

IDENTIFIKASI MOLEKULER BAKTERI PENGHASIL ENZIM *L*-ASPARAGINASE DARI ALGA COKLAT *SARGASSUM sp*

Mashuri Masri*

*) Dosen pada Jurusan Biologi Fakultas Sains dan Teknologi
UIN Alauddin Makassar
Email :

Abstract: *Molecular Identification of bacterial L-asparaginase activity from Sargassum sp were isolated from Barrang Lompo Island South Sulawesi in 2013. Among them three bacterial strains exhibiting glutaminase free L-asparaginase activity were identified as Pseudomonas putida, Enterobacter asburine dan Marinobacter arcticus on the basis of 16S rRNA gene sequencing. The Highest Max Score 1358 and Query Cover 98 % were Pseudomonas putida furthermore identified as bacterial L-asparaginase activity from Sargassum sp. Pseudomonas putida has Identities 756/765 (99%) with 778 bp Query length, Query cover 98% and Gaps 5/765 (0%).*

Key words: *L-Asparaginase, Sargassum sp.*

I. PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

Interaksi metabolit sekunder yang dihasilkan oleh biota laut dengan bakteri yang berasosiasi menyebabkan kemungkinan bakteri terinduksi untuk menghasilkan suatu metabolit bioaktif yang spesifik. Menurut Nofiani (2008), bakteri tersebut memiliki kemampuan yang hampir sama dengan inangnya untuk menghasilkan senyawa bioaktif.

Makroalga merupakan salah satu organisme laut yang berperan dalam siklus rantai makanan sebagai produsen primer. Untuk mempertahankan diri dalam habitatnya, alga memproduksi berbagai senyawa yang terdiri dari senyawa primer yang bersifat esensial bagi proses metabolisme sel dan senyawa sekunder yang tidak esensial bagi pertumbuhan organisme dan ditemukan dalam bentuk yang unik (Deval dkk., 2001). Metabolit sekunder berperan sebagai alat pertahanan inang (host) terhadap patogen, parasit, predator, kompetitor dan epibiota dan produksinya sangat tergantung pada kondisi bio-geografi. Sifat metabolit sekunder sebagai alat pertahanan diri organisme laut ternyata

mempunyai potensi yang sangat besar sebagai sumber bahan obat berbagai penyakit (Hay, 1996).

Sebagian besar alga yang memiliki bioaktivitas yang berbeda-beda mulai dari antibakteri, antifungi, antikanker dan sebagainya merupakan kelompok alga coklat, terutama dari kelompok *Sargassum* dan *Turbinaria*. Beberapa jenis alga coklat antara lain *Sargassum cinereum*, *Sargassum hemiphyllum*, *Sargassum polycystum*, *Sargassum echinocarpum* dan *Turbinaria decurrens* ditemukan di perairan Sulawesi Selatan (Rasyid, 2001).

Enzim ialah biopolimer yang sebagian besar molekulnya berupa protein. Enzim berperan sebagai katalis dalam reaksi-reaksi biokimia yang terjadi di dalam sel makhluk hidup atau disebut pula biokatalisator yang menurunkan energi aktivasi dalam menguraikan substratnya dengan sangat spesifik. Oleh karena sifatnya tersebut dan tanpa efek samping, enzim telah banyak dimanfaatkan di luar tubuh dalam skala industri. Medis menggunakan enzim sebagai bahan diagnosis dan pengobatan. Salah satu enzim yang dimanfaatkan dalam dunia medis adalah L-Asparaginase.

L-Asparagin merupakan salah satu komponen nutrisi bagi sel kanker. Pemberian L-Asparaginase pada sel kanker dapat menguraikan L-Asparagin, sehingga diharapkan dapat menghambat pertumbuhan sel tersebut. L-Asparaginase memberikan manfaat yang besar pada terapi kanker (E-Moharam, dkk, 2010), salah satunya berupa sel kanker mulut rahim.

L-Asparaginase adalah salah satu jenis enzim hidrolase yang mengkatalis reaksi hidrolisis L-Asparagin menjadi asam aspartat dan amonia dengan memutus ikatan amida.

L-Asparaginase (E.C.3.5.1.1) dapat dijumpai pada banyak jaringan hewan, bakteri, tanaman, dan dalam serum tikus, namun tidak dijumpai pada manusia. L-Asparaginase dihasilkan dengan jumlah yang besar oleh beberapa mikroorganisme termasuk *E.coli*, *Erwinia cartova*, *Enterobacter aerogenes* (El-Bessoumy, dkk, 2004).

Berdasarkan latar belakang tersebut maka dilakukan suatu penelitian dengan judul “Identifikasi Molekuler Bakteri Penghasil Enzim L-Asparaginase dari Alga Coklat *Sargassum sp*”.

B. Tujuan Penelitian

Berdasarkan Latar Belakang dan Tinjauan Pustaka maka tujuan yang ingin dicapai dalam penelitian ini adalah untuk Mengidentifikasi Bakteri Symbion Makroalga *Sargassum Sp* dengan Metode BLAST.

