

AKTIVITAS PROTEOLITIK BAKTERI LOKAL YANG DI ISOLASI DARI TEMPAT PENANGKARAN BUAYA

Jendri Mamangkey^{1*}, Dwi Suryanto²

¹Program Studi Pendidikan Biologi, FKIP-Universitas Kristen Indonesia, DKI Jakarta

²Departemen Biologi, FMIPA-Universitas Sumatera Utara, Medan

*Corresponding author: jendri.mamangkey@uki.ac.id

Abstract

Indonesia has an ecological diversity which can be used as significantly potential habitat for local bacteria. One of such environments is crocodile breeding where research on proteolytic bacteria is still minimal. Proteolytic bacteria are a type of bacteria which can produce protease enzymes. This research was performed aiming to find selected proteolytic bacteria that can produce protease enzymes. Pour plate method using skim milk agar media was employed to isolate the bacteria. Bacteria isolates were selected based on qualitative and quantitative tests. Current research results discovered 6 bacteria isolates which had proteolytic ability after the qualitative test. Among those 6 isolates, 3 (FB2, THB1b, and THB6a) were able to hydrolyze skim milk media with the fastest incubation time of 18 hours. Meanwhile, based on quantitative test, 1 isolate produced the highest protease activity, which is FB2 isolate with 958 U/mL having a total of 12.05 cells/mL. Based on this research report, FB2 isolate collected from crocodile feces (FB) has the potential to be utilized in protease enzymes application in the environment.

Keywords: *Proteolytic, crocodile breeding, qualitative and quantitative, protease*

PENDAHULUAN

Biodiversitas bakteri proteolitik yang belum maksimal dieksplorasi mengakibatkan aktualisasi informasi mengenai aplikasi industri enzim protease melibatkan bakteri-bakteri lokal belum terimplementasikan dengan baik. Salah satu lingkungan yang belum banyak dikaji mengenai bakteri proteolitiknya adalah tempat penangkaran buaya. Ekologi penangkaran buaya berpotensi untuk diteliti diversitas bakterinya untuk keperluan industri. Upaya yang terus dilakukan adalah mengoleksi sebanyak mungkin enzim bakteri yang berpotensi menghasilkan nilai produk industri bermanfaat dan memiliki nilai tinggi. Bakteri proteolitik merupakan jenis bakteri

yang memiliki kemampuan untuk memproduksi enzim protease. Protease memiliki peran yang komprehensif, selain berperan dalam mekanisme metabolisme seluler protease dapat diimplementasikan untuk berbagai macam perindustrian (Gupta *et al.*, 2002).

Sejak protease dari tumbuhan dan hewan tidak dapat memenuhi permintaan yang terus meningkat, saat ini lebih difokuskan pada protease mikroorganisme secara global (Sakinala *et al.*, 2016). Selain itu, protease mikroorganisme yang diperlukan kira-kira 40% dari total produksi enzim di seluruh dunia (Haddar *et al.*, 2009; Raval *et al.*, 2014). Bakteri adalah sumber enzim protease yang menjanjikan untuk menghasilkan

pemasukan miliaran dolar perdagangan internasional. Rujukan Chandra *et al.* (2020) menyatakan, protease mikroorganisme dikenal stabilitasnya terhadap berbagai pH, suhu, dan sifat substrat. Enzim, produk metabolisme mikroorganisme, memiliki relevansi tinggi dalam menunjang ekonomi hijau dengan alasan spesifik yaitu substrat berlimpah di alam, peningkatan efisiensi katalitik, efektivitas biaya, dan keramahan lingkungan (Ahuja *et al.*, 2004; Baweja *et al.*, 2016).

Protease bakteri termasuk kelompok hidrolase dan enzim multifungsi yang mengkatalisis reaksi-reaksi hidrolisis dari berbagai polimer protein ke dalam konstituen yaitu peptida dan asam amino (Guleria *et al.*, 2016; Johannes & Zhao, 2006). Protease termasuk salah satu dari tiga kelompok enzim yang diaplikasikan dalam industri, pasar global protease meningkat secara drastis setiap tahunnya. Protease menyumbang 20% dari 60% enzim yang dipasarkan di seluruh dunia (Kang *et al.*, 1995; Rao *et al.*, 2009; Singhal *et al.*, 2012). Bakteri proteolitik saat ini dilaporkan adalah bersumber pada substrat berprotein tinggi seperti limbah sisa cucian ayam potong dan sisa cucian ikan (Andika & Sulistyarsi, 2017), limbah cair pengolahan bandeng presto (Paskandani *et al.* 2014), dan tanah tempat pembuangan akhir (Mamangkey *et al.*,

2020). Protease merupakan kelompok enzim yang peranannya cukup penting dalam berbagai fungsi biologi mulai dari tingkat sel, organ hingga organisme yang diistilahkan sebagai reaksi metabolik dan fungsi regulator (Vazquez *et al.*, 2008).

Eksplorasi bakteri proteolitik yang berasal dari tempat penangkaran buaya adalah bentuk upaya untuk menemukan jenis bakteri baru lokal yang belum diketahui sebelumnya. Ekologi penangkaran buaya menunjang berkembangnya bakteri proteolitik, hal ini dikarenakan ketersediaan substrat protein berlimpah dari sisa makanan buaya yaitu daging burung/ayam dan bulu-bulu burung/ayam yang sudah jelas mengandung protein tinggi. Oleh karena itu, penelitian ini bertujuan untuk menyeleksi dan menguji kemampuan proteolitik bakteri lokal dari tempat penangkaran buaya Asam Kumbang Medan Selayang, Medan, Sumatra Utara, Indonesia sebagai dasar awal penentuan isolat yang dapat diaplikasikan pada industri pertanian, peternakan, dan lingkungan.

METODE PENELITIAN

Lokasi Pengambilan Sampel

Sampel feses buaya diperoleh dari tempat penangkaran buaya Asam Kumbang, Sumatra Utara, Indonesia (E 98 ° 37 ' 11.24 ", N). Feses yang dikoleksi

lalu disimpan dalam plastik ziplock steril (30x40 cm). Sampel dimasukkan ke dalam ice box untuk pengerjaan selanjutnya di laboratorium.

Isolasi Bakteri

Isolasi bakteri sesuai metode Yue *et al.* (2017) dengan beberapa modifikasi. Sampel tanah/feses buaya 1 gram dimasukkan dalam 9 mL NaCl (0,9% w/v) melalui tahapan pengenceran bertingkat 10^{-1} sampai 10^{-9} . 100 μ L sampel tersuspensi dari tiga pengenceran terakhir yaitu 10^{-7} , 10^{-8} , dan 10^{-9} dituangkan merata pada media *Nutrient Agar* (OXOID, kode CM0003). Komposisi *Nutrient Agar* kode CM0003 adalah pepton 5 gram, sodium chlorida 5 gram, agar 15 gram, lab-lemco powder 1 gram, dan *yeast extract* 2 gram. Cawan berisi media dan sampel diinkubasi pada $35^{\circ}\text{C}\pm 2$ selama 24 jam. Koloni bakteri yang tumbuh dipindahkan ke dalam media *nutrient agar* miring (tabung reaksi) disimpan untuk penelitian lebih lanjut.

Skrining Kemampuan Proteolitik Bakteri (Pengujian Kualitatif)

Media *Skim milk agar* (OXOID LP0031B) digunakan untuk menguji bakteri yang diisolasi dari tanah/feses buaya. *Skim milk agar* dimasukkan dalam akuades steril, selanjutnya homogenisasi dan dipasteurisasi suhu $\pm 70^{\circ}\text{C}$ sampai susu skim larut. Koloni bakteri terseleksi diinokulasikan pada media *skim milk agar*. Bakteri terdeteksi menghidrolisis protein

ketika terbentuk zona bening pada sekitar objek koloni bakteri. Aktivitas proteolitik diketahui nilainya dengan menggunakan rumus:

$$\text{Aktivitas Proteolitik} = \text{Diameter zona bening} - \text{Diameter koloni bakteri (Meliah et al. 2018)}.$$

