banyak digunakan dalam bidang industri, farmasi, manajemen limbah, dan industri deterjen (Adrio *et al.*, 2014).

Produksi protease dipengaruhi beberapa faktor, diantaranya pH dan waktu inkubasi. pH yang tidak sesuai dapat mengganggu sintesis enzim, sehingga enzim yang dihasilkan belum optimal (Elliah *et al.*, 2002). Faktor lain yang mempengaruhi produksi protease, yaitu waktu inkubasi yang berhubungan dengan jumlah enzim yang dihasilkan. Protease merupakan metabolit primer yang diproduksi secara bersamaan dengan pertumbuhan kapang (Sankeerthana *et al.*, 2013). Mengetahui pH dan waktu inkubasi yang tepat guna produksi protease yang optimal dianggap penting guna menekan biaya produksi dalam dunia industri.

Penelitian Natasya (2013) mendapatkan isolat *Aspergillus* sp.KRM 43 yang berasal dari rizosfer kacang meongan (*Aeschynomene americana* L.) di Desa Sukolilo Barat, Kecamatan Labang, Kabupaten Bangkalan, Madura mempunyai aktivitas proteolitik yang tinggi pada pH 7 dengan nilai aktivitas sebesar 76%. Potensi yang dimiliki *Aspergillus* sp.KRM 43 dan beberapa faktor yang dapat mempengaruhi produksi enzim seperti pH dan waktu inkubasi melatarbelakangi dilaksanakannya penelitian

METODOLOGI

Penelitian dilakukan pada bulan November 2014-Februari 2015 di Laboratorium Terpadu Universitas Diponegoro, Laboratorium

Mikrobiologi Fakultas Sains dan Matematika, dan Balai Pengujian dan Informasi Konstruksi.

Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian meliputi isolat *Aspergillus* sp. KRM 43 yang berasal dari Rizosfer Kacang Meongan hasil penelitian Natasya (2013) dari kawasan Sukolilo Barat, Kecamatan Labang, Kabupaten Bangkalan, Madura, CZ (*Czapex DoxLiquid*), CYA20s (*Czapex Yeast Aga+sukrosa 2%*), CYA (*Czapex Yeast Agar*), MEA (Malt Ekstrak Agar), CDA (*Czapex Dox Agar*), PDA (Potato dextro Agar), Na₂CO₃, K-Na-Tartrat, CuSO₄, Folin-Ciocalteu, kasein 1%, TCA (*Trichloroacetic acid*) 10 %, NaHCO₃, Aquades, Na₂HPO₄.2 H₂O, NaH₂PO₄, Na₂HPO₄, , NaOH 1 N, NaCl Tween 80, HCL 0,1 M, BSA (*BovineSerum Albumin*), Tirosin.

Peremajaan Isolat *Aspergillus* sp.KRM 43

Aspergillus sp.KRM 43 yang berasal dari isolat murni diinokulasikan ke tabung reaksi yang berisi media CDA (*Czapex Dox Agar*) *modified*, selanjutnya diinkubasi selama 5 hari pada suhu kamar

Identifikasi Kapang (Klich, 2002)

Identifikasi dilakukan dengan cara makroskopis dan mikroskopis, yaitu dengan menumbuhkan isolat pada media CYA (*Czapex Yeast Agar*) di suhu 25 °C dan 37°C, CYA20s (*Czapex Yeast Agar+sukrosa 2%*), MEA (*Malt Ekstrak Agar*), CDA *modified* (*Czapex Dox Agar*) selama 7 hari pada suhu kamar. Identifikasi dilakukan dengan mencocokkan karakteristik makroskopis dan mikroskopis kapang dengan buku-buku identifikasi, yaitu *Identification of common Aspergillus spesies* (Klich, 2002), *Food and Indoor Fungi* (Samson *et al.*, 2010), dan *Jamur benang (mold) pada bahan pangan* (Rahayu *dkk*, 2014).