II. TINJAUAN PUSTAKA

A. Tinjauan Alga Coklat

Alga sering disebut *rumpun laut* yang merupakan terjemahan dari istilah Inggris "sea weed". Penelitian tentang kandungan metabolit sekunder dari alga menunjukkan bahwa tanaman ini berpotensi sebagai produser metabolit bioaktif yang beragam dengan aktivitas yang sangat luas sebagai antibakteri, antijamur, antivirus, dan sitotastik (Zainuddin dan Malina, 2009).

Alga coklat seperti *Sargassum* tumbuh subur pada daerah tropis dengan kedalaman 0,5-10 m, suhu perairan 27,25 °C - 29,30 °C dan salinitas 32-33,5 %. Tumbuh membentuk rumpun besar dengan panjang thalli utama mencapai 1-3 m. Umumnya alga ini tumbuh secara liar dan masih belum dimanfaatkan secara baik, bahkan sering dianggap sebagai sampah laut pada musim tertentu, sebab banyak yang hanyut di permukaan laut dan terdampar di pantai akibat tercabut atau patah akibat ombak yang besar atau karena perubahan musim (Kadi, 2005).

B. Tinjauan Bakteri Simbion Makro Alga

Bakteri simbion adalah bakteri yang hidup menetap pada suatu inang, biasanya menghasilkan senyawa bioaktif yang sama seperti inangnya (Peres-Matos dkk, 2007). Inang menjadi tempat hidup bagi bakteri yang dalam hal ini berupa Makro Alga.

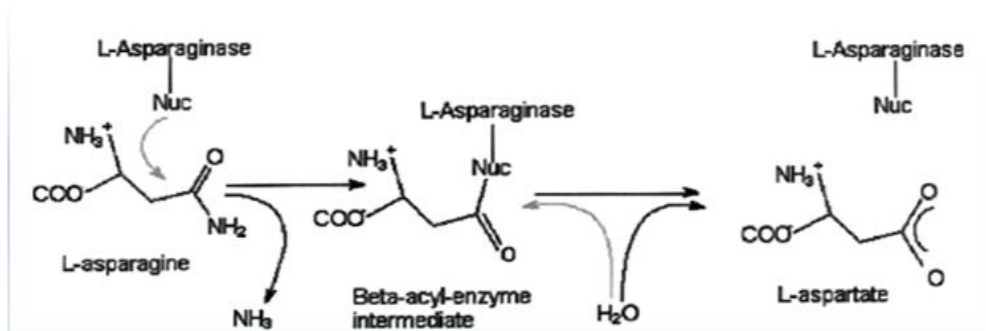
Lee dkk., (2001) juga melaporkan bahwa metabolit yang dihasilkan oleh spons merupakan hasil biosintesis bakteri simbiannya. Dengan demikian, spons dapat mengandung komponen bioaktif yang sama dengan simbiannya.

Hasil eksplorasi metabolit bioaktif bakteri laut merupakan salah satu sumber potensial bahan baku obat. Berdasarkan cara hidupnya, bakteri penghasil metabolit bioaktif dapat berasal dari bakteri yang hidup bebas, bakteri laut yang terdapat pada sedimen, bakteri yang berasosiasi dengan permukaan alga, atau bakteri yang berasosiasi dengan invertebrata. Bakteri yang hidup berikatan dengan partikel tertentu menghasilkan metabolit bioaktif 5-10 kali lebih tinggi dibandingkan dengan bakteri yang hidup bebas (Long dan Azam, 2001).

C. Tinjauan Enzim L – Asparaginase

Fungsi suatu enzim ialah sebagai katalis untuk proses biokimia yang terjadi dalam sel maupun di luar sel. Suatu enzim dapat mempercepat reaksi 10^8 sampai 10^{11} kali lebih cepat dari pada apabila reaksi tersebut dilakukan tanpa katalis (Poedjiadi, 1994).

L – Asparaginase mengkatalisis hidrolisis L – Asparagin menjadi L – Aspartat dan ammonia, seperti pada Gambar 1.



Gambar 1. Reaksi hidrolisis oleh L – Asparaginase (El-Bessoumy dkk, 2004).

Aplikasi penting dari enzim L – Asparaginase adalah penerapannya pada pengobatan leukemia limfoblastik akut (umumnya pada anak-anak), penyakit Hodgkin, leukemia myelositik akut, leukemia myelomonositik akut, leukemia limfositik kinis, terapi lymfosarkoma, reticulasarbom dan melanosarkoma (Verma dkk, 2007) serta Kanker Mulut Rahim. Peran L – Asparaginase pada terapi sel leukemia limfositik didasarkan pada fakta bahwa sel ini tidak memproduksi L – Asparagin namun memperolehnya dari luar sel (Duval dkk, 2002). Enzim L– Asparaginase akan mereduksi suplai L – Asparagin ke sel kanker dengan merubahnya menjadi asam aspartat dan amoniak, seperti yang ditunjukkan pada Gambar 1.

III. METODELOGI PENELITIAN

A. *Desain Penelitian*

Penelitian bersifat eksploratif menggunakan metode eksperimental dengan teknik fermentasi substrat padat.

B. *Waktu dan Lokasi Penelitian*

Penelitian ini dilakukan pada bulan September 2013 sampai Februari 2014 di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin, Laboratorium Biokimia FMIPA Universitas Hasanuddin, Laboratorium Mikrobiologi dan laboratorium biokimia UIN alauddin Makassar.

C. *Alat dan Bahan Penelitian*

1. *Alat Penelitian*

Alat yang digunakan adalah cawan petri, tabung reaksi, rak tabung reaksi, jarum ose, oven, laminary air flow, perangkat UV light, sarung tangan, masker, bunsen, tangkai pengaduk, erlenmeyer, pH meter, hot plate, magnetic stirrer,

lemari pendingin, pinset, mikropipet, timbangan analitik, mikroskop, kaca obyek, kaca penutup, autoclave, frezer. Mikropipet + tip filter, tabung effendorf 1,5 µl, rak tabung effendorf, vortex shaker, sentrifuge, gene cycler, gel doc, alat elektroforesis. PCR.

2. Bahan Penelitian

Alga coklat *Sargassum sp*, Media Nutrient Broth, NaCl fisiologis, Media M-9 yang mengandung 6 g/L $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 3 g/L KH_2PO_4 , 10 g/L NH_4Cl , 0,5 g/L NaCl, 1,0 g/L $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 10 g/L L – Asparagin, 1,0 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 3 g/L glukosa 20 g/L agar dan 0,05 g/L indikator fenol red dengan pH optimal 7.0. Sepasang primer yang digunakan U1 dan U2, dengan sekuen untuk semua bakteri. Sekuen primer U1 adalah 5'-CCAGCAGCCGCGGTAATACG-3' pada nukleotida 518-537 dari gen 16S rRNA E.coli, dan U2 adalah 5'-ATCGG (C / T) TACCTTGTTACGACTTC-3', sesuai dengan nukleotida 1.513-1.491 dari gen yang sama. Template DNA, *Taq* DNA polymerase (Perkin-Elmer, Norwalk, Conn.), PCR Mix, Triton X-100, Tris, EDTA, Tris-HCl, KCl, MgCl_2 , , parafin, deoxynucleoside triphosphate, polyacrylamide gel, agarose, Ethidium Bromide, akuades.

D. Populasi dan Sampel Penelitian

1. Populasi

Populasi pada penelitian ini adalah semua *Sargassum sp*. yang terdapat diperairan Pulau Barrang Lompo, Sulawesi Selatan.

2. Sampel

Sampel pada penelitian ini adalah bagian dari populasi terjangkau.

E. Definisi Operasional

1. Bakteri simbion Makro Alga *Sargassum sp* adalah bakteri yang hidupnya menetap pada Makro Alga *Sargassum sp* yang menghasilkan senyawa bioaktif yang sama seperti inangnya.
2. Enzim L Asparaginase adalah salah satu jenis enzim hidrolase yang mengkatalis reaksi hidrolisis L Asparagin menjadi asam aspartat dan amonia dengan memutus ikatan amida.
3. Universal primer adalah primer yang digunakan untuk mengamplifikasi DNA semua jenis bakteri.
4. Sekuensing adalah proses pengurutan nukleotida RNA forward sampel bakteri
5. Sekuen adalah urutan nukleotida sampel bakteri.

IV. PROSEDUR KERJA

A. Preparasi Sampel

Sampel alga yang telah dikumpulkan kemudian dibersihkan dari kotoran yang menempel dan disimpan dalam *cool box*. Selanjutnya sampel disegarkan dalam media *Nutrient Broth*. Sebanyak 15 gram sampel alga dibilas dengan 30 mL NaCl fisiologis. Selanjutnya, alga yang telah dibilas dihaluskan dengan menggunakan blender dan ditambahkan NaCl fisiologis. Suspensi kemudian dimasukkan ke dalam 30 mL media *nutrient broth* lalu dikocok menggunakan *shaker* pada suhu kamar selama 24-48 jam.

B. Isolasi dan Identifikasi Bakteri Symbion Makroalga

Sampel diambil sebanyak 1 mL dan dilakukan pengenceran bertingkat untuk memperoleh pengenceran yang sesuai. Selanjutnya sebanyak 0,1 mL dari pengenceran tersebut disebarkan ke dalam medium agar dan ditumbuhkan selama 24 jam. Pemurnian bakteri dilakukan dengan menumbuhkan koloni bakteri yang berbeda-beda dari kultur sebelumnya ke dalam cawan petri yang mengandung media selektif M-9. Medium disterilkan dalam autoclave selama 15 menit pada suhu 121⁰C tekanan 1 atm. Diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37 °C. Pada medium ini L – Asparagin digunakan sebagai sumber nitrogen. Produksi L – Asparaginase oleh bakteri akan melepaskan amoniak sehingga meningkatkan pH medium pembiakan. Perubahan pH membentuk warna pink disekitar koloni yang memproduksi L – Asparaginase (Gashemi, dkk., 2008).

