

## Isolasi, Skrining, dan Identifikasi Molekuler Bakteri Termotoleran Proteolitik dari Sumber Air Panas Nglimut Gonoharjo Kendal

### Isolation, Screening, and Molecular Identification of Proteolytic Thermotolerant Bacteria from Nglimut Gonoharjo Kendal Hot Springs

**Siti Zidna Ilma Nafia, Sri Pujiyanto dan Anto Budiharjo**

Departemen Biologi, Fakultas Sains dan Matematika, Universitas Diponegoro

Jalan Prof. Soedarto, SH, Semarang, 50275

Corresponding Author ; ilmazidna088@gmail.com

#### Abstract

The potential for the use of enzymes in industry is starting to be widely used. Protease is one of the most widely used enzymes in industry. Protease is an enzyme capable of hydrolyzing peptide bonds in proteins. Proteolytic thermotolerant bacteria are one of the important sources of thermostable enzymes that can be isolated from hot springs. The purpose of this study was to isolate and screen proteolytic thermotolerant bacteria and to identify molecularly the best isolates of proteolytic thermotolerant bacteria from the hot springs of Nglimut Gonoharjo. Isolation was carried out by graded dilution on Sodium Agar (NA) and Thermus Agar (TA) media using the spread plate method, and the proteolytic activity test using the paper disc method. Characterization of proteolytic bacterial isolates was carried out by macroscopic and microscopic morphology with gram staining. Molecular identification with 16S rRNA gene through amplification, electrophoresis, sequencing, BLAST analysis and phylogenetic reconstruction. The isolation results obtained 32 proteolytic thermotolerant isolates with irregular and round colony shape characteristics, Gram positive and Gram negative, and stem cells. The results of the enzyme test showed that isolate T5 was the best isolate with a proteolytic index value of 1.90 and was identified as *Bacillus subtilis*. Gram Positive and Gram Negative, and have stem cells. The results of the enzyme test showed that isolate T5 was the best isolate with a proteolytic index value of 1.90 and was identified as *Bacillus subtilis*.

Keywords: *Thermotolerant Bacteria, Proteolytic, Hot Springs, Bacillus*

#### Abstrak

Potensi pemanfaatan enzim dalam industri mulai banyak digunakan. Protease adalah salah satu enzim yang paling banyak digunakan dalam industri. Protease merupakan enzim yang mampu menghidrolisis ikatan peptide pada protein. Bakteri termotoleran proteolitik merupakan salah satu sumber penting enzim termotabil yang dapat diisolasi dari sumber air panas. Tujuan dari penelitian ini untuk mengisolasi dan menskrining bakteri termotoleran proteolitik serta mengidentifikasi secara molekuler isolat terbaik bakteri termotoleran proteolitik dari sumber air panas Nglimut Gonoharjo. Isolasi dilakukan dengan pengenceran bertingkat pada media Natrium Agar (NA) dan Thermus Agar (TA) dengan metode spread plate, uji aktivitas proteolitik dengan metode papper disc. Karakterisasi isolat bakteri proteolitik dilakukan secara morfologi makroskopis dan mikroskopis dengan pewarnaan gram. Identifikasi molekuler dengan gen 16S rRNA melalui amplifikasi, elektroforesis, sekuensing, analisis BLAST dan rekonstruksi filogenetik. Hasil isolasi diperoleh 32 isolat termotoleran proteolitik dengan ciri bentuk koloni irregular maupun round, Gram Positif dan Gram Negatif, dan memiliki sel batang. Hasil uji enzim menunjukkan bahwa isolat T5 merupakan isolat terbaik dengan nilai indeks proteolitik 1,90 dan teridentifikasi sebagai *Bacillus subtilis*.

