

PURIFIKASI DAN KARAKTERISASI PROTEASE DARI BAKTERI PATOGEN *Pseudomonas aeruginosa*

[Purification and Characterization of Protease from Pathogenic Bacteria
Pseudomonas aeruginosa]

Ace Baehaki¹⁾, Maggy T.Suhartono²⁾, Nurheni Sri Palupi²⁾ dan Tati Nurhayati³⁾

¹⁾ Program Studi Teknologi Hasil Perikanan, Fakultas Pertanian Universitas Sriwijaya

²⁾ Departemen Ilmu dan Teknologi Pangan, Institut Pertanian Bogor

³⁾ Departemen Teknologi Hasil Perairan, Institut Pertanian Bogor

Diterima 28 Juli 2007 / Disetujui 30 Juni 2008

ABSTRACT

In the last decade, concern on protease as medical target for overcoming bacterial diseases and viral diseases has been rapidly increased because of the obvious involvement of this enzyme in the molecular of the diseases. The purpose of this research was to purify and characterize protease from pathogenic bacteria *Pseudomonas aeruginosa*. The bacteria were grown in media containing triptone 1%, NaCl 1% and Yeast extract 0,5%. Protease of *P.aeruginosa* was purified using column chromatography with Sephadex G-100 gel. There were three peaks of enzyme protein, which were detected on fractions 14, 17 and 30. The optimum pH of the extracellular protease from *P. aeruginosa* was 8. The optimum temperature of *P.aeruginosa* protease was 30°C. Fe³⁺ (1dan 5 mM) was strong activator and Co²⁺ was strong inhibitor. Study on the effect of metals ion and spesific inhibitors indicated that protease from *P. aeruginosa* was serin metaloprotease. The apparent moleculer weights, as determined by SDS-PAGE and zymogram technique, 36 kD and 42 kD.

Key words : Protease, characterization, purification, patogenic bacteria *P.aeruginosa*

PENDAHULUAN

Bakteri patogen menghasilkan berbagai enzim yang pada dasarnya tidak toksik tetapi berperan penting dalam proses infeksi. Beberapa bakteri patogen memproduksi enzim hidrolitik seperti protease dan hialuronidase, yang mendegradasi komponen matrik ekstraseluler sehingga dapat merusak struktur jaringan inang. Enzim hidrolitik ini digunakan oleh bakteri untuk memperoleh sumber karbon dan energi dengan menghancurkan polimer inang menjadi gula sederhana dan asam amino (Salyers dan Whitt, 1994).

Pseudomonas aeruginosa patogen mensekresikan metaloprotease ekstraseluler, elastase dan alkalin protease yang berkolerasi dengan patogenitasnya. Elastase merupakan metaloprotease yang mengandung seng, mempunyai kemampuan mendegradasi substansi biologi penting yaitu elastin, laminin, fibrin, kolagen manusia dan immunoglobulin (Hase dan Finkelstein, 1993). Keterlibatan enzim bakteri patogen ini dalam mekanisme molekuler timbulnya berbagai penyakit memungkinkan untuk mencari dan mendesain inhibitor protease dalam rangka mencari peluang penemuan obat yang berhubungan dengan penyakit tersebut. Potensi yang besar pada mikroba dan sumber hayati lainnya sebagai penghasil inhibitor protease menyebabkan para peneliti mengkaji aspek tersebut. Dalam pencarian/penapisan inhibitor protease informasi karakteristik protease sebagai target menjadi

sangat penting. Untuk itu, aspek yang perlu diteliti adalah produksi, pemurnian dan karakteristik dari protease patogen target.

METODOLOGI

Bahan penelitian

Bahan utama adalah isolat bakteri patogen yaitu antara lain *P.aeruginosa* yang diperoleh dari koleksi Rumah Sakit Pertamina Jakarta.

Produksi protease

Galur bakteri patogen diinokulasi sebanyak 1-2 lup pada media Luria Broth (LB). Proses diawali dengan penentuan umur prekulturr (dalam media LB) yang tepat untuk keperluan produksi enzim. Pengamatan dilakukan dengan mengukur *optical density* (OD) sampai nilai OD = 0,8 pada $\lambda = 620$ nm. Media (LB) yang sudah mempunyai OD = 0,8 diambil 10% kemudian ditambahkan pada media LB yang baru. Pada media LB ini diukur nilai OD dan aktivitas protease setiap 8 jam selama 56 jam dengan kecepatan 120 rpm pada suhu 37°C.

Pengukuran aktivitas protease dan kadar protein

Aktivitas protease diukur dengan metode Bergmeyer (1983) dengan menggunakan substrat kasein Hammerstein 2% (b/v). Satu unit aktivitas protease

didefinisikan sebagai jumlah enzim yang dapat menghasilkan satu μmol produk tirosin per menit pada kondisi pengukuran. Kadar protein ditentukan dengan metode Bradford (1976) menggunakan Bovine Serum Albumin Fraction V sebagai standar protein.