Preparasi Inokulum dan Enumerasi Konidia Kapang

Kultur kapang yang berusia 120 jam dalam medium CDA ditambahkan 10 ml NaCl Tween 80 ke dalamnya, selanjutnya tabung di vortex untuk melepaskan konidia. Perhitungan jumlah konidia dilakukan dengan metode TPC (*Total plate Count*) secara Duplo. Starter yang digunakan memiliki kepadatan 13,5 x 10⁷

Produksi Enzim Protease

Sebanyak 0,5 mL (10^7 konidia/mL) suspensi konidia isolat *Aspergillus* sp. KRM 43 berumur 120 jam diinokulasikan ke dalam *Czapek DoxLiquid* dan kasein 1% 50 mL. Inkubasi dilakukan pada suhu ruang selama 7 hari di shaker dengan kecepatan 120 rpm. Kultur disaring dengan kertas Whatman no. 1, Filtrat yang didapat disentrifugasi pada kecepatan 10.000 rpm selama 20 menit pada suhu 4 °C (Charles *et al.*, 2008). Supernatan yang terbentuk merupakan *crude enzyme* yang selanjutnya digunakan dalam uji penentuan aktivitas protease.

Penentuan Aktivitas Enzim

A. Pembuatan kurva standart tirosin

Kurva standart tirosin dibuat dengan cara, melarutkan 30 mg tirosin ke dalam 10 mL HCL 0,1 N, selanjutnya ditambah aquades hingga mencapai 100 mL. Dilakukan pengenceran dari larutan induk 0,3 mg/mL menjadi beberapa konsentrasi, yaitu 0,015 mg/mL, 0,03 mg/ml, 0,045 mg/ml, 0,06 mg/ml, 0,09 mg/ml dan 0,12 mg/ml. Variasi tersebut dibuat dengan menggunakan larutan standart tirosin 0,3 mg/mL. Larutan diambil sebanyak 0,5; 1; 1,5; 2; 3; 4 ml lalu diencerkan dengan HCL 0,1 M hingga 10 ml. Masing-masing konsentrasi tersebut di ukur absorbansinya pada panjang gelombang maksimum tirosin (275 nm) dengan spektrofotometer UV-Vis.

B. Uji penentuan aktivitas protease

Sebanyak 1 ml *crude enzyme* ditambah dengan 1 ml kasein 1 % yang dilarutkan dalam buffer untuk masing-masing pH, selanjutnya diinkubasi pada suhu 37°C selama 10 menit. Reaksi dihentikan dengan penambahan larutan TCA 10 % sebanyak 3 ml, dikocok dan diinkubasi 30 menit. Blanko yang digunakan adalah 1 ml kasein yang dilarutkan dalam buffer pH 7, 8, 9 tanpa penambahan *crude enzyme* di inkubasi selama 10 menit lalu ditambahkan larutan TCA 10% sebanyak 3 ml. Jika terdapat endapan disaring menggunakan kertas Whatman no 1, selanjutnya masing-masing supernatan diukur absorbansinya (Yadav *et al.*, 2011). Absorbansi larutan diukur pada panjang gelombang maksimum tirosin (275 nm). Menurut Walker (1994) untuk mendapatkan nilai aktivitas protease digunakan rumus:

$$\text{Aktivitas protease (U/ml)} = \frac{x \cdot 1000}{t \cdot 181,19}$$

Keterangan

x = Konsentrasi Tirosin (mg/ml)

t = waktu reaksi (menit)

181,19 = berat molekul tirosin (g/mol)

Penentuan kadar protein

A. Penentuan kurva standar BSA

Sebanyak 0,1 ml BSA berbagai konsentrasi (0,25; 0,5; 0,75; 1,0; 1,25; 1,5; dan 1,75 mg/mL) ditambah 9,8 ml Na_2CO_3 2% dan 0,1 ml CuSO_4 1% dikocok perlahan. Larutan diinkubasi pada suhu kamar selama 10 menit. Campuran ini, selanjutnya ditambah dengan 1 ml Folin-Ciocalteu secara cepat dan diinkubasi pada suhu kamar selama 30 menit. Larutan tersebut selanjutnya ditentukan absorbansinya pada panjang gelombang maksimum larutan BSA, yaitu 740 nm (Pierce, 2005)

B. Penentuan kadar protein dengan metode Lowry (Pierce, 2005)

Sebanyak 0,1 ml larutan *crude enzyme* ditambah 9,8 ml Na_2CO_3 2% dan 0,1 ml K-Na-Tartrat 2,7 % serta 0,1 ml CuSO_4 1% dikocok dan diinkubasi pada suhu kamar selama 10 menit. Sebanyak 1 ml Folin-Ciocalteu ditambahkan secara cepat dan diinkubasi pada suhu kamar selama 30 menit. Larutan tersebut, selanjutnya diukur absorbansinya pada panjang gelombang maksimum BSA (740 nm) dengan spektrofotometer UV-Vis. Kadar protein ditentukan secara regresi linier terhadap kurva standart BSA dengan menggunakan rumus sebagai berikut:

$$\text{Kadar Protein (mg/ml)} = \frac{y-c}{m} \times f$$

y= Absorbansi sampel

c= Slope pada kurva

m=Intersep pada kurva standart

f= faktor pengenceran

Uji penentuan aktivitas spesifik protease

Menurut Kamelia *dkk.*(2005) untuk mendapatkan nilai aktivitas spesifik protease, digunakan rumus:

$$\text{Aktivitas Spesifik (U/mg)} = \frac{\text{Unit aktivitas}}{\text{mg}}$$

HASIL DAN PEMBAHASAN

Identifikasi isolat *Aspergillus* sp. KRM 43

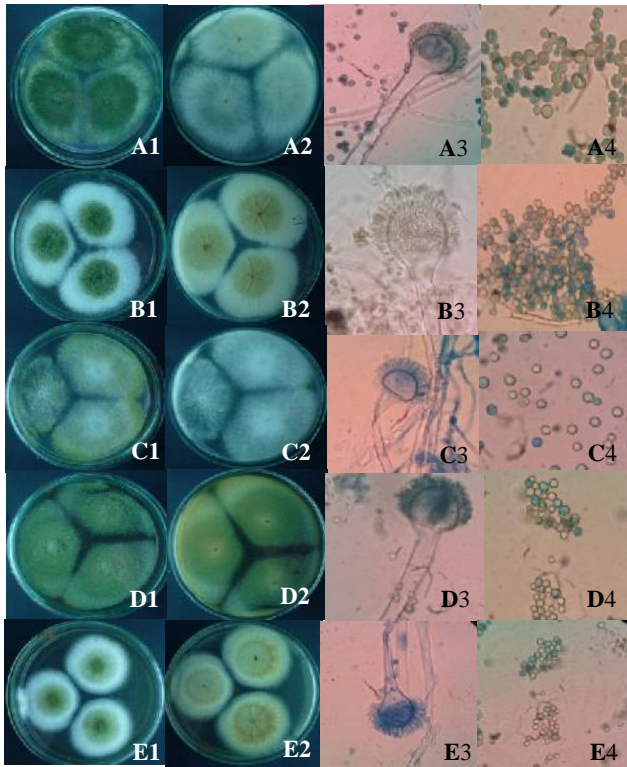
Hasil pengamatan makroskopis, mikroskopis dan penyamaan ciri-ciri dengan kunci identifikasi menurut Klich (2002), Samson *et al.* (2010), dan Rahayu *dkk.* (2014) Isolat *Aspergillus* sp. KRM 43 teridentifikasi sebagai *Aspergillus parasiticus*. *A. parasiticus* merupakan kapang yang dapat tumbuh pada temperatur tinggi dan toleran terhadap kadar air yang rendah. *A. parasiticus* banyak ditemukan di kacang tanah, sereal, dan makanan lainnya (Samson *et al.*, 2010).

Koloni *A. parasiticus* KRM 43 pada media MEA berwarna hijau gelap dengan *reverse* tidak berwarna dan tidak ada *radial furrow*. Penampakan yang sedikit berbeda terlihat pada koloni *A. parasiticus* KRM 4 di media CYA yang diinkubasi suhu 25 °C dan 37 °C. Koloni pada medium CYA suhu 37 °C berwarna hijau gelap dan pertumbuhannya lebih cepat, sedangkan pada 25°C koloni berwarna hijau pada bagian tengah dan berwarna putih di bagian tepi koloni. *Radial furrow* terlihat pada kedua suhu inkubasi. Hasil pengamatan yang sama diutarakan oleh Dovi i ová *et al.* (2012) yang menyatakan *A. parasiticus* yang ditumbuhkan pada media CYA akan membentuk warna koloni hitam gelap dengan *reverse* hijau-kuning, sedangkan pada media CY20S akan membentuk *reverse* kuning.