Kata Kunci : *Bakteri Termotoleran, Proteolitik, Sumber Air Panas, Bacillus*

#### PENDAHULUAN

Potensi enzim dalam kehidupan sehari-hari banyak digunakan dalam bidang teknologi dan industri. Proses kimia yang dijalankan secara bertahap mulai digantikan dan dikatalisis oleh enzim. Enzim sebagai biokatalisator dapat mempercepat reaksi biokimia yang terjadi baik di dalam sel maupun di luar sel. Enzim dibutuhkan

dalam menjalankan proses yang terjadi di bidang industri baik dalam bidang pangan maupun non pangan (Elleuche *et al*, 2014). Saat ini penggunaan mikroorganisme penghasil enzim lebih banyak dibandingkan dengan penggunaan hewan maupun tumbuhan, hal ini karena adanya karakteristik menarik dari bakteri untuk mampu hidup pada suhu yang tinggi, biasanya jenis bakteri ini

termasuk dalam golongan bakteri termotoleran termofil yang menghasilkan enzim yang lebih termostabil. Keistimewaan bakteri termofil adalah dapat hidup di kondisi suhu yang relatif tinggi pada kisaran suhu 45-55 °C dengan rentang pH 2 sampai 10.

Protease merupakan salah satu enzim utama dalam industri, enzim ini menghidrolisis ikatan peptida dalam protein. Menurut Deng *et al* (2010) dalam Sharma *et al* (2015) protease termasuk dalam 3 kelompok enzim terbesar yang digunakan dalam industri, nilai ini berdasarkan penjualan enzim pada industri di seluruh dunia sebesar \$ 1 milyar yang diperkirakan mencapai sekitar 59 %. Diantara protease mikroba, protease alkali (APases) menempatkan lebih dari 50 % dari produksi enzim dunia, dengan aplikasi khusus dalam farmasi, pembuatan detergen, finishing industri kulit, sintesis peptide, reaksi biotransformasi, pemulihan perak dari film sinar-X/ fotografi dan dalam pengolahan limbah (Barzkar *et al.*, 2020). Menurut penelitian Gupta *et al* (2005) dalam Sharma *et al* (2015) bahwa spesies bakteri yang mampu menghasilkan protease antara lain dari genus *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Flavobacterium*, *Serratia*, *Alcaligenes*, *Vibrio*, *Brevibacterium*, *Pseudomonas* dan *Halobacterium*, tetapi strain *B. amyloquifaciens*, *B. subtilis* dan *B. licheniformis* merupakan yang paling dominan dari kelompok bakteri penghasil protease.

Eksplorasi bakteri termotoleran penghasil enzim protease terus dilakukan oleh para peneliti hal ini karena permintaan kebutuhan enzim yang terus meningkat setiap waktunya, meskipun enzim protease dapat diproduksi dari hewan dan tumbuhan namun belum dapat memenuhi permintaan industri yang terus meningkat. Fakta ini menyebabkan peningkatan pencarian enzim protease yang berasal dari mikroba, khususnya dari sumber-sumber yang masih jarang dilakukan eksplorasi penelitian. Salah satu sumber air panas yang masih jarang dieksplorasi adalah sumber air panas Nglimut Gonoharjo yang terletak di Desa Nglimut Kecamatan Boja, Kabupaten Kendal, Jawa Tengah. Oleh karena itu untuk mendapatkan bakteri termotoleran dari sumber air panas tersebut diperlukan upaya untuk melakukan isolasi bakteri termotoleran karena belum ada penelitian khususnya untuk bakteri termotoleran proteolitik, selain itu perlu dilakukan identifikasi molekuler agar dapat diketahui jenis bakteri termotoleran yang paling optimal potensinya dalam menghasilkan protease. Berdasarkan latar belakang yang telah dijelaskan diatas maka dilakukan

penelitian ini untuk mengeksplorasi bakteri termotoleran penghasil enzim protease di Sumber air panas Nglimut Gonoharjo Kendal serta dilakukan identifikasi secara molekuler untuk mengetahui jenis dari bakteri termotoleran tersebut.

## BAHAN DAN METODE

Sampel air dari sumber air panas Nglimut Gonoharjo, media Nutrien Agar (NA) terdiri atas Natrium Broth (NB) dan bubuk agar, media Thermus Agar (TA) terdiri atas bubuk beef extract, bubuk pepton, bubuk yeast extract, kristal NaCl, bubuk skim milk, kertas cakram, pewarna gram, InstaGene Matrix, agarose 1%, pewarna florosafe buffer, TAE 1X, loading dye, Primer 27F (5'AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') dan Primer 1492R (5'-GGTTACCTTGTACGACTT-3').