Pemurnian protease

Pemurnian dilakukan dengan menggunakan kromatografi filtrasi gel menggunakan Sephadex G-100. Sebelum dilakukan pemurnian terlebih dahulu dilakukan pengendapan dengan amonium sulfat teknis 70% yang dilanjutkan dengan dialisis menggunakan kantong dialisis cut-off 10 kD (Sigma).

Sebanyak 0,75 gram Sephadex G-100 (Sigma) dibasahkan dengan 75 ml air bebas ion kemudian dipanaskan 90°C sambil diaduk perlahan selama 90 menit dan dibiarkan sampai dingin, untuk selanjutnya disimpan dalam ruangan 4°C semalam. Larutan didekantasi lalu supernatan diganti dengan buffer Tris-HCl 0,1 M pH 8 sambil diaduk perlahan. Larutan protease sebanyak 1 ml dimasukkan dengan pipet secara perlahan ke dalam kolom tepat di atas permukaan gel. Kolom diisi dengan pengelusi yaitu buffer Tris-HCl 10 mM pH 8. Selanjutnya setiap fraksi diambil masing-masing 70 tetes (2 ml) dan ditampung dalam *fraction collector* (Redifrac, Pharmacia-Biotech).

Karakterisasi protease ekstrak kasar

Uji karakterisasi protease meliputi pengaruh pH (6,5; 7; 7,5; 8; 8,5; 8,5; 9), suhu (30 °C; 40 °C; 50 °C; 60 °C; 70 °C), ion logam (Na^+ ; K^+ ; Ca^{2+} ; Mn^{2+} ; Co^{2+} ; Zn^{2+} ; Ba^{2+} dan Fe^{2+}) dan inhibitor spesifik (EDTA dan PMSF).

SDS PAGE dan Zimogram

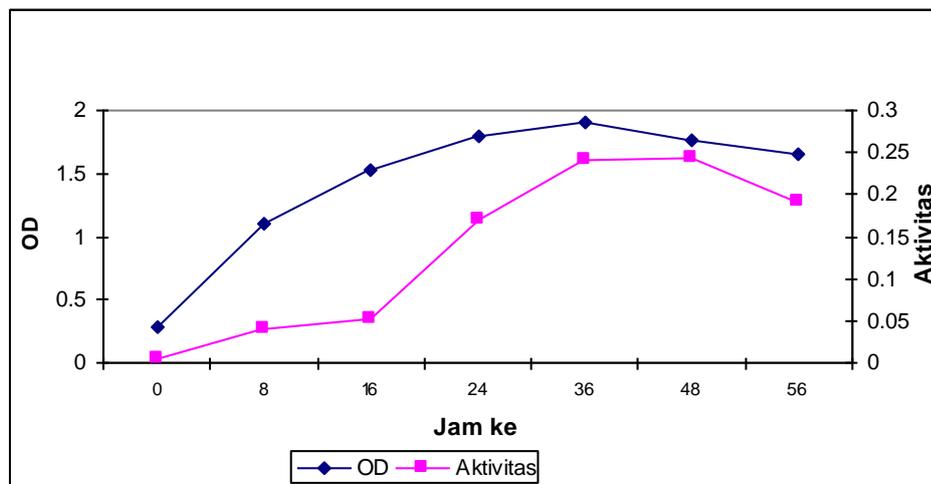
Penentuan berat molekul dilakukan menggunakan SDS PAGE (Laemmli, 1970), sedangkan zimogram menggunakan modifikasi metode Choi et al.,

(2001). Pada penentuan berat molekul dengan SDS PAGE setelah elektroforesis dilakukan pewarnaan dengan *silver staining*, tahapannya adalah sebagai berikut: gel direndam dalam larutan fiksasi (25% metanol dan 12% asam asetat) selama 1 jam kemudian direndam dalam 50% etanol selama 20 menit. Selanjutnya diganti dengan 30% etanol selama 2 x 20 menit, selanjutnya larutan *enhancer* dan dilanjutkan dengan dicuci dengan akuadestilata. Setelah dicuci ditambahkan larutan silver nitrat selama 30 menit kemudian dicuci lagi dengan akuadestilata 2 x 20 detik serta ditambahkan larutan campuran Na_2CO_3 dan formaldehida serta diakhiri dengan larutan fiksasi. Pada pembuatan zimogram gel akrilamid 8% dikopolimerisasi dengan substrat kasein 2%. Setelah dilakukan elektroforesis, gel direndam dengan Triton X-100 2,5% selama 1 jam selanjutnya diinkubasi dalam buffer Tris-Cl 10 mM, pH 8 selama 24 jam.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Produksi protease

Produksi protease dilakukan pada media *luria broth* (LB) setelah sebelumnya dikultur dalam medium yang sama hingga mencapai OD=0,8 pada suhu 37 °C dan kecepatan 120 rpm. Enzim yang telah dihasilkan oleh bakteri dipisahkan dari sel bakteri menggunakan sentrifugasi. Dengan teknik ini, sel akan mengendap oleh adanya gaya gravitasi sedangkan enzim tetap terdapat pada supernatan. Sentrifugasi dilakukan pada suhu 4°C untuk mencegah terjadinya kerusakan struktur enzim, selanjutnya dilakukan pengujian aktivitas protease, sedangkan pertumbuhan bakteri diamati melalui *optical density* (OD) pada $\lambda = 620 \text{ nm}$. Hasilnya menunjukkan bahwa produktivitas protease optimum dari bakteri patogen ini dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Waktu produksi optimum protease *P. aeruginosa*

