

ISOLASI DAN KARAKTERISASI PROTEASE DARI BAKTERI TANAH RAWA INDRALAYA, SUMATERA SELATAN

[Isolation and Characterization of Proteases from Indralaya Soil Swamp Bacteria, South Sumatera]

Ace Baehaki*, Rinto, dan Arief Budiman

Program Studi Teknologi Hasil Perikanan, Fakultas Pertanian Universitas Sriwijaya

Diterima 25 November 2009 / Disetujui 12 Agustus 2011

ABSTRACT

In an effort of obtaining indigenous protease producing bacteria, screening for bacterial protease was conducted from samples collected from Indralaya soil swamp, South Sumatera. Three of 31 colonies showed high protease activity with proteolytic index >1.00. T1S1 produced enzyme with the highest activity. The crude enzyme activity after 48 hours of incubation was 0.391 IU/ml. The optimum pH of the extracellular proteases from T1S1, T3S2 and T3S3 were 8.0, 8.0, and 7.5, respectively. The optimum temperature of T1S1, T3S2 and T3S3 proteases were 40, 50, and 50°C, respectively. All metal ions tested (Na^+ , K^+ , Mn^{2+} , Zn^{2+} and Fe^{2+}) inhibited proteases except Fe^{2+} which activates the T3S3 protease at 5 mM. EDTA (1 and 5 mM) inhibited all proteases. Study on the effect of metals ion and specific inhibitors indicated that all protease are metalloprotease. Molecular weights was determined using SDS-PAGE and zymogram technique. The molecular weight of T1S1 proteases was 121 kD, T3S2 proteases were 51, 71, and 119 kD whereas T3S3 proteases were 49, 70, and 116 kD.

Key words: Protease, isolation, characterization, bacteria

PENDAHULUAN

Protease merupakan satu diantara tiga kelompok enzim komersial yang diperdagangkan dengan nilai mencapai 60% total penjualan enzim yang aplikasinya sebagai katalisator hayati, digunakan didalam industri pangan, detergen dan kulit (Suhartono, 2000). Protease memegang peran utama didalam banyak fungsi hayati, mulai dari tingkat sel, organ sampai organisme, yaitu dalam melangsungkan reaksi metabolisme, fungsi regulasi dan reaksi-reaksi yang menghasilkan sistem berantai (*cascade*) untuk menjaga normal homeostatis maupun kondisi patofisiologis abnormal serta proses kematian sel terencana (Rao *et al.*, 1998).

Dalam dasa warsa terakhir ini terjadi peningkatan lebih pesat dalam pemakaian enzim karena sifatnya yang efisien, selektif, mengkatalisis reaksi tanpa produk samping dan ramah lingkungan. Salah satu sumber protease adalah mikroba. Protease mikroba dapat diklasifikasikan sebagai protease serin (E.C. 3.4.21), protease sulfhidril (E.C.3.4.22), protease asam (E.C.3.4.23) dan metaloprotease (E.C.3.4.24). Beberapa mikroorganisme yang telah diketahui sebagai penghasil protease untuk aplikasi komersial adalah *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Pyrococcus*, *Termonospora*, *Rhizopus*, *Mucor*, *Endothia* and *Aspergillus* (Rao *et al.*, 1998; Ward *et al.*, 2009). Begitu pentingnya enzim ini sehingga perlu mencari enzim dari mikroba dengan habitat yang berbeda sehingga diharapkan enzim yang dihasilkan memiliki karakter yang unik untuk memenuhi kebutuhan industri baik industri produk pertanian, kimia dan medis. Salah satu sumber enzim ini adalah mikroba dari rawa Indralaya, Sumatera Selatan dimana daerah ini memiliki rawa

yang luas yang memungkinkan terdapatnya beranekaragam mikroba yang berpotensi menghasilkan enzim.

METODOLOGI

Bahan dan alat

Bahan utama adalah tiga isolat bakteri yang memiliki indeks proteolitik yang tinggi dari hasil pemilihan dari tanah rawa Indralaya, Sumatera Selatan. Bahan kimia penting yang digunakan adalah kasein hammersten (merck), standar L-tirosin (merck), pereaksi elektroforesis SDS-PAGE dan zimogram. Alat utama yang digunakan adalah sentrifugasi dingin model MRX-152, spektrofotometer Pharmacia LKB-Novaspec II dan inkubator model Certomat WR.

Isolasi mikroba rawa

Isolasi mikroba dilakukan dengan mengambil sampel tanah rawa dari daerah Indralaya Sumatera Selatan secara aseptik. Sampel sebanyak 0,1 ml ditumbuhkan dalam cawan petri dengan media *Luria Bertani Agar* (LBA) yang sebelumnya dilakukan pengenceran dari 10^{-1} sampai 10^{-5} untuk mendapatkan biakan bakteri murni, selanjutnya diinkubasi pada suhu 37°C.

Uji proteolitik

Uji proteolitik dilakukan dengan menggunakan media *skim milk agar* (SMA) yaitu media LBA yang ditambah dengan susu skim 2%. Isolat ditusukkan dalam media SMA, lalu diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Aktivitas proteolitik dari bakteri rawa yang ditumbuhkan pada media SMA ditunjukkan dengan terlihatnya areal bening yang muncul di sekitar koloni yang terbentuk. Indeks proteolitik dihitung dengan cara mengukur diameter areal bening dan diameter koloni bakteri. Perhitungan

*Korespondensi Penulis :
Email : ace76_none@yahoo.com

indeks proteolitik adalah perbandingan diameter areal bening dengan diameter koloni bakteri.

Penentuan waktu optimum produksi protease

Bakteri diinokulasi sebanyak 1-2 ose pada media *Luria Bertani Broth* (LB) dengan komposisi tripton 1%, NaCl 1% dan *yeast extract* 0,5%. Proses diawali dengan penentuan umur prekultor produksi protease (dalam media LB). Produksi protease dilakukan pada suhu 37 °C. 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% dari jumlah media kemudian ditambahkan pada media LB yang baru sebagai media untuk memproduksi protease. Pengambilan sampel dilakukan setiap 8 jam selama 64 jam dan diukur nilai OD, aktivitas protease dan kadar protein. Ekstraksi enzim protease dilakukan dengan cara sentrifugas media pertumbuhan bakteri dengan kecepