

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

AKTIVITAS DAN KARAKTERISASI ENZIM PROTEASE ISOLAT *Bacillus* sp. (UJ132) SECARA KUALITATIF DAN KUANTITATIF

Sumardi[#], Salman Farisi, Christina Nugroho Ekowati, dan Milsa Solva Diana

Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Lampung
Jl. Soemantri Brojonegoro No. 1, Gedung Meneng, Bandar Lampung 35145

(Naskah diterima: 5 April 2019; Revisi final: 23 Agustus 2019; Disetujui publikasi: 23 Agustus 2019)

ABSTRAK

Bakteri penghasil enzim protease memiliki kemampuan untuk melakukan bioremediasi limbah protein. Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui aktivitas dan karakterisasi enzim protease dari isolat *Bacillus* sp. (UJ132) yang diisolasi dari udang pasir (*Metapenaeus affinis*) di kawasan hutan mangrove Desa Margasari, Lampung Timur. Uji aktivitas enzim dilakukan secara kualitatif dan kuantitatif. Karakterisasi enzim meliputi penentuan suhu dan pH optimum, pengaruh ion logam, serta penentuan K_m dan V_{maks} . Dari hasil percobaan diketahui bahwa enzim protease dihasilkan pada waktu produksi optimum 18 jam dengan aktivitas protease sebesar 0,09 U/mL. Suhu optimum enzim ini yaitu pada suhu 50°C yang menghasilkan aktivitas sebesar 0,08 U/mL. Enzim protease ini mempunyai kondisi optimum pada pH 5 dengan nilai aktivitas 0,09 U/mL. Semua ion logam (Ca_2^+ , Mn_2^+ , Cu_2^+ , Mg_2^+) berfungsi sebagai inhibitor kecuali ion Fe_3^+ yang berfungsi sebagai aktivator pada konsentrasi 1 mM dan 5 mM. EDTA dengan konsentrasi 1 mM dan 5 mM berfungsi sebagai inhibitor pada enzim protease isolat UJ132. Nilai V_{maks} enzim protease 0,33 U/mL sedangkan K_m senilai 4,59 mg/mL substrat, enzim ini mempunyai afinitas yang tinggi terhadap substrat.

KATA KUNCI: *Bacillus* sp.; bakteri proteolitik; hutan mangrove; probiotik; protease

ABSTRACT: *The activity and characterization of protease enzyme of Bacillus sp. UJ132, a probiotic candidate for shrimp farming. By: Sumardi, Salman Farisi, Christina Nugroho Ekowati, and Milsa Solva Diana*

Shrimp farming produces protein wastes which mainly come from the remnants of given feed and excreta (feces) of shrimp. Bacteria known to possess protease enzymes have the ability to solve this protein waste problem in the shrimp farming industry. This study was conducted to determine the production and characterization of protease enzyme from *Bacillus* sp. (UJ132) isolated from the mangrove forest area of Margasari Village of Lampung Timur. The enzyme activity test was done qualitatively and quantitatively. The objectives of this study were to determine the optimum production of the enzymes and observe their characteristics, including determining the temperature and optimum pH, the effect of several metal ions, as well as K_m and V_{max} . The experimental results revealed that the protease enzyme had an optimum time of 18 hours of protease activity as much as 0.09 U/mL. The optimum temperature of this enzyme was 50°C which produced an activity of 0.08 U/mL. This protease enzyme has an optimum working condition at pH 5 with an activity value of 0.09 U/mL. All metal ions (Ca_2^+ , Mn_2^+ , Cu_2^+ , Mg_2^+) acted as inhibitors except Fe_3^+ ions which acted as activators at concentrations of 1 mM and 5 mM. EDTA with a concentration of 1 mM and 5 mM served as an inhibitor of UJ132 isolate protease enzyme. The value of V_{max} of the protease enzyme was 0.33 U/mL while K_m was 4.59 mg/mL suggesting that this enzyme has a high affinity with the substrate.

KEYWORDS: *Bacillus* sp.; proteolytic bacteria; mangrove forest; probiotics; protease

PENDAHULUAN

Penggunaan mikroba probiotik di sektor budidaya udang yang telah menjadi kebiasaan saat ini. Penggunaan probiotik untuk pencegahan penyakit

[#] Korespondensi: Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Lampung. Jl. Soemantri Brojonegoro No. 1, Gedung Meneng, Bandar Lampung 35145, Indonesia.
Tel. + 62 721 704625
E-mail: sumardi.bio@yahoo.co.id

mempunyai keuntungan dibandingkan cara-cara pengendalian yang lainnya, karena: (1) menekan pertumbuhan bakteri patogen *vibrio*; (2) mampu memperbaiki kualitas air (Moriarty, 1998); (3) bioremediasi kualitas air (Muliani *et al.*, 2004); dan (4) efisiensi pada pakan (Murdianto, 2015).

