

Isolasi dan Pengaruh Monosodium Glutamat terhadap Pertumbuhan Bakteri Proteolitik Limbah Cair Tahu

Isolation and Effect of Monosodium Glutamate on Growth Tofu Liquid Waste Proteolytic Bacteria

Emi Cahyaningrum, Wijanarka dan Arina Tri Lunggani

Departemen Biologi, Fakultas Sains dan Matematika, Universitas Diponegoro

Jalan Prof. Soedarto, SH, Semarang, 50275

Corresponding Author ; emicahyaningrum55@gmail.com

Abstract

The tofu industry in Indonesia is growing rapidly. Tofu liquid waste is usually discharged into the waters and causes water pollution. An efficient way to overcome this problem is to utilize tofu liquid waste. Tofu liquid waste contains proteolytic bacteria that are useful in industry. The increase in bacterial growth is done by adding substances, one of which is the addition of Monosodium Glutamate (MSG). MSG contains glutamate which plays a role in protein synthesis. This study aims to isolate proteolytic bacteria and determine the effect of MSG on the growth of proteolytic bacteria in tofu liquid waste. The research methods included isolation, purification, morphological characterization, calculation of the Proteolytic Index (IP), testing the effect of MSG concentration on growth and protease activity, and data analysis. The MSG concentration used was 0 gr/L; 0.5 gr/L; 1 g/L and 1.5 g/L. The design used was Completely Randomized Design (CRD). The results obtained four isolates with different morphological characteristics. The isolate that had the highest IP value was the fourth isolate of 3,206 and was used for the test. The effect of MSG on growth and protease activity was highest at a concentration of 1.5 g/L at 24 hours. The highest protease enzyme activity was 0.0756 U/mL. The results of the ANOVA analysis showed a significant effect ($p < 0.05$) on the administration of MSG on the growth of the four proteolytic bacterial isolates of tofu wastewater

Key words: *Proteolytic Bacteria, MSG, Protease*

Abstrak

Industri tahu di Indonesia berkembang pesat. Limbah cair tahu biasanya dibuang ke perairan dan menyebabkan pencemaran air. Cara efisien mengatasi masalah ini adalah memanfaatkan limbah cair tahu. Limbah cair tahu mengandung bakteri proteolitik yang berguna dalam industri. Peningkatan pertumbuhan bakteri dilakukan dengan penambahan zat, salah satunya penambahan Monosodium Glutamat (MSG). MSG mengandung glutamat yang berperan dalam sintesis protein. Penelitian ini bertujuan mengisolasi bakteri proteolitik dan mengetahui pengaruh MSG terhadap pertumbuhan bakteri proteolitik pada limbah cair tahu. Metode penelitian meliputi isolasi, pemurnian, karakterisasi morfologi, perhitungan Indeks Proteolitik (IP), pengujian pengaruh konsentrasi MSG terhadap pertumbuhan dan aktivitas protease, serta analisis data. Konsentrasi MSG yang digunakan adalah 0 gr/L; 0,5 gr/L; 1 g/L dan 1,5 g/L. Rancangan yang digunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL). Hasil penelitian diperoleh empat isolat dengan karakteristik morfologi berbeda. Isolat yang memiliki nilai IP tertinggi adalah isolat keempat sebesar 3,206 dan digunakan untuk uji. Pengaruh MSG terhadap pertumbuhan dan aktivitas protease tertinggi pada konsentrasi 1,5 g/L pada 24 jam. Aktivitas enzim protease tertinggi adalah 0,0756 U/mL. Hasil analisis ANOVA menunjukkan adanya pengaruh yang nyata ($p < 0,05$) pada pemberian MSG terhadap pertumbuhan keempat isolat bakteri proteolitik limbah cair tahu.

Kata kunci: *Proteolytic Bacteria, MSG, Protease*

PENDAHULUAN

Industri tahu yang ada di Indonesia berkembang sangat pesat. Industri tahu menghasilkan limbah cair dan padat. Limbah padat dimanfaatkan untuk pakan ternak dan bisa dimanfaatkan menjadi tempe gembus sedangkan limbah cair biasanya langsung di buang ke saluran-saluran pembuangan (Munir dkk., 2017). Akibat

jika limbah cair industri tahu dibuang langsung ke perairan maka dapat menyebabkan polusi pada air, bau yang menyengat pada lingkungan sekitar, dan mengganggu ekologi perairan yang dapat menyebabkan kematian ikan dan biota lainnya yang ada di perairan tersebut (Lestari, 2016)..