Pengujian Kuantitatif Aktivitas Protease Bakteri

Semua isolat bakteri terpilih diuji secara kuantitatif kemampuan proteolitiknya. Aktivitas protease diuji dari 500 μ L supernatan yang ditambahkan 500 μ L substrat kasein 2% dalam 0,05 M buffer fosfat (pH 7). Inkubasi suspensi dilakukan pada suhu 37°C selama 10 menit, setelah itu ditambahkan 1 mL asam trikloroasetat (0,4M) dan didiamkan 30 menit pada suhu ambient. Larutan disentrifugasi menggunakan kecepatan 4000 rpm selama 15 menit (4°C). Sebanyak 1 mL *crude enzyme* atau supernatan diambil dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi pengenceran, kemudian diencerkan dengan menambahkan Tris HCl sampai volume total 2 mL. Aktivitas protease diketahui dengan mengukur nilai absorbansi larutan dengan panjang gelombang 450 nm. Satu unit aktivitas protease didefinisikan sebagai jumlah enzim yang diperlukan untuk menghasilkan perubahan penyerapan 1 μ mol tirosin dengan substrat azokasein

dalam kuvet 1 cm, di bawah kondisi alat uji (Sarath, *et al.*, 1989).

Pengamatan Pertumbuhan Bakteri

Pertumbuhan bakteri proteolitik dapat diamati melalui nilai *Optical Density* (OD). Pengukuran OD dengan cara menyiapkan 10 ml sampel, larutan disentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm (10 menit). Supernatan (larutan hasil sentrifugasi) dibuang dan pelet yang diperoleh dilarutkan dengan 10 mL larutan PBS selanjutnya divortex untuk homogenisasi. Nilai OD diamati menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 600 nm.

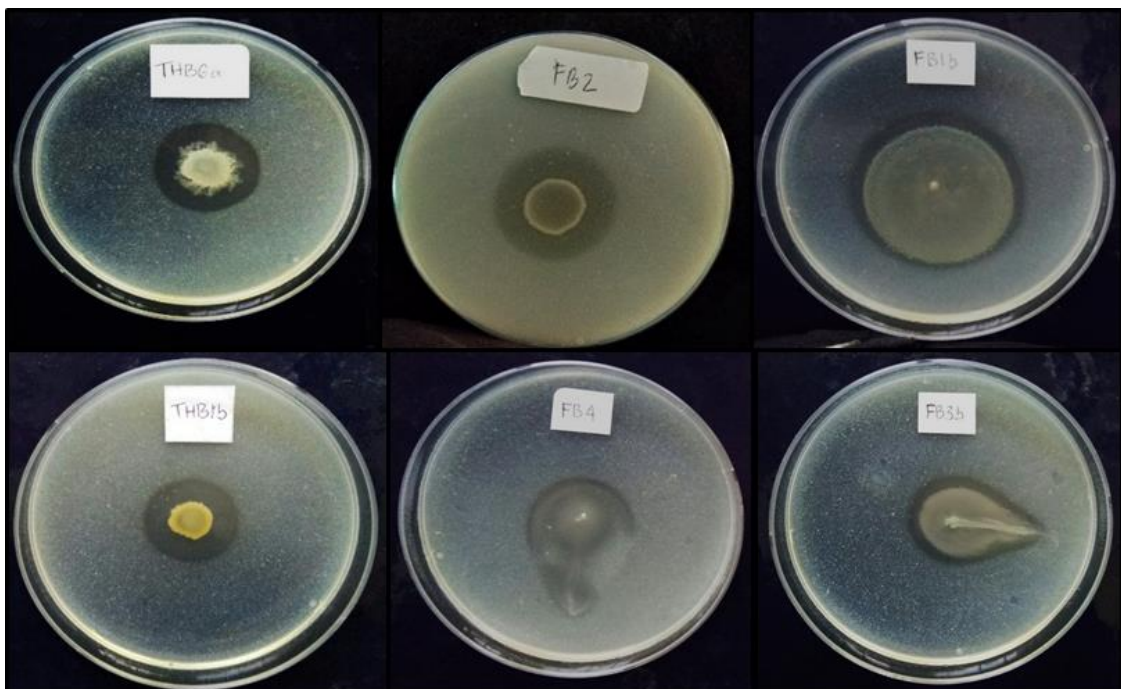
Analisis Data

Data dianalisis menggunakan software OriginLab 2019

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pengolahan Sampel

Ada dua jenis sampel yang dikoleksi untuk mengisolasi bakteri dari tempat penangkaran buaya, yang pertama habitat buaya (THB) dan kedua adalah feses buaya (FB). Masing-masing tipe sampel diambil dari beberapa titik dengan tujuan menemukan jenis bakteri yang lebih variatif. Total bakteri yang berhasil diisolasi dari tempat penangkaran buaya adalah 24 isolat (Tabel 1). Dari 24 isolat bakteri hanya 6 isolat yang terdeteksi memiliki kemampuan proteolitik yaitu THB1b, THB6a, FB1b, FB2, FB3b, dan FB4 (**Gambar 1**). Kemampuan proteolitik bakteri diketahui setelah ditumbuhkan dalam media *skim milk agar*.