Protease *P.aeruginosa* memiliki aktivitas tertinggi 0,243 IU/ml setelah diinkubasi selama 48 jam dalam media LB. Protease diproduksi seiring dengan pertumbuhan sel dan mencapai aktivitas tertinggi pada fase stasioner (Gambar 1). Hal ini menunjukkan bakteri ini memerlukan protease sebagai strategi dalam mempertahankan hidupnya. Penelitian tentang produksi optimum protease yang dilakukan oleh Fawzya (2002) menunjukkan bahwa isolat bakteri asal ikan hiu (*Carcharhinus limbatus*) menghasilkan protease optimal pada jam ke-24, pada saat pertumbuhan bakteri mulai mencapai fase stasioner. Selain itu, dilaporkan pula bahwa protease yang dihasilkan oleh *Vibrio proteolyticus* memiliki produksi yang optimal pada fase stasioner (Durham, 1990).

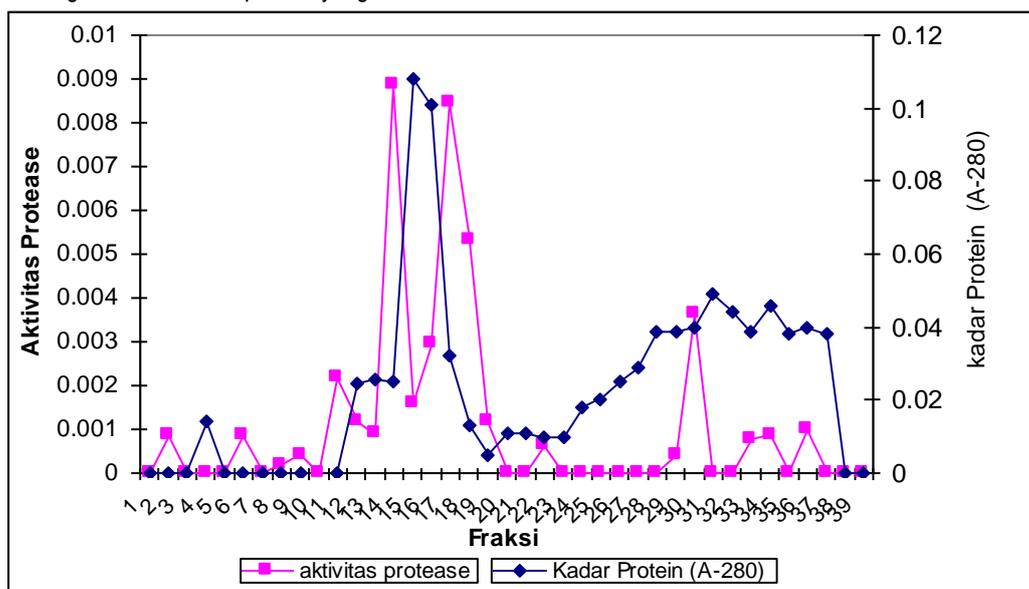
Pemurnian protease

Pemurnian protease *P.aeruginosa* dilakukan dengan kromatografi filtrasi gel menggunakan Sephadex G-100 sebagai matriks, dan bufer Tris-HCl 0,05 M, pH 8 sebagai pengelusnya. Sebelum dilakukan pemurnian dengan kromatografi gel, terlebih dahulu dilakukan pengendapan dengan amonium sulfat 70% yang dilanjutkan dengan dialisis. Setiap fraksi yang keluar dari

kolom diukur aktivitas protease dan kadar protein. Hasilnya tertera pada Gambar 2. Hasil kromatografi menunjukkan terdapat tiga puncak fraksi yang memiliki aktivitas tertinggi yaitu fraksi 14, 17 dan 30.

Data pada Tabel 1 menunjukkan terjadi peningkatan derajat kemurnian enzim. Dengan pengendapan amonium sulfat derajat kemurnian relatif menjadi 1,66 kali dan, dengan dialisis menjadi 2,26. Dengan kromatografi kolom ini terjadi peningkatan kemurnian menjadi 2,42 kali untuk fraksi 14, 1,81 kali untuk fraksi 17. Untuk fraksi 30 derajat kemurniannya menurun, hal ini kemungkinan aktivitasnya sangat kecil

Protease yang telah dimurnikan dengan filtrasi gel menggunakan Sephadex G-100 mempunyai aktivitas spesifik dan tingkat kemurnian yang lebih tinggi dari tahap sebelumnya. Dengan demikian dapat disimpulkan bahwa Sephadex G-100 dapat digunakan untuk memisahkan protein yang dikehendaki yaitu enzim dari senyawa-senyawa lain sebagai pengotor. Ekstrak kasar protein umumnya tercampur dengan asam nukleat, karbohidrat dan garam organik. Logam berat dan asam nukleat biasanya mengganggu kerja enzim, sehingga dapat menghilangkan kontaminan tersebut terjadi peningkatan aktivitas enzim (Haris dan Angal, 1989).



