

Tersedia online di: <http://ejournal-balitbang.kkp.go.id/index.php/jra>

KEMAMPUAN *Bacillus subtilis* VITNJ1 DARI SALURAN PENCERNAAN IKAN NILA DALAM MEMPRODUKSI ENZIM PROTEASE

Yusra[#] dan Yempita Efendi

Program Studi Pemanfaatan Sumberdaya Perikanan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Bung Hatta Gedung B Kampus I, Jl. Sumatera Ulak Karang Padang, Sumatera Barat 25133

(Naskah diterima: 21 Maret 2019; Revisi final: 30 Juli 2019; Disetujui publikasi: 1 Agustus 2019)

ABSTRAK

Bacillus subtilis strain VITNJ1 merupakan bakteri potensial yang berasal dari saluran pencernaan ikan nila (*Oreochromis niloticus*). Penelitian ini bertujuan untuk menganalisis aktivitas enzim protease dari bakteri *Bacillus subtilis* strain VITNJ1. Metode yang digunakan adalah eksperimental, data dianalisa secara deskriptif kuantitatif. Hasil penelitian menunjukkan *B. subtilis* strain VITNJ1 memiliki kemampuan produksi enzim protease yang diukur dari indeks proteolitiknya yakni sebesar 26 mm. Waktu inkubasi optimum enzim protease bakteri *B. subtilis* strain VITNJ1 dicapai pada jam ke-54 dengan aktivitas enzim protease sebesar 9,10 U/mL; kadar protein 110,64 mg/mL; dan aktivitas spesifik sebesar 0,082 U/mg; dan diharapkan dapat dijadikan sebagai probiotik untuk budidaya ikan nila.

KATA KUNCI: kemampuan; enzim; protease; *Bacillus subtilis* VITNJ1; nila

ABSTRACT: *The ability of Bacillus subtilis VITNJ1 derived from digestive tract tilapia to produce protease. By: Yusra and Yempita Efendi*

Bacillus subtilis strain VITNJ1 is a potential bacterium derived from Nile tilapia's (*Oreochromis niloticus*) digestive tract and known to have proteolytic activity. This research aimed to determine the protease activity of *B. subtilis* strain VITNJ1 bacterium. The method used were experimental design, the data were analyzed in quantitative descriptive. The research result confirms that *B. subtilis* strain VITNJ1 can produce protease. The proteolytic activity was 26 mm. The optimum incubation period of *B. subtilis* strain VITNJ1 was obtained at hour-54 with the proteolytic enzyme activity of 9.10 U/mL, the protein concentration of 110.64 mg/mL, and the specific activity of 0.082 U/mg. This research suggests that the bacteria strain could be used as an alternative probiotic bacterium in Nile tilapia farming.

KEYWORDS: ability; enzyme; protease; *Bacillus subtilis* VITNJ1; Nile

PENDAHULUAN

Saluran pencernaan ikan mengandung sejumlah bakteri yang dapat dimanfaatkan sebagai agen probiotik pada budidaya ikan nila. Probiotik adalah mikroorganisme yang memiliki kemampuan memelihara keseimbangan mikroflora normal usus, menghambat bakteri patogen, dan meningkatkan sistem imun (Rolfe, 2000). Mikroorganisme yang terdapat di dalam saluran pencernaan ikan berasal dari lingkungan perairan dan dari makanan. Saluran pencernaan yang banyak mengandung makanan merupakan tempat yang baik untuk pertumbuhan mikroorganisme. Karena pH saluran pencernaan yang

sangat asam, menyebabkan hanya sedikit bakteri probiotik yang mampu bertahan dengan kondisi tersebut (Fukami *et al.*, 2002).

Prinsip dasar kerja probiotik adalah pemanfaatan kemampuan mikroorganisme dalam memecah atau menguraikan rantai panjang karbohidrat, protein, dan lemak karena adanya enzim-enzim khusus yang dimiliki oleh mikroba untuk memecah ikatan tersebut (Effendie, 2002). Protease merupakan enzim proteolitik yang mengkatalisis pemutusan ikatan peptida pada protein menjadi oligopeptida dan asam amino. Protease yang aktif dapat ditemukan di saluran pencernaan. Protease tidak hanya berperan dalam proses metabolisme seluler pada ikan, namun juga dapat diaplikasikan dalam bidang industri perikanan. Aplikasi bioteknologi enzim protease yang berasal dari beberapa bahan pangan dapat digunakan di antaranya pada industri pembuatan detergen, industri

[#] Korespondensi: Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Bung Hatta. Gedung B Kampus I, Jl. Sumatera Ulak Karang Padang, Sumatera Barat 25133, Indonesia.
Tel. + 62 751 7051678
E-mail: yusra@bunghatta.ac.id

penyamakan kulit, bahan aditif pada industri pangan, farmasi, pertanian, dan perikanan (Gupta *et al.*, 2002; Bhaskar *et al.*, 2007; Jellouli *et al.*, 2009).

Mikroorganisme merupakan sumber enzim protease yang paling potensial. Beberapa *strain* mikroba yang mampu menghasilkan protease di antaranya adalah *Bacillus licheniformis*, *Bacillus firmus*, *Bacillus alcalo*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus thuringiensis*, dan *Pseudomonas* sp. (Said & Likadja, 2012). Beberapa enzim protease komersial berhasil dimurnikan, misalnya alcalase dari *Bacillus licheniformis*, esperase dari *Bacillus lentus*, biofeed pro dari *Bacillus licheniformis*, dan subtilisin dari *Bacillus alcalophilus* (Gupta *et al.*, 2002). Bakteri *Bacillus* sp. L21 dan *Bacillus licheniformis* dapat menghasilkan enzim protease yang bersifat tahan basa dan halotoleran (Tari *et al.*, 2005; Suganthi *et al.*, 2013).

Penelitian tentang produksi enzim dari bakteri yang berasal dari saluran pencernaan ikan telah banyak dilakukan (Bairagi *et al.*, 2002; Mondal *et al.*, 2008; Ray *et al.*, 2010; Ray *et al.*, 2012). Dari saluran pencernaan ikan *Terapon jarbua* ditemukan *Brevibacillus parabrevis* dan dari ikan *Mystus gulio* ditemukan bakteri *Bacillus licheniformis* yang dapat menghasilkan enzim protease (Das *et al.*, 2013). Sementara itu, informasi tentang produksi enzim yang berasal dari bakteri usus ikan air tawar masih minim (Balaji *et al.*, 2012; Chovatiya *et al.*, 2014). Dari saluran pencernaan ikan nila (*Oreochromis niloticus*) yang dibudidayakan di keramba jaring apung Danau Maninjau ditemukan satu isolat bakteri potensial yakni isolat *B. subtilis strain* VITNJ1 (Efendi & Yusra, 2014). Penelitian ini bertujuan untuk menganalisis aktivitas enzim protease dari bakteri *B. subtilis strain* VITNJ1, sehingga diharapkan dapat dijadikan sebagai kandidat probiotik.

BAHAN DAN METODE

Isolat Bakteri *Bacillus subtilis* VITNJ1

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah isolat bakteri terpilih *B. subtilis strain* VITNJ1 yang diisolasi dari saluran pencernaan ikan nila. Isolat bakteri tersebut dikultur dalam medium *skim milk agar* (SMA) (5,0 g pepton; 3,0 g yeast extract; 1,0 g skim milk powder).

Pengukuran Enzim Protease Secara Kualitatif

Isolat bakteri *B. subtilis strain* VITNJ1 dikultur menggunakan medium SMA dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Aktivitas proteolitik ditunjukkan dengan luas zona bening yang terbentuk di sekitar koloni. Indeks proteolitik dihitung dengan

perbandingan diameter zona bening dengan diameter koloni bakteri (Atlas, 1997).

Waktu Optimum untuk Menghasilkan Enzim Protease

Metode penentuan waktu optimum untuk menghasilkan protease dengan menggunakan medium *luria bertani* (LB) sebanyak 90 mL dan ditambahkan 10 mL inokulum biakan *B. subtilis strain* VITNJ1 dalam *erlemeyer* dan diinkubasi menggunakan *water shaker* pada suhu 37°C selama 64 jam. Pengamatan dilakukan setiap enam jam, dan diukur nilai *optical density* (OD)-nya menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 660 nm. Blanko yang digunakan adalah medium LB tanpa penambahan inokulum bakteri.

Aktivitas Enzim Protease Secara Kuantitatif

Sebanyak 0,2 mL enzim direaksikan dengan 1 mL substrat kasein hammerstein dan 1 mL *buffer*, inkubasi pada suhu 37°C selama 10 menit, kemudian ditambahkan 0,2 MTCA. Selanjutnya larutan diinkubasi kembali pada suhu 37°C selama 10 menit, kemudian dilanjutkan dengan sentrifugasi pada kecepatan 5.000 rpm 10 menit. Supernatan yang terbentuk selanjutnya ditambahkan ke dalam tabung reaksi yang berisi Na₂CO₃ 0,4M; pereaksi folin ciocalteau (1:2); dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 20 menit. Hasil inkubasi diukur dengan spektrofotometer pada $\lambda = 578$ nm. Satu unit aktivitas protease didefinisikan sebagai jumlah enzim yang dapat menghasilkan satu μ mol produk tirosin per menit pada kondisi optimum pengukuran dengan menggunakan substrat kasein (Lowry *et al.*, 1951; Mohapatra *et al.*, 2003).

Karakteristik Protein Enzim Protease

Kadar protein ditentukan dengan menggunakan *bovine serum albumin* (BSA) sebagai standar protein. BSA ditimbang sebanyak 100 mg dan selanjutnya ditambahkan sebanyak 25 mL aquades. Larutan tersebut kemudian dikocok secara perlahan-lahan dan diencerkan sampai volume 50 mL. Konsentrasi akhir larutan stok untuk standar ini adalah 2 mg/mL. Kemudian sederetan larutan standar dibuat dengan menggunakan larutan stok di atas. Selanjutnya larutan dipipet sebanyak 0,1 mL dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi, tambahkan dengan pereaksi *Bradford* sebanyak 5 mL. Blanko dibuat dengan cara mencampurkan sebanyak 0,1 mL dan direaksikan dengan 5 mL pereaksi *Bradford*. Setelah dibiarkan kurang lebih lima menit, masing-masing campuran reaksi diukur absorbansinya pada $\lambda = 595$ nm (Bradford, 1976).

HASIL DAN BAHASAN

Pengukuran Enzim Protease Secara Kualitatif

Bakteri *B. subtilis strain* VITNJ1 mempunyai kemampuan menghasilkan enzim proteolitik ekstraseluler. Aktivitas kualitatif protease dari isolat bakteri *B. subtilis strain* VITNJ1 menggunakan SMA dapat dilihat pada Gambar 1.

Aktivitas enzim protease dari bakteri *B. subtilis strain* VITNJ1 diperlihatkan dengan adanya zona bening yang terdapat di sekitar koloni bakteri yakni sebesar 26 mm. Semakin besar zona bening yang terbentuk menandakan mikroba tersebut memiliki kemampuan yang tinggi dalam mengubah substrat yang terkandung di dalam medium (Nurmalinda *et al.*, 2013). Aktivitas proteolitik mikroba akan memecah protein susu yang terkandung dalam kasein menjadi senyawa nitrogen terlarut yang akan ditunjukkan dengan area bening di sekeliling koloni mikroba (Fardiaz, 1992; Folasade *et al.*, 2005).

Hasil ini sesuai dengan hasil penelitian sebelumnya yang melaporkan bahwa dari kotoran ikan *Neimterus japonicus* yang terdapat di India diperoleh empat genus bakteri yakni *Bacillus sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Alkaligenes sp.*, dan *Lactobacillus sp.* yang bersifat proteolitik (Kumaran *et al.*, 2013). Bakteri *B. subtilis* yang diisolasi dari saluran pencernaan ikan air tawar *Labeo rohita* juga memiliki aktivitas proteolitik (Geethanjali & Subash, 2011). Peneliti lain juga mengungkapkan bahwa dari ikan Rohu (*Labeo rohita*) ditemukan bakteri *B. cereus* yang juga memiliki aktivitas proteolitik dan dapat digunakan sebagai

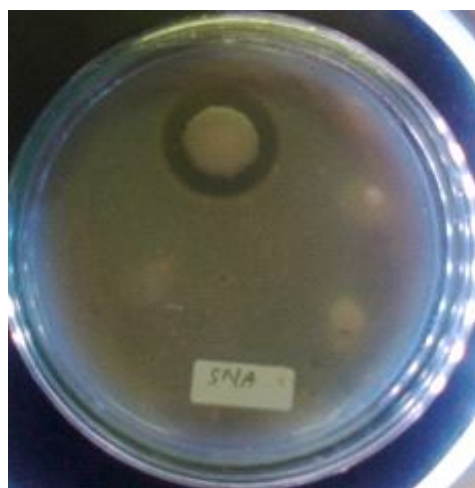
kandidat probiotik (Natarajan & Rajikkannu, 2014). Dari saluran pencernaan ikan *Channa punctatus* didapatkan bakteri *B. subtilis* yang memiliki aktivitas enzim protease ekstraseluler dengan diameter zona bening 22 mm (Deepa & Usha, 2016).

Waktu Optimum untuk Menghasilkan Protease

Waktu generasi bakteri dan konstanta laju pertumbuhan bakteri *B. subtilis strain* VITNJ1 didasarkan pada kurva pertumbuhan bakteri dilakukan dari jam ke-6 sampai jam ke-64 seperti terlihat pada Gambar 2.

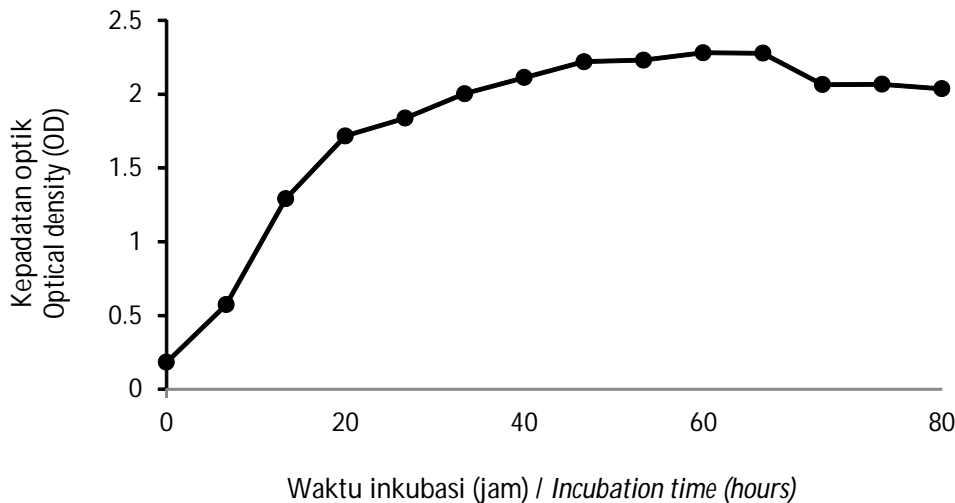
Laju pertumbuhan maksimum diperoleh pada jam ke-54. Aktivitas enzim meningkat secara bertahap semenjak jam ke-6 hingga jam ke-54; setelah itu, terjadi penurunan. Fase eksponensial berhubungan dengan waktu sel bakteri dalam memproduksi suatu produk atau senyawa metabolit, di antaranya adalah enzim, antibakteri, vitamin, dan asam organik (Putra, 2010). Metabolit primer dihasilkan mikroorganisme pada saat pertumbuhan eksponensial dan metabolit sekunder dihasilkan pada fase stasioner (Crueger & Crueger, 1984). Protease biasanya dihasilkan maksimum antara akhir fase eksponensial dan awal fase stasioner (Feng *et al.*, 2001). Produksi enzim dari mikroorganisme bervariasi, dipengaruhi oleh berbagai faktor fisika (suhu, pH), kimia (karbon, nitrogen), dan waktu inkubasi (Madigan *et al.*, 2008; Muthulakshmi *et al.*, 2011).

Pola pertumbuhan isolat bakteri *B. subtilis strain* VITNJ1 hampir sama dengan bakteri *Bacillus sp.* yang



Gambar 1. Performansi kualitatif enzim protease menggunakan medium SMA.

Figure 1. Qualitative performance of protease enzyme using SMA medium.



Gambar 2. Waktu produksi optimum enzim protease dari bakteri *B. subtilis* strain VITNJ1.

Figure 2. Optimum production time of protease enzyme derived from *B. subtilis* strain VITNJ1.

diisolasi dari saluran pencernaan ayam broiler, dengan optimasi pertumbuhan maksimumnya terjadi pada jam ke-48 (Gusminarni, 2009). Hal ini juga sesuai dengan hasil penelitian sebelumnya bahwa bakteri *B. licheniformis* juga memiliki aktivitas pertumbuhan tertinggi pada jam ke-48 (Soeka *et al.*, 2011). Optimasi pertumbuhan bakteri *B. subtilis* ITBCCB148 yang merupakan kelompok mikroba mesofilik terjadi pada jam ke-60 (Yandri *et al.*, 2008).

Aktivitas Enzim Protease Secara Kuantitatif

Aktivitas enzim protease diukur dengan bantuan grafik standar tirosin. Berdasarkan kurva tirosin diketahui bahwa aktivitas protease dari bakteri *B. subtilis* strain VITNJ1 yang tertinggi dicapai pada suhu 37°C dengan waktu inkubasi 54 jam adalah sebesar 9,10 U/mL. Aktivitas spesifik enzim dipengaruhi oleh jenis bakteri, kemungkinan hal ini disebabkan oleh jumlah enzim dan asam amino protein enzim yang dihasilkan oleh masing-masing isolat berbeda satu sama lainnya (Agustien, 2010). Selanjutnya aktivitas protease dapat dipengaruhi oleh beberapa faktor di antaranya pH, suhu, konsentrasi substrat, dan waktu inkubasi (Rahman *et al.*, 2005; Naiola & Widhyastuti, 2007; Pratiwi, 2008).

Penelitian tentang produksi enzim protease yang berasal dari saluran pencernaan ikan sudah banyak dilakukan (Arbaciauskiene, 2007; Ray *et al.*, 2010; Askarian *et al.*, 2012; Banerjee *et al.*, 2013). Pengukuran aktivitas proteolitik dilakukan pada *strain* bakteri yang diisolasi dari sembilan jenis ikan teleostei air tawar,

aktivitas proteolitik tertinggi terdapat pada bakteri TP3A yang berasal dari usus ikan *Oreochromis mossambica* (Bairagi *et al.*, 2002). Sementara itu juga, dilaporkan aktivitas proteolitik bakteri yang diisolasi dari saluran pencernaan ikan *Labeo calbasu*, *Catla catla*, *Labeo rohita*, dan *Cirrhinus mrigala* (Mondal *et al.*, 2008; Ray *et al.*, 2010). Selanjutnya dari bakteri *B. subtilis* AKRS3, yang berasal dari kotoran ikan yang diperdagangkan di daerah Tamil Nadu, India diperoleh aktivitas protease sebesar 42,76 U/mL (Ravishankar *et al.*, 2012), sedangkan dari ikan *Channa punctatus* diketahui aktivitas protease tertinggi berasal dari bakteri *B. subtilis* yakni sebesar 105,3 U/mL dengan lama waktu inkubasi 36 jam (Deepa & Usha, 2016).

Karakteristik Protein Enzim Protease

Kadar protein enzim protease bakteri *B. subtilis* strain VITNJ1 ditentukan dengan menggunakan *bovine serum albumin* (BSA) sebagai standar setelah dilakukan inkubasi selama 48 jam adalah 110,64 mg/L dan aktivitas spesifik sebesar 0,082 U/mg seperti terlihat pada Tabel 1.

Aktivitas spesifik dapat dihitung dengan cara membagi aktivitas enzim dengan kadar protein. Aktivitas spesifik enzim menunjukkan kemurnian suatu enzim. Semakin tinggi aktivitas spesifik enzim, maka semakin tinggi pula tingkat kemurnian enzim tersebut. Hal ini disebabkan karena proses berkurangnya jumlah protein non-enzim sebagai akibat dari tahapan pemisahan yang dilalui dalam pemurnian enzim (Wijaya, 2002).

Tabel 1. Karakteristik protein dari protease yang diperoleh dari *B. subtilis strain* VITNJ1

Table 1. The protein characteristics of protease derived from *B. subtilis strain* VITNJ1

Protein terlarut <i>Dissolved protein</i> (mg/L)	Aktivitas enzim protease <i>Protease enzyme activity</i> (U/mL)	Aktivitas spesifik <i>Specific activity</i> (U/mg protein)
110.64	9.10	0.082

Hasil penelitian ini sejalan dengan hasil penelitian sebelumnya yang melaporkan bahwa dari saluran pencernaan ikan red snapper (*Lutjanus campechanus*) dan ikan seer fish (*Scomberomorus guttatus*), yang dijual di pasar ikan Kota Chennai ditemukan kadar protein enzim protease berturut-turut 27,40 dan 23,21 U/mg (Sabtecha *et al.*, 2014). Selanjutnya juga dilaporkan kadar protein enzim protease dari bakteri *Bacillus* HMT-3 dengan lama waktu inkubasi 12 jam sebesar 0,145 mg/mL; dan kadar protein dengan aktivitas tertinggi terdapat pada jam ke-36 sebesar 132,35 mg/mL (Indriyani, 2010; Irwan, 2012). Penelitian lain tentang aktivitas enzim protease dari isolat *Bacillus* sp. B1 galur lokal Riau memiliki aktivitas optimum pada waktu produksi 30 jam sebesar 0,2523 ± 0,0050 U/mg (Yuniati *et al.*, 2015). Aktivitas enzim protease *Bacillus* sp. Ve1 sebesar 397 U/mL pada media gelatin cair (Patel *et al.*, 2004). Selanjutnya dari *B. cereus* MCM B-326 yang diisolasi dari kulit kerbau ditemukan aktivitas enzim protease maksimum sebesar 126,87 U/mL pada media pati kedelai (Nilegaonkar *et al.*, 2007).

KESIMPULAN

Bakteri *B. subtilis strain* VITNJ1 memiliki kemampuan untuk menghasilkan enzim protease melalui aktivitas proteolitiknya sebesar 26 mm. Fase eksponensial mulai terjadi pada jam ke-6, fase stasioner terjadi pada jam ke-18 sampai jam ke-48, aktivitas optimum enzim protease dicapai pada jam ke-54. Aktivitas enzim protease dari bakteri *B. subtilis strain* VITNJ1 sebesar 9,10 unit/mL; kadar protein 110,64 mg/L; dan aktivitas spesifik adalah 0,082 U/mg.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih disampaikan kepada DRPM Dikti Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi, Departemen Pendidikan Nasional yang telah mendanai penelitian ini melalui Skim Hibah Fundamental Tahun 2017.

DAFTAR ACUAN

- Agustien, A. (2010). Protease bakteri termofilik. Bandung: Universitas Padjajaran Press.
- Arbaciauskiene, S.V. (2007). Enzymatic activity of intestinal bacteria in roach *Rutilus rutilus* L. *Fishes Science*, 73, 964-966.
- Askarian, F., Zhou, Z., Olsen, R.E., Sperstad, S., & Ringo, E. (2012). Culturable autochthonous gut bacteria in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) fed diets with or without chitin. Characterization by 16S rRNA gene sequencing, ability to produce enzymes and *in vitro* growth inhibition of fish pathogens. *Aquaculture Journal*, 326-329, 1-8.
- Atlas, R.M. (1997). Handbook of microbiological media. Florida, USA, Boca Raton: CRC Press.
- Bairagi, A., Ghosh, K.S., Sen, S.K., & Ray, A.K. (2002). Enzyme producing bacterial flora isolated from fish digestive tracts. *Aquaculture International*, 10, 109-121.
- Balaji, N., Rajasekaran, K.M., Kalaipandian, N., Vignesh, V., & Thirumurugan, R. (2012). Isolation and screening of proteolytic bacteria from fresh water fish *Cyprinus carpio*. *International Multidisciplinary Research Journal*, 2(6), 56-59.
- Banerjee, G., Ray, A.K., Askarian, F., & Ringo, E. (2013). Characterization and identification of enzyme-producing autochthonous bacteria from gastrointestinal tract of two Indian air-breathing fish. *Beneficial Microbes Journal*, 4(3), 277-284.
- Bhaskar, N., Sudeepa, E.S., Rashmi, H.N., & Selvi, A.T. (2007). Partial purification and characterization of protease of *Bacillus proteolyticus* CFR3001 isolated from fish processing waste and its antibacterial activities. *Bioresource Technology Journal*, 98, 2758-2764.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry Journal*, 72, 248-254.

