

Pengaruh Medium Limbah Organik Terhadap Aktivitas Enzim Protease dari Isolat Kapang Tanah Wonorejo

Ni W. N. S. Dewi dan Nengah D. Kuswytasari

Jurusan Biologi, Fakultas MIPA, Institut Teknologi Sepuluh Nopember (ITS)

Jl. Arief Rahman Hakim, Surabaya 60111 Indonesia

e-mail: kuswytasari@bio.its.ac.id

Abstrak— Meningkatnya akumulasi limbah organik yang mengandung protein di lingkungan perlu ditanggulangi. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas enzim protease dari *Penicillium* sp. 3 T3F2, *Verticillium* sp. T3.3 dan *Trichoderma* sp. 1 T3I2 secara tunggal maupun konsorsium pada medium limbah organik yang berbeda. Limbah yang telah dikarakterisasi menjadi pH 7, diinokulasikan isolat (starter) dan diinkubasi selama 7 hari pada suhu 40°C. Hasil penelitian menunjukkan bahwa isolat secara tunggal dan konsorsium berpengaruh terhadap aktivitas protease pada medium limbah organik yang berbeda. Aktivitas protease dan degradasi protein tertinggi terdapat pada konsorsium isolat *Penicillium* sp. 3 T3F2 + *Verticillium* sp. T3.3 pada ketiga jenis limbah organik. Pada medium limbah cair pencucian ikan sebesar 0.219 U/mL; 48.394%. Pada medium limbah tangki septik 0.149 U/mL; 31.268%. Pada medium limbah cair tahu sebesar 0.222 U/mL; 44.627 %.

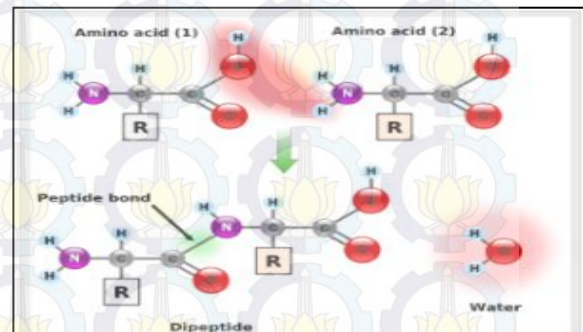
Kata Kunci— Degradasi protein, limbah organik, protease

I. PENDAHULUAN

Secara umum, karakteristik limbah cair terdiri dari 99.9% air dan 0.1% padatan organik yang mengandung karbohidrat 25%, lemak 10% dan protein 65% [1]. Kandungan protein yang tinggi pada limbah cair ini belum banyak diolah (*recycle*) padahal protein yang terkandung dapat menjadi sumber nutrisi untuk mikroorganisme proteolitik.

Dalam limbah cair hasil pencucian ikan terdapat darah, kepala ikan, sisa daging dan sisik ikan yang banyak mengandung protein [2]. Pada sisik ikan mengandung 27% protein, 70% air, 1% lemak dan 2% abu [3]. Limbah organik lainnya juga dihasilkan tangki septik yang terdiri dari air (75%), protein, serat, lemak dan garam, serta limbah cair tahu yang setiap 43,5 liter limbah mengandung protein 10% dan air yang mencapai 90% [4].

Protein kompleks dapat dihidrolisis oleh enzim proteolitik. Enzim proteolitik atau protease mempunyai dua pengertian yaitu proteinase yang mengkatalis hidrolisis molekul protein menjadi fragmen-fragmen besar dan peptidase yang menghidrolisis fragmen polipeptida menjadi asam amino. Enzim proteolitik yang berasal dari mikroorganisme adalah protease yang mengandung proteinase dan peptidase [5].



Gambar 1. Ikatan Peptida pada Struktur Protein [8].

Berdasarkan hasil penelitian [6] yang menguji 37 isolat kapang asal Wonorejo, diperoleh 4 isolat dengan hasil aktivitas protease tertinggi yaitu: (a) *Penicillium* sp. 3 T3F2 dengan nilai optimal 2.416 U/mL pada suhu 40°C dan pH 8. (b) *Verticillium* sp. T3.3 dengan nilai optimal 2.088 U/mL pada suhu 45°C dan pH 6. (c) *Penicillium* sp.1 T4E3 dengan nilai optimal 0.873 U/mL pada suhu 45°C dan pH 4. (d) *Trichoderma* sp.1 T2I3 dengan nilai optimal 0.734 U/mL pada suhu 50°C dan pH 7.