Pengamatan *A. parasiticus* KRM 43 secara mikroskopis pada kelima media menunjukkan persamaan pada susunan kepala konidianya, yakni *uniseriate*. Menurut Kozakiewicz., 1995 dalam Khoury, 2011 hanya ada sekitar 10 % *A. parasiticus* yang memiliki metula dan fialid (*biseriate*), selebihnya ditemukan dengan susunan kepala konidia *uniseriate*.

A. parasiticus KRM 43 pada media CDA memiliki konidiofor yang kasar dengan panjang 250-500 µm, sedangkan pada media CY20S panjang konidiofor mampu mencapai 700 µm. Hasil yang di dapat sesuai dengan Klich (2002), bahwa panjang konidiofor *A. parasiticus* 250-500 µm. Penampakan mikroskopis yang hampir sama terlihat pada *A. parasiticus* KRM 43 pada media CDA dan CY20S. *A. parasiticus* KRM 43 pada kedua media ini terlihat memiliki kepala konidia *radiate*, dengan konidia berbentuk *globose*, *enchinulate*, berwarna hijau kekuningan yang berdiameter 4-5 µm. Perbedaan keduanya terlihat pada ukuran fialid. *A. parasiticus* KRM 43 pada media CY20S memiliki ukuran fialid yang lebih panjang, yakni 8-12 µm, sedangkan pada media CDA panjang fialidnya 5-8 µm.

A. parasiticus yang ditumbuhkan di suhu 37°C memiliki konidia mencapai 3,5-6 µm, sedangkan pada suhu 25 °C diameter konidia 4-5 µm, keduanya memiliki bentuk vesikel *globose*. *A. parasiticus* di media MEA memiliki permukaan konidiofor kasar dengan panjang sekitar 300-700µm, dengan bentuk kepala konidia *columnar*, konidia berbentuk *globose* dengan permukaan kasar. Penampakan mikroskopis *A. parasiticus*



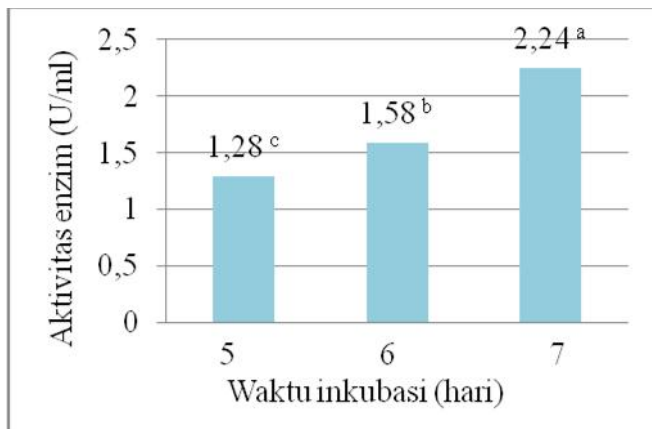
Gambar 1. Morfologi makroskopis dan mikroskopis *A. parasiticus* KRM 43 (Perbesaran 10x100)

- A1: Koloni pada CYA37
- A2: *Reverse colony*
- A3: Kepala konidia
- A4: Konidia
- B1: Koloni pada CYA25
- B2: *Reverse colony*
- B3: Kepala konidia
- B4: Konidia
- C1: Koloni pada CDA
- C2: *Reverse colony*
- C3: Kepala konidia
- C4: Konidia
- D1: Koloni pada MEA
- D2: *Reverse colony*
- D3: Kepala konidia
- D4: Konidia
- E1: Koloni pada CY20S
- E2: *Reverse colony*
- E3: Kepala konidia
- E4: Konidia

hampir mirip dengan *A. flavus*, ciri perbedaan keduanya terlihat pada *A. parasiticus* yang memiliki kepala konidia *uniseriate*, sedangkan *A. flavus* sering ditemukan dengan kepala konidia *biseriate* dan menghasilkan konidia dengan dinding yang lebih jelas kasar dan warna konidia yang kuning hijau lebih gelap (Rahayu *dkk.*, 2014)

Pengaruh pH dan waktu inkubasi terhadap aktivitas protease

Produksi protease *A. parasiticus* KRM 43 dapat diketahui melalui aktivitasnya menghidrolisis kasein menjadi tirosin. Hasil analisis sidik ragam (Anova) terhadap aktivitas protease menunjukkan, bahwa perlakuan waktu inkubasi berpengaruh nyata dalam peningkatan aktivitas protease (F Hitung>F Table 5%), sedangkan perlakuan pH dan interaksi keduanya (PxT) berpengaruh tidak nyata dalam peningkatan aktivitas protease.