Pakan udang dan ikan mengandung protein sebanyak 55,51%-67,68% (Hany, 2011). Untuk

meningkatkan penggunaan pakan yang efisien tersebut maka diperlukan beberapa mikroba probiotik yang dapat menghasilkan enzim protease. Beberapa mikroba diketahui sebagai penghasil protease untuk aplikasi komersial yakni *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Pyrococcus*, *Termonospora Rhizopus*, *Mucor*, *Endothia*, dan *Aspergillus* (Ward, 2009; Sumardi et al., 2016).

Usaha pemberian proteolitik *Bacillus* sp. yang terbaik berasal dari lingkungan alaminya seperti hutan mangrove. Dari studi literatur hingga saat ini belum banyak isolat *Bacillus* sp. dari kawasan mangrove digunakan sebagai probiotik. Dalam penelitian ini digunakan bakteri isolat *Bacillus* sp. UJ132 yang merupakan isolat penghasil protease tertinggi dan belum dikarakterisasi. Isolat tersebut berasal dari hutan mangrove di Desa Margasari, Lampung Timur. Dengan demikian maka perlu dilakukan penelitian untuk mengetahui karakteristik enzim protease yang dihasilkan dari isolat *Bacillus* sp tersebut.

BAHAN DAN METODE

Isolat Bakteri

Isolat bakteri tersebut merupakan koleksi dari Laboratorium Mikrobiologi FMIPA Universitas Lampung. Isolat yang digunakan adalah *Bacillus* sp. dengan kode isolat UJ132 yang diisolasi dari usus udang pasir di kawasan hutan mangrove. Isolat UJ132 terlebih dahulu diuji kemampuannya menghasilkan protease secara kualitatif. Dalam uji tersebut bakteri diinokulasi ke media *skim milk + sea water complete* (SWC)-agar yang terdiri atas, 5 g *bacto pepton*; 0,1 g *yeast extract*; 0,3 mL gliserol; 75 mL air laut; 25 mL *aquadest*; 1,5 g agar; dan 1 g *skim milk*. Zona jernih yang terbentuk menunjukkan bahwa bakteri tersebut menghasilkan protease.

Pembuatan Starter *Bacillus*

Pembuatan media produksi protease dilakukan dengan cara membuat media *starter* terlebih dahulu. Media *starter* dibuat sebagai media SWC (*sea water complete*) ditambahkan 1-3 ose isolat *Bacillus* sp. Selanjutnya diinkubasi dalam *shaker* inkubator selama 24 jam dengan kecepatan 120 rpm pada suhu ruang.

Optimasi Waktu Produksi Enzim Protease

Sebanyak 5 mL media *starter* (10^7 sel/mL) ditambahkan ke dalam 45 mL media produksi SWC. Kultur bakteri diinkubasi ke dalam *shaker* inkubator masing-masing selama 6, 12, 18, 24, 30, 36 jam dengan kecepatan 120 rpm pada suhu ruang. Sampel disentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm selama 15 menit pada suhu 4°C untuk mendapatkan

supernatan. Supernatan tersebut digunakan untuk uji aktivitas, serta karakterisasi enzim protease.

Uji Aktivitas Enzim Protease

Aktivitas protease diukur dengan metode (Bergmeyer & Grassl, 1983) menggunakan kasein hammersten sebagai substrat (2% casein dalam 0,01 M larutan buffer fosfat pH 7,0). Sebanyak 0,5 mL supernatan yang mengandung larutan enzim protease ditambahkan pada 0,1 mL larutan 0,01 M *buffer* fosfat pH 7. Campuran reaksi diinkubasikan kembali pada suhu 37°C selama 10 menit. Reaksi dihentikan dengan menambahkan 0,5 mL 0,1 M *trichloroacetic acid* (TCA). Selanjutnya supernatan dipisahkan dari endapan dengan *sentrifuse* pada suhu 4°C dengan kecepatan 10.000 rpm selama 10 menit. Sebanyak 0,38 mL filtrat ditambah dengan 1,25 mL 0,4 M natrium karbonat kemudian ditambahkan 0,25 mL reagen *folin ciocalteau* dan diinkubasikan kembali selama 20 menit. Pembacaan *optical density* (OD) dilakukan pada panjang gelombang 578 nm. Penentuan nilai blanko dilakukan dengan cara yang sama, di mana 0,5 mL sampel protease diganti dengan 0,5 mL *aquadest*. Penentuan nilai standar juga dilakukan dengan cara sama di mana 0,5 mL sampel protease diganti dengan 0,5 mL tirosin 5 mM. Satu unit (U) aktivitas enzim protease adalah banyaknya enzim yang diperlukan untuk menghasilkan 1 μ mol tirosin per menit pada kondisi pengujian. Perhitungan aktivitas dilakukan dengan rumus adalah sebagai berikut:

$$PU = \frac{A_{sp} - A_{bl}}{A_{st} - A_{bl}} \times \frac{1}{T}$$

di mana:

PU : unit aktivitas protease (unit/mL)

A_{sp} : nilai absorbansi sampel

A_{st} : nilai absorbansi standar

A_{bl} : nilai absorbansi blanko

T : waktu

Karakterisasi Protease

Karakterisasi protease meliputi uji aktivitas suhu optimum 20°C-70°C. Pengaruh pH diuji dengan kisaran pH 4-12. Satu seri *buffer* pH 0,05 M yang berbeda, yakni: pH 4,5 (*buffer* sitrat); pH 6,7 (*buffer* fosfat); pH 8,9 (*buffer* tris-HCl); pH 10, 11, 12 (*buffer* glisin-NaOH). Uji pengaruh ion logam logam Ca_2+ , Mn_2+ , Cu_2+ , Mg_2+ , Fe_3+ , dan senyawa inhibitor asam etilen diamintetraasetat (EDTA) dengan konsentrasi 1 mM dan 5 mM. Pegukuran K_m dan V_{maks} dilakukan dengan menguji konsentrasi substrat 0%; 1%; 1,5%; 2%; 2,5%; dan 3%. Pada setiap karakterisasi, dilakukan uji aktivitas protease diukur dengan metode Bergmeyer & Grassl (1983).

HASIL DAN BAHASAN

Uji Kualitatif

Pada uji kualitatif ini terlihat bahwa isolat UJ132 menghasilkan zona bening di sekitar koloni bakteri. Hal ini menunjukkan bahwa isolat UJ132 merupakan bakteri proteolitik atau mampu menghasilkan enzim protease (Gambar 1).

Bacillus sp. UJ132 juga menghasilkan lainnya yakni selulase dan xilanase (Sumardi *et al.*, 2019). Mikroba tersebut dapat hidup pada media pakan udang dan pakan ikan. Pada media tersebut dapat menghasilkan enzim protease, selulase, dan xilanase.

Optimasi Waktu Produksi

Penentuan produksi enzim dapat dilakukan dengan cara mengukur aktivitas enzimnya. Konsentrasi enzim tersebut bekerjanya akan berbanding lurus dengan aktivitas enzim. Hasil percobaan membuktikan bahwa pada jam ke-6 masih rendah (0,02 U/mL); kemudian pada jam ke-12 naik menjadi 0,04 U/mL. Produksi protease dari isolat *Bacillus* sp. UJ132 optimum adalah pada jam ke-18 sebesar 0,09 U/mL (Gambar 2).

Pada waktu jam ke-24 sampai dengan jam ke-36 produksi enzim menurun karena berkurangnya jumlah substrat yang dipecah. Produk enzim yang terbentuk dan produk lainnya berupa asam dapat menghambat pembentukan kompleks enzim substrat. Akibat gangguan tersebut bisa terjadi perubahan struktur, sehingga sisi aktif enzim mengalami perubahan dan tidak dapat digunakan dalam mengikat substrat secara

baik (Yunita, 2012). Dugaan lain yakni kebutuhan nutrisi asam amino oleh bakteri sudah terpenuhi, atau bakteri mulai mengalami lisis atau mati (Yuniati *et al.*, 2015). Aktivitas protease dari isolat *Bacillus* sp. UJ132 sebesar 0,09 U/mL. Hasil ini lebih besar jika dibandingkan dengan penelitian Inten *et al.* (2015) yang melaporkan ekstrak tanah mangrove memiliki aktivitas protease mencapai $1,9 \times 10^{-4}$ U/mL. Berdasarkan penelitian Yuniati *et al.* (2015), aktivitas proteolitik dari isolat *Bacillus* sp. B1 yang diisolasi dari rizosfer tanaman sawi menunjukkan aktivitas optimumnya pada waktu produksi 30 jam. Aktivitas enzim *Bacillus* sp. UJ132 dari penelitian ini masih lebih kecil dibandingkan nilai aktivitas enzim protease *Bacillus* sp. Ve1 yang memiliki aktivitas protease tertinggi sebesar 397 U/mL pada media gelatin cair (Patel *et al.*, 2004). Selain hal tersebut, Nilegaonkar *et al.* (2006) memberikan laporan yakni enzim protease *Bacillus cereus* MCM B-326 yang diisolasi dari kulit kerbau mempunyai aktivitas maksimum sebesar 126,87 U/mL di medium pati kedelai.

Pengaruh Suhu

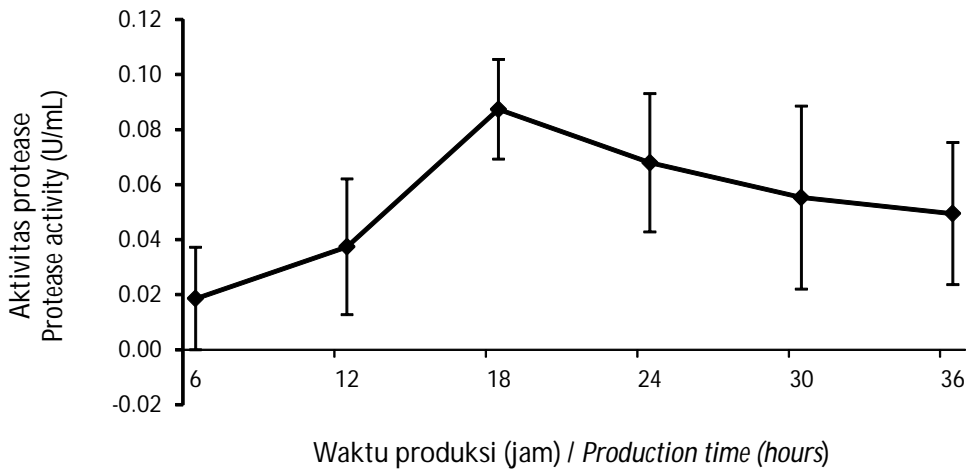
Setiap enzim dapat memiliki aktivitas optimum yang tertentu. Enzim protease dari isolat *Bacillus* sp. UJ132 memiliki optimum pada suhu 50°C (Gambar 3).

Suatu enzim akan memiliki aktivitas yang semakin tinggi jika suhu semakin dinaikkan hingga mencapai aktivitas maksimum. Namun, jika kenaikan suhu semakin dilakukan ketika enzim mencapai fase maksimum hal ini akan menyebabkan protein dalam

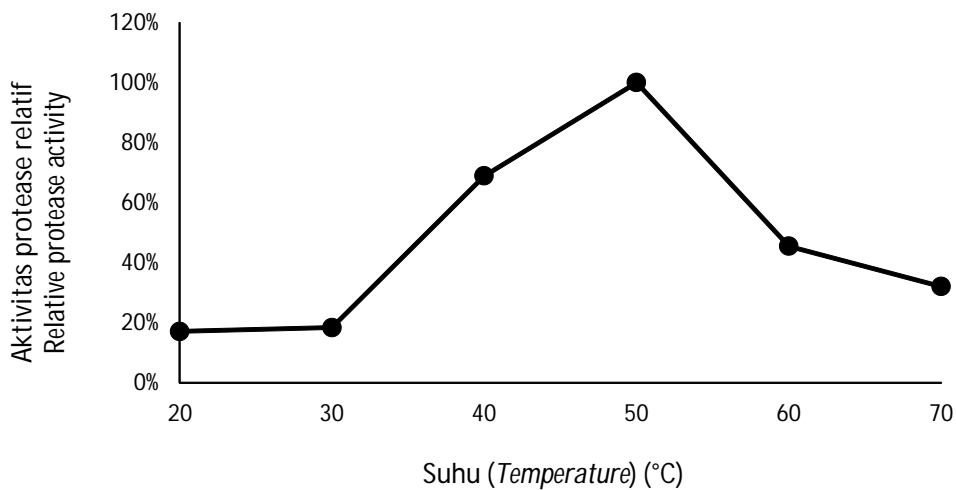


Gambar 1. Bakteri *Bacillus* sp. UJ132 ditumbuhkan pada media skim milk + SWC-agar umur 24 jam pada suhu ruang.

Figure 1. Bacteria of *Bacillus* sp. UJ132 was grown on media of skim milk + SWC-agar at room temperature for 24 hours.



Gambar 2. Pengaruh waktu produksi terhadap aktivitas protease.
 Figure 2. The effect of production period on protease activity.



Gambar 3. Pengaruh suhu terhadap aktivitas relatif protease dari *Bacillus* sp. UJ132.
 Figure 3. The effect of temperature on relative protease activity of *Bacillus* sp. UJ132.

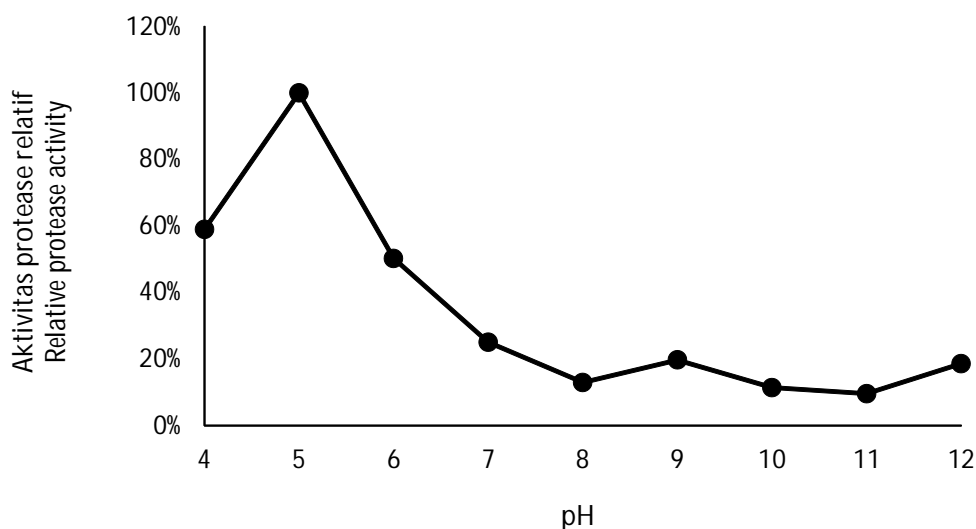
enzim akan terdenaturasi yang menyebabkan penurunan aktivitas enzim hingga kembali ke fase minimum. Pada suhu 20°C dan 30°C aktivitas protease sebesar 0,01 U/mL (aktivitas relatif 100%). Nilai tersebut paling rendah dibandingkan aktivitas pada suhu yang lain. Aktivitas tertinggi terjadi pada perlakuan suhu 50°C dengan nilai sebesar 0,08 U/mL. Oleh karena itu, suhu 50°C merupakan suhu maksimum produksi protease dari isolat *Bacillus* sp. hutan mangrove. Meskipun aktivitas protease pada suhu 60°C tetap ada namun sangat rendah. Hal ini diakibatkan enzim protease telah mencapai fase optimum. Soeka *et al.* (2011) melaporkan *Bacillus licheniformis* mempunyai aktivitas optimum pada suhu 60°C. Yandri *et al.* (2007) juga melaporkan aktivitas protease hasil pemurnian *B. subtilis* ITBCCB148 optimum pada suhu

60°C enzim protease hasil pemurnian dengan aktivitas 0,91 U/mL.

Pengaruh pH

pH mempunyai peranan penting terhadap aktivitas suatu enzim. Kondisi lingkungan enzim harus sesuai dengan karakter enzim sehingga enzim dapat bekerja secara optimum dan mencapai hasil yang maksimum. Isolat *Bacillus* sp. UJ132 hasil isolasi dari sampel udang pasir di hutan mangrove Lampung Timur yang telah diukur aktivitasnya dalam rentang pH 4-12 mempunyai aktivitas tertinggi pada pH 5 (Gambar 4).

Selain suhu, pH juga memengaruhi aktivitas enzim. Aktivitas protease pada pH 5 terlihat dari Gambar 4 yang memiliki nilai aktivitas enzim protease sebesar



Gambar 4. Pengaruh pH *buffer* terhadap aktivitas relatif protease dari *Bacillus* sp. UJ132.
 Figure 4. The influence of buffer pH on relative protease activity of *Bacillus* sp. UJ132.

0,09 U/mL. Selanjutnya pada pH 6-12 aktivitas protease menurun di rentang nilai 0,01 dan 0,02 U/mL. Penurunan aktivitas protease dapat disebabkan karena pH yang sudah tidak optimum di rentang pH 6-12. Sehingga dapat dikatakan bahwa kondisi pH maksimum protease isolat *Bacillus* dari hutan mangrove ada pada pH 5. Pada penelitian Novita *et al.* (2006) melaporkan bahwa isolat *Bacillus amyloliquefaciens* NRRL B-14396 memiliki aktivitas optimum pada pH 7,5. Begitu pula *Bacillus subtilis* yang diisolasi dari terasi Samarinda mempunyai pH optimum 8,5 (Yati & Sulistiyani, 2014). Perubahan pH yang ekstrem, enzim dapat mengalami denaturasi akibat gangguan terhadap berbagai interaksi nonkovalen yang menjaga kestabilan struktur tiga dimensi enzim (Hames & Hooper, 2000).

Pengaruh Ion Logam terhadap Aktivitas Enzim Protease

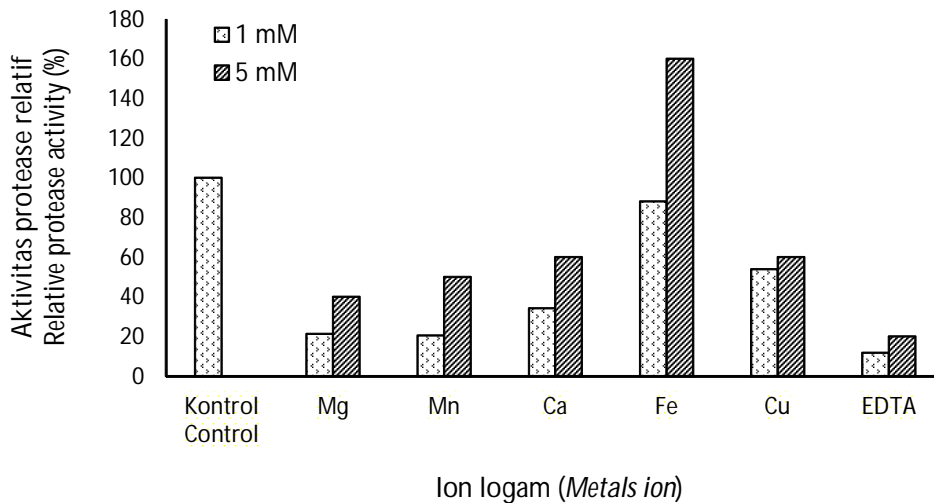
Pengaruh ion logam Ca^{2+} , Mn^{2+} , Cu^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{2+} , serta inhibitor spesifik EDTA terhadap aktivitas isolat *Bacillus* sp. hutan mangrove terlihat pada Gambar 5. Semua ion logam yang ditambahkan pada uji aktivitas protease berfungsi sebagai inhibitor kecuali ion logam Fe^{2+} (5 mM) yang berfungsi sebagai aktivator (Gambar 5).

Selain suhu dan pH, ion logam juga memengaruhi aktivitas enzim. Ion logam merupakan kofaktor. Kofaktor digunakan untuk mendukung aktivitas katalitik enzim. Ion logam dapat menjadi aktivator dan juga inhibitor. Ion dapat dikatakan aktivator jika dapat menaikkan aktivitas enzim. Sementara, dapat menjadi inhibitor apabila ion logam tersebut menghambat aktivitas protease yang ditandai dengan

menurunnya aktivitas enzim. Pada isolat *Bacillus* sp. UJ132 semua ion logam (Ca^{2+} , Mn^{2+} , Cu^{2+} , Mg^{2+}) bekerja sebagai inhibitor kecuali ion Fe^{2+} yang bertindak sebagai aktivator baik pada konsentrasi 1 mM dan 5 mM. Hal ini dapat dilihat dari grafik (Gambar 5). Pada percobaan Sumardi *et al.* (2018) juga membuktikan bahwa ion logam Fe^{2+} yang diberi paparan medan magnet 0,2 mT dalam medium dapat meningkatkan produksi protease pada *Bacillus* sp. EDTA mempunyai pengaruh yang signifikan dalam aktivitas protease isolat *Bacillus* sp. UJ132 yakni sebagai inhibitor pada semua reaksi. Perbandingan ion logam sebagai inhibitor atau aktivator dapat dilihat dengan membandingkan setiap aktivitas ion logam dengan kontrol (tanpa ion logam). Hasil penelitian Utarti *et al.* (2009) menunjukkan bahwa ion logam yang berfungsi sebagai kofaktor protease dari *Bacillus* sp. 31 adalah ion Fe^{2+} . Hal ini berbeda dengan hasil karakterisasi dari Adinarayana *et al.* (2003) bahwa serin alkalin protease dari *B. subtilis* PE-11 kofaktornya adalah ion Ca^{2+} , Mg^{2+} , dan Mn^{2+} . Sementara pada protease dari *Bacillus* sp. APR-4 kofaktornya adalah ion Ca^{2+} dan ion Cu^{2+} (Kumar & Bhalla, 2004). Adanya penghambatan ion logam terhadap aktivitas protease pada konsentrasi tertentu berkaitan dengan kekuatan ion, dan kekuatan ion itu sendiri memengaruhi konformasi atau struktur tiga dimensi dari protein enzim atau protein substrat (Suhartono, 1989).

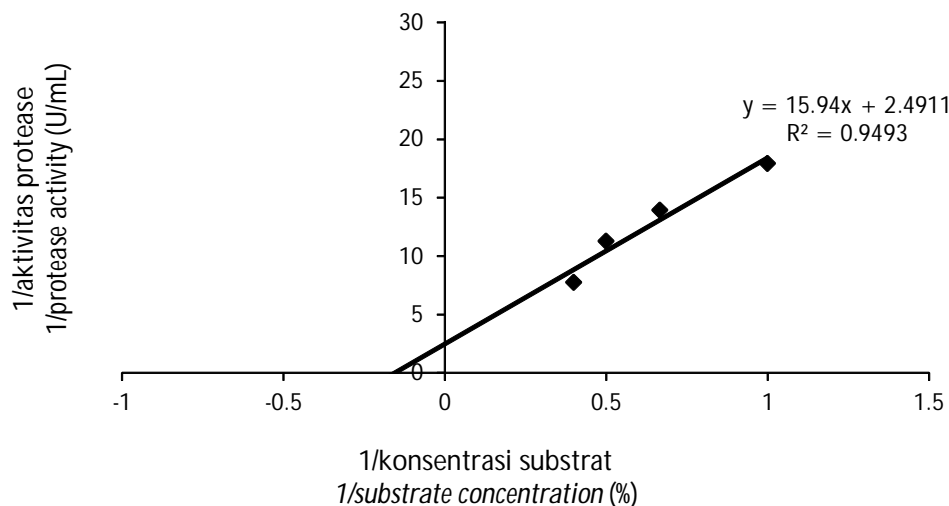
Kinetika Enzim (Km dan Vmaks)

Dari persamaan *Lineweaver-Burk* diperoleh harga V_{maks} enzim protease 0,330 U/mL; sedangkan K_m senilai 4,598 mg/mL substrat (Gambar 6).



Gambar 5. Pengaruh ion logam dan inhibitor EDTA terhadap aktivitas protease relatif dari *Bacillus* sp. UJ132.

Figure 5. The effect of metal ion and EDTA inhibitors on relative protease activity of *Bacillus* sp. UJ132.



Gambar 6. Kurva *lineweaver-Burk* ($1/V$ terhadap $1/[S]$) untuk mengetahui kinetika protease dari *Bacillus* sp. UJ132.

Figure 6. *Lineweaver-Burk* plot ($1/V$ versus $1/[S]$) for determination of kinetic protease of *Bacillus* sp. UJ132.

Kinetika enzim merupakan salah satu karakteristik yang dibutuhkan dalam mengkarakter suatu enzim. Kinetika enzim sendiri diartikan sebagai setiap konsentrasi substrat yang memengaruhi aktivitas suatu enzim. Dari persamaan *Lineweaver-Burk* diperoleh harga V_{maks} enzim protease 0,330 U/mL; sedangkan K_m senilai 4,598 mg/mL substrat (Gambar 6). Harga K_m lebih besar jika dibandingkan dengan isolat *Bacillus* sp. 31 yang mempunyai nilai K_m sebesar $1,5 \times 10^{-3}$ (Utarti *et al.*, 2009). Bila dibandingkan dengan

serin protease dari *Bacillus* sp. 31 yang mempunyai V_{maks} 21,32 U/mg (Utarti *et al.*, 2009) kecepatan maksimum protease dari *Bacillus* sp. 31 tergolong rendah.

KESIMPULAN

Enzim protease *Bacillus* sp. UJ132 diproduksi dalam waktu yang relatif singkat (18 jam) dengan nilai kecepatan aktivitas V_{maks} enzim protease sebesar 0,33 U/mL; walaupun mempunyai daya ikat rendah

terhadap substrat (Km 4,59 mg). Enzim protease dari *Bacillus* sp. UJ132 ini mempunyai kondisi optimum pada pH 5 dan suhu 50°C.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini didanai oleh Hibah Pascasarjana Universitas Lampung dengan kontrak No: 1572/ UN26.21 / PP / 2018, tanggal 9 Juli 2018.