Gambar 1. Zona Bening Bakteri Proteolitik dari Tempat Penangkaran Buaya
Sumber. Dokumen Penulis

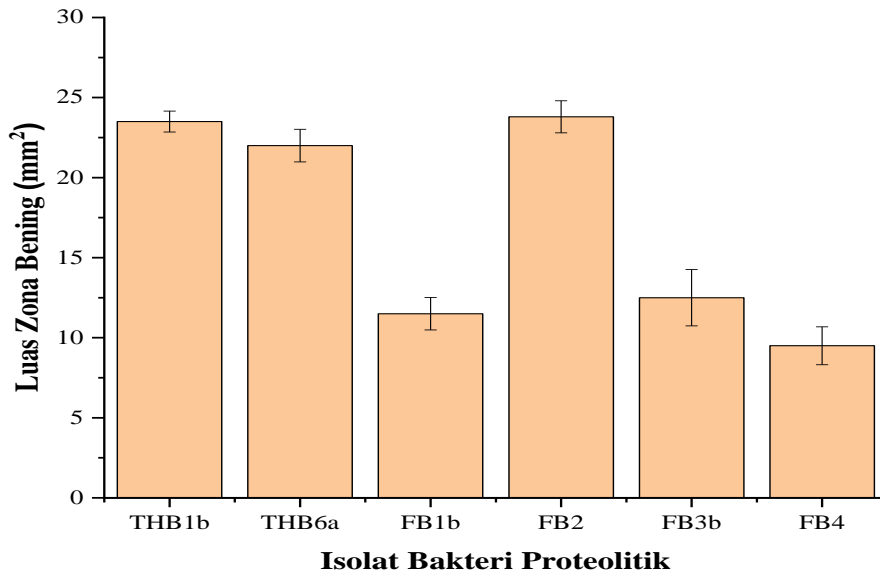
Besarnya aktivitas proteolitik masing-masing isolat bakteri bervariasi yang ditunjukkan oleh perbedaan luas zona bening yang terbentuk (**Gambar 1**). Terbentuknya zona bening menunjukkan isolat bakteri memanfaatkan *skim milk* pada media sebagai substrat pertumbuhannya yang mengakibatkan protein di sekitar koloni habis dimanfaatkan. (Lakshmi *et al.* (2014) berpendapat bahwa keberadaan zona bening (indeks proteolitik) dalam media padat dapat dijadikan rujukan untuk mendemonstrasikan kemampuan bakteri dalam memproduksi protease, tetapi tidak dijadikan referensi untuk menentukan kualitas untuk menghasilkan protease (Ningthoujam & Kshetri, 2010; Zilda *et al.*,

2012).Aktivitas proteolitik bakteri sangat dipengaruhi oleh komposisi media yang digunakan sebagai sumber nutrisi. *Skim milk* agar mengandung banyak nutrisi seperti kasein, kalsium, kalium, magnesium, dan fosfor. Kasein yang mengandung protein fosfor dapat mengikat kalsium untuk membentuk kalsium kalsinat, sehingga suspensi berwarna putih dan lebih mudah diamati zona hidrolisis bakteri pada media padat (Pakpahan, 2009). Untuk menguatkan hasil penelitian maka dilakukan pengamatan waktu hidrolisis pada masing-masing isolat. **Tabel 1** menunjukkan dari 24 isolat bakteri, ada 3 isolat (FB2, THB1b, THB6a) yang mampu menghidrolisis media *skim milk* dengan waktu inkubasi tercepat, yaitu 18 jam.