Gambar 2. Diagram batang pengaruh waktu inkubasi terhadap aktivitas enzim *A. parasiticus* KRM 43

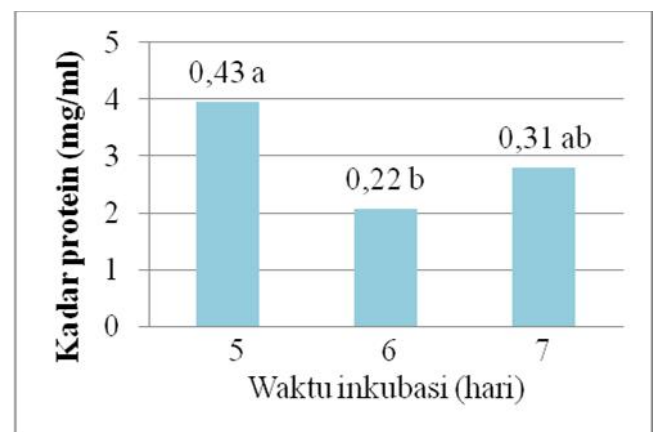
*Angka-angka yang diikuti huruf yang sama menunjukkan perbedaan yang tidak nyata berdasarkan uji Duncan pada taraf kepercayaan 95%

Uji lanjut Duncan terhadap aktivitas protease berdasarkan perlakuan waktu memperlihatkan, bahwa perlakuan waktu inkubasi berbeda nyata dalam peningkatkan aktivitas enzim. Hal ini dapat dilihat dari aktivitas protease yang dihasilkan (Gambar 2).Aktivitas protease perlakuan T₇ memiliki aktivitas protease yang lebih tinggi daripada perlakuan T₅ dan T₆. Hal ini diduga karena pada waktu inkubasi 7 hari merupakan puncak dari fase logaritmik, sehingga pada waktu inkubasi ke 7 didapatkan produksi protease tertinggi dibandingkan dengan waktu

inkubasi lainnya. Menurut Sankeerthana *et al.* (2013) waktu inkubasi berhubungan dengan produksi enzim, enzim merupakan metabolite primer yang di produksi pada fase logaritmik. Pertumbuhan kapang dengan memanfaatkan protein yang ada dalam substrat, sedangkan penurunan aktivitas enzim dapat disebabkan oleh konstituen lainnya

Pengaruh pH dan waktu inkubasi terhadap kadar protein

Hasil analisis sidik ragam (Anova) terhadap kadar protein menunjukkan perlakuan waktu inkubasi berpengaruh nyata terhadap kadar protein (F Hitung>F Table 5%), sedangkan perlakuan pH dan interaksi keduanya (PxT) berpengaruh tidak nyata terhadap kadar protein. Berdasarkan Gambar 3 nilai kadar protein pada T₅ menunjukkan nilai yang lebih tinggi, hal ini diduga pada waktu inkubasi 5 hari protease yang dihasilkan dalam jumlah banyak, selain itu ketersediaan protein yang berasal dari substrat masih banyak sehingga nilai kadar prtein yang terukur cenderung tinggi. Perlakuan T₆ mulai terjadi penurunan kadar protein.