C. Identifikasi Molekuler Isolat Bakteri simbion

Identifikasi bakteri simbion penghasil L-Asparaginase dideterminasi dengan menggunakan sekuen 16S-rRNA. Analisis cluster pada sekuens tersebut dilakukan dengan program *BLAST (Basic Local Aligmnet Search Tool)* dari *NCBI (National Center for Biotechnology Information)*. Adapun langkah-langkahnya sebagai berikut :

1. Ekstraksi DNA

Sampel sekitar 10⁵ cfu dilarutkan dengan 200 µL *PBS*. Sampel dipanaskan dalam waterbath pada suhu 90°C selama 25-30 menit. Sampel disentrifuge selama 10-15 menit dengan kecepatan 13.000 rpm lalu 100 µL supernatan siap di amplifikasi pada mesin PCR.

2. Pembuatan gel agarose

Untuk target DNA < 1000 bp digunakan agarose 2 % yakni 2 gr/100 mL akuades. Gel agarosa ditimbang sebanyak 2 gram lalu dilarutkan dalam 100 ml

10 Tris borate EDTA (TBE) dan dipanaskan bersama stirer sampai mendidih. Dibiarkan memadatkan bersama sisir sumur. Selanjutnya direndam dalam larutan ethidium bromide.

3. Amplifikasi PCR

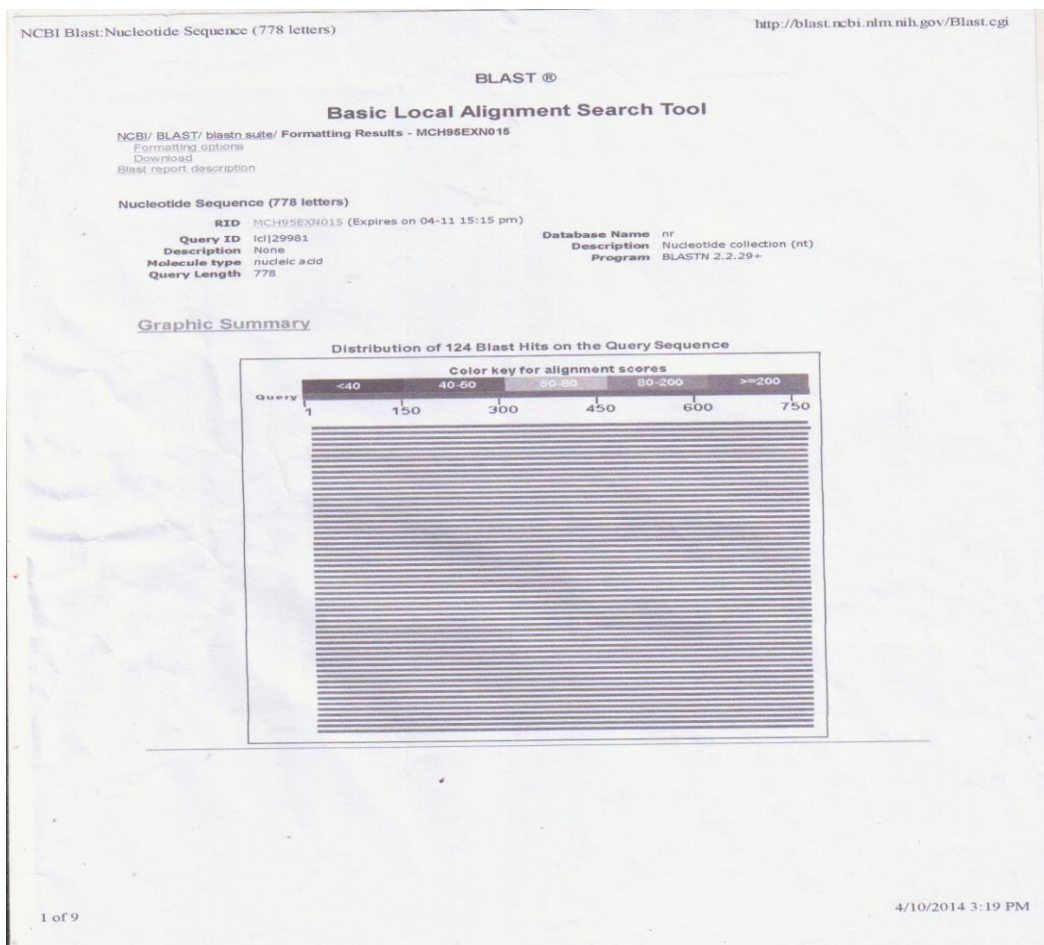
Melarutkan kit primer U1 351,8 μL dan U2 308,1 μL masing-masing dengan 100 μM nuclease free water. Membuat master mix yang mengandung 1 μL U1, 1 μL U2, 5 μL 10 X buffer, 2 μL MgCl_2 25 mM, 1 μL dNTP 10 mM, hot start 0,25 μL , H_2O 29,75 μL dan DNA 10 μL . Melarutkan 10 μL supernatant dan 40 μL master mix sehingga total volume sampel 50 μL kemudian dimasukkan dalam mesin PCR. Sampel didenaturasi pada suhu 95°C selama 15 menit. Proses PCR melalui 35 siklus, denaturasi pada suhu 95°C selama 1 menit, annealing pada suhu 55°C selama 1 menit dan extension pada suhu 72°C selama 2 menit lalu diinkubasi pada suhu 72°C selama 10 menit. Produk PCR sebanyak 2 μL dilarutkan dengan 1,5 μL loading dye lalu dielektroforesis pada gel agarose 2 %. Untuk mengetahui ukuran produk PCR maka digunakan marker pada sumur pertama dan terakhir. Gel agarose dimasukkan dalam gel doc untuk melihat produk PCR dengan pita yang jelas yang berukuran 150 bp.