Gambar 2. Kromatogram *P. aeruginosa* dengan Sephadex G-100

Tabel 1. Tahapan pemurnian protease *Pseudomonas aeruginosa*

Tahapan pemurnian	Aktivitas Protease (IU/ml)	Kadar protein (mg)	Volume (ml)	Total aktivitas (IU)	Total protein (mg)	Aktivitas spesifik (IU/mg)	Derajat kemurnian relatif
Ekstrak kasar	0,047	0,313	100	4,67	31,3	0,149	1
Pengendapan (NH ₄) ₂ SO ₄	0,153	0,617	3	0,459	1,851	0,248	1,66
Dialisis	0,065	0,193	2	0,13	0,386	0,337	2,26
Sephadex G-100							
Fraksi 14	0,009	0,025	2	0,018	0,05	0,36	2,42
Fraksi 17	0,0085	0,032	2	0,017	0,064	0,27	1,81
Fraksi 30	0,0037	0,04	2	0,0074	0,08	0,925	0,62

Karakterisasi protease ekstrak kasar

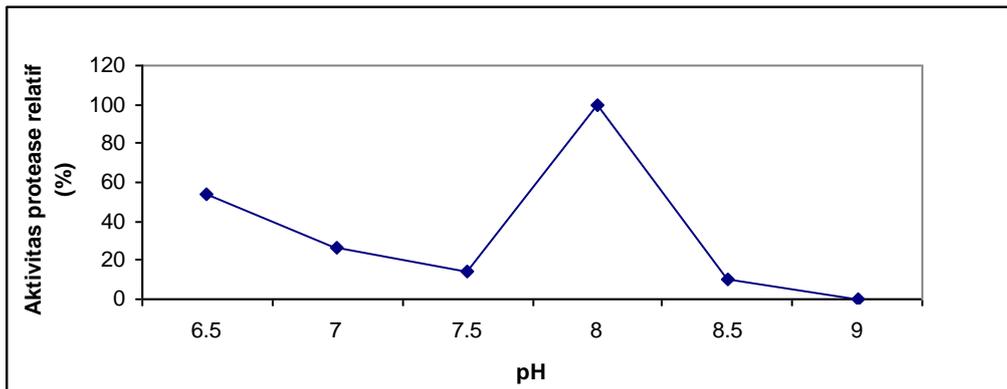
pH optimum

Semua reaksi enzimatik dipengaruhi pH, sehingga diperlukan bufer untuk mengontrol pH reaksi. Pada umumnya enzim bersifat amfolitik, yang berarti enzim mempunyai konstanta disosiasi pada gugus asam maupun gugus basanya terutama pada gugus residu terminal karboksil dan gugus terminal aminonya. Diperkirakan perubahan keaktifan enzim akibat ionisasi pada gugus ionik enzim, pada sisi aktifnya atau sisi lain yang secara tidak langsung mempengaruhi sisi aktif. Gugus ionik berperan dalam menjaga konformasi sisi aktif dalam mengikat substrat dan dalam mengubah substrat menjadi produk. Ionisasi juga dapat dialami oleh substrat atau kompleks enzim-substrat, yang juga berpengaruh terhadap aktivitas enzim (Muchtadi et al., 1996). Perubahan pH yang kasar enzim dapat mengalami denaturasi akibat gangguan terhadap berbagai interaksi non kovalen yang menjaga kestabilan struktur 3D enzim (Hames dan Hooper, 2000). Gambar 3 memperlihatkan pH optimum aktivitas protease ekstrak kasar bakteri patogen *P. aeruginosa*.