Melalui data penelitian tersebut, perlu dilakukan pengembangan agen hayati pendegradasi protein dan penghasil protease dengan memanfaatkan isolat kapang yang berpotensi dan limbah organik sebagai substratnya.

II. URAIAN PENELITIAN

A. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Februari sampai Juni 2014, di Laboratorium Mikrobiologi dan Bioteknologi Biologi ITS.

B. Pembuatan Kurva Pertumbuhan

Medium yang digunakan untuk kurva pertumbuhan yaitu medium PDB (*Potato Dextrose Broth*). Isolat murni *Penicillium* sp. 3 T3F2, *Verticillium* sp. T3.3 dan *Trichoderma* sp. 1 T3I2 diinokulasikan sebanyak 10% ke dalam masing-masing medium medium PDB (*Potato Dextrose Broth*). Pertumbuhan dikontrol tiap 24 jam selama 7 hari, dengan mengukur nilai biomasnya.

C. Pembuatan Kurva Standar Tirosin

Kurva standar tirosin dibuat dengan variasi konsentrasi yaitu : 0.1 mg/mL, 0.2 mg/mL, 0.3 mg/mL, 0.4 mg/mL, 0.5 mg/mL, dan 0.6 mg/mL, 0.7 mg/mL, 0.8 mg/mL, 0.9 mg/mL, 1.0 mg/mL. Dilakukan pengenceran dengan menggunakan HCl 0.1 M hingga 10 mL. Masing-masing konsentrasi tersebut diukur absorbansinya pada 275 nm dengan spektrofotometer Uv-Vis. Dibuat persamaan regresi linearnya [7].

D. Pembuatan Kurva Standar BSA (Bovine Serum Albumin)

Ditimbang 0,1 mg BSA (Bovine Serum Albumin) yang kemudian dilarutkan dengan 10 mL aquades steril. Dibuat variasi konsentrasi yaitu : 0.1 mg/mL, 0.2 mg/mL, 0.3 mg/mL, 0.4 mg/mL, 0.5 mg/mL, dan 0.6 mg/mL, 0.7 mg/mL, 0.8 mg/mL, 0.9 mg/mL, 1.0 mg/mL. Dilakukan pengukuran terhadap standar protein dengan menambahkan 0.1 mL tiap konsentrasi larutan standar dengan 5 mL reagen Bradford. diinkubasi pada suhu ruang selama 10 menit. Masing-masing konsentrasi tersebut diukur absorbansinya pada 595 nm dengan spektrofotometer Uv-Vis. Dibuat persamaan regresi linearnya [8].

E. Preparasi dan Karakterisasi Limbah Cair Organik

Medium produksi yang digunakan berasal dari limbah cair organik, yaitu: limbah cair pencucian ikan, limbah tangki septik dan limbah cair tahu. Diukur pH, suhu dan kandungan total protein dengan mengacu pada metode [8].

F. Inokulasi Isolat Terpilih pada Medium Limbah Organik

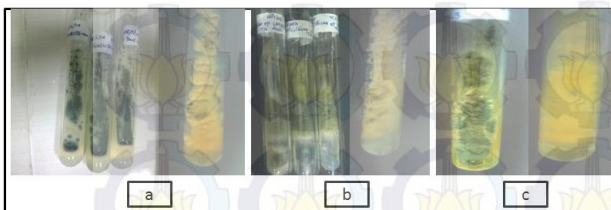
Starter yang telah diinkubasi selama 3 hari (berdasarkan hasil kurva pertumbuhan dari *Penicillium* sp. 3 T3F2, *Verticillium* sp. T3.3 dan *Trichoderma* sp. 1 T3I2) diinokulasikan sebanyak 10% secara aseptik ke dalam medium limbah cair organik secara tunggal dan konsorsium kemudian diinkubasi selama 7 hari [9].

G. Uji Parameter

Parameter aktivitas enzim protease diuji dengan mengacu pada metode [10], dan konsentrasi protease ditentukan berdasarkan persamaan regresi kurva standar tirosin. Parameter degradasi protein diuji dengan mengacu pada metode [8], dan konsentrasi protein ditentukan berdasarkan persamaan regresi kurva standar BSA.

III. HASIL DAN PEMBAHASAN

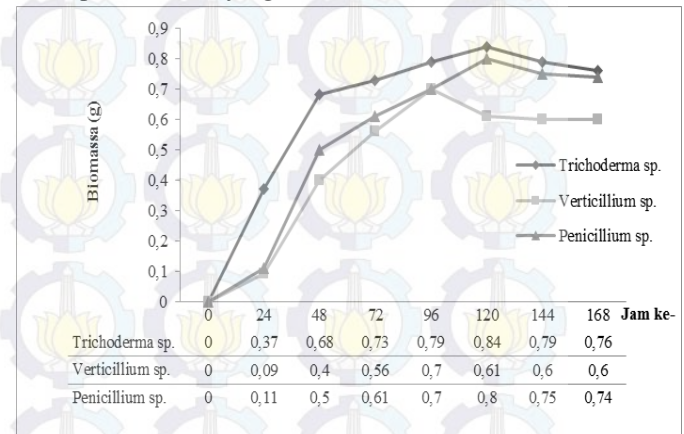
Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas enzim protease dari *Penicillium* sp. 3 T3F2, *Verticillium* sp. T3.3 dan *Trichoderma* sp. 1 T3I2 secara tunggal dan konsorsium dalam mendegradasi protein pada medium limbah cair organik yang berbeda.



Gambar 2. Isolat terpilih : (a) *Penicillium* sp. 3 T3F2; (b) *Verticillium* sp. T3.3; (c) *Trichoderma* sp. 1 T3I2.

A. Kurva Pertumbuhan

Kurva pertumbuhan adalah biomassa sel terukur dalam satuan waktu yang digunakan untuk mengetahui usia starter. Ketika kapang diinokulasikan ke dalam media nutrisi dan diinkubasi di bawah kondisi optimal untuk pertumbuhan fisik, kurva pertumbuhan yang khas akan dihasilkan [11].



Gambar 3. Kurva Pertumbuhan Isolat Terpilih

Penicillium sp. 3 T3F2 dalam pertumbuhannya, menunjukkan bahwa fase lag berada pada masa inkubasi 0-24 jam. Fase ini merupakan penyesuaian sel-sel dengan lingkungan dan pembentukan enzim-enzim untuk pengurai substrat sehingga biomassa yang dihasilkan masih rendah yaitu 0.11 g.

Fase log adalah fase dimana jumlah sel terus mengalami peningkatan. Fase log berada pada masa inkubasi 24-120 jam yang meliputi fase akselerasi (24-48 jam) dan fase eksponensial (48-120 jam). Fase akselerasi merupakan fase mulainya sel-sel membelah dengan biomassa sel mengalami peningkatan menjadi 0.5 g. Sedangkan fase eksponensial adalah fase perbanyak jumlah sel yang sangat banyak, aktivitas sel sangat meningkat dan fase ini merupakan fase penting yang digunakan sebagai dasar menentukan usia starter. Biomassa sel pada fase eksponensial yaitu 0.80 g.

Fase deselerasi dan fase stasioner merupakan fase dimana jumlah sel yang bertambah dengan jumlah sel yang mati relatif seimbang, berada pada masa inkubasi 120-168 jam dengan biomassa seimbang yaitu 0.74 g. Fase kematian belum diketahui, karena masa inkubasi hanya terbatas selama 168 jam. Berdasarkan jbaran data di atas, usia starter isolat *Penicillium* sp. 3 T3F2 berada pada masa inkubasi 72 jam dengan biomassa isolat 0.61 g.

Kurva pertumbuhan isolat *Verticillium* sp. T3.3 memiliki fase log pada masa inkubasi 24-96 jam. Pada fase lag (0-24 jam) biomassa isolat 0.09 g, dan mengalami peningkatan setelah masa inkubasi 24-48 jam (fase akselerasi) menjadi 0.40 g. Pada masa inkubasi 48 - 96 jam (fase eksponensial) biomassa mengalami peningkatan menjadi 0.70 g. Usia starter diambil pada fase ini, yaitu pada masa inkubasi 72 jam dengan biomassa 0.56 g.