Tahu diproduksi dari kedelai yang mana mengandung banyak protein sehingga limbah cair

tahu mengandung bakteri proteolitik dengan jumlah yang tinggi. Bakteri proteolitik dapat dimanfaatkan untuk kepentingan manusia ataupun di bidang industri. Aplikasi enzim protease pada industri seperti pembuatan detergen, penyamakan kulit, industri pangan, dan zat terapeutik pada bidang farmasi (Fitriana dkk., 2016). Peningkatan pertumbuhan bakteri proteolitik dapat dilakukan dengan penambahan nutrisi. Salah satunya dengan penambahan Monosodium Glutamat (MSG). Gugus NH_2 pada struktur kimia MSG berperan sebagai sumber nitrogen dalam proses pembentukan asam amino yang digunakan selama proses pertumbuhan bakteri. Glutamat berperan penting dalam proses sintesa protein dan sebagai prekursor glutamin. Glutamat dari MSG komersial merupakan sumber nitrogen yang paling efisien bagi isolat bakteri *Bacillus* sp. dan *Pseudomonas* sp. dalam menghasilkan berbagai senyawa biosurfaktan, meningkatkan biomassa, serta meningkatkan kemampuan dalam (Cooper dan Jeitner, 2016).

Berdasarkan polemik permasalahan tersebut, maka pada penelitian ini dilakukan untuk mengisolasi dan mengetahui pengaruh penambahan MSG terhadap pertumbuhan bakteri proteolitik dari limbah cair tahu. Penelitian ini akan dilakukan isolasi dan pengaruh penambahan MSG terhadap pertumbuhan bakteri proteolitik dari limbah cair tahu.

BAHAN DAN METODE

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Bioteknologi, Departemen Biologi, Fakultas Sains dan Matematika, Universitas Diponegoro pada bulan Februari sampai bulan Juni 2021. Alat dan bahan yang digunakan adalah botol sampel, autoklaf, *Laminar Air Flow* (LAF), cawan petri, inkubator, tabung reaksi, pipet ukur, erlenmeyer, *microwave*, timbangan, jangka sorong, alat sentrifugasi, ose, spektrofotometer, *rotary shaker*, mikroskop, mikropipet, tabung ependorf, limbah cair tahu, *Skim milk*, agar, *Nutrien Broth* (NB), aquades, NaCl fisiologis, Gram A, Gram B, Gram C, Gram D, dan Monosodium Glutamat (MSG), Folin Ciocalteau, tirosin, alkohol 70%, buffer fosfat pH 7, Natrium Carbonat (Na_2CO_3), dan kasein.

Pembuatan Media *Skim Milk Agar* (SMA)

Bubuk susu skim 8 gr ditambah aquades 160 mL Susu skim dipasteurisasi suhu 70°C selama 30 menit. Pasteurisasi dilakukan sebanyak tiga kali selama 3 hari berturut turut. Media agar 9,6 gr ditambah 240 mL aquades. Media agar disterilisasi dengan autoklaf dengan suhu 121°C selama 15

menit. Media susu skim yang sudah dipasteurisasi dituang ke media agar kemudian dituang ke dalam cawan petri dan dibiarkan sampai media memadat (Kabense dkk., 2019). Isolasi bakteri proteolitik dengan metode seri pengenceran. Sampel limbah cair tahu dipipet sebanyak 1 mL lalu dimasukkan ke dalam tabung pengenceran 10^{-1} dan dihomogenkan. Tabung pengenceran 10^{-1} diambil sampel sebanyak 1 mL dan dimasukkan ke dalam tabung pengenceran 10^{-2} . Pengenceran dilakukan secara bertingkat hingga 10^{-3} . Sampel hasil pengenceran 10^{-3} sebanyak 0,1 mL kemudian dikultur pada media SMA dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Koloni kemudian dimurnikan dan dikarakterisasi makroskopis (Karina dkk., 2014).