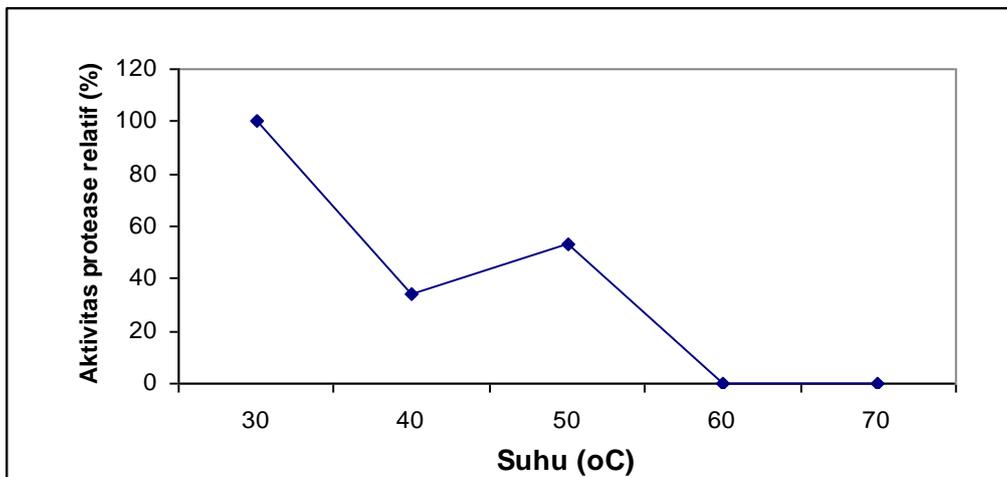
Protease *P. aeruginosa* memiliki pH optimum pada pH 8. Elliott dan Cohen (1986) melaporkan protease *P. aeruginosa* memiliki pH optimum 8-9, sedangkan menurut Rao et al., (1998) protease *P.aeruginosa* aktif pada pH 7-9. Diperkirakan perubahan keaktifan enzim diakibatkan sering adanya ionisasi pada gugus ionik enzim, pada sisi aktifnya atau sisi lain yang secara tidak langsung mempengaruhi sisi aktif. Gugus ionik berperan dalam menjaga konformasi sisi aktif dalam mengikat substrat dan dalam mengubah substrat menjadi produk. Ionisasi juga dapat dialami oleh substrat atau kompleks enzim-substrat, yang juga berpengaruh terhadap aktivitas enzim (Muchtadi et al., 1996).

Suhu optimum

Pada umumnya setiap enzim memiliki aktivitas maksimum pada suhu tertentu, aktivitas enzim akan semakin meningkat dengan bertambahnya suhu sampai suhu optimum tercapai. Setelah itu kenaikan suhu lebih lanjut akan menyebabkan aktivitas enzim menurun. Pengaruh suhu terhadap aktivitas protease ekstrak kasar *P.aeruginosa* terdapat pada Gambar 4.



Gambar 3. Pengaruh pH terhadap aktivitas protease ekstrak kasar



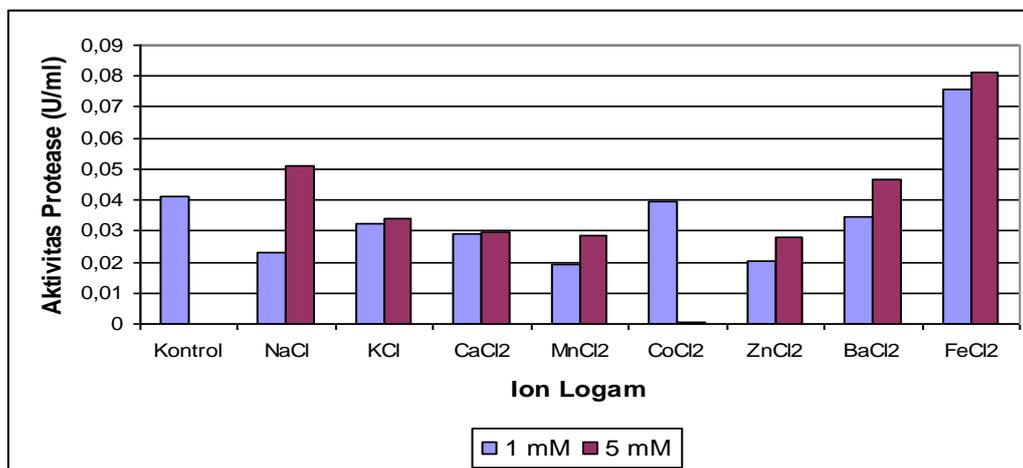
Gambar 4. Pengaruh suhu terhadap aktivitas protease ekstrak kasar

Dari hasil pengukuran aktivitas enzim pada berbagai suhu, suhu optimum protease *P. aeruginosa* adalah dengan suhu 30°C. Suhu optimum protease *P.aeruginosa* yang dilaporkan oleh Engel et al., (1998) adalah 45 °C. Suhu mempengaruhi laju reaksi katalisis enzim dengan dua cara. Pertama, kenaikan suhu akan meningkatkan energi molekul substrat dan pada akhirnya meningkatkan laju reaksi enzim. Peningkatan suhu juga berpengaruh terhadap perubahan konformasi substrat sehingga sisi aktif substrat mengalami hambatan untuk memasuki sisi aktif enzim dan menyebabkan turunnya aktivitas enzim. Kedua, peningkatan energi termal molekul yang membentuk struktur protein enzim itu sendiri akan menyebabkan rusaknya interaksi-interaksi non kovalen (ikatan hidrogen, ikatan van der Waals, ikatan hidrofobik dan interaksi elektrostatik) yang menjaga struktur 3D enzim secara bersama-sama sehingga enzim mengalami denaturasi. Denaturasi menyebabkan

struktur lipatan enzim membuka pada bagian permukaannya sehingga sisi aktif enzim berubah dan mengakibatkan terjadi penurunan aktivitas enzim (Hames dan Hooper, 2000).