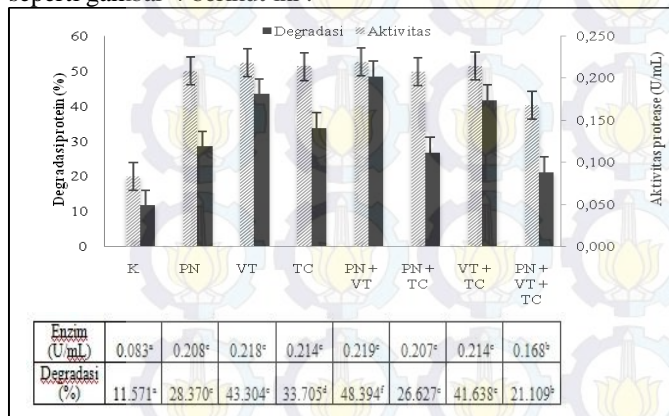
Penurunan jumlah nutrisi yang lebih cepat dibandingkan isolat *Penicillium* sp. 3 T3F2 dan *Trichoderma* sp. 1 T3I2, menjadikan isolat ini memasuki fase deselerasi dan stasioner pada masa inkubasi 120-168 jam dengan biomassa seimbang yaitu 0.60 g.

Kurva pertumbuhan isolat *Trichoderma* sp. 1 T3I2 hampir sama dengan isolat *Penicillium* sp. 3 T3F2. Fase log berada pada masa inkubasi 24-120 jam, yang meliputi : fase lag (setelah masa inkubasi 0-24 jam) dengan biomassa isolat 0.37 g. Fase akselerasi (setelah masa inkubasi 24-48 jam) dengan biomassa isolat mengalami peningkatan menjadi 0.68 g. Fase eksponensial (setelah masa inkubasi 48-120 jam) dengan biomassa isolat 0.84 g. Usia starter diambil pada fase ini, yaitu pada masa inkubasi 72 jam dengan biomassa 0.73 g.

Jadi, berdasarkan hasil kurva pertumbuhan diatas, dapat diketahui bahwa usia starter pada ketiga isolat untuk proses produksi yaitu setelah masa inkubasi 72 jam (3 hari) atau awal fase eksponensial pada medium starter.

B. Medium Limbah Cair Pencucian Ikan

Karakteristik limbah cair ini adalah memiliki nilai pH 7 dan suhu 32°C. Sumber protein limbah cair pencucian ikan berasal dari bagian darah, sisik dan jaringan yang rusak atau tercuci, sehingga jumlah total protein yang terkandung cukup tinggi yaitu 0.757 mg/mL. Berdasarkan hasil uji aktivitas enzim protease dan degradasi protein dari isolat, diperoleh data seperti gambar 4 berikut ini :



Gambar 4. Aktivitas Enzim Protease Dan Nilai Degradasi Protein pada Medium Limbah Cair Pencucian Ikan. Keterangan gambar : (K: Kontrol; PN: *Penicillium* sp. 3 T3F2; VT: *Verticillium* sp. T3.3 dan TC: *Trichoderma* sp. 1 T3I2).

Data aktivitas enzim protease dianalisis menggunakan Annova *One-Way* dan diperoleh nilai P value sebesar 0,000. Nilai ini menunjukkan bahwa isolat yang diinokulasikan secara tunggal dan konsorsium memberikan pengaruh yang signifikan terhadap aktivitas enzim protease pada medium limbah cair pencucian ikan.

Nilai aktivitas protease dan degradasi protein tertinggi ditunjukkan pada perlakuan konsorsium, yakni isolat *Penicillium* sp. 3 T3F2 + *Verticillium* sp. T3.3 yaitu 0.219^c U/mL; 48.394^f %. Nilai aktivitas pada konsorsium ini sebanding dengan isolat tunggal *Verticillium* sp. T3.3 yaitu 0.218^c U/mL; 43.304^e %. Isolat tunggal *Verticillium* sp. T3.3 dapat dikatakan sebagai isolat yang memiliki pertumbuhan paling optimal didalam medium limbah cair pencucian ikan.

Selama masa inkubasi, isolat *Penicillium* sp. 3 T3F2 + *Verticillium* sp. T3.3 membentuk miselium di permukaan medium yang berwarna hijau tua dan granul berwarna kuning. Medium berubah warna dari merah kecoklatan menjadi hitam pekat tanpa endapan dari hari ke 3 inkubasi hingga hari ke 7.

Nilai pH mengalami penurunan dari 7 menjadi 5 karena adanya produksi asam organik hasil metabolisme. Hasil metabolisme ini bersifat toksin untuk isolat, sehingga pada hari ke 6 inkubasi, terlihat miselium mulai mengalami fase kematian. Kedua isolat tergolong dalam filum yang sama, yakni Deuteromycota dengan interaksi yang sinergis sesuai dengan hasil uji interaksi.

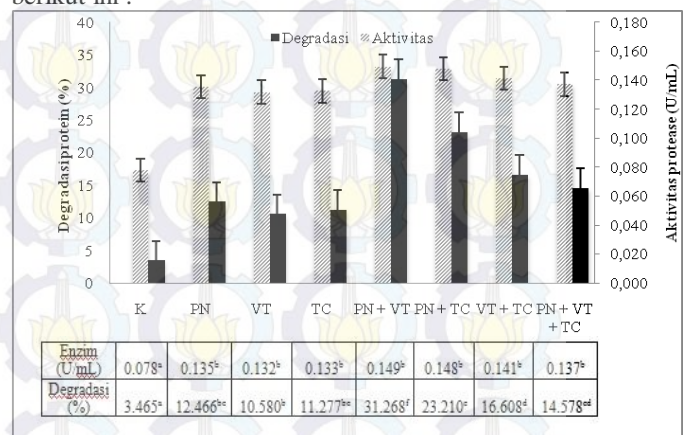
Nilai terendah terdapat pada konsorsium isolat *Penicillium* sp. 3 T3F2 + *Verticillium* sp. T3.3 + *Trichoderma* sp. 1 T3I2 dengan aktivitas enzim 0.168^b U/mL dan degradasi protein 21.109^b %. Rendahnya nilai degradasi menunjukkan produksi protease yang rendah, dimana isolat tidak maksimal dalam memproduksi protease akibat adanya kompetisi antar spesies. Ketiga isolat tergolong dalam filum Deuteromycota, yang menandakan bahwa ketiganya memiliki karakteristik yang hampir sama sehingga saat di konsorsiumkan, terjadi kompetisi interspesifik yang menyebabkan perebutan sumber nutrisi untuk pertumbuhan ketiga isolat, meskipun dalam uji interaksi ketiga isolat terlihat bersifat sinergis.

Eksoprotease yang diskresikan isolat, memiliki spesifitas yang berbeda dalam memecah ikatan peptida pada sisi aktif α-amino atau α-karboksil berdasarkan berat molekul dari protein yang terkandung [12]. Hal ini menjadi dasar bahwa aktivitas enzim protease menjadi lebih tinggi dibandingkan dengan nilai degradasi proteinnya

Isolat terbaik yang dapat digunakan sebagai agen hayati pendegradasi protein pada medium limbah cair pencucian ikan adalah konsorsium isolat *Penicillium* sp. 3 T3F2 + *Verticillium* sp. T3.3 karena memiliki aktivitas enzim tertinggi dan sebanding dengan jumlah enzim yang diproduksi.

C. Medium Limbah Tangki Septik

Karakteristik dari limbah tangki septik yaitu : nilai pH 7 dan suhu 32°C. Jumlah total protein pada limbah ini adalah 0.564 mg/mL. Berdasarkan hasil uji aktivitas enzim protease dan degradasi protein dari isolat, diperoleh data seperti gambar 5 berikut ini :



Gambar 5. Aktivitas Enzim Protease Dan Nilai Degradasi Protein pada Medium Tangki Septik. Keterangan gambar : (K: Kontrol; PN: *Penicillium* sp. 3 T3F2; VT: *Verticillium* sp. T3.3 dan TC: *Trichoderma* sp. 1 T3I2).

Isolat yang diinokulasikan secara tunggal dan konsorsium memberikan pengaruh terhadap aktivitas enzim protease di medium limbah tangki septik, sesuai dengan hasil analisa

statistik Annova *One-Way* yang menunjukkan nilai P value = 0.003.