4. Sekuensing

RNA forward sampel dikirim ke MacroGen Korea untuk disekuensing. Hasilnya berupa sekuen nukleotida sepanjang \pm 150 nukleotida. Nukleotida tersebut dimasukkan dalam program BLAST untuk dicocokkan dengan data spesies pada GenBank, keidentikan yang digunakan pada range 80-100 %.

V. HASIL DAN PEMBAHASAN

Setelah melakukan sekuensing di laboratorium MacroGen Korea, diperoleh hasil sebagai berikut :



Gambar 2. Hasil BLAST

Dari gambar 2 dinyatakan bahwa panjang basa nukleotida sampel bakteri simbion makro alga *Sargassum sp* sebesar 778 bp yang dinyatakan dengan Query length.

NCBI Blast:Nucleotide Sequence (778 letters) http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi

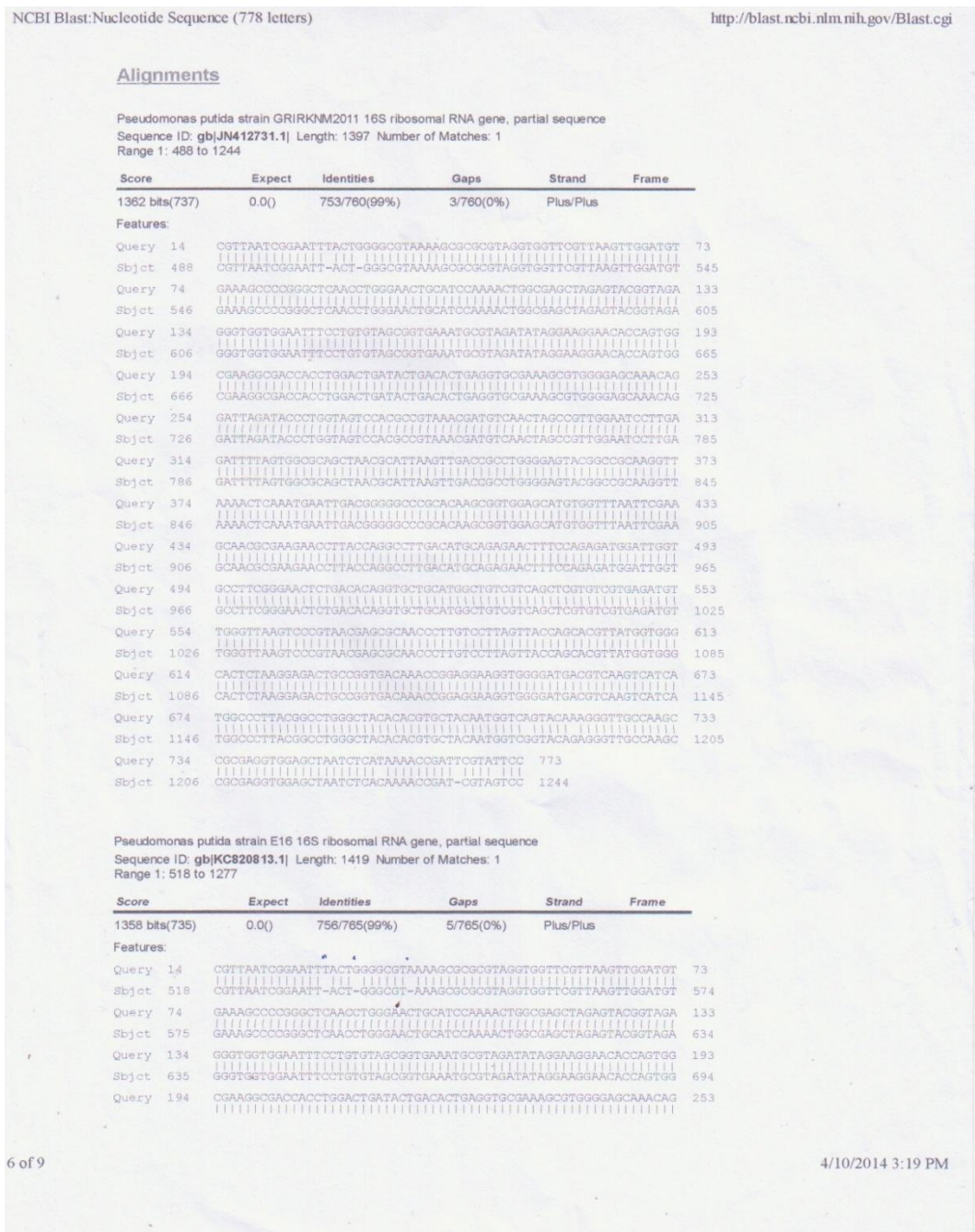
Descriptions
Sequences producing significant alignments:

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Pseudomonas putida strain GRIRKNM2011 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1362	1362	97%	0.0	99%	JN412731.1
Pseudomonas putida strain E16 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1358	1358	98%	0.0	99%	KC820913.1
Pseudomonas plecoglossicida strain MSSRFDB 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1358	1358	97%	0.0	99%	HQ454989.1
Pseudomonas sp. JD22 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1356	1356	97%	0.0	99%	KJ191408.1
Pseudomonas plecoglossicida strain S20411 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1356	1356	97%	0.0	99%	KF956584.1
Pseudomonas fluorescens strain AAU PR3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1356	1771	97%	0.0	99%	KJ161327.1
Pseudomonas putida strain AAU PR2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1356	1922	97%	0.0	99%	KJ161326.1
Pseudomonas putida strain Lcp2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1356	1356	97%	0.0	99%	KJ09238.1
Pseudomonas putida strain FPC951 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1356	1356	97%	0.0	99%	KJ410558.1
Pseudomonas sp. Bacto19 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1356	1356	97%	0.0	99%	KF872744.1
Pseudomonas taiwanensis strain A/S1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1356	1356	97%	0.0	99%	KF964570.1
Pseudomonas sp. t6(2014) 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1356	1356	97%	0.0	99%	KF898098.1
Marinobacter arcticus 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1356	1356	97%	0.0	99%	KF898098.1
Pseudomonas sp. LS-Q88 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1356	1356	97%	0.0	99%	KF870448.1
Pseudomonas sp. LS-Q20 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1356	1356	97%	0.0	99%	KF870428.1
Pseudomonas plecoglossicida strain SBADK2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1356	1356	97%	0.0	99%	KF836136.1
Pseudomonas plecoglossicida strain GSN22 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1356	1356	97%	0.0	99%	KF815701.1
Pseudomonas putida strain GSN11 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1356	1356	97%	0.0	99%	KF815895.1
Pseudomonas putida strain CG29 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1356	1356	97%	0.0	99%	KF782801.1
Pseudomonas sp. CV48 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1356	1356	97%	0.0	99%	KF782800.1
Pseudomonas sp. FGI182, complete genome	1356	9464	97%	0.0	99%	CP007012.1
Pseudomonas monteilii SB3101, complete genome	1356	8139	97%	0.0	99%	CP006879.1
Pseudomonas monteilii SB3078, complete genome	1356	8139	97%	0.0	99%	CP006878.1
Pseudomonas plecoglossicida strain PSG1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1356	1356	97%	0.0	99%	KF861549.1