### Isolasi dan Karakterisasi Bakteri Termotoleran

Isolasi bakteri dari sampel air dilakukan melalui pengenceran bertingkat  $10^{-7}$  secara duplo pada media NA dan TA. Pengenceran dilakukan dengan mengambil 1 ml sampel air dan dimasukan kedalam 9 ml akuades steril dalam tabung reaksi pertama (pengenceran  $10^{-1}$ ) selanjutnya dihomogenkan dengan di vorteks. Hasil pengenceran  $10^{-1}$  diambil sebanyak 1 ml dan dimasukan kedalam 9 ml akuades tabung reaksi kedua (pengenceran  $10^{-2}$ ) dan dilakukan sampai pengenceran  $10^{-7}$ . Setiap tingkat larutan pengenceran diambil sebanyak 1 ml dan diinokulasikan ke atas permukaan media NA dan media TA dalam cawan petri yang telah disiapkan sebelumnya, kemudian digunakan spreader steril untuk meratakan larutan pengenceran di media. Setelah media kering cawan petri diinkubasi pada suhu 45 °C selama 48 jam. Hasil pertumbuhan koloni yang berbeda kemudian diinokulasikan ke media NA dan media TA baru sampai didapat koloni tunggal isolat bakteri. Karakterisasi isolat bakteri secara makroskopis dilakukan dengan pengamatan morfologi secara. Karakterisasi isolat bakteri secara mikroskopis dilakukan dengan pengamatan dibawah mikroskop untuk mengetahui bentuk sel dan jenis gram bakteri melalui pewarnaan gram.

### Skrining Kualitatif Aktivitas Proteolitik

Isolat bakteri menjadi sasaran skrining primer untuk produksi protease ekstraseluler dengan uji pelat menggunakan media skim milk agar (SMA). Bubuk skim milk 2 gr kemudian ditambahkan akuades yang telah disterilisasi

sebanyak 40 ml. Kemudian media skim milk di pasteurisasi dengan suhu 70 °C selama 30 menit sebanyak tiga kali dalam waktu 3 hari berturut-turut. Pada hari ke 3 pasteurisasi, media agar dibuat dari 2,4 gr bubuk agar, kemudian ditambahkan 60 ml akuades. Media agar disterilisasi pada suhu 121 °C selama 15 menit dalam autoklaf. Setelah media tercampur media dituang ke dalam cawan petri dan dibiarkan sampai media memadat (Widhyastuti dan Dewi, 2001). Skinning awal kemampuan proteolitik bakteri termotoleran dilakukan dengan cara menginokulasikan isolat bakteri termotoleran dari isolat tunggal diatas permukaan media SMA dengan cara dititik, kemudian diinkubasi pada suhu 45 °C selama 24-48 jam, setelah itu diamati pertumbuhannya (Yuanita dan Wikandari, 2014).

### **Optimasi Suhu Uji Aktivitas Proteolitik**

Optimasi aktivitas proteolitik bakteri termotoleran dilakukan dengan cara menginokulasikan isolat cair bakteri termotoleran dari sumber air panas Nglimut Gonoharjo diatas permukaan kertas cakram pada media SMA, kemudian diinkubasi pada suhu 45, 50 dan 55 °C selama 24-48 jam, setelah itu diamati pertumbuhannya. Kemampuan bakteri termotoleran dalam menghasilkan enzim protease ditunjukkan dengan adanya zona bening yang terbentuk disekitar koloni bakteri pada media SMA.

### **Identifikasi Molekuler**

Isolasi DNA merupakan tahap awal dalam identifikasi molekuler dengan cara mengekstrak DNA dari bakteri. Penelitian ini melakukan ekstraksi DNA dengan metode *InstaGene Matrix* yang sesuai dengan protokol di Laboratorium Terpadu Universitas diponegoro dengan sedikit modifikasi. Metode ini diawali dengan menginokulasikan satu osse kultur bakteri ke dalam tabung reaksi yang telah diisi oleh 4 ml media cair, kemudian diinkubasi selama 48 jam pada suhu 45 °C. Kultur cair kemudian disentrifugasi secara bertahap dan dibuang supernatannya, pellet yang didapat kemudian diresuspend dengan akuades steril 1 ml. sentrifugasi kembali selama 1 menit dengan kecepatan 13.000 rpm dan buang supernatan. Selanjutnya ditambahkan 200 µl matrix *InstaGene* kedalam pellet dan diinkubasi di *heatblok* pada suhu 56 °C selama 30 menit, vortex dengan kecepatan tinggi selama 10 detik. Kemudian inkubasi kembali pada suhu 100 °C selama 10 menit dan vortex pada kecepatan tinggi. Terakhir

sentrifugasi pada 13.000 rpm selama 3 menit dan pindahkan supernatant yang mengandung DNA ke dalam mikrotube baru.

DNA yang diperoleh selanjutnya dilakukan amplifikasi menggunakan reaksi rantai polimerase atau sering disebut PCR. Amplifikasi PCR dengan gen 16S rRNA menggunakan volume 50 µl terdiri dari ddH<sub>2</sub>O 22 µl, My Taq 25 µl, Primer 27F 1 µl, Primer 1492 R 1 µl, Template DNA 1 µl. Amplifikasi DNA dilakukan dengan mesin PCR *Thermalcycler*, tahap PCR sebagai berikut pre denaturasi 96 °C selama 2 menit, denaturasi 96 °C selama 1 menit, annealing 51 °C selama 1 menit, extension 72 °C selama 38 detik, dan final extension 72 °C selama 7 menit. Visualisasi produk PCR 16S rRNA dilakukan menggunakan analisis elektroforesis dengan cara memasukkan 5 µl produk PCR dengan ditambahkan 2 µl *loading dye* ke dalam sumuran gel agarose 1 % yang telah direndam larutan buffer TAE 1 x, gel kemudian dielektroforesis dengan voltase sebesar 100 V selama 40 menit. Terakhir, pita hasil PCR dilihat menggunakan alat *Gel Documentation*.

Analisis sekuens dilakukan menggunakan jasa perusahaan Biologi Molekuler yaitu PT. *Genetica Science* dengan mengirim sampel isolat bakteri terpilih yang mampu optimal dalam menghasilkan enzim. Hasil urutan basa nukleotida yang diperoleh dianalisis untuk mengetahui kemiripan sekuensnya dengan data di *GeneBank* menggunakan program *Basic Alignment Search Tool* (BLAST) pada situs *National Centre for Biotechnology Information* (NCBI) dengan mengakses alamat <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> untuk mengetahui jenis dari isolat bakteri termotoleran. Hasil dari analisis dibuat konstruksi pohon filogenetik menggunakan metode *Neighbor Joining Tree* dengan *No. of Bootstrap replication* 1000 (Pangestika dkk., 2015).

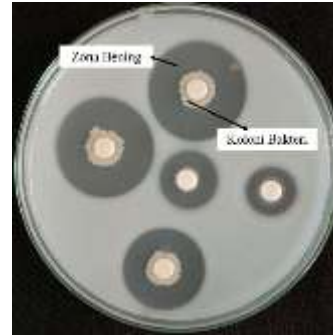
### **HASIL DAN PEMBAHASAN**

Penelitian ini berhasil mengisolasi 53 isolat campuran bakteri termotoleran dari sumber air panas Nglimut Gonoharjo yang tumbuh pada suhu 45 °C yang terdiri dari 30 isolat dari media TA dan 23 isolat dari media NA, yang mana setelah dilakukan pemurnian serta karakterisasi menjadi 34 isolat murni dan tunggal dengan memiliki karakteristik morfologi berbeda terdiri dari isolat N1, N2, N3, N4, N6, N7, N8, N9, N10, N11, N12, N13, N14, N15, N16, N17, N18, N19, N20, N21, N22, T3, T4, T5, T6, T7, T12, T13, T15, T16, T17, T18, T19, T20.

Secara morfologi koloni dari 34 isolat bakteri menunjukkan beberapa variasi pada

bentuk, tepi, elevasi, tekstur dan warna (Tabel 1). Pengamatan bentuk koloni memperlihatkan 19 isolat memiliki bentuk koloni *irregular* (tidak beraturan) dan 15 isolat lainnya memiliki bentuk *round* (bulat) dengan elevasi yang bermacam dari *flat*, *raised*, *umbonate*, *convex* dan *plateau*, kebanyakan isolat berwarna putih-krem. Pengamatan mikroskopis di la pewarnaan gram kemudian diamati dengan mikroskop. Hasil pewarnaan sel bakteri yang menunjukkan warna biru sampai ungu menandakan isolat bakteri Gram Positif, sementara jika menunjukkan warna merah menandakan isolat bakteri Gram Negatif.

Semua isolat diuji untuk mengetahui potensi aktivitas proteolitik isolat bakteri termotoleran yang didapatkan menggunakan media *Skim Milk Agar* (SMA). Kemampuan isolat menghasilkan enzim protease dilihat dengan adanya zona bening disekitar koloni yang tumbuh (Gambar 1.) Berdasarkan hasil seleksi, didapatkan 32 isolat yang memiliki aktivitas proteolitik dari 34 isolat yang diuji pada suhu 45 °C, selanjutnya dipilih 20 isolat terbaik berdasarkan nilai indeks proteolitik tertinggi dan dilakukan uji enzim dengan optimasi suhu 45,50, dan 55 °C. Kemampuan isolat dalam memecah substrat protein menjadi asam amino yang lebih kecil dapat dilihat dari nilai indeks proteolitik pada Tabel 2.



Gambar 1. Uji protease isolat T13 pada media *Skim Milk Agar* (SMA).

Berdasarkan tabel diatas menunjukkan variasi rasio indeks proteolitik antara 0,16-1,9. Adanya nilai indeks proteolitik yang bermacam-macam menunjukkan variasi kemampuan isolat dalam memecah substrat protein menjadi asam amino yang lebih kecil. Isolat T5 d ipilih sebagi isolat potensial untuk identifikasi secara molekuler menggunakan gen 16S rRNA karena isolat T5 meiliki nilai indeks proteolitik tertinggi yaitu 1,90 pada tahap uji enzim protease dengan optimasi suhu. DNA isolat T5 selanjutnya dilakukan identifikasi molekuler menggunakan primer universal 27F dan 1492R untuk diamplifikasi gen 16S rRNA. Hasil amplifikasi DNA selanjutnya dianalisis elektroforsis agrose 1% untuk melihat ukuran DNA.

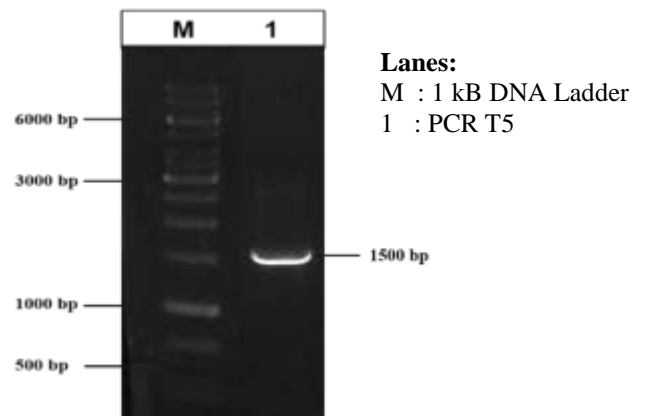
Tabel 1. Hasil karakterisasi secara makroskopis dan mikroskopis

No	Kode	Karakterisasi Makroskopis					Karakterisasi Mikroskopis		
		Bentuk	Margin	Elevasi	Tekstur	Warna	Bentuk Sel	Gram	
1	N1	Irregular	Irregular	Flat	Moist	Coklat	Basil	+	
2	N2	Irregular	Irregular	Raised Spreading Edge	Mukoid	Merah Muda	Basil	+	
3	N3	Irregular	Lobate	Flat	Mukoid	Putih Keunguan	Basil	+	
4	N4	Irregular	Rhizoid	Raised Spreading Edge	Mukoid	Krem	Basil	+	
5	N6	Round	Irregular	Raised Spreading Edge	Mukoid	Coklat	Basil	-	
6	N7	Irregular	Rhizoid	Plateau	Dry	Putih	Basil	+	
7	N8	Round	Smooth	Convex	Moist	Oranye	Basil	-	
8	N9	Irregular	Irregular	Plateau	Moist	Kuning	Basil	+	
9	N10	Irregular	Lobate	Raised	Moist	Putih	Basil	+	
10	N11	Irregular	Rhizoid	Raised Spreading Edge	Dry	Putih	Basil	-	