Pewarnaan Gram

Satu tetes aquades steril diletakkan di atas kaca objek, satu ose koloni diletakkan di atas aquades steril, disebar hingga merata, biarkan olesan tersebut kering karena udara, kemudian difiksasi. Sampel ditetesi Gram A, didiamkan satu sampai dua menit, cuci menggunakan aquades pada botol semprot, dan dikeringkan. Langkah selanjutnya ditetesi Gram B, dibiarkan 2 menit, dicuci menggunakan aquades pada botol semprot, dan dikeringkan. Sampel kemudian ditetesi larutan Gram C 30 detik, dicuci menggunakan aquades pada botol semprot, dan dikeringkan. Langkah selanjutnya ditetesi dengan Gram D, didiamkan dua menit, dicuci menggunakan aquades pada botol semprot, dan dikeringkan. Morfologi sel bakteri diamati dengan menggunakan mikroskop pada pembesaran 400 kali. (Karina dkk., 2014).

Uji Kualitatif Proteolitik

Satu ose masing-masing isolat digoreskan pada medium SMA dengan tiga kali ulangan. Isolat diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Pengukuran uji kualitatif menggunakan rumus Indeks Proteolitik (IP) (Karina dkk., 2014) sebagai berikut:

$$\text{IP} = \frac{\text{Diameter zona bening (mm)}}{\text{Diameter koloni bakteri (mm)}}$$

Bakteri yang menghasilkan Indeks Proteolitik (IP) tertinggi kemudian digunakan untuk pembuatan starter dan dilakukan uji pengaruh MSG terhadap pertumbuhan bakteri proteolitik limbah cair tahu.

Pembuatan Kurva Standar Tirosin

Konsentrasi yang digunakan untuk pembuatan kurva standar tirosin yaitu 1 ppm, 2 ppm, 3 ppm, 4 ppm, 5 ppm. Masing-masing konsentrasi dipipet 1 mL dan ditambah 2,5 mL Na_2CO_3 0,5 M kemudian ditambah 0,5 mL reagen Folin Ciocalteau. Langkah selanjutnya larutan

standar diukur absorbansinya dengan menentukan panjang gelombang maksimal (650-700 nm) kemudian dibuat persamaan linear (Soda dan Agustini, 2013).

Uji Pengaruh MSG terhadap Pertumbuhan Bakteri Proteolitik

Media produksi yang digunakan yaitu media Nutrien Broth (NB). Konsentrasi MSG yang digunakan yaitu 0g/L, 0,5 g/L, 1 g/L, dan 1,5 g/L. Masing-masing konsentrasi MSG dilakukan lima kali ulangan kemudian diinkubasi pada suhu ruang di atas *shaker* dengan kecepatan 125 rpm. Penghitungan pertumbuhan isolat dengan IP tertinggi pada panjang gelombang 600 nm dengan mengambil sampling sebanyak 3 mL setiap selang waktu 4 jam selama 56 jam (jam ke 0; 4; 8; 24; 28; 32; 48; 52; 56). Densitas optik diukur dengan spektrofotometer. Kurva pertumbuhan diperoleh dari hasil pengukuran absorbansi terhadap waktu.

Aktivitas Enzim Protease

Uji aktivitas enzim protease dilakukan jam ke 0, 4, 8, 24, 28, dan 32. Kultur sebanyak 3 mL disentrifugasi 4000 rpm 20 menit. Supernatan sebanyak 0,5 mL ditambah dengan 0,5 mL 0,05 M larutan buffer pH 7 kemudian diinkubasi 5 menit 37°C. Larutan ditambah 0,5 mL substrat kasein 2% dalam 0,05 M buffer fosfat pH 7 kemudian diinkubasi 10 menit. Larutan ditambah 1 mL *trichloasetat acid* (TCA) 0,4 M dan disentrifugasi 4000 rpm 20 menit. Supernatan diambil 0,5 mL dan ditambahkan 2,5 mL Na₂CO₃ 0,5 M diinkubasi 10 menit kemudian ditambah 0,5 mL reagen Folin Ciocalteu yang sudah ditambahkan dengan air perbandingan 1:2 dan diinkubasi selama 30 menit. Larutan diencerkan tiga kali dan diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer

pada panjang gelombang maksimal larutan standar tirosin Kurniatanty dan Widowati, 2021). Rumus aktivitas protease yaitu:

$$\text{Unit aktivitas enzim} = \frac{\text{tirosin} \cdot v \cdot fp}{\text{BM} \cdot p \cdot q}$$

- V = volume total sampel percobaan-->3,5 mL
- p = jumlah enzim (ml)---> 0,5 mL
- q = waktu inkubasi (menit)---> 10 menit
- fp = faktor pengenceran---> 3
- BM = berat molekul tirosin---> 181

HASIL DAN PEMBAHASAN

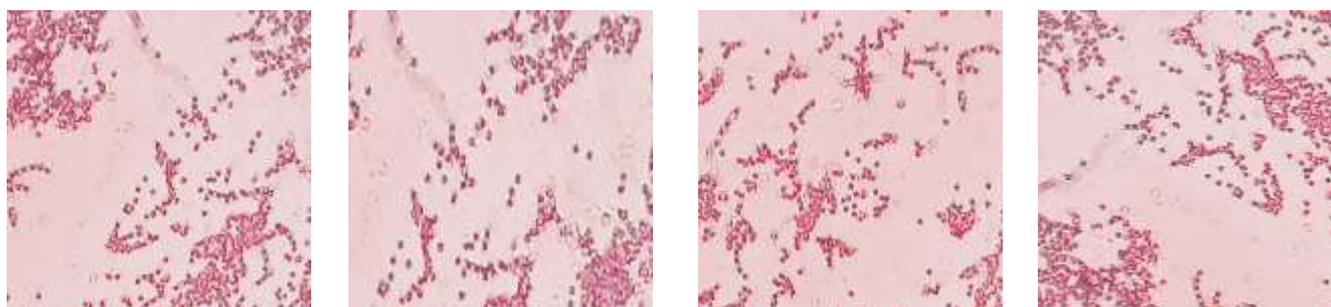
Isolasi Bakteri Proteolitik

Hasil isolasi bakteri proteolitik dari limbah cair tahu didapatkan empat isolat yang memperlihatkan zona bening jelas dengan karakter morfologi koloni seperti ditunjukkan pada tabel 1.

Tabel 1. Bentuk Koloni Bakteri Proteolitik Hasil Isolasi

Isolat	Bentuk	Warna	Elevasi	Tepian
1	Tidak Beraturan	Putih Kekuningan	Convex	Berlekuk
2	Bulat Kecil	Putih	Rata	Rata
3	Bulat	Putih	Rata	Rata
4	Bulat	Putih	Convex	Rata

Hasil karakterisasi morfologi mikroskopis keempat isolat bakteri proteolitik dapat dilihat pada gambar 1. di bawah ini



(a)

(b)

(c)

(d)

Gambar 1. Karakterisasi Morfologi Mikroskopis (a) Isolat 1 (b) Isolat 2 (c) Isolat 3 (d) Isolat 4

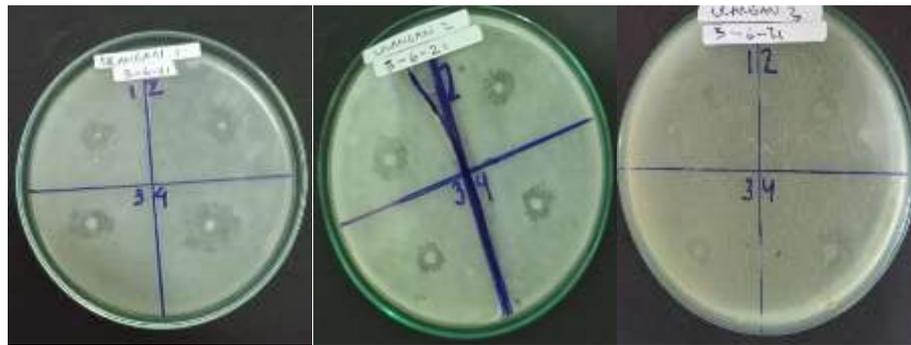
Pengamatan secara mikroskopis dengan perbesaran 400 kali didapatkan keempat isolat (gambar 1.) memiliki bentuk sel *coccus* dan termasuk bakteri Gram negatif karena setelah

dilakukan pewarnaan Gram, isolat tersebut menunjukkan sel berwarna merah muda. Warna merah muda dikarenakan isolat ini (bakteri Gram negatif) memiliki komposisi dinding sel yang

sebagian besar tersusun dari lapisan lipid sehingga pada saat pewarnaan, kurang dapat mempertahankan zat warna utama (Gram A/ kristal violet) terutama saat dicuci dengan Gram C/alkohol (lipid rusak saat dicuci dengan alkohol). Akibatnya kelompok bakteri ini akan memberikan kenampakan warna merah dari zat warna yang ke dua yaitu safranin (Gram D) di akhir kegiatan pewarnaan Gram (Rahmadian dkk., 2018).

Uji Kualitatif Proteolitik

Uji kualitatif proteolitik dengan mengukur besarnya zona bening di sekitar koloni. Zona bening terjadi karena adanya hidrolisis kasein oleh bakteri proteolitik. Protease akan mengkatalisis degradasi kasein dengan memutuskan ikatan peptida CO-NH dengan masuknya air ke dalam molekul. Reaksi tersebut akan melepaskan asam amino (Pertiwiningrum dkk., 2017). Aktivitas proteolitik isolat bakteri proteolitik limbah cair tahu pada media SMA dengan tiga kali ulangan ditunjukkan pada gambar 2. sebagai berikut.



Gambar 2. Uji Kualitatif Bakteri Proteolitik

Tabel 2. Uji Indeks Proteolitik (IP) Limbah Cair Tahu

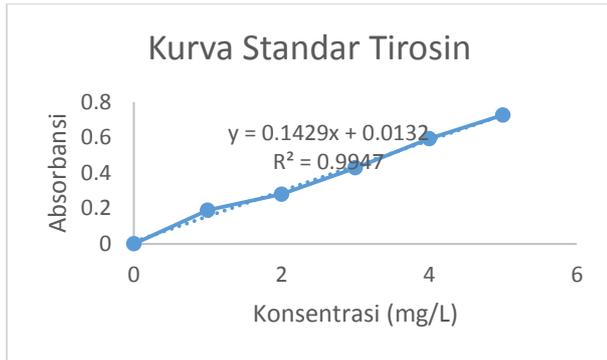
Isolat	Diameter Zona Bening			Diameter Koloni			Indeks Proteolitik			Rata-rata IP
	U1	U2	U3	U1	U2	U3	U1	U2	U3	
	1	11	11	8	3	4	3	3,66	2,75	
2	9	8	8	2,45	2,5	3,6	3,67	3,2	2,22	3,03
3	15	7	7	4	3,2	3	3,75	2,187	2,33	2,75
4	14	10	12	3,75	3,5	4	3,76	2,86	3	3,206

Isolat pertama, kedua, dan keempat memiliki IP tinggi sedangkan pada isolate ketiga IP sedang. Suatu koloni apabila memiliki IP dibawah satu maka koloni tersebut memiliki IP yang rendah (IP <1). Koloni apabila memiliki nilai IP antara satu sampai tiga maka koloni tersebut memiliki IP yang sedang (1>IP<3). Koloni yang memiliki nilai IP di atas tiga maka koloni tersebut memiliki IP yang tinggi (IP>3). Tingginya IP pada isolat keempat kemungkinan disebabkan karena isolat tersebut memiliki kemampuan yang cepat dalam mensintesis dan mendegradasi asam amino (Pertiwiningrum dkk., 2017).

Isolat keempat memiliki IP tertinggi sehingga isolat ini digunakan untuk pembuatan starter dalam pengujian pengaruh MSG terhadap pertumbuhan bakteri proteolitik limbah cair tahu.

Kurva Standar Tirosin

Larutan standar tirosin yang telah didapatkan nilai absorbansinya kemudian data diolah menjadi grafik antara konsentrasi larutan standar tirosin dalam satuan Unit/mL dengan absorbansinya. Kurva standar tirosin dapat dilihat pada grafik di bawah ini.

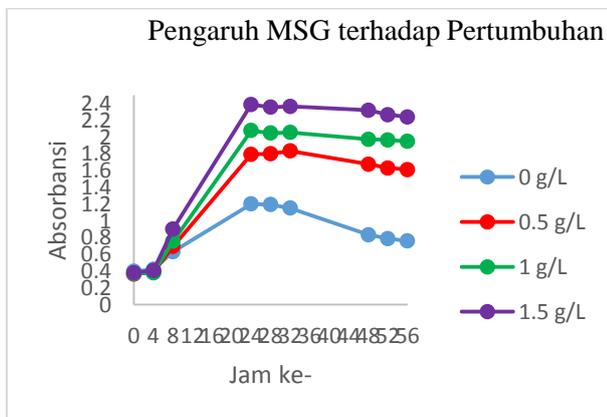


Gambar 3. Kurva Standar Tirosin

Persamaan garis regresi linier yang menyatakan hubungan antara absorbansi larutan standar tirosin dengan konsentrasinya yakni $y = 0,1429x + 0,0132$ dengan $R^2 = 0,9947$. Persamaan garis regresi linier tersebut digunakan untuk menentukan konsentrasi tirosin yang berhasil dihidrolisis oleh enzim protease dari substrat kasein (Soda dan Agustini, 2013).

Pengaruh MSG terhadap Pertumbuhan Bakteri Proteolitik Limbah Cair Tahu

Hasil grafik uji pengaruh MSG terhadap pertumbuhan isolat keempat bakteri proteolitik dapat dilihat pada gambar di bawah ini



Gambar 4. Grafik Pertumbuhan Bakteri Proteolitik Limbah Cair Tahu

Pola pertumbuhan bakteri proteolitik isolat keempat dimulai dari fase adaptasi (penyesuaian) atau fase lag. Fase ini terjadi pada jam ke-0 sampai jam ke-4. Fase adaptasi berlangsung cukup singkat karena media yang digunakan sama dengan media lama sehingga bakteri tidak kesulitan beradaptasi di media yang baru. Fase pertumbuhan selanjutnya yaitu fase eksponensial (log). Fase eksponensial (log) pada empat perlakuan terjadi pada jam yang

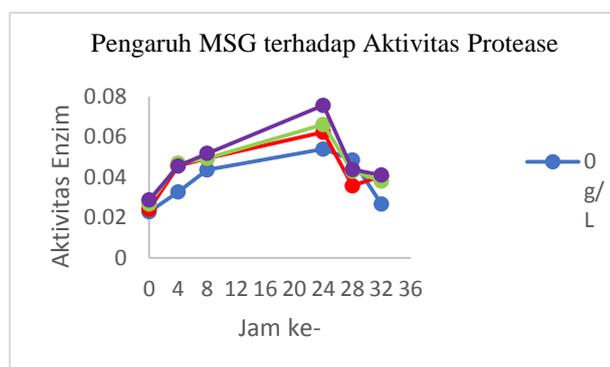
sama yaitu jam ke-4 sampai jam ke-24. Pertumbuhan tertinggi pada konsentrasi MSG 1,5 g/L dengan nilai pada jam ke-24. Fase log (eksponensial) ditandai dengan pertumbuhan yang signifikan dan konstan. Kecepatan pertumbuhan pada fase ini dipengaruhi oleh medium pertumbuhannya seperti pH dan kadar nutrisi yang sesuai. Akhir fase log kecepatan pertumbuhannya menurun. Fase selanjutnya adalah fase stasioner. Fase stasioner yaitu fase pertumbuhan yang relatif tetap. Hal ini dikarenakan pada fase ini jumlah sel yang membelah sama dengan jumlah sel mati sehingga jumlahnya relatif konstan. Nutrisi yang terkandung di media mulai berkurang sehingga pada fase ini pembelahan sel yang terjadi sangat lambat tidak secepat pada fase log. Fase stasioner pada konsentrasi 0 g/L terjadi pada jam ke-24 sampai jam ke-28. Fase stasioner pada konsentrasi 0,5 g/L dan 1 g/L terjadi pada jam ke-24 sampai jam ke-32 sedangkan konsentrasi 1,5 g/L terjadi pada jam ke-24 sampai jam ke-48. Perbedaan ini terjadi karena nutrisi pada media masing-masing konsentrasi berbeda. Konsentrasi 1,5 g/L mempunyai nutrisi tambahan dari MSG sehingga bakteri pada jam ke-52 masing berada pada fase stasioner. Fase selanjutnya bakteri memasuki fase kematian. Hal ini dikarenakan nutrisi yang terdapat di media mulai habis untuk pertumbuhan bakteri sehingga banyak bakteri yang mati. Hal ini menyebabkan grafik kurva pertumbuhan menjadi turun. Fase kematian pada konsentrasi 0 g/L terjadi pada jam ke-28 sampai jam ke-56. Konsentrasi 0,5 g/L dan 1 g/L fase kematian terjadi pada jam ke-32 sampai jam ke-56 sedangkan pada konsentrasi 1,5 g/L fase kematian terjadi pada jam ke-48 sampai jam ke-56 (Setyati dkk., 2015).