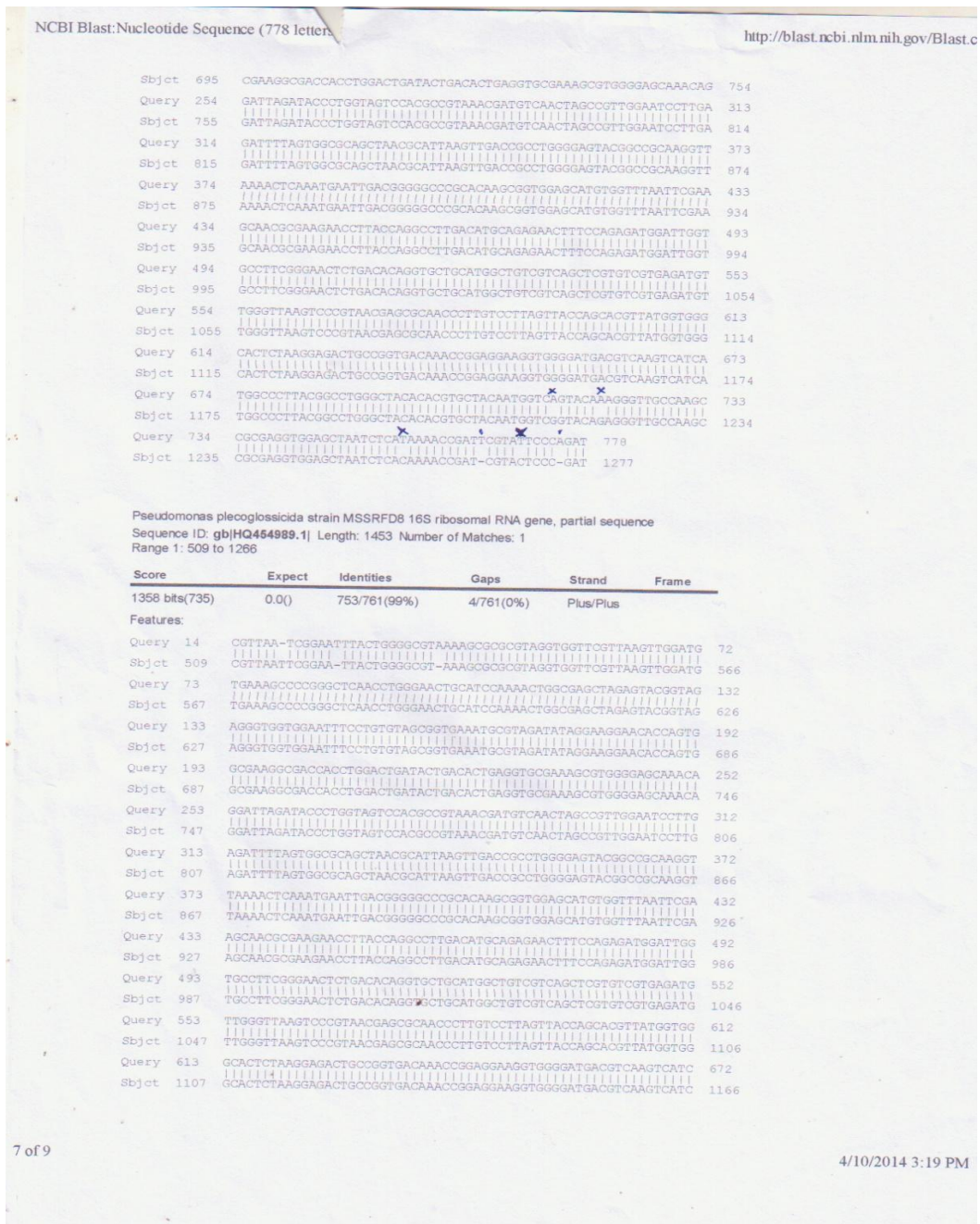
2 of 9 4/10/2014 3:19 PM

Gambar 3. Deskripsi hasil Identifikasi dari berbagai jenis kemungkinan bakteri

Terdapat 3 kemungkinan bakteri hasil metode BLAST, yakni *Pseudomonas putida*, *Enterobacter asburine* dan *Marinobacter arcticus*. Dari gambar 3 diperoleh nilai tertinggi sebesar 1358 yang dinyatakan dengan Max Score. Persentase basa nukleotida yang terbaca sebesar 98% yang dinyatakan dengan Query cover. Sehingga dari hasil tersebut ditentukan bahwa bakteri *Pseudomonas putida* strain E16 16S ribosomal RNA gene merupakan bakteri simbion makro alga *Sargassum sp.*



Gambar 4. Urutan Basa Nukleotida *Pseudomonas putida* strain E16 16S ribosomal RNA gene dengan nomor akses KC820813.1



Gambar 5. Urutan Basa Nukleotida *Pseudomonas putida* strain E16 16S ribosomal RNA gene dengan nomor akses KC820813.1 (lanjutan).

Dari gambar 4 dan gambar 5 terlihat bahwa 16S Ribosomal RNA gene dinyatakan dengan sbjct sedangkan sampel dinyatakan dengan Query. Panjang 16S Ribosomal RNA gene yang digunakan sebesar 1419 bp dengan range 518 bp sampai 1277 bp. Penggunaan 518 bp sampai 1277 bp oleh system karena di bagian tersebut merupakan bagian yang paling mendekati dengan urutan nukleotida sampel dengan nilai *Query cover* 98%.

Identities sebesar 756/765 (99%). Hal ini berarti bahwa terdapat 756 bp yang sama antara Query dengan Sbjct dari 765 bp Query. Terdapat 9 perbedaan yang berasal dari 5 bp yang mengalami insersi dan 4 bp yang mengalami substitusi, yakni pada Query 714 bp, 720 bp, 755 bp, 770 bp. Substitusi yang pertama terjadi pada Query 714 bp yang berupa A tetapi pada Sbjct 1215 bp berupa G. Substitusi ke dua terjadi pada Query 720 bp yang berupa A tetapi pada Sbjct 1221 bp berupa G. Substitusi ke tiga terjadi pada Query 755 bp yang berupa T tetapi pada Sbjct 1256 bp berupa C. Substitusi ke empat terjadi pada Query 770 bp yang berupa T tetapi pada Sbjct 1270 bp berupa C (tanda berupa X pada gambar 4 dan 5).

