

Identification and Characterization of PrTK-2 Bacterial Isolate Producing Extracellular Protease Enzym from Rubber Seeds Tempeh

Cico Jhon Karunia Simamora ^{1*}, Sukmawati Sukmawati ²

¹Universitas Tanjungpura Pontianak, Kota Pontianak, Kalimantan Barat Indonesia

²Universitas Muhammadiyah Sorong, Kota Sorong, Papua Barat Indonesia

*chicosimamora@gmail.com

Abstract. Protease is an enzyme that can hydrolyze proteins into simpler compounds such as small peptides and amino acids. The enzymes produced by microorganisms can be isolated by separating cells through centrifugation. The aims of the study was to determine the biological characteristics of the PrTK 02 bacterial isolate and the characteristics of the crude extract of the protease enzyme produced by the PrTK 02 bacterial isolate. The study was conducted by inoculated one ose PrTK 02 bacteria on the Nutrient Broth (NB) media. Pre-culture was carried out at 37 °C for 48 hours with an agitation speed of 120 rpm. Protease enzyme extraction was done by centrifugate the bacterial growth media at rate of 3000 rpm for 15 minutes at 4 °C. The Supernatant was tested for protease activity and protein content. The results of this study were obtained from the protease enzyme activity from bacterial isolate PrTK 02, marked by a clear zone in the Skim Milk Agar (SMA) medium. The highest enzyme activity were obtain with optimal production time by 24 hours with the specific activity by 1.2154 unit/mg protein. Biochemical and microscopic identification shows that the isolate of PrTk 02 bacteria is a class of *Bacillus sp.* PrTk 02 is a Gram - positive bacteria that is found in tempeh.

Keyword: Protease, Proteolytic, *Bacillus*, Supernatant, Protease Activity



This is an open access article distributed under the Creative Commons 4.0 Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited. ©2020 by author.

1. PENDAHULUAN

Protease adalah enzim yang dapat menghidrolisis protein menjadi senyawa-senyawa yang lebih sederhana seperti peptida kecil dan asam amino. Enzim protease merupakan enzim penting dan memiliki nilai ekonomi yang tinggi karena aplikasinya yang sangat luas. Contoh industri pengguna enzim protease antara lain industri deterjen, kulit, tekstil, makanan, pengolahan susu, farmasi, bir dan limbah (Chu, 2006). Sumber enzim protease yang telah diketahui berasal dari hewan, mikroba, dan tanaman. Tanaman merupakan sumber enzim protease terbesar (43.85%) diikuti oleh bakteri (18.09%), jamur (15.08%), hewan (11.15%), alga (7.42%) dan virus (4.41%) (Mahajan and Shamkant, 2010). Di Indonesia kebutuhan enzim protease juga semakin meningkat namun kebutuhan ini masih

tergantung pada produksi impor. Salah satu cara mengantisipasi ketergantungan terhadap impor tersebut adalah memproduksi sendiri enzim protease tersebut.

Penggunaan mikroorganisme untuk produksi enzim mempunyai beberapa kelebihan, diantaranya mudah diproduksi dalam skala besar, waktu produksi relatif pendek serta dapat diproduksi secara berkesinambungan dengan biaya yang relatif rendah. Mikroorganisme penghasil protease dapat berupa bakteri, kapang maupun khamir. Enzim yang dihasilkan oleh mikroorganisme dapat diisolasi dengan cara memisahkan sel secara sentrifugasi dan selanjutnya pemurnian dilakukan dengan cara pengendapan, gel filtrasi dan kromatografi penukar ion (Smith, 1990).

Penelitian ini menggunakan bakteri PrTK 02 yang dimurnikan dari tempe biji karet sebagai substratnya dan telah diketahui memiliki kemampuan memproduksi enzim protease untuk menghidrolisis protein seperti asam glutamat. Diduga bakteri yang didapatkan dari substrat yang berbeda akan berpengaruh terhadap jenis senyawa yang dihasilkan dalam produk fermentasi, karena beda mikroba yang digunakan beda juga kemampuan aktivitas enzimnya. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui karakteristik biologis isolat bakteri PrTK 02 dan karakteristik ekstrak kasar enzim protease yang dihasilkan isolat bakteri PrTK 02.