11	N12	Irregular	Irregular	Raised Spreading Edge	Mukoid	Putih	Basil	-
12	N13	Round	Smooth	Plateau	Moist	Kuning	Basil	+
13	N14	Irregular	Irregular	Raised	Moist	Putih	Basil	-
14	N15	Irregular	Smooth	Raised	Mukoid	Putih Kuning	Basil	+
15	N16	Irregular	Irregular	Flat	Dry	Coklat	Basil	+
16	N17	Round	Lobate	Flat	Moist	Krem	Basil	-
17	N18	Round	Lobate	Plateau	Mukoid	Putih	Basil	+
18	N19	Round	Smooth	Umbonate	Moist	Transparan Oranye Muda	Basil	+
19	N20	Irregular	Filamentous	Flat	Mukoid	Oranye	Basil	-
20	N21	Round	Smooth	Plateau	Mukoid	Putih	Basil	+
21	N22	Round	Smooth	Convex	Moist	Putih Susu	Kokus	-
22	T3	Irregular	Irregular	Flat	Moist	Putih	Basil	-
23	T4	Irregular	Irregular	Flat	Mukoid	Putih	Basil	-
24	T5	Round	Smooth	Flat	Dry	Putih	Basil	+
25	T6	Round	Smooth	Flat	Dry	Putih	Basil	+
26	T7	Irregular	Irregular	Raised	Mukoid	Putih	Basil	-
27	T12	Round	Irregular	Raised	Moist	Krem	Basil	+
28	T13	Irregular	Irregular	Flat	Moist	Putih	Basil	+
29	T15	Round	Smooth	Raised	Moist	Putih	Basil	-
30	T16	Round	Smooth	Flat	Mukoid	Krem	Basil	+
31	T17	Irregular	Irregular	Raised	Mukoid	Putih	Basil	-
32	T18	Irregular	Irregular	Flat	Mukoid	Putih	Basil	-
33	T19	Round	Smooth	Flat	Mukoid	Putih	Streptobasil	-
34	T20	Irregular	Lobate	Flat	Mukoid	Coklat	Basil	-

Tabel 2. Hasil uji aktivitas proteolitik dengan variasi suhu

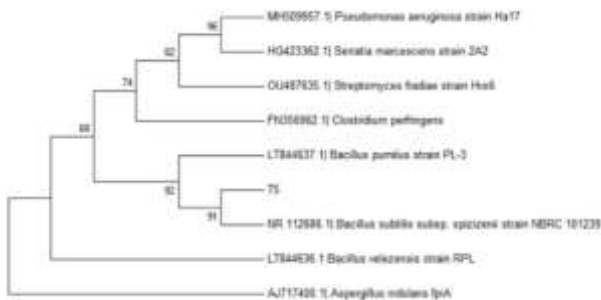
No	Nama Isolat	Indeks Aktivitas Proteolitik		
		Suhu 45 °C	Suhu 50 °C	Suhu 55 °C
1	T3	1,02	1,15	0,00
2	T4	1,40	0,00	0,00
3	T5	1,90	1,30	0,00
4	T6	1,42	0,88	0,00
5	T12	1,04	0,87	0,00
6	T13	1,38	1,32	0,00
7	T15	0,83	0,97	0,00
8	T16	1,10	1,04	0,00
9	N3	1,49	0,00	0,00
10	N4	1,20	0,22	0,35
11	N6	1,85	0,22	0,00
12	N7	1,79	1,33	0,00
13	N8	0,17	0,35	0,48
14	N10	1,66	1,28	0,00
15	N12	1,26	1,45	0,00
16	N14	1,33	0,00	0,87
17	N17	1,74	0,00	0,00
18	N18	1,83	0,16	0,00
19	N20	0,22	0,00	0,00
20	N21	1,52	0,54	0,00



Gambar 2. Hasil elektroforesis amplifikasi gen 16S rRNA isolat T5 dengan panjang pita 1500 bp

Analisis Blast isolat T5 menunjukkan nilai homologi 99,93% dengan *Bacillus subtilis*, sementara hasil konstruksi pohon filogenetik isolat T5 menggunakan program MEGA X dan metode *Neighbor Joining Tree* dengan uji *bootstrap* 1000 ulangan menunjukkan bahwa isolat bakteri termotoleran dari sumber air panas Nglimut berada sejajar dengan bakteri *Bacillus subtilis* subsp *spizizenii* strain NBRC 101239 yang mana dalam

satu cabang yang sama dengan nilai bootstap yaitu 91 % dapat dilihat pada gambar 3.