Gaps sebesar 5/765 (0%). Hal ini dimaksudkan bahwa Query sepanjang 765 bp dan Terdapat 5 gaps dengan Sbjct, yakni pada urutan 28 bp, 32 bp, 39 bp, 765 bp dan 775 bp yang terjadi karena insersi pada Query (terdapat pada Query namun tidak terdapat pada sbjct). (tanda berupa . pada gambar 4 dan 5).

VI. KESIMPULAN

Setelah Melakukan penelitian ini diperoleh jenis bakteri *Pseudomonas putida* strain E16 16S ribosomal RNA gene yang merupakan bakteri simbion makro alga *Sargassum sp.*

DAFTAR RUJUKAN

- Deval, A. G., Platas, G., Basilio, A., Cabello, A., Gorrochategui, J., Suay, I., Vicente, F., Portillo, E., del Rio, M. J., Reina, G. G., and Pelaez, F., 2001, *Screening of Antimicrobial Activities in Red, Green and Brown Macroalgae from Gran Canaria (Canary Islands, Spain)*. Int. Microbiologi, Vol. 4.
- E-Moharam, M., Gamal-Eldeen, A.M., dan El-Sayed, S.T., 2010, *Production, Immobilization and Anti Tumor Activity of L – Asparaginase of Bacillus sp R36*, Journal of American Science, Vol. 6.
- El-Bessoumy, A.A., Sarhan, M., dan Mansour, J., 2004, *Production, Isolation, and Purification of L – Asparaginase from Pseudomonas Aeruginosa 50071 Using Solid state Fermentation*, Journal of Biochemistry and Molecular Biology, Vol. 37.
- Gashemi, Y., Ebrahimi, A., Rasoul-Amini, S., Zarrini, G., and Ghoshon, M. B., 2008, *An Optimized Medium for Screening of L – Asparaginase Production by Eschericia coli*, American Journal of Biochemistry an Biotechnology, Vol. 4.

- Hadioetomo, R. S., 1993, *Mikrobiologi Dasar dalam Praktek*, PT. Gramedia Pustaka Utama, Jakarta.
- Hay, M. E., 1996, *Marine Chemical Ecology : What's Known and What's Next*, J. Exp. Mar. Biol. Ecol., Vol. 200.
- Kadi, A., 2005, *Beberapa Catatan Kehadiran Marga Sargassum di Perairan Indonesia, Bidang Sumber daya Laut*, Pusat Penelitian Oseanografi, LIPI, Jakarta, Vol. 30.
- Kurnia, D. R. D., 2010, *Studi Aktivitas Lipase dari Aspergillus niger sebagai Biokatalis pada Proses Gliserolisis untuk Menghasilkan Monoasilgliserol* (Tesis), Universitas Diponegoro, Semarang
- Lay, B. W., 1994, *Analisis Mikroba di Laboratorium*, Rajawali Pers, Jakarta.
- Lee, Y. K., Lee, J. H., Lee, H. K., 2001, *Microbial Symbiosis in Marine Sponges*, J. Microbiol, Vol. 30.
- Long, R. A., and Azam, F., 2001, *Antagonistic Interactions among Marine Pelagic Bacteria*, Appl Environ Microbiol, Vol. 67.
- Natsir, H., Patong, A. R., Suhartono, M. T., and Ahmad A., 2010, *Production and Characterization of Chitinase Enzyme from Sulili Hot Spring in South Sulawesi, Bacillus sp. HSA3-1a*, Indo. J. Chem., Vol. 10.
- Nofiani, R., 2008, *Urgensi dan Mekanisme Biosintesis Metabolit Sekunder Mikroba Laut*, Jurnal Natur Indonesia.
- Perez-Matos, A. E., Rosado, W., Govind, N.S., 2007, Bacterial Diversity Associated with the Caribbean Tunicate Ecteinascidia turbinata, Department of Marine Sciences University of Puerto Rico, Vol. 92.
- Poedjiadi, A., 1994, *Dasar-dasar Biokimia*, Universitas Indonesia, Jakarta.
- Rasyid, A., 2001, *Potensi Sargassum Asal Perairan Kepulauan Spermonde sebagai Bahan Baku Alginat*, Kandidat Peneliti Puslitbang Oseanologi, LIPI, Jakarta.
- Verma, N. K., Kumar, G., Kaur, and Ariand, S., 2007, *L-Asparaginase : A Promising Chemotherapeutic Agent*, Critical Review Biotechnology, Vol. 27.
- Zainuddin, E. N., dan Malina, A. C., 2009, *Skrining Rumput Laut Asal Sulawesi Selatan sebagai Antibiotik melawan Bakteri Patogen pada Ikan*, Laporan Penelitian Research Grant, Biaya IMHERE-DIKTI.