Pengaruh ion logam

Beberapa enzim membutuhkan ion logam sebagai kofaktor untuk mendukung efisiensi katalitik enzim. Logam tersebut membantu reaksi katalitik dengan cara mengikat substrat pada sisi pemotongan. Selain berperan dalam pengikatan enzim dengan substrat, beberapa logam juga dapat mengikat enzim secara langsung untuk menstabilkan konformasi aktifnya atau menginduksi formasi situs pengikatan atau situs aktif suatu enzim. Gambar 5 memperlihatkan pengaruh ion logam terhadap aktivitas protease bakteri *P. aeruginosa*.



Gambar 5. Pengaruh ion logam terhadap aktivitas protease *P.aeruginosa*

Aktivator kuat untuk *P. aeruginosa* adalah Fe³⁺ (1 dan 5 mM), ion logam ini dapat meningkatkan aktivitas enzim 2 kali lipat dari kontrol. Sedangkan inhibitor logam yang kuat terhadap protease *P. aeruginosa* adalah Co²⁺ (5 mM). Karena dipengaruhi ion logam maka protease *P. aeruginosa* digolongkan metaloprotease. Fricke et al., (1999) melaporkan protease *P. aeruginosa* termasuk metaloprotease. Protease dari *Pseudomonas pseudomallei* juga digolongkan sebagai metaloenzim (Sexton et al.,1994).

Adanya peningkatan keaktifan karena penambahan logam tertentu menunjukkan bahwa ion logam diperlukan sebagai komponen dalam sisi aktif enzim. Mekanisme ion logam dapat memperbesar aktivitas enzim yaitu (a) menjadi bagian integral dari sisi aktif, (b) merubah konstanta kesetimbangan dari reaksi enzimatik, (c) merubah muatan listrik, (d) mengusir ion inhibitor, (e) menukar ion yang kurang efektif pada sisi aktif enzim atau substrat (Richardson dan Hyslop, 1985).

Sedangkan penghambatan ion logam terhadap aktivitas protease pada konsentrasi tertentu berkaitan dengan kekuatan ion, dimana kekuatan ion itu sendiri mempengaruhi konformasi atau struktur tiga dimensi dari protein enzim atau protein substrat (Suhartono, 1989). Pada konsentrasi tertentu ion logam tertentu dapat bertindak sebagai inhibitor, tetapi dapat juga bertindak sebagai aktivator pada konsentrasi lain (Richardson dan Hyslop, 1985).

Pengaruh inhibitor spesifik

Protease memiliki kemampuan menghidrolisis substrat, maka *Nomenclature Commitee of International Union of Biochemistry and Molecular Biology* menggolongkan enzim protease ke dalam hidrolase. Sedangkan para ahli menggolongkan protease berbeda-beda. Berdasarkan mekanisme reaksi yang dikatalisis, endopeptidase dapat dikelompokkan menjadi empat

yaitu: protease serin, protease aspartat, protease sistein dan protease logam.

Dalam penelitian ini penggolongan protease hasil produksi dilakukan dengan cara mereaksikan dengan senyawa-senyawa inhibitor spesifik. PMSF (*fenil metil sulfonil fluorida*) merupakan inhibitor spesifik untuk protease serin dengan mengubah sisi aktif enzim menjadi derivat fenil metil sulfonil dan EDTA merupakan senyawa pengkelat ion logam. Tabel 2. menunjukkan EDTA dan PMSF menghambat protease *P. aeruginosa* sehingga digolongkan sebagai serin metaloprotease.

Tabel 2. Pengaruh inhibitor spesifik pada protease bakteri *P.aeruginosa*

Inhibitor Spesifik	Konsentrasi	Aktivitas protease relatif (%)
PSMF	1mM	61,3
	5 mM	55
EDTA	1mM	63,4
	5mM	46,25

SDS-PAGE dan Zimogram

Perkiraan berat molekul protease ekstrak kasar

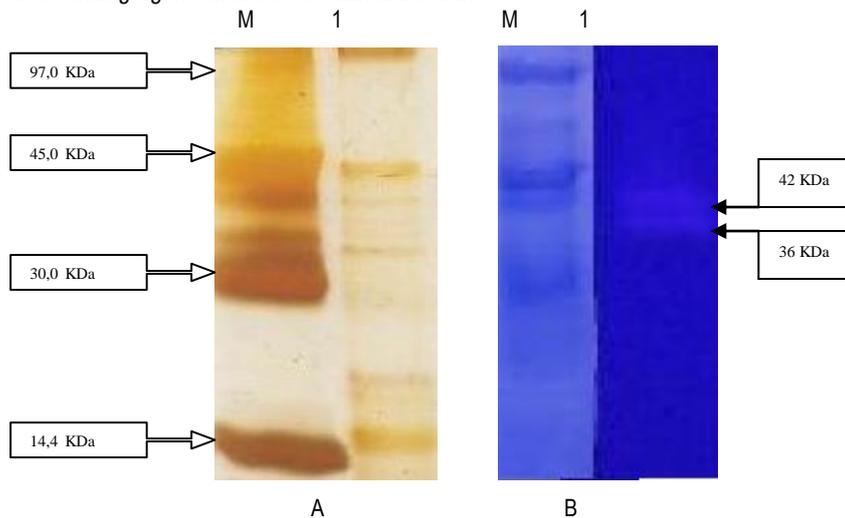
Penentuan berat molekul dilakukan dengan teknik SDS-PAGE (Sodium dodesil sulfat-Poliakrilamida gel elektroforesis), yang merupakan metode yang sudah digunakan secara luas. Pada penelitian ini ada dua macam gel yang digunakan yaitu gel penahan (*resolving gel*) dan gel pemisah (*stacking gel*) yang mengandung akrilamid, SDS, APS dan TEMED. Gel poliakrilamid diperoleh dengan cara polimerisasi akrilamid dengan sejumlah *cross linking agent* metilena bis akrilamid dan