Gambar 3. Diagram batang pengaruh waktu inkubasi terhadap kadar protein *A. parasiticus* KRM 43

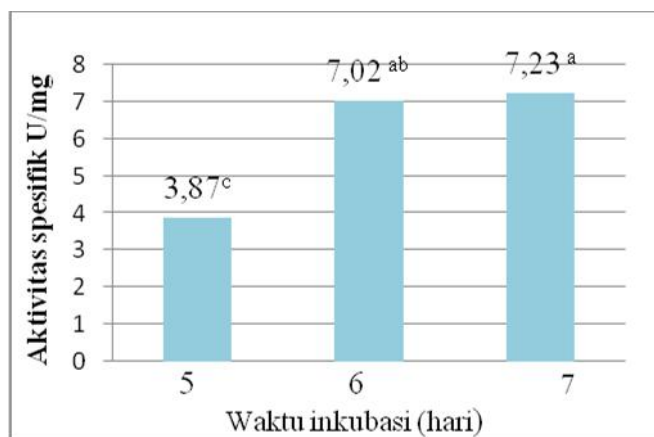
*Angka-angka yang diikuti huruf yang sama menunjukkan perbedaan yang tidak nyata berdasarkan uji Duncan pada taraf kepercayaan 95%

Hal ini, diduga karena protein yang digunakan sebagai enzim digunakan untuk pertumbuhan jamur. Protein dibedakan menjadi protein fungsional dan protein struktural. Protein fungsional contohnya enzim pencernaan, hormon, sedangkan protein struktural digunakan untuk pertumbuhan. Perlakuan T₇ terjadi kenaikan kadar protein yang cukup berbeda nyata. Hal ini di

duga protein terlarut yang terukur tidak mutlak mencerminkan kadar protein protease, karena di dalam media juga mengandung protein terlarut berupa kasein. *A. parasiticus* KRM 43 diketahui mampu mensintesis enzim lain, Berdasarkan penelitian Natasya (2013) *Aspergillus* sp. KRM 43 yang di uji aktivitas selulolitiknya secara semi-kuantitatif menunjukkan memiliki kemampuan menghasilkan enzim selulosa. Murray *et al.* (2003) mengatakan, bahwa keberadaan enzim lain dapat ikut menyebabkan kadar protein menjadi naik. Protein yang terkandung dalam komposisi medium dapat ikut terbaca pada saat pengukuran, sehingga menyebabkan nilai kadar protein menjadi tinggi.

Pengaruh pH dan waktu inkubasi terhadap aktivitas spesifik protease

Hasil analisis sidik ragam (Anova) menunjukkan, waktu inkubasi berpengaruh nyata terhadap aktivitas spesifik protease (F_{hitung} > F_{Table 5%}), sedangkan perlakuan pH dan interaksi keduanya berpengaruh tidak nyata terhadap peningkatan aktifitas spesifik protease.



Gambar 4. Diagram batang pengaruh waktu inkubasi terhadap aktivitas spesifik protease *A. parasiticus* KRM 43

*Angka-angka yang diikuti huruf yang sama tidak menunjukkan perbedaan yang nyata berdasarkan uji Duncan pada taraf kepercayaan 95%.

Nilai aktivitas spesifik dapat menggambarkan tingkat kemurnian suatu enzim. Semakin tinggi nilai aktivitas enzim, maka tingkat kemurnian enzim tersebut semakin tinggi. Nilai aktivitas spesifik dapat menjadi gambaran produksi enzim. Hasil uji Duncan perlakuan waktu inkubasi terhadap aktivitas spesifik protease menunjukkan, perlakuan T₆ dan T₇

menunjukkan nilai aktivitas spesifik protease yang tidak berbeda nyata, namun berdasarkan nilai aktivitas spesifik yang dihasilkan perlakuan T₇ memiliki aktivitas spesifik protease yang paling tinggi yakni sebesar 7,23 U/mg.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian isolat *Aspergillus* sp.KRM 43 teridentifikasi sebagai *Aspergillus parasiticus*. *A. parasiticus* KRM 43 dari Desa Sukolilo Barat, Kecamatan Labang, Kabupaten Bangkalan, Madura belum mampu memproduksi protease alkali secara optimal ketika diberi perlakuan pH. *A. parasiticus* KRM 43 mampu memproduksi protease secara optimal dengan perlakuan waktu inkubasi 7 hari dengan nilai aktivitas protease sebesar 2,24 U/mL dan aktivitas spesifik protease sebesar 7,23 U/mg.