Gambar 3. Hasil analisis pohon filogenetik isolat T5

Hasil identifikasi berdasarkan homologi BLAST dan rekonstruksi pohon filogenetik dinyatakan bahwa isolat T5 mempunyai kemiripan dengan *Bacillus subtilis* yang memiliki karakteristik berupa bentuk koloni *round*, margin *smooth*, elevasi *flat*, berwarna putih, tekstur koloni *dry*, dan termasuk jenis bakteri Gram Positif berbentuk basil. Menurut Pant *et al* (2015) *Bacillus subtilis* merupakan salah satu kelompok bakteri Gram Positif, yang memiliki bentuk sel basil, biasanya ditemukan di tanah, sehingga dikenal juga sebagai basil jerami ataupun basil rumput. Spesies *Bacillus* termasuk kedalam aerob obligat. *B. subtilis* menghasilkan protease alkali yang digunakan untuk memenuhi kebutuhan industri dalam skala luas.

## KESIMPULAN

Isolasi bakteri termotoleran didapatkan 34 isolat dari sumber air panas Nglimut Gonoharjo dan 20 isolat memiliki indeks proteolitik yang tinggi. Isolat T5 terpilih sebagai isolat terbaik yang memiliki aktivitas protease tertinggi dengan nilai indeks proteolitik sebesar 1,90 dan teridentifikasi sebagai *Bacillus subtilis* subsp *spizizenii* strain NBRC 101239 dengan tingkat homologi sebesar 99,93% yang diidentifikasi secara molekuler menggunakan gen 16S rRNA.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih ditujukan kepada segenap pihak yang telah membantu dalam penelitian ini, khususnya kepada Laboratorium Molekuler dan Mikrobiologi, UPT. Laboratorium Terpadu, Universitas Diponegoro, Semarang sebagai tempat pelaksanaan penelitian.

## DAFTAR PUSTAKA

- Barzkar, Noora. 2020. Marine Microbial Protease: An Efficient and Essential Tool for Various Industrial Application. *International Journal of Biological Macromolecules*. 161 (2020): 1216-1229.
- Deng, A., WUJ, Zhang, G., dan Wen, T. 2010. Purification and Characterization of A Surfactant Stable High Alkaline Protease from *Bacillus* sp. *Bioresource. Technology*. 101: 7100-7116.
- Elleuche, S., Scrouder, C., Sahm, K., Antranikian, G. 2014. Extremozymes Biocatalysts with Unique Properties from Extremophilic Microorganism. *Elsevier*. 29: 116-123.
- Gupta, R., Chauhan, B., Ramnani, P., dan Singh, R. 2005. Bacterial Alkaline Protease: Recent Trend and Industrial Applications. In: *Microbial Diversity: Current Perspective and Potential Application*, Satyanarayana T and Johri BN, eds., IK International Pvt. Ltd., New Delhi, pp. 769-789.
- Pangestika, Y., Budiharjo, A., dan Kusumaningrum, H. P. 2015. Analisis Filogenetik Curcuma zedua (Temu Putih) Berdasarkan Gen Internal Transcribed Spacer (ITS). *Jurnal Biologi*. 4 (04):8-13.
- Pant, G., Prakash, A., Pavani, J.V., Bera, S., Deviram, G., Kumar, A., Panchpuri, M., dan Prasuna, R.G. 2015. Production Optimization and Partial Purification of Protease from *Bacillus subtilis*. *Journal of Taibah University for Science*. 9 (2015):50-55.
- Widhyastuti, N. dan Dewi, R. M. 2001. Isolasi Bakteri Proteolitik dan Optimasi Produksi Protease. Laporan Teknik Proyek Inventarisasi dan Karakterisasi Sumberdaya Hayati. Pusat Penelitian Biologi - LIPI Bogor.
- Yuanita, Dian N. dan Wikandari, Prima R. 2014. Screening Bakteri proteolitik Termofilik dari Sumber Air Panas Singgahan Tuban. *Journal of chemistry*. 3 (03): 49-54.