- Chovatiya, S., Dhola, K., Patel, P., & Ingale, S. (2014). Characterization and optimization of protease enzyme producing microorganism from gastrointestinal tract of *Labeo rohita*. *International Journal of Pure and Applied Bioscience*, 2(3), 124-134.
- Crueger, W. & Crueger, A. (1984). A text book of industrial microbiology. New York: Ed. T.D. Brock, Sinauer Associates Inc.
- Das, P., Mandal, S., Khan, A., Manna, S.K., & Ghosh, K. (2013). Distribution of extracellular enzyme-producing bacteria in the digestive tracts of 4 brackish water fish species. *Turkish Journal of Zoology*, 38, 79-88.
- Deepa, N. & Usha, R. (2016). Isolation and screening of proteolytic bacteria from the gut of fresh water fish *Channa punctatus*. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 5(9), 2434-2444.
- Efendi, Y. & Yusra. (2014). *Bacillus subtilis* strain VITNJ1 potential probiotic bacteria in the gut of tilapia (*Oreochromis niloticus*) are cultured in floating net, Maninjau Lake, West Sumatera. *Pakistan Journal of Nutrition*, 13, 710-715.
- Effendie, M.I. (2002). Biologi ikan. Yogyakarta: Yayasan Pustaka Nusatama.
- Fardiaz, S. (1992). Mikrobiologi pangan 1. Jakarta: Gramedia Pustaka Utama.
- Feng, Y.Y., Yang, W.B., Ong, S.L., & Hu, J.Y. (2001). Fermentation of starch for alkaline protease production by constructing an alkalophilic *Bacillus pumilus* strains. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 57, 153-160.
- Folasade, M., Olajuyigbe., Joshua, O., & Ajele. (2005). Production dynamics of extracellular protease from *Bacillus* species. *African Journal of Biotechnology*, 4(8), 776-779.
- Fukami, K., Ishiyama, S., Yaguramaki, H., Masuzawa, T., Nabeta, Y., Endo, K., & Shimoda, M. (2002). Identification of distinctive volatile compounds in fish sauce. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(19), 5412-5416.
- Geethanjali, S. & Subash, A. (2011). Optimization of protease production by *Bacillus subtilis* isolated from mid gut of fresh water fish *Labeo rohita*. *World Journal of Fish and Marine Sciences*, 3(1), 88-95.
- Gupta, R., Beg, Q.K., & Lorenz, P. (2002). Bacterial alkaline proteases: Molecular approaches and industrial applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 59, 15-32.
- Gusminarni. (2009). Aktivitas penghambatan bakteri asal saluran pencernaan ayam broiler terhadap *Escherichia coli* dan *Salmonella* spp. pada berbagai media, aerasi, pH, dan suhu. Tesis. Program Pascasarjana. Institut Pertanian Bogor. Bogor, 78 hlm.
- Indriyani. (2010). Pengaruh pH dan suhu terhadap aktivitas protease dari isolat bakteri HMT-3. Tesis. Universitas Hasanuddin. Makassar.
- Irwan, R. (2012). Pengaruh penambahan $MnCl_2$ terhadap produksi enzim protease dari *Bacillus licheniformis* HSA3-1a. Tesis. Universitas Hasanuddin. Makassar.
- Jellouli, K., Bougatef, A., Manni, L., Agrebi, R., Siala, R., Younes, I., & Nasri, M. (2009). Molecular and biochemical characterization of an extracellular serine-protease from *Vibrio etschnikovii*. *Microbiology and Biotechnology*, 36, 939-948.
- Kumaran, E., Mahalakshmi, A., & Rajan, S. (2013). Effect of fish waste based *Bacillus* protease in silver recovery from waste X-ray films. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 2(3), 49-56.
- Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L., & Randal, R.J. (1951). Protein measurement with folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, p. 193-265.
- Madigan, M.T., Martinko, J.M., Stahl, D., & Clark, D.P. (2008). Brock biology of microorganisms. 12th Ed. San Francisco, USA: Pearson Benjamin-Cummings.
- Mohapatra, B.R., Bapuji, M., & Sree, A. (2003). Production of industrial enzymes (amylase, carboxymethylcellulase and protease) by bacteria isolated from marine sedentary organisms. *Acta Biotechnology*, 23, 75-84.
- Mondal, S., Roy, T., Sen, S.K., & Ray, A.K. (2008). Distribution of enzyme-producing bacteria in the digestive tracts of some freshwater fish. *Acta Ichthyologica et Piscatoria*, 38, 1-8.
- Muthulakshmi, C., Gomathi, D., Kumar, D.G., Ravikumar, G., Kalaiselvi, M., & Uma, C. (2011). Production, purification and characterization of protease by *Aspergillus flavus* under solid state fermentation. *Jordan Journal of Biological Sciences*, 4(3), 137-148.
- Naiola, E. & Widhyastuti N. (2007). Semi purification and characterization of proteases *Bacillus* sp. *Periodic Biological Research*, 13, 51-56.
- Natarajan, N. & Rajikkannu, M. (2014). Antimicrobial activity of *Bacillus cereus* strain isolated from Rohu (*Labeo rohita*). *International Journal of Current Microbiology Applied Sciences*, 3(8), 474-480.
- Nilegaonkar, S.S., Zambare, V.P., Kanekar, P.P., Dhakephalkar, P.K., & Sarnaik, S.S. (2007). Pro-

- Nurmalinda, A., Periadnadi, & Nurmiati. (2013). Isolasi dan karakterisasi parsial bakteri pemfermentasi dari buah durian (*Durio zibethinus* Murr.). *Jurnal Biologi Universitas Andalas*, 2(1), 8-13.
- Patel, R., Dodia, M., & Singh, S.P. (2004). Extracellular alkaline protease from a newly isolated haloalkaliphilic *Bacillus* sp: Production and optimization. *Process Biochemistry*, 40, 3569-3575.
- Pratiwi, S.T. (2008). *Microbiologi farmasi*. Jakarta: Erlangga Press.
- Putra, A.N.P. (2010). *Aplikasi pemberian probiotik, prebiotik dan sinbiotik untuk meningkatkan pencernaan pakan ikan nila (Oreochromis niloticus)*. Tesis. Program Pasca Sarjana. Institut Pertanian Bogor.
- Rahman, R.N.Z.A., Basri, L.P.G.M., & Saleh, A.B. (2005). Physical factors affecting the production of organic solvent-tolerant protease by *Pseudomonas aeruginosa* strain K. *Bioresource Technology*, 96, 429-436.
- Ravishankar, K., Kumar, M.A., & Saravanan, K. (2012). Isolation of alkaline protease from *Bacillus subtilis* AKRS3. *African Journal of Biotechnology*, 11(69), 13415-13427.
- Ray, A.K., Roy, T., Mondal, S., & Ringo, E. (2010). Identification of gut-associated amylase, cellulase, and protease-producing bacteria in three species of Indian major carps. *Aquaculture Research*, 41, 1462-1469.
- Ray, A.K., Ghosh, K., & Ringo, E. (2012). Enzyme producing bacteria isolated from fish gut. A review. *Aquaculture Nutrition*, 18, 465-492.
- Rolfe, R. (2000). The role of probiotic cultures in the control of gastrointestinal health. *Journal of Nutrition*, 130, 396-402.
- Sabtecha, B., Jayapriya, J., & Tamilselvi, A. (2014). Extraction and characterization of proteolytic enzymes from fish visceral waste: Potential applications as destainer and dehairing agent. *International Journal of ChemTech Research*, 6(10), 4504-4510.
- Said, M.I. & Likadja, J.C. (2012). Isolasi dan identifikasi bakteri yang berpotensi sebagai penghasil enzim protease pada industri penyamakan kulit PT. Adhi Satria Abadi (Asa), Yogyakarta. *Makalah Ilmiah*. Fakultas Peternakan, Universitas Hasanuddin. Makassar.
- Soeka, Y.S., Rahayu, S.H., Setianingrum, N., & Naiola, E. (2011). Kemampuan *Bacillus licheniformis* dalam memproduksi enzim protease yang bersifat alkali dan termofilik. *Artikel Ilmiah. Media Litbang Kesehatan*, 21(2), 89-95.
- Suganthi, C., Mageswari, A., Karthikeyan, S., Anbalagan, M., Sivakumar, A., & Gothandam, K.M. (2013). Screening and optimization of protease production from a halotolerant *Bacillus licheniformis* isolated from saltern sediments. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 11(1), 47-52.
- Tari, C., Genckal, H., & Tokatl, F. (2005). Optimization of a growth medium using a statistical approach for the production of an alkaline protease from a newly isolated *Bacillus* sp. L21. *Process Biochemistry Journal*, 41, 659-665.
- Wijaya, S. (2002). Isolasi kitinase dari *Scleroderma columnare* dan *Trichoderma harzianum*. *Jurnal Ilmu Dasar*, 3(1), 30-35.
- Yandri, T.S., Dian, H., & Sutopo, H. (2008). The chemical modification of protease enzyme isolated from local bacteria isolate, *Bacillus subtilis* ITBCCB148 with cyanuric chloride polyethylenglycol. *European Journal of Scientific Research*, 23, 177-186.
- Yuniati, R., Nugroho, T.T., & Puspita, F. (2015). Uji aktivitas enzim protease dari isolat *Bacillus* sp. galur lokal Riau. *JOM FMIPA*, 1(2), 116-122.