Aktivitas protease dan degradasi protein tertinggi terdapat pada konsorsium yang sama pada limbah cair pencucian ikan yaitu isolat *Penicillium* sp. 3 T3F2 + *Verticillium* sp. T3.3 dengan nilai 0.149^b U/mL; 31.268^f %. Selama masa inkubasi, isolat *Penicillium* sp. 3 T3F2 + *Verticillium* sp. T3.3 membentuk miselium di permukaan medium yang berwarna hijau tua dan granul berwarna kuning dalam medium. Medium berubah warna dari merah kecoklatan menjadi hitam pekat tanpa endapan dari hari ke 3 inkubasi hingga hari ke 7. Nilai pH mengalami penurunan dari 7 menjadi 5 karena adanya produksi asam organik hasil metabolisme. Hasil metabolisme ini bersifat toksin untuk isolat, sehingga pada hari ke 6 inkubasi, terlihat miselium mulai mengalami fase kematian.

Interaksi yang sinergis dan menggunakan nutrisi berupa protein secara bersama-sama untuk pertumbuhannya, tanpa saling mempengaruhi menjadikan konsorsium ini memiliki aktivitas enzim tertinggi disamping memang kedua isolat telah diketahui sebagai agen hayati penghasil protease. Kemampuan isolat *Penicillium* sp. 3 T3F2 dalam menghasilkan antibakteri penisilin, juga dapat menghambat indigenus yang beragam dalam limbah tangki septik sehingga pertumbuhan isolat secara tunggal dan konsorsium isolat menjadi optimal.

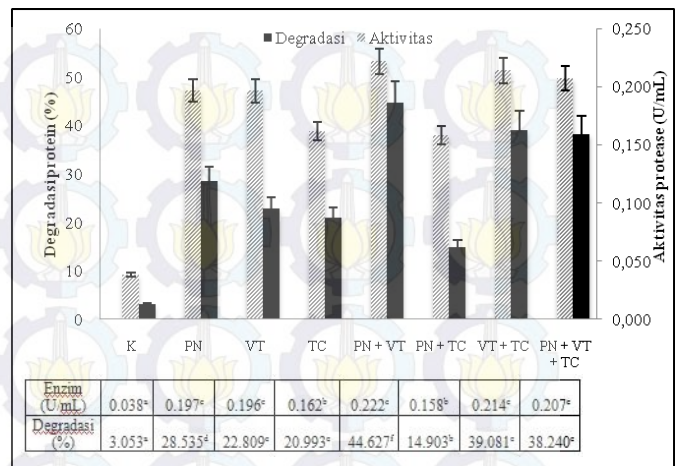
Sedangkan nilai terendah terdapat pada isolat *Verticillium* sp. T3.3 dengan aktivitas enzim 0.132^b U/mL dan degradasi protein 10.580^b %. Selama masa inkubasi pada medium limbah tangki septik, isolat tidak membentuk miselium di permukaan, namun terdapat sedikit granul yang berwarna kuning keemasan dan berwarna hitam. Medium mengalami perubahan dari bening menjadi hitam keruh dan terdapat banyak endapan. Hasil metabolisme ini bersifat toksin untuk isolat, sehingga pada hari ke 7 inkubasi, terlihat miselium mulai mengalami fase kematian. pH medium mengalami perubahan dari 7 menjadi 6.

Hal ini juga dapat dipengaruhi oleh faktor kompetisi isolat dengan indigenus didalamnya. Mengacu pada gambar 5, aktivitas enzim protease yang digunakan untuk mendegradasi cukup tinggi, namun produk yang dihasilkan tidak sebanding dengan aktivitas enzimnya. Selain karena kompetisi, aktivitas enzim dapat juga dipengaruhi oleh faktor pH dan suhu, serta beberapa faktor lain diantaranya kadar air, pelarut, konsentrasi enzim dan substrat.

Isolat terbaik yang dapat digunakan sebagai agen hayati pendegradasi protein pada limbah tangki septik adalah konsorsium isolat *Penicillium* sp. 3 T3F2 + *Verticillium* sp. T3.3 karena memiliki aktivitas enzim tertinggi dan sebanding dengan jumlah enzim yang diproduksi.