amonium persulfat (APS) sebagai katalisator. Radikal bebas yang terbentuk dari pelarutan ammonium persulfat dalam air akan bereaksi dengan akrilamid membentuk akrilamid aktif yang dapat bereaksi satu sama lain membentuk polimer. Analisis SDS-PAGE pada protease ekstrak kasar didapatkan protease *P. aeruginosa* memiliki 4 pita yang berat molekulnya berkisar antara 13,5 kD sampai dengan 48,5 kD sedangkan dengan analisis zimogram menunjukkan dua pita yang berberat molekul 36 kD dan 42 kD (Gambar 6). Elliott dan Cohen (1986) melaporkan berat molekul protease *P. aeruginosa* adalah 30 kD, sedangkan menurut Rao et al., (1998) berkisar 48-60 kD. Penelitian lainnya adalah protease *Pseudomonas pseudomallei* menunjukkan berat molekul yang sama dengan protease *P. aeruginosa* yang digunakan dalam penelitian ini yaitu 36 kD (Sexon et al., 1994).

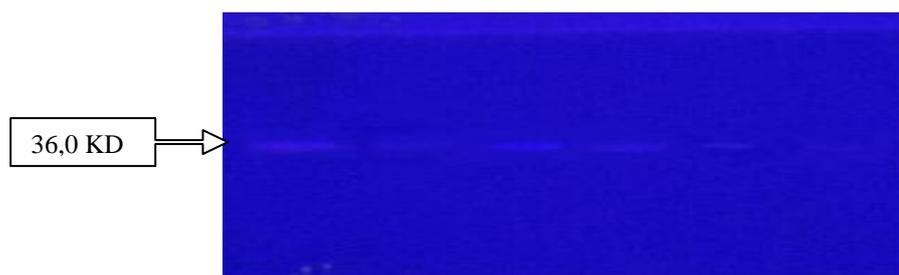
Perkiraan berat molekul protease hasil pemurniaan

Hasil kromatografi kolom diuji aktivitasnya dengan menggunakan zimogram. Substrat yang digunakan dalam zimogram ini adalah kasein Hammersten 2%. Hasil zimogram hasil pemurniaan protease *P.aeruginosa* dapat dilihat pada Gambar 7.

Berdasarkan hasil zimogram didapatkan fraksi yang memiliki protease adalah fraksi 14 sampai 19 dengan berat molekul sekitar 36 kD, sedangkan fraksi 30 menggunakan zimogram ini tidak didapatkan zona bening, hal ini ada hubungannya dengan derajat kemurnian yang menurun atau aktivitasnya sangat kecil.



Gambar 6. Hasil SDS silver staining (A) dan Zimogram (B) aktivitas Protease ekstrak kasar (M=Marker, 1=*P.aeruginosa*)



Gambar 7. Hasil zimogram aktivitas protease *Pseudomonas aeruginosa* hasil kromatografi kolom Sephadex G-100 (Fraksi 14-19).

KESIMPULAN

Protease *Pseudomonas aeruginosa* memiliki aktivitas tertinggi yaitu 0,243 IU/ml setelah diinkubasi selama 48 jam dalam media LB, protease diproduksi seiring dengan pertumbuhan sel dan mencapai aktivitas tertinggi pada fase stasioner. Hasil pemurnian menunjukkan dengan pengendapan amonium sulfat terjadi peningkatan derajat kemurnian dari 1 (ekstrak kasar) menjadi 1,66. Pada tahap pemurnian dengan kromatografi sphadex G-100 didapatkan 3 fraksi yaitu fraksi 14, 17 dan 30, pada tahap ini terjadi peningkatan derajat kemurnian menjadi 2,42 (fraksi 14) dan 1,81 (fraksi 17), sedangkan fraksi 30 terjadi penurunan derajat kemurniannya. Karakterisasi protease *Pseudomonas aeruginosa* memiliki pH optimum 8, suhu optimum pada suhu 30 °C, ion logam Fe^{3+} (1 dan 5 mM) merupakan aktivator kuat dan inhibitor kuat adalah Co^{2+} (5 mM) serta dihambat oleh inhibitor spesifik (PSMF dan EDTA) sehingga protease ini termasuk serin metaloprotease dan berat molekul dengan menggunakan SDS-PAGE dan zimogram adalah sekitar 36 kD.