Pengaruh konsentrasi MSG dapat dilihat dari sudut jarak antar kurva untuk setiap penambahan MSG (gambar 4.), semakin tinggi konsentrasi MSG maka semakin tinggi pula pertumbuhannya bahkan pada konsentrasi 1,5 gr/L dapat memberikan pertumbuhan tertinggi. Hal ini dikarenakan MSG dapat berperan sebagai sumber nutrisi tambahan karena MSG mempunyai struktur kimia yang terdapat gugus NH_2 yang berperan sebagai sumber nitrogen dalam proses pembentukan asam amino yang digunakan selama proses pertumbuhan mikroorganisme (Cooper dan Jeitner, 2016).

Aktivitas Protease

Hasil uji aktivitas protease disajikan pada gambar 5. Grafik tersebut menunjukkan bahwa dari keempat konsentrasi MSG yang memiliki aktivitas protease tertinggi yaitu pada konsentrasi 1,5 g/L sebesar 0,0756 U/mL pada jam ke-24

sedangkan diantara keempat konsentrasi MSG yang memiliki aktivitas enzim terendah yaitu pada konsentrasi 0 g/L. Hal ini dikarenakan pada konsentrasi 0 g/L tidak adanya penambahan MSG sehingga nutrisi yang digunakan untuk sintesis protease lebih rendah dibandingkan dengan konsentrasi yang lain (Cooper dan Jeitner, 2016).



Gambar 6.. Grafik Aktivitas Protease

Besarnya aktivitas protease ditentukan berdasarkan jumlah tirosin yang dihasilkan dalam menghidrolisis kasein. Aktivitas protease diproduksi seiring pertumbuhan sel. Aktivitas protease tertinggi dari keempat konsentrasi MSG dihasilkan pada jam ke-24 dikarenakan pada jam ini bakteri mengalami fase akhir eksponensial atau fase awal stasioner. Aktivitas enzim diproduksi seiring dengan pertumbuhan sel dan akan mencapai aktivitas tertinggi menjelang fase stasioner atau diakhir fase eksponensial. Hal ini dapat terjadi karena adanya penumpukan hasil metabolit yang digunakan untuk pertumbuhan bakteri tersebut. Sintesis protein ekstraseluler biasanya juga terjadi pada fase stasioner. Saat memasuki fase stasioner, represi dari katabolit mulai menurun sehingga mengaktifkan biosintesis enzim pada bakteri tersebut (Simamora dan Sukmawati, 2020).

Hasil ANOVA pemberian MSG pada media produksi memberikan pengaruh berbeda nyata terhadap pertumbuhan bakteri proteolitik isolat keempat. Hal ini dikarenakan nilai signifikansinya sebesar 0,049. Uji Tukey 95% konsentrasi MSG 0 g/L dan 1,5 g/L berada pada kelompok yang berbeda. Hal ini menunjukkan bahwa pada konsentrasi tersebut memiliki pengaruh yang berbeda.