2 BAHAN DAN METODE

Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian yang digunakan adalah rancangan penelitian deskriptif kualitatif. Data yang diperoleh disajikan secara deskriptif meliputi karakteristik makroskopis, mikroskopis, dan identifikasi secara biokimia, serta pengukuran aktivitas spesifik enzim protease dari isolate PrTk 02 asal tempe biji karet.

Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di laboratorium Mikrobiologi, Bioteknologi, dan Kimia Pangan, Fakultas Pertanian, Universitas Tanjungpura, Pontianak, pada bulan November 2019 sampai Februari 2020.

Alat dan bahan

Alat-alat yang digunakan adalah Spektrofotometer UV-Mini, Autoklaf, pH meter, *Vortex mixer*, tabung mikro dan alat-alat standar lainnya yang digunakan di laboratorium sesuai dengan prosedur kerja.

Bahan-bahan yang digunakan adalah susu skim, pepton, NaCl, kasein, standar tirosin, standar protein untuk penentuan konsentrasi protein adalah *albumin bovine serum* (BSA), reagen biuret, reagen ninhidrin dan bahan kimia lain adalah proanalisis atau bahan preparatif sesuai prosedur kerja.

Prosedur Kerja

Peremajaan bakteri

Peremajaan isolat bakteri PrTK 02 dilakukan untuk merawat bakteri agar tetap dalam kondisi optimal. Peremajaan dilakukan dengan media miring *Nutrient Agar* (NA) ditanami isolat bakteri PrTK 02 dari media miring yang lama melalui teknik goresan, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 48 jam (Yusriana *at al.*, 2014).

Penyiapan starter bakteri

Penyiapan *starter* bakteri dilakukan menurut metode Iskandar *at al.* (2009) dengan modifikasi. Sebanyak 1 ose kultur murni isolat bakteri PrTK 02 dimasukkan ke dalam 30 ml media *Nutrient Broth* (NB) steril dan diinkubasi selama 48 jam.

Uji kualitatif aktivitas proteolitik

Uji kualitatif aktivitas enzim protease dilakukan dengan cara menginokulasikan isolat bakteri PrTK 02 pada media *Skim Milk Agar* (SMA). Media SMA mengandung pepton (0.1% w/v), NaCl (0.5% w/v), agar (2.0% w/v), dan susu skim (10% w/v) (Chu, 2006). Uji positif ditunjukkan dengan adanya zona bening disekitar koloni bakteri pada permukaan media SMA.

Uji kuantitatif aktivitas proteolitik

Produksi protease dilakukan dengan metode Cappucino dan Sherman (1983) yang dimodifikasi dengan menginokulasikan isolat bakteri PrTK 02 sebanyak 1 ose ke dalam 30 ml media produksi (2% susu skim dan 0.5% pepton) dengan pH 7 dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 2 hari di atas pengocok (*shaker*) inkubator dengan kecepatan 120 rpm. Sampel disentrifugasi dengan kecepatan 10.160 xg pada suhu 4°C selama 5 menit. Supernatan yang dihasilkan dianggap sebagai ekstrak kasar enzim protease.

Pengujian aktivitas proteolitik secara kuantitatif dilakukan dengan metode yang dijelaskan oleh Leewit dan Pornsuksawang (1988) dengan modifikasi. Sebanyak 1 ml ekstrak kasar enzim protease dicampur 2 ml larutan kasein 0.5% dengan 0.5 ml larutan buffer fosfat pH 7 lalu didiamkan selama 10 menit pada suhu 37°C. Reaksi dihentikan dengan menambahkan 2.5 ml TCA 5% lalu diinkubasi selama 30 menit pada suhu ruang. Larutan disentrifugasi 4000 rpm selama 20 menit. Diambil 1 ml filtrat dan diencerkan sampai 5 ml. Hasil pengenceran diukur absorbansinya dengan UV pada panjang gelombang 275 nm.