DAFTAR PUSTAKA

- Adnan, M.1997.** Tehnik Kromatografi untuk Analisa Bahan Makanan. Penerbit Andi. Yogyakarta
- Bergmeyer HU, Bergmeyer J, Graßl M. 1983.** Methods of Enzymatic Analysis. Vol 2. Weinheim : Verlag Chemie. Halm 1007-1009.
- Bradford MM. 1976.** A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye-binding. Anal Biochem 72:234-254.
- Budiarti S, Suhartono M.T. 1999.** Peranan protease pada bakteri patogen. Makalah dipresentasikan Pada Pertemuan Ilmiah Tahunan Perhimpunan Mikrobiologi Indonesia. Padang, 3-4 Agustus 1999.
- Choi NS, Yoon KS, Lee JY, Han KY, Kim SH. 2001.** Comparison of three substrates (casein, fibrin, and gelatin) in zimographic gel. J Biochim Mol Biol 34:531-536.
- Durham D.R. 1990.** The unique stability of *Vibrio proteolyticus* neutral protease under alkaline conditions afford a selective step for purification and use in amino acid-coupling reaction. Appl. Environ. Microbiol. 56:2277-2281.
- Elliott BW Jr, Cohen C. 1986.** Isolation and characterization of a lysine-specific protease from *Pseudomonas aeruginosa*. J Biol Chem. 261(24):11259-65.
- Engel LS, Hill JM, Caballero AR, Green LC, O'Callaghan RJ. 1998.** Protease IV, a unique extracellular protease and virulence factor from *Pseudomonas aeruginosa*. J Biol Chem. 273(27):16792-7.
- Fawzya, Y.N. 2002.** Karakterisasi protease ekstraseluler dari isolat bakteri asal ikan hiu atas (*Carcharhinus limbatus*). Tesis Institut Pertanian Bogor.
- Fricke B, Parchmann O, Kruse K, Rucknagel P, Schierhorn A, Menge S. 1999.** Characterization and purification of an outer membrane metalloproteinase from *Pseudomonas aeruginosa* with fibrinogenolytic activity. Biochim Biophys Acta. 30(3):236-50.
- Hames B.D, Hooper N.M. 2000.** Biochemistry: The instant Notes. Ed. Ke-2. Hongkong:Springer-Verlag. Hal 83-84.
- Harris E.L.V, S. Angal. 1989.** Protein Purification Methods. A Practical approach. IRL Press. Oxford New York Tokyo.
- Hase CC, R Finkelstein. 1993.** Bacterial extracellular zinc-containing metalloprotease. Microbiol Reviews. 57(4):823-837.
- Henderson IR, S Hicks, F Navarro-Garcia, Fnoriega, JP Nataro. 1999.** Characterization of Pic, a secreted protease of *Shigella flexneri* and enteroaggregative *Escherichia coli*. Infect and Immun. 67(11):5587-5596.

- Jawetz E, Melnick J, Adelberg E. 1996.** Medical Microbiology. Alih bahasa Edi Nugroho, R.F. Maulany. Penerbit Buku Kedokteran. Jakarta.
- Laemmli UK. 1970.** Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227:680-685.
- Muchtadi, D, Palupi NS, Astawan M. 1996.** Enzim dalam Industri Pangan. PAU Pangan dan Gizi. Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Qua DV, Simidu U, Taga N. 1981.** Purification and some properties of halophilic protease produced by a moderately halophilic marine *Pseudomonas* sp. Can J. Microbiol. 27:505-510.
- Rao MM, AM Tanksale, MS Gatge, VV Desphande. 1998.** Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. Microbiol. And Mol. Biol. Rev. 62(3):597-635.
- Richardson T, DB Hyslop. 1985.** Enzyme dalam O.R. Fennema (Ed). Food Chemistry. Mac Kerel Bekker, Inc. New York.
- Salyers AA, DD Whitt. 1994.** Bacterial Pathogenesis, A Molecular Approach. Departement of Microbiology. University of Illinois. ASM Press, Washington D.C.
- Sexton MM, Jones AL, Chaowagul W, Woods DE. 1994.** Purification and characterization of protease from *Pseudomonas pseudomellei*. Can J. of Microbiol. 40(11): 903-910.
- Suhartono M.T. 1989.** Enzim dan Bioteknologi. Pusat Antar Universitas IPB-Depdikbud. Bogor.
- Suhartono, M.T. 2000.** Pemahaman Karakteristik Biokimia Enzim Protease dalam Menunjang Industri Berbasis Bioteknologi. Orasi Ilmiah Guru Besar Tetap Dasar-dasar Biokimia Pangan. Fateta IPB. Bogor.
- Thenawijaya, M. 1988.** Dasar-dasar Biokimia. Jilid I, Penerbit Erlangga. Jakarta.
- Teufel P, Gotz F. 1993.** Characterization of an extracellular metalloprotease with elastase activity from *Staphylococcus epidermidis*. J. Bacteriol. 175(13):4218-4224.
- Waturangi DE. 1999.** Purifikasi dan Karakterisasi Protease Ekstraseluler Enteropatogenik *Escherichia coli*. Tesis Institut Pertanian Bogor.