KESIMPULAN

Isolasi bakteri proteolitik limbah cair tahu didapatkan empat isolat dengan bentuk sel *coccus* dan termasuk gram negatif. Indeks Proteolitik (IP)

tertinggi pada isolat keempat sebesar 3,206 dan isolat ini digunakan untuk uji pengaruh MSG terhadap pertumbuhan. Pertumbuhan dan aktivitas protease tertinggi pada konsentrasi MSG 1,5 g/L pada jam ke-24 sebesar 0,0756 U/mL. Hasil ANOVA dan uji Tukey didapatkan bahwa perlakuan MSG berpengaruh pada pertumbuhan bakteri proteolitik limbah cair tahu.

DAFTAR PUSTAKA

- Cooper, Arthur J dan Jeitner, Thomas M. 2016. Central Role of Glutamate Metabolism in the Maintenance of Nitrogen Homeostasis in Normal and Hyperammonemic Brain. *Biomolecules*. 6(2): 1-33
- Fitriana., Amirullah., Nurul, Ilymy., Dyah, Nur Pratiwi., Andi, Adela Resmilasari., Nabila, Adelina HM. 2016. Potensi Limbah Air Tahu Asal Kota Maros sebagai Sumber Bakteri Penghasil Enzim Protease dalam Melawan Radikal Bebas. *As-Syifaa*. 8(2): 33-40
- Kabense, Riorifki., Elvy, L. Ginting., Stenly, Wullur., Nickson, J. Kawung., Fitje, Losung., Jhon, L. Tombakan. 2019. Penapisan Bakteri Proteolitik yang Bersimbiosis dengan Alga *Gracillaria sp.* *Jurnal Ilmiah Platax*. 7(2): 413-418
- Karina, Andri Nindya., Dirayah, Rauf Hussain., Eva, Johannes., Nur, Haedar Nawir. 2014. Isolasi dan Karakterisasi Bakteri Proteolitik dari Saluran Pembuangan Limbah Industri Tahu. *Jurnal Biologi*. 1(2): 1-8
- Kurniatanty, Isma dan Esti, Wahyu Widowati. 2021. Enzymatic Activity of Protease Producing Bacteria from Tofu Waste. *EPiC Series in Biological Sciences*. 1(1): 67-71
- Lestari, P. B. 2016. Biodegradasi Limbah Cair Tahu dari Mikroorganisme Indigen sebagai Bahan Ajar Mikrobiologi Lingkungan Di Perguruan Tinggi. *Jurnal Edukasi Matematika dan Sains*. 2(1): 84-94
- Munir, Fatmawati., Riche, Hariyati., Erry, Wiryani. 2017. Pengaruh Limbah Cair Tahu terhadap Pertumbuhan Populasi *Chlorella pyrenoidosa* H. Chick dalam Skala Laboratorium. *Jurnal Biologi*. 6(2): 1-6
- Pertiwiningrum, A., Anggraini, F. D., Fitriantol, N. A., Rochijan. 2017. Isolation and Identification of Bacterial Protease Enzyme of Leather Waste. *Journal of the Indonesian Tropical Animal Agriculture*. 42(1): 33-41
- Rahmadian, Cut Ade., Ismail., Mahdi, Abrar., Erina., Rastina., Yudha, Fahrimal. 2018. Isolasi dan Identifikasi Bakteri

Pseudomonas sp. pada Ikan Asin di Tempat Pelelangan Ikan Labuhan Haji Aceh Selatan. *JIMVET*. 29(4): 493-502

Setyati, Wilis Ari., Errni, martini., Triyanto., subagiyo., Muhammad, Zainuddin. 2015. Kinetika Pertumbuhan dan Aktivitas Protease Isolat 36k dari Sedimen Ekosistem Mangrove, Karimunjawa, Jepara. *Jurnal Ilmu Kelautan*. 20(3) : 163-169

Simamora, Cico Jhon Karunia dan Sukmawati, Sukmawati. 2020. Identification and

Characterization of PrTK-2 Bacterial Isolate Producing Extracellular Protease Enzym from Rubber Seeds Tempeh. *Bioscience*. 4(1): 79-88

Soda, Fransiska Nay dan Rudiana, Agustini. 2013. Pengaruh Penambahan Ion Logam K⁺ terhadap Aktivitas Enzim Papain. *Journal of Chemistry*. 2(2): 29-34