Penentuan waktu optimum produksi protease

Bakteri PrTK 02 diinokulasi sebanyak 1 ose pada media *Nutrient Broth* (NB). Prekultur dilakukan pada suhu 37°C selama 48 jam dengan kecepatan agitasi 120 rpm. Media NB diambil 10% dari jumlah media kemudian ditambah pada media *Skim Milk Broth* (SMB) dengan komposisi susu skim 2% dan pepton 0.5% sebagai untuk memproduksi protease

(Soeka dan Sulistiani, 2014). Ekstraksi enzim protease dilakukan dengan cara sentrifugasi media pertumbuhan bakteri dengan kecepatan 3000 rpm selama 15 menit pada suhu 4°C. Sel akan mengendap oleh adanya gaya gravitasi sedangkan enzim tetap terdapat di dalam supernatan. Supernatan sebagai sampel diuji aktivitas protease dan kadar proteinnya (Baehaki *at al.*, 2011).

Pengujian aktivitas protease

Pengukuran aktivitas protease dilakukan menggunakan metode Enggel *et al* (2004). Sebanyak 0.1 ml larutan ekstrak kasar enzim protease ditambahkan dengan 0.1 ml larutan 0.05 M buffer fosfat pH 7, dipreinkubasi selama 5 menit pada suhu 37°C. Selanjutnya ditambahkan 0.1 ml substrat (2% kasein dalam 0.05 M buffer fosfat pH 7), diinkubasi selama 10 menit pada suhu 37°C. Reaksi dihentikan dengan menambahkan 0.2 ml asam trikloroasetat (TCA) 0.4 M dan disentrifus. Sebanyak 0.2 ml filtrat hasil sentrifus ditambahkan dengan 1 ml natrium karbonat 0,5 M, dipreinkubasi selama 10 menit dan kemudian ditambahkan 1 ml reagen ninhidrin dan didiamkan selama 30 menit. Absorbansi diukur menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 578 nm. Aktivitas proteolitik enzim dihitung dengan rumus :

$$\text{Aktivitas protease} = \frac{[\text{Tirosin}] \times V}{(p \times q) \times FP}$$

Keterangan :

[tirosin] : konsentrasi tirosin yang terbentuk

V : volume total sampel pada tiap tabung (ml)

p : jumlah enzim (ml)

q : waktu inkubasi (menit)

Fp : faktor pengenceran

Pengukuran kadar protein

Kadar protein ditentukan dengan metode biuret yang dimodifikasi. Pengukuran kadar protein menggunakan *Bovine Serum Albumine* (BSA) sebagai standar protein. konsentrasi yang digunakan dalam pembuatan standar protein yaitu 0-1000 mg/L. Selanjutnya memipet larutan sampel dalam tiap tabung sebanyak 0.1 ml dan diencerkan kedalam 10 ml akuades. Hasil pengenceran diambil 1 ml dan ditambahkan 1 ml reagen biuret serta dihomogenkan. Diamkan selama 10 menit dan sampel diukur pada panjang gelombang 480 nm. konsentrasi protein ditentukan dengan menggunakan kurva standar (Yuliani, 2018).

Penentuan aktivitas spesifik protease

Aktivitas spesifik enzim diperoleh menggunakan rumus :

$$\text{Aktivitas spesifik ((Unit/mg protein))} = \frac{\text{Aktivitas Protease U/mL}}{\text{Kadar Protein g/mL}} \quad (\text{Ramadhani } \textit{at al.}, 2015)$$

Identifikasi mikroskopis dan biokimia bakteri

Isolat PrTk 02 yang telah dimurnikan, dilakukan peremajaan pada media Nutrient Agar kemudian diinkubasi 48 jam pada suhu ruang. Pengamatan mikroskopis dan identifikasi biokimia dilakukan mengacu pada pedoman identifikasi bakteri (Bergey's Manual Determinative Bacteriology tahun 1948). Pengamatan mikroskopis dilakukan dengan pewarnaan Gram sel bakteri. Uji biokimia yang dilakukan meliputi uji triple sugar, sulfide, indol, motilitas, uji penggunaan asam sitrat, uji jenis gula, katalase, oksidase, pertumbuhan MacConkey Agar, dan uji balik pada media Sierra dengan Tween 80.

Analisis Data. Data yang diperoleh disajikan secara deskriptif meliputi karakteristik makroskopis dan mikroskopis serta identifikasi tingkat genus menggunakan rangkaian identifikasi biokimia, serta kadar protein, uji aktivitas spesifik enzim protease isolate PrTk 02 asal tempe biji karet.