Tabel 1. Hasil pengujian kemampuan bakteri menghidrolisis protein

Kode isolat	Kemampuan Hidrolisis Protein	Waktu Yang Diperlukan (Jam)
FB1a	-	0
FB1b	++	21
FB2	+++	18
FB2b	-	0
FB3a	-	0
FB3b	++	21
FB4	+	24
FB4b	-	0
FB5	-	0
FB5b	-	0
FB6	-	0
FB6b	-	0
THB1a	-	0
THB1b	+++	18
THB2	-	0
THB2b	-	0
THB3	-	0
THB3b	-	0
THB4	-	0
THB4b	-	0
THB5	-	0
THB5b	-	0
THB6a	+++	18
THB6b	-	0

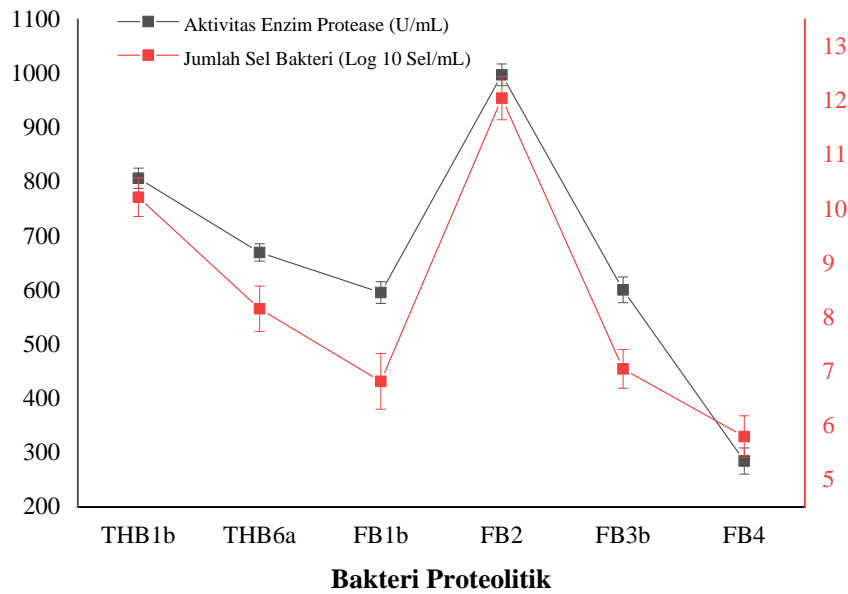
Keterangan: (-) = 0 mm, (+) = < 10 mm, (++) = > 10 mm, (+++) = > 20 mm



Gambar 2. Luas Zona Bening Isolat Bakteri Proteolitik
Sumber. Dokumen Penulis

Isolat FB2 diperoleh dari feses buaya pada titik lokasi ke-2, sedangkan isolat THB1b dan THB6a berhasil dikoleksi dari tempat habitat buaya diwakili oleh sampel tanah dan sisa-sisa pakan buaya. Ketiga isolat bakteri proteolitik mampu menggunakan *skim milk* untuk pertumbuhannya sesuai dengan nutrisi habitat aslinya, buaya yang diberi pakan berupa daging ayam/burung mentah (protein tinggi) akan menghasilkan feses yang mengandung bakteri proteolitik, selain itu akumulasi alami bulu unggas dalam feses dan tanah di lingkungan penangkaran sangat cocok bagi bakteri proteolitik untuk tumbuh. Bakteri proteolitik dapat menggunakan kandungan protein pakan ataupun sisa pakan buaya sebagai sumber C dan N-nya.

Isolat bakteri proteolitik dari feses sebelumnya telah diteliti namun dari objek hewan yang berbeda. Rahmawati (2016) berhasil menyeleksi 3 isolat bakteri proteolitik dari feses hewan luwak (*Paradoxurus hermaphroditus*). Ogunnusi & Olorunfemi (2018) melaporkan 12 isolat bakteri proteolitik yang diperoleh dari sampel feses sapi diantaranya *Providencia stuartii*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus* sp., *Escherichia*, *Klebsiella oxytoca*, dan *Streptococcus* sp. Hamdani *et al.* (2019) juga berhasil mengisolasi 2 isolat bakteri proteolitik dari kotoran babi, setelah diidentifikasi dengan metode 16s rRNA menunjukkan bahwa kedua bakteri proteolitik tersebut adalah *Bacillus pseudomycolides* dan *Staphylococcus sciuri*.