D. Medium Limbah Cair Tahu

Limbah cair tahu memiliki pH 5 dan suhu 40°C. Sumber protein limbah ini berasal dari proses pengolahan kedelai, dengan kandungan total protein sebesar 0.701 mg/mL. Berdasarkan hasil uji aktivitas enzim protease dan degradasi protein pada medium limbah cair tahu, diperoleh data seperti gambar 6 berikut ini:



Gambar 6. Aktivitas Enzim Protease Dan Nilai Degradasi Protein pada Medium Limbah Cair Tahu. Keterangan gambar : (K: Kontrol; PN: *Penicillium* sp. 3 T3F2; VT: *Verticillium* sp. T3.3 dan TC: *Trichoderma* sp. 1 T3I2).

Isolat yang diinokulasikan secara tunggal dan konsorsium memberikan pengaruh signifikan terhadap aktivitas enzim protease di medium limbah cair tahu, sesuai dengan hasil analisa statistik Annova *One-Way* yang menunjukkan nilai P value = 0.000.

Berdasarkan gambar 6, diketahui nilai aktivitas enzim protease dan degradasi protein tertinggi terdapat pada konsorsium isolat *Penicillium* sp. 3 T3F2 + *Verticillium* sp. T3.3 dengan aktivitas enzim 0.222^c U/mL dan degradasi protein 44.627^f %. Konsorsium isolat *Penicillium* sp. 3 T3F2 + *Verticillium* sp. T3.3 memiliki nilai aktivitas enzim protease dan degradasi protein tertinggi, sama pada medium limbah cair pencucian ikan dan limbah tangki septik.

Selama masa inkubasi, isolat membentuk miselium di permukaan medium yang berwarna hijau tua dan granul berwarna kuning dalam medium. Medium berubah warna dari merah kecoklatan menjadi hitam pekat tanpa endapan dari hari ke 3 inkubasi hingga hari ke 7. Nilai pH mengalami penurunan dari 7 menjadi 5 karena adanya produksi asam organik hasil metabolisme. Hasil metabolisme ini bersifat toksin untuk isolat, sehingga pada hari ke 6 inkubasi, terlihat miselium mulai mengalami fase kematian.

Interaksi yang sinergis, kecepatan penyerapan nutrisi dan kolonisasi untuk pertumbuhannya, tanpa saling menghambat menjadikan konsorsium ini memiliki aktivitas enzim tertinggi disamping memang kedua isolat telah diketahui sebagai agen hayati penghasil protease seperti dijabarkan pada sub bab sebelumnya.

Sedangkan nilai terendah terdapat pada konsorsium isolat *Penicillium* sp. 3 T3F2 + *Trichoderma* sp. 1 T3I2 dengan aktivitas enzim 0.158^b U/mL dan degradasi protein 14.903^b %. Selama masa inkubasi di medium limbah cair tahu, isolat membentuk miselium terpisah di permukaan medium berwarna kuning keemasan dan hitam. Medium berubah warna dari kuning menjadi hitam keruh dengan endapan. pH medium tidak mengalami perubahan.

Hal ini dapat didasarkan pada adanya kompetisi eksploitasi. Kompetisi eksploitasi (juga disebut dengan kompetisi pre-

emptive), dimana melibatkan kemampuan dalam kolonisasi atau dalam mendapatkan nutrisi. Pada kompetisi ini, satu spesies mengkonsumsi sumber nutrisi dari kompetitor, tetapi tidak ada interaksi secara langsung antar spesies [18]. Dengan kata lain terjadi dominasi *Penicillium* sp. 3 T3F2 didalam medium namun tidak menghambat pertumbuhan *Trichoderma* sp. 1 T3I2. Rendahnya nilai degradasi menunjukkan produksi protease yang rendah, dimana isolat tidak maksimal dalam memproduksi protease akibat adanya kompetisi.

Isolat terbaik yang dapat digunakan sebagai agen hayati pendegradasi protein pada limbah cair tahu adalah konsorsium isolat *Penicillium* sp. 3 T3F2 + *Verticillium* sp. T3.3 karena memiliki aktivitas enzim tertinggi dan sebanding dengan jumlah produksi enzim.