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

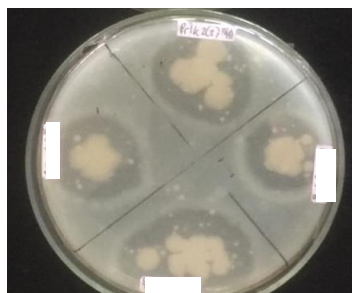
Uji kualitatif aktivitas proteolitik

Uji aktivitas proteolitik dilakukan pada isolat bakteri PrTK 02 dengan menggunakan media SMA. Uji positif ditunjukkan dengan adanya zona bening di sekitar koloni bakteri pada media SMA (Gambar 1). Hasil uji kualitatif menunjukkan bahwa isolat bakteri PrTK 02 merupakan bakteri proteolitik karena mampu menghasilkan enzim protease yang ditandai dengan terbentuknya zona bening di sekitar koloni bakteri (Tabel 1).

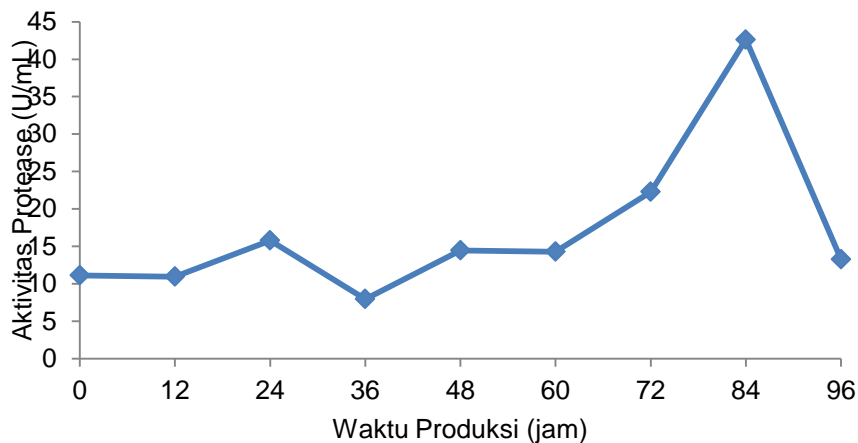
Indeks zona bening tertinggi ditunjukkan oleh isolat bakteri PrTK 02 pada inkubasi selama 48 jam mencapai 70.29%. Adanya zona jernih yang muncul mengindikasikan adanya pemecahan molekul protein yang terkandung di dalam susu skim pada media SMA. Bakteri proteolitik mampu memproduksi enzim protease ekstraseluler, yaitu enzim pemecah protein yang diproduksi di dalam sel kemudian dilepaskan keluar sel (Abraham *et al*, 1993). Susu skim mengandung kasein yang berfungsi sebagai substrat enzim. Hidrolisis kasein digunakan untuk memperlihatkan adanya aktivitas hidrolitik enzim protease (Susanti, 2002).

Tabel 1. Indeks zona bening isolat bakteri PrTK 2

Kode Isolat	Indeks Zona Bening (%)	
	24 jam	48 jam
PrTK 2	9.14	70.29



Gambar 1. Hasil uji kualitatif aktivitas proteolitik isolat bakteri PrTK 2 pada media *Skim Milk Agar* (SMA) inkubasi suhu ruang, 48 jam



Uji kuantitatif aktivitas proteolitik

Aktivitas enzim didefinisikan sebagai kecepatan pengurangan substrat atau kecepatan pembentukan produk pada kondisi optimum (Lehninger. 1993). Uji aktivitas proteolitik secara kuantitatif dilakukan sebagai uji lanjutan terhadap pengukuran aktivitas proteolitik secara kualitatif. Hasil pengujian aktivitas proteolitik secara kuantitatif menunjukkan isolat bakteri PrTK 02 memiliki aktivitas proteolitik. Hasil uji aktivitas proteolitik disajikan pada Tabel 2.