Gambar 3. Hubungan Jumlah Sel Dengan Aktivitas Protease Isolat Bakteri Proteolitik
 Sumber. Dokumen Penulis

Ketika bakteri ditumbuhkan pada substrat protein seperti gelatin, protein susu, protein daging, protein semata-mata tersedia untuk pertumbuhan bakteri. Nitrogen, karbon, dan energi tersedia dalam protein. Untuk mengatur faktor-faktor pertumbuhan bakteri proses pertama yang harus dilakukan bakteri proteolitik adalah hidrolisis enzimatis protein. Bakteri proteolitik akan mendegradasi protein dan memanfaatkan produk degradasi yang lebih sederhana seperti asam amino sebagai nutrisi untuk pertumbuhannya. Tingginya aktivitas proteolitik oleh bakteri sangat ditentukan oleh jumlah enzim yang disekresikan substrat setelah melewati masa inkubasi (Sharma, 2010). Hasil penelitian menunjukkan bahwa isolat

bakteri proteolitik menghasilkan luas zona bening berkisar antara 9-23 mm².

Isolat FB2 terdeteksi memiliki kemampuan proteolitik yang paling besar yaitu 23,8 mm², sedangkan terendah yaitu 9,5 mm² terdapat pada isolat FB4 (**Gambar 2**). Isolat FB2 dan FB4 berhasil dikoleksi dari feses buaya, FB2 pada titik lokasi 2 dan FB4 pada titik lokasi 4. Tingginya aktivitas proteolitik FB4 kemungkinan besarnya karena konsentrasi substrat protein yang lebih tinggi pada hasil koleksi feses buaya. Penelitian bakteri proteolitik lainnya berhasil dilaporkan oleh beberapa peneliti diantaranya Rizaldi *et al.* (2018) melaporkan bakteri proteolitik yang berasosiasi dengan lamun, isolat EA-2 dengan diameter zona bening 7,5 mm

adalah aktivitas protease terendah dan zona bening terbesar diperlihatkan oleh isolat EA-1 dengan diameter 18 mm. Fatoni *et al.* (2008) berhasil mendapatkan 7 isolat bakteri proteolitik yang bersumber pada limbah cair tahu, Wardani & Nindita (2012) berhasil mengisolasi 30 bakteri proteolitik dari *whey* tahu yang memiliki aktivitas protease bervariasi.

Enam isolat bakteri dari tempat penangkaran buaya yang memiliki aktivitas proteolitik yaitu THB1b, THB6a, FB1b, FB2, FB3b, dan FB4 (**Gambar 2**). Aktivitas protease bakteri menyebabkan *skim* dalam media *skim milk agar* terhidrolisis dan berubah peptida dan asam amino. Asam amino termasuk molekul amfoter (dapat bertindak baik sebagai asam atau basa, tergantung mediumnya) yang terdiri dari gugus amina dan asam karboksilat sebagai kelompok fungsional (Andrea & Pierandrea, 2012). Asam amino diumpamakan sebagai blok bangunan protein, yang penting dalam mempertahankan pertumbuhan organisme hidup termasuk bakteri (Jakubke & Sewald, 2008).

Besarnya aktivitas protease bakteri sangat ditentukan jumlah sel bakteri yang tumbuh dalam media pertumbuhan. Hasil penelitian menunjukkan bahwa isolat bakteri yang memiliki aktivitas protease tertinggi adalah isolat FB2 sebesar 958 U/mL dengan jumlah 12,05 sel/mL

sedangkan isolat FB4 sebesar 285 U/mL dengan jumlah terendah yaitu 5,80 sel/mL (Gambar 3). Isolat FB2 memiliki aktivitas protease tertinggi sangat dipengaruhi oleh nutrisi yang ada dalam media pertumbuhan, sumber N media membuat sekresi protease isolat FB2 maksimal. Protease bakteri merupakan bentuk enzim konstitutif. Enzim konstitutif artinya ketersediaannya selalu ada di dalam sel bakteri dengan kuantitas relatif konstan, sedangkan enzim induktif disintesis apabila dilakukan induksi dalam media pertumbuhan bakteri. Sintesis enzim induktif dapat meningkat beriringan dengan ditingkatkannya konsentrasi substrat terutama ketika substratnya menjadi sumber nutrisi tunggal (Lidya & Djenar, 2000).