UCAPAN TERIMAKASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Jurusan Biologi Fakultas Sains dan Matematika UNDIP, Dra. MG Isworo Rukmi, M. Si dan Dr. Drs. Wijanarka, M. Si yang telah membantu terlaksananya penelitian ini serta bimbingan selama tugas akhir

DAFTAR PUSTAKA

- Adrio, J.L & Arnold, L.D. 2014. Microbial Enzymes: Tools for Biotechnological Processes. *J Biomolecules*. 4(1): 117-139
- Charles, P., Devanathan, V., Anbu, P., Ponnuswamy M.N., Kalaichelvan P.T., Hur B.K. 2008. Purification, characterization and crystallization of an extracellular alkaline protease from *Aspergillus nidulans* HA-10. *Journal Basic Microbiol* 48(5):347-352.
- Dovi i ová, M., Dana, T., Roman, L., and Michael, S. 2012. *Aspergillus parasiticus* from Wheat Grain of Slovak Origin and its Toxigenic Potency. *Czech Journal. Food Sci* 5(30):483-487
- Ellaiah P, Adinarayana K, Bhavani Y, Padmaja P. & Srinivasulu B. 2002. Optimization of process parameters for glucoamylase production under solid state fermentation by

- a newly isolated *Aspergillus* species. *Process Biochem.* 38:615- 620.
- Ibrahim, C. O., 2007. Development of applications of industrial enzymes from Malaysian indigenous microbial sources. *Journal Bioresource Technology.* 99; 4572–4582.
- Klich, M.A. 2002. Identification of Common *Aspergillus* Species. CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre Utrecht. Netherland. p 76-77
- Khoury, el., André and Atoui., Ali and Rizk., Toufic and Lteif., Roger., Kallassy., Mireille., Lebrihi, Ahmed, 2011, Differentiation between *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* from Pure Culture and Aflatoxin-Contaminated Grapes Using PCR-RFLP Analysis of aflR-aflJ Intergenic Spacer. *Journal of Food Science*, vol. 76:247-253
- Lehninger, A.L, 1995. *Dasar-dasar Biokimia*. Jilid 1. *Alih bahasa*: Maggy Thenawidjaja. Airlangga Press. Jakarta
- Murray, R.K., Daryl, K.G., Victor, W.R. 2003. *Biokimia Harper*. EGC. Jakarta. P. 22-31
- Natassya, G. 2013. Keanekaragaman dan Aktivitas Enzimatis Kapang Rizosfer Kacang Meongan (*Aeschynomene americana* L.) di Desa Sukolilo Barat, Kecamatan Labang, Kabupaten Bangkalan, Madura. Skripsi. Jurusan Biologi Fakultas Sains dan Matematika Universitas Diponegoro. Semarang.
- Pierce, 2005. *Protein Assay: Technical Handbook*. Pierce Biotechnology. Inc., USA
- Rahayu, S.E., Sardjono., Robert A.S. 2014. *Jamur Benang (Mold) pada bahan pangan*. Kanisius. Jogjakarta. P.1-16
- Samson, R.A., Houbraken, J., Thrane, U., Frisvad, J.C., Andersen, B. 2010. *Food and Indoor Fungi*. CBS KNAW fungal Biodiversity Centre Utrecht. Netherland. p.134-135
- Sandhya, A. Sumantha, G. Szakacs & Pandey, A. 2005. Comparative evaluation of neutral protease production by *Aspergillus oryzae* in submerged and solid-state fermentation. *Process Biochem* 40:2689 – 269.
- Sankeerthana, C., Shabana, P., Rizwana, T.J., Shamala, B., Anupama, S., Sarovar, B & Shashikala, R. 2013. Production and Partial Characterization of Protease from *Aspergillus Flavus* using Rice Mill Waste as a Substrate and its Comparison with *Aspergillus Niger* Protease *International Journal of Current Engineering and Technology*. ISSN 2277 – 4106
- Suhartono, M.T. 2000. *Enzim dan Bioteknologi*. Departemen Pendidikan dan Kebudayaan Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi Antar Universitas Bioteknologi Institut Pertanian Bogor. Bogor
- Walker, J.M. 1994. *The Protein Protocols Handbook*. Humana Press Inc. Totowa. New Jersey.
- Yadav, S.K., Bisht, D., Shikha., Darmwal, N.S. 2011. Oxidant and solvent stable alkaline protease from *Aspergillus flavus* and its characterization. *African Journal Biotechnol* 10(43):8630-864