Tabel 2. Hasil uji kuantitatif aktivitas proteolitik setelah inkubasi 48 jam

No.	Kode Isolat	Aktivitas (U/mL)
1	PrTK 2	12.4324

Hasil uji aktivitas proteolitik menunjukkan bahwa isolat bakteri PrTK 02 memiliki nilai aktivitas proteolitik sebesar 12.4324 U/mL (Tabel 2). Besarnya aktivitas proteolitik menunjukkan bahwa bakteri dapat menghasilkan enzim protease yang mampu mendegradasi kasein menjadi asam amino dan peptida. Hasil ini sebanding dengan penelitian yang dilakukan oleh Pakpahan (2009), yaitu isolat bakteri SP2 diketahui memiliki indeks zona bening tertinggi berdasarkan uji kualitatif dan mampu memproduksi enzim dengan nilai aktivitas sebesar 9.93 unit.

Penentuan waktu produksi optimum

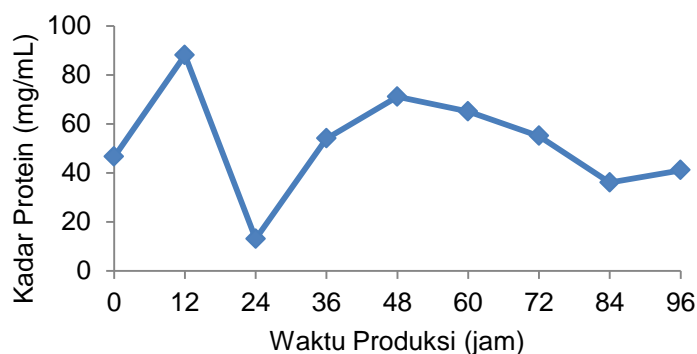
Produksi enzim protease dari isolat bakteri PrTK 02 dapat diketahui melalui aktivitasnya dalam menghidrolisis substrat kasein menjadi asam-asam amino penyusunnya. Satu unit aktivitas protease didefinisikan sebagai sejumlah enzim yang dapat membebaskan 1 μ mol tirosin per menit (Ramadhani *at al.* 2015). Aktivitas protease isolat bakteri PrTK 02 dapat dilihat pada Gambar 2.

Aktivitas protease menunjukkan bahwa isolat bakteri PrTK 02 memiliki waktu produksi optimum pada 84 jam dengan aktivitas 42.63 Unit/mL (Gambar 2). Aktivitas protease membentuk dua puncak, yaitu pada waktu produksi 24 jam dan 84 jam. Munculnya

beberapa puncak pada aktivitas enzim dapat diduga karena adanya isoenzim, yaitu enzim yang mengkatalis reaksi yang sama, namun memiliki karakteristik fisik dan kimia (titik isoelektrik, pH optimum, afinitas substrat, atau adanya enzim inhibitor) yang berbeda karena disintesis oleh gen yang berbeda (Yuratmoko *et al.* 2007). Nilai aktivitas enzim yang diperoleh pada penelitian ini lebih rendah dibandingkan dengan aktivitas enzim protease *Bacillus* sp. Ve1 yang memiliki aktivitas enzim optimum sebesar 397 Unit/mL pada media gelatin cair (Patel *et al.* 2004).

Produksi enzim protease isolat bakteri PrTK 02 tertinggi diperkirakan berada pada fase stasioner. Sintesis protein ekstraseluler biasanya jugaterjadi pada fase stasioner. Pada saat memasuki fase stasioner, represi katabolit mulai menurun sehingga mengaktifkan biosintesis enzim (Suhartono. 1992). Grafik pada Gambar 2 menunjukkan pola yang fluktuaktif sehingga menghasilkan dua puncak.Pola aktivitas protease yang fluktuaktif juga dilaporkan dalam penelitian Mubarik dan Wirahadikusumah (1996).

Pengukuran kadar protein dalam penelitian ini dilakukan dengan analisa secara kuantitatif berdasarkan kurva standar BSA (*Bovine Serum Albumin*). Pengukuran kadar protein dilakukan untuk menentukan aktivitas spesifik enzim terhadap per miligram protein (Clark. 1997). Kadar protein isolat bakteri PrTK 02 dapat dilihat pada Gambar 3. Selama 96 jam,isolat bakteri PrTK 02 memiliki kadar protein yang cukup fluktuaktif (Gambar 3). Kadar protein membentuk dua puncak. yaitu pada waktu produksi 12 jam dan 48 jam. Kadar protein tertinggi dicapai pada waktu produksi 12 jam sebesar 88 mg/mL. Pola fluktuaktif pada hasil kadar protein sama dengan pola fluktuaktif pada hasil aktivitas protease. Keberadaan protein lain dapat menyebabkan nilai kadar protein menjadi tinggi. Protein lain yang terlarut dapat terbaca pada saat pengukuran yang menyebabkan nilai kadar protein menjadi tinggi (Murray *et al.* 2003).



Gambar 3. Kadar protein isolat bakteri PrTK 2 pada berbagai waktu produksi

Aktivitas spesifik enzim protease diperoleh dengan cara membagi hasil aktivitas protease dengan kadar proteinnya. Aktivitas spesifik enzim protease tertinggi yang diperoleh isolat bakteri PrTK 02 dalam penelitian ini adalah 1.2154 Unit/mg protein pada waktu produksi 24 jam. Aktivitas spesifik enzim mengindikasikan bahwa protein yang dihasilkan mikroba ke media tumbuh merupakan protein target yang diinginkan (Yuniati *et al.*, 2015).

Identifikasi Mikroskopis dan Biokimia Bakteri

Karakterisasi biokimia dari isolat bakteri PrTk 02 menunjukkan bahwa bakteri ini termasuk dalam golongan *Bacillus* sp. (Tabel 3).

Tabel 3. Karakterisasi makroskopis, mikroskopis, dan uji biokimia isolat bakteri proteolitik PrTk 02 Asal Tempe Biji Karet

Pengamatan/Uji Biokimia	Jenis Isolat Bakteri LpTk 19
Bentuk Koloni	Bulat. Pinggir Rata
Permukaan Koloni	Halus Mengkilat
Warna Koloni	Putih Kekuningan
Gram	+
Bentuk Sel	Batang
Blood Agar	Non Haemolitik
Glukosa	-
Laktosa	-
Sukrosa	-
Maltosa	-
Manitol	-
TSIA	m/m
Indol	-
H ₂ S	-
Motilitas	-
Simon Sitrat	-
Oksidase	-
Katalase	-
Uji Balik	-
Species	<i>Bacillus</i> sp.

Kelimpahan bakteri proteolitik pada tempe biji karet sangat dipengaruhi oleh kandungan protein yang tinggi yaitu sebesar 22.58% (Sari *et al.* 2018). Bakteri proteolitik pada tempe berperan penting dalam mendegradasi protein menjadi asam amino, sehingga memungkinkan untuk menghasilkan asam amino dan amina, yang berpengaruh terhadap fermentasi lanjut dan masa simpan tempe.

4. KESIMPULAN DAN SARAN

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan, maka dapat disimpulkan bahwa isolat bakteri PrTK 02 merupakan bakteri proteolitik yang ditandai dengan terbentuknya zona bening di sekitar koloni bakteri pada media SMA. Isolat bakteri PrTK 02 memiliki waktu produksi optimum pada 24 jam dengan aktivitas spesifik enzim 1.2154 Unit/mg protein, aktivitas protease 15.8 Unit/mL, dan kadar protein 13 mg/mL. Identifikasi mikroskopis dan biokimia menemukan bahwa bakteri proteolitik PrTK 02 merupakan *Bacillus* sp.

DAFTAR PUSTAKA

- Abraham, A.G, Antoni, L and Anon, A.C. (1993). Proteolytic Activity of *Lactobacillus bulgaricus* Grown in Milk. *Journal of Dairy Science*. 1498- 1505.
- Baehaki, A, Rinto dan Budiman, A. (2011). Isolasi dan Karakterisasi Protease dari Bakteri Tanah Rawa Indralaya, Sumatera Selatan. *J. Teknol. Dan Industri Pangan*. 22(1): 37-42.
- Cappucino, J.G dan Sherman, N. (1983). *Mikrobiologi: A Laboratory Manual*. Addison-Wesley Publishing Company. California USA.
- Chu, W.H. (2006). Optimization of extracellular alkaline protease production from species of *Bacillus*. *J Ind Microbiol Biotechnol*. 34: 241-245.
- Clark, J, John, M and Switzen, R.L. (1997). *Experimental Biochemistry*. 2nd edition, John Willey and Sons Inc., USA. 116-123.
- Enggel, J, Meriandini, A dan Natalia, L. (2004). Karakterisasi Protease Ekstraseluler *Clostridium bif fermentans* R14-1-b. *J. Mikrobiologi Indonesia*. 9(1): 9-12.
- Iskandar, Y, Rusmiati, D dan Dewi, R. (2009). Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Rumput Laut (*Eucheuma cottonii*) Terhadap Bakteri *Eschericia coli* dan *Bacillus cereus*. UNPAD: Jurusan Farmasi FMIPA.
- Leewit, S dan Pornsuksawang. (1988). Protease from Bacteria in Soybean Whey. *Proc. Food Science and Technology in Industrial Development*. Vol 1. (Ed Manepoon). Thailand. pp. 751-754.
- Lehninger, A.I. (1993). *Dasar-dasar Biokimia*. Jakarta: Erlangga.
- Mahajan, R.T dan Shamnkant, B.B. (2010). Biological aspects of proteolytic enzymes: A Review. *India J. Pharm, research*, 3(9): 2048-2068.
- Mubarik, N.R dan Wirahadikusumah, M. (1996). Pemurnian dan karakterisasi protease ekstraseluler *Bacillus subtilis* ATCC 6633. *Hayati*. 3: 50-54.
- Murray, R.K, Granner, D.K, Mayes, P.A, and Rodwell, V.W. (2003). *Biokimia Harper*. Penerbit Buku Kedokteran EGC. Ed 25. Jakarta. 270.
- Pakpahan, R. (2009). Isolasi Bakteri dan Uji Aktivitas Protease Termofilik dari Sumber Air Panas Sipoholon Tapanuli Utara. *Tesis*. Medan: Universitas Sumatera Utara.

- Patel, R, Dodia, M, and Singh, S.P. (2004). Extracellular alkaline protease from a newly isolated haloalkaliphilic *Bacillus* sp.: production and optimization. *Process Biochemistry*. 40: 3569- 3575.
- Ramadhani, P, Rukmi, M.G.I dan Pujiyanto, S. (2015). Produksi Enzim Protease dari *A. Niger* PAM18A dengan Variasi pH dan Waktu Inkubasi. *Jurnal Biologi*. 4(2): 25-34.
- Sari, N.M.R. (2018). Pengaruh Lama Penggantian Air Rendaman Dan Dosis Jamur Komersial Terhadap Kualitas Tempe Biji Karet (*Havea Brasilliensis* Muell.Arg). *Skripsi*. Pontianak: Universitas Tanjungpura Fakultas Pertanian
- Smith, E.J. (1990). *Biotechnology Principle*. Terjemahan Usman FS, Bambang S dan Agung S. Jakarta: PT Gramedia.
- Soeka, Y.S dan Sulistiani. (2014). Karakterisasi Protease *Bacillus subtilis* A₁ InaCC B398 yang Diisolasi dari Terasi Samarinda. *Berita Biologi*. 13(2): 203-212.
- Suhartono, M.T. (1992). *Protease*. Bogor: Depdikbud, DIKTI, PAU IPB.
- Susanti, E. (2002). *Petunjuk Praktikum Biokimia*. Malang: Jurusan Kimia FMIPA UM.
- Yuliani, D. (2018). *Biokimia I*. Petunjuk Praktikum. Malang: UIN Maulana Malik Ibrahim.
- Yuniati, R, Nugroho, T.T dan Puspita, F. (2015). Uji Aktivitas Enzim Protease dari Isolat *Bacillus* sp. Galur Lokal Riau. *JOM FMIPA*. 1(2): 116-122.
- Yuratmoko, D, Mubarik, N.R and Merjandini, A. (2007). Screening of proteolytic enzymes of *Streptomyces* sp. local strains and their characterization. *Microbiology Indonesia*. 1(2): 69-73.
- Yusriana, C.S, Budi, C.S dan Dewi, T. (2014). Uji Daya Hambat Infusa Daun Nangka (*Artocarpus heterophyllus*) Terhadap Pertumbuhan Bakteri *Staphylococcus aureus*. *Jurnal Permata Indonesia*. 5(2): 1-7.