SIMPULAN

Enam isolat bakteri lokal yang memiliki kemampuan proteolitik berhasil diisolasi, yaitu THB1b, THB6a, FB1b, FB2, FB3b, dan FB4. Tiga isolat bakteri yaitu FB2, THB1b, THB6a mampu menghidrolisis media *skim milk* dengan waktu inkubasi 18 jam. Isolat FB2 memiliki aktivitas protease paling tinggi yaitu sebesar 958 U/mL dengan jumlah 12,05 sel/mL.

DAFTAR PUSTAKA

Ahuja SK, Ferreira GM, & Moreira AR. 2004. Utilization of Enzymes for

- Environmental Applications. *Crit. Rev. Biotechnol*, 24(2-3): 125-154.
- Andika ZP & Sulistyarsi. 2017. Isolasi dan Karakterisasi Bakteri Proteolitik Pada Limbah Air Cucian Ayam Potong dan Cucian Ikan Sebagai Penyusun Modul Biologi SMA Kelas X. *Prosiding Seminar Nasional SIMBIOSIS II*. 30 September 2017. Madiun, Indonesia, 357-367.
- Andrea B & Pierandrea T. 2012. Nuclear Magnetic Resonance of Amino Acids, Peptides, and Proteins. In *Amino Acids, Peptides and Proteins in Organic Chemistry, Analysis and Function of Amino Acids and Peptides*; Hughes, A.B., Ed.; John Wiley and Sons, Inc.: Weinheim, Germany, 5: 97-153.
- Baweja M, Tiwari R, Singh PK, Nain L, & Shukla P. 2016. An Alkaline Protease From *Bacillus pumilus* Mp 27: Functional Analysis Of Its Binding Model Toward Its Applications as detergent additive. *Front. Microbiol*, 7: 1195.
- Chandra SJ, Shanker AS, & Pindi PK. 2020. Isolation and characterization of novel and efficient protease producing bacteria from drinking water resources. *Water Supply*, 20 (1): 157-164.
- Fatoni A, Zufahair, & Lestari P. 2008. Isolasi dan Karakterisasi Protease Ekstraseluler dari Bakteri dalam Limbah Cair Tahu. *Jurnal Natur Indonesia*, 10 (2): 83-88.
- Guleria S, Walia A, Chauhan A, & Shirkot CK. 2016. Purification and Characterization of Detergent Stable Alkaline Protease From *Bacillus amyloliquefaciens* SP1 Isolated From Apple Rhizosphere. *J. Basic Microbiol*, 56(2):138-152.
- Haddar A, Bougatef A, Agrebi R, Sellami-Kamoun A, Nasri M. 2009. A novel surfactantstable alkaline serine-protease from a newly isolated *Bacillus mojavensis* A21. *Purif. Charac. Process. Biochem*, 44(1): 29-35.
- Hamdani S, Asstiyani N, Astriany D, Singgih M, & Ibrahim S. 2019. Isolation and identification of proteolytic bacteria from pig sludge and protease activity determination. *IOP Conf. Series: Earth and Environmental Science*, 230: 012095.
- Jakubke HD & Sewald N. 2008. *Peptides From A to Z: A Concise Encyclopedia*; Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: Weinheim, Germany.
- Johannes TW & Zhao H. 2006. Directed Evolution of Enzymes and Biosynthetic Pathways. *Curr. Opin. Microbiol*, 9(3): 261-267.
- Kang SG, Kim IS, Rho YT, & Lee KJ. 1995. Production Dynamics of Extracellular Proteases Accompanying Morphological Differentiation of *Streptomyces albidoflavus* SMF301. *Microbiology*, 141(12): 3095-3103.
- Lakshmi BKM, Ratnasri PV, Devi KA, Hemalatha KPJ. 2014. Screening, optimization of producing and partial characterization of alkaline protease from haloalkaliphilic *Bacillus* sp. *IJRET. Int. J. Res. Appl. Sci. Eng. Technol*, 3(2): 435-443.
- Lidya & Djenar. 2000. *Dasar Bioproses* Direktorat Pembinaan dan Fenolinin dan Pengabdian Masyarakat Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi. Departemen Pendidikan Nasional: Jakarta.
- Mamangkey J, Suryanto D, Munir E, & Mustopa AZ. 2020. Keratinase Activity of A Newly Keratinolytic Bacteria, *Azotobacter chroococcum* B4. *J Pure Appl Microbiol*, 14(2): 1203-1211.
- Meliah S, Kusumawati DI, & Lisdiyanti P. 2018. The Genus *Chitinophaga* Isolated from Wanggameti National Park and Their Lytic Activities. *Jurnal Biologi Indonesia*, 14(2):165-174.
- Ninghoujam DS, Kshetri P. 2010. A thermostable alkaline protease from a moderately halo-alkalithermotolerant *Bacillus subtilis* strain SH1. *Australian J. Basic Appl Sci*, 4(10): 5126-5134.
- Ogunnusi TA & Olorunfemi O. 2018. Isolation and Identification of Proteolytic and Lipolytic Bacteria in