IV. KESIMPULAN

Berdasarkan hasil yang telah diperoleh, maka dapat disimpulkan bahwa penambahan isolat mempengaruhi aktivitas enzim pada masing-masing limbah dengan nilai $p=0,000$ ($<0,005$) pada uji ANOVA *oneway* dengan rincian sebagai berikut :

1. Pada medium limbah cair pencucian ikan, aktivitas protease dan degradasi protein tertinggi dari isolat tunggal dan konsorsium terdapat pada : *Verticillium* sp. T3.3 sebesar 0.218 U/mL; 43.308% dan *Penicillium* sp. 3 T3F2 + *Verticillium* sp. T3.3 sebesar 0.219 U/mL; 48.394 %.
2. Pada medium limbah tangki septik, aktivitas protease dan degradasi protein tertinggi dari isolat tunggal dan konsorsium terdapat pada : *Penicillium* sp. 3 T3F2 sebesar 0.135 U/mL; 12.466 % dan *Penicillium* sp. 3 T3F2 + *Verticillium* sp. T3.3 sebesar 0.149 U/mL; 31.268 %.
3. Pada medium limbah cair tahu, aktivitas protease dan degradasi protein tertinggi dari isolat tunggal dan konsorsium terdapat pada : *Penicillium* sp. 3 T3F2 sebesar 0.197 U/mL; 28.535 % dan *Penicillium* sp. 3 T3F2 + *Verticillium* sp. T3.3 sebesar 0.222 U/mL; 44.627 %.

DAFTAR PUSTAKA

- [1] Dix, H. M. "Environmental Pollution". New York : John Willey & Sons. (1981).
- [2] Colic, M., Morse, W., Lechter., Millier. "Fish Processing plant waste water treatment". Clean Water technology : Goleta (2011).
- [3] Nagai, T., Ideno, A., Tsuge, M., Oyanagi, C., Oniki, M., Kita, K., Horita, M., Aoki, T., Kobayashi, T., Touchiya, K. "Preservation of fungi in an atmosphere over liquid nitrogen after uncontrolled freezing". *Journal Microbiological Cultivation Collection*. 16(1) (2000):13-22.
- [4] Triyono.S. dan Hasanudin. U. Pengurangan Beban Pencemaran Air Limbah Industri Tahu Melalui Proses Pengurangan Kadar Minyak Kedelai. Laporan penelitian. Faperta Universitas Lampung : Lampung (1998).
- [5] Rahayu, K. " Enzim Mikrobial". Pangan dan Gizi Universitas Gajah Mada : Yogyakarta (1990).
- [6] Yusriah. "Potensi Isolat Kapang Wenerejo dalam Menghasilkan Enzim Protease pada pH dan Suhu yang Berbeda (Skripsi)". S1 Biologi, Institut Teknologi Sepuluh Nopember : Surabaya (2013).
- [7] Kosim. M. Dan Putra.S. "Pengaruh Suhu Pada Protease Dari *Bacillus Subtilis*". *Prosiding no 091304*. Surabaya : Jurusan Kimia FMIPA, Institut Teknologi Sepuluh Nopember (2010).
- [8] Bradford, M. "A rapid and sensitive for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding". *Journal Analytical Biochemistry* 72 (1976): 248-254.

- [9] Madhumitha, C., Raghavan, K., Sundaram, S., Changam, S., Soma, G., Kothurathu, M. "Utilization Of Vegetable Wastes For Production Of Protease By Solid State Fermentation Using *Aspergillus niger*". *World Journal of Agricultural Sciences* 7 (5): 550-555, (2011) ISSN 1817-3047.
- [10] Enggel, J.; Meriandini, A. dan Natalia, L. "Karakterisasi Protease Ekstraseluler *Clostridium bifermentans* R14-1-b". *Jurnal Mikrobiologi Indonesia*, 9 (1): 9-12 (2004).
- [11] Kavanagh, K. "Fungi Biology and Application". Jhon Willey & Sons Ltd, The Atrium, Southern Gate, Chicester : England (2005).
- [12] Kennedy, Peter. "Ectomycorrhizal fungi and interspecific competition: species interactions, community structure, coexistence mechanisms, and future research direction". *Review article*. USA : New Phytologist. Departemen of Biology (2011).