DAFTAR ACUAN

- Adinarayana, K., Ellaiah, P., & Prasad, D.S. (2003). Purification and partial characterization of thermostable serine alkaline protease from a newly isolated *Bacillus subtilis* PE 11. *AAPS Pharm.Sci.Tech*, 4(4), 1-9.
- Bergmeyer, H.U. & Grassl, F. (1983). Method of enzymatic analysis. Third Edition. VCH (Verlagsgesellschaft), Meinheim, Germany. Volume II (Samples, reagents, assesment of results), p. 1-159.
- Hames, B.D. & Hooper, N.M. (2000). *Biochemistry: The Instant Notes. Ed.ke-2*. Hongkong: Springer-Verlag
- Hany, H. (2011). Optimalisasi substitusi tepung *Azolla* terfermentasi pada pakan ikan untuk meningkatkan produktivitas ikan nila GIFT. *Jurnal Teknik Industri*, 12(2), 177-181.
- Inten, H.N., Nengah, I.W., & Mayun, L.A.A.I.A. (2015). Analisis potensi protease ekstraseluler tanah hutan mangrove Pantai Suwung Kauh Bali. *Cakra Kimia*, 3(2), 84-90.
- Kumar, D. & Bhalla, T.C. (2004). Purification and characterization of a small size protease from *Bacillus* sp. APR-4. *Exp. Biol.*, 42, 515-517.
- Moriarty, D.J.W. (1998). Control of luminous *Vibrio* species in penaeid aquaculture ponds. *Aquaculture*, 184, 351-358.
- Muliani, Nurbaya, Tompo, A., & Atmomarsono, M. (2004). Eksplorasi bakteri filosoffer dari tanaman mangrove sebagai bakteri probiotik pada budidaya udang windu *Penaeus monodon*. *J. Pen. Perik. Indonesia*, 2, 47-57.
- Murdianto. (2015). Study on the effects of probiotic, *Pediococcus acidilactici* in the diet on some biological indices of *Oscar astronautocellatus*. *International Research Journal of Applied and Basic Sciences*, 4(11), 3458-3464.
- Nilegaonkar, S.S., Zambare, V.P., Kanekar, P.P., Dhakephalkar, P.K., & Saranik, S.S. (2006). Production and partial characterization of dehairing protease from *Bacillus cereus* MCM B-326. *Bioresource Technology*, 98, 1238-1245.
- Novita, W., Arief, K., Nisa, F.C., & Murdiyatmo, U. (2006). Karakterisasi parsial ekstrak kasar enzim protease dari *Bacillus amyloliquefaciens* NRRL B-14396. *Jurnal Teknologi Pertanian*, 7(2), 96-105.
- 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.
- Soeka, Y.S., Rahayu, S.H., Setianingrum, N., & Naiola, E. (2011). Kemampuan *Bacillus licheniformis* dalam memproduksi enzim protease yang bersifat alkalin dan termofilik. *Media Litbang Kesehatan*, 21(2), 89-95.
- Suhartono, M.T. (1989). *Enzim dan bioteknologi*. Departemen Pendidikan dan Kebudayaan, Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi Antar Universitas Bioteknologi. Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Sumardi, Sutyarso, Susanto, G.N., Kurtini, T., Hartono, M., & Widhi, R.R.E.P.N. (2016). Pengaruh probiotik terhadap kolesterol darah pada ayam petelur (layer). *Jurnal Kedokteran Hewan*, 10(2), 128-131.
- Sumardi, Agustrina, R., Irawan, B., & Selfiana, I. (2018). Pengaruh paparan medan magnet 0,2 mT pada ion logam Fe dan Zn dalam media pertumbuhan terhadap protease *Bacillus* sp. *Jurnal Ilmu Lingkungan*, 16(2), 173-177.
- Sumardi, Ekowati, C.N., & Rismayanti. (2019). The activity assay of protease, cellulase, amylase, xylanase, and mannanase from *Bacillus* sp. as a candidate of probiotics. *World Journal of Pharmaceutical and Life Sciences*, 5(3), 88-93.
- Ward, O.P, Rao, M.B., & Kulkarni, A. (2009). Proteases production. *Applied Microbiol. Industrial*, p. 495-511.
- Utarti, E., Nurita, L., & Arimurti, S. (2009). Karakterisasi protease ekstrak kasar *Bacillus* sp. 31 characterization of crude protease *Bacillus* sp. 31. *Jurnal Ilmu Dasar*, 10(1), 102-108.
- Yandri, T.S., Dian, H., & Sutopo, H. (2007). The chemical modification of protease enzyme isolated from local bacteria isolate, *Bacillus subtilis* ITBCCB148 with cyanuric chloride polyethylenglycol. *Europ. J. Scien. Resea.*, 23, 177-186.
- Yati, S.S. & Sulistiyani. (2014). Karakterisasi protease *Bacillus subtilis* A1 Inacc B398 yang diisolasi dari terasi Samarinda. *Berita Biologi*, 13(2), 203-211.
- Yuniati, R., Nugroho, T.T., & Puspita, F. (2015). Uji aktivitas enzim protease dari isolat *Bacillus* sp. galur lokal Riau. *JOMP FMIPA*, 1, 116-122.
- Yunita, S.P. (2012). *Skrining dan uji aktivitas enzim protease bakteri dari limbah rumah pemotongan hewan*. Skripsi. Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Airlangga, Surabaya.