- Cow Dung and Abattoir Effluent from Ekiti General Abattoir, Ekiti State, Nigeria. *Journal of Advances in Microbiology*, 11(4): 1-10.
- Pakpahan R. 2009. Isolasi Bakteri dan Uji Aktivitas Bakteri Protease Termofilik dari Sumber Air Panas Sipoholon Tapanuli Utara Sumatra Utara. *Tesis*. Sekolah Pascasarjana Universitas Sumatra Utara.
- Paskandani R., Ustadi & Husni A. 2014. Isolasi dan Pemanfaatan Bakteri Proteolitik Untuk Memperbaiki Kualitas Limbah Cair Pengolahan bandeng presto. *J. Manusia dan Lingkungan*, 21(3): 310-316.
- Rahmawati NHF. 2016. Isolasi dan Karakterisasi Bakteri Proteolitik dari Feses Hewan Luwak (*Paradoxurus hermaphroditus*). *Jurnal Biologi*. 5(4): 62-69.
- Rao CS, Sathish T, Ravichandra P, & Prakasham R. 2009. Characterization of Thermo-and Detergent Stable Serine Protease From isolated *Bacillus circulans* and Evaluation of Eco-Friendly Applications. *Process Biochem*, 44(3): 262–268.
- Raval VR, Pillai S, Rawal CM, Singh SP. 2014. Biochemical and structural characterization of a detergent-stable serine alkaline protease from seawater haloalkaliphilic bacteria. *Process Biochem*, 49(6) :955-962.
- Rizaldi R, Setyantini WH, & Sudarno. 2018. Isolasi dan Karakterisasi Bakteri Proteolitik yang Berasosiasi dengan Lamun (*Enhalus acoroides*) di Pantai Bama, Taman Nasional Baluran, Situbondo, Jawa Timur. 10(1): 4-14.
- Sakinala JC, Anuradha BS, Reddy K, & Reddy SR. 2016. Screening and optimization of physical parameters for enhanced alkaline protease production by alkaliphilic *Bacillus subtilis* SH2 isolate. *American J. Curr. Microbiol*, 4 (1): 55-65.
- Sarath G, de la Motte R, & Wagner F. 1989. *Protease assay meth-ods*. In: *Beynon R, Bond J (eds) Proteolytic Enzymes: A Practical Approach*, p. 259. New York: Oxford University Press.
- Sharma PM. 2010. Biodegradation by Proteolytic Bacteria: An Attractive Alternative for Biological Waste Treatment. *Nat. Environ. Pollut. Technol*, 9(4): 707-711.
- Singhal P, Nigam V, & Vidyarthi A. 2012. Studies on Production, Characterization and Applications of Microbial Alkaline Proteases. *Int. J. Adv. Biotechnol. Res*, 3: 653–669.
- Vázquez SC, Hernández E, & Cormack WPM. 2008. Extracellular Proteases from The Antarctic Marine *Pseudoalteromonas sp.* P96-47 Strain. *Rev. Argent. Microbiol*, 40(1):63-71.
- Wardani AK, & Nindita LO. 2012. Purifikasi dan Karakterisasi Protease dari Bakteri Hasil Isolasi dari Whey tahu. *Jurnal Teknologi Pertanian*, 13(3): 149-156.
- Zilda DS, Harmayani E, Widada J, Asmara W, Irianto HE, Patantis G, Fawzya YN. 2012. Screening of thermostable protease producing microorganisms isolated from Indonesia Hotspring. *Squalen*, 7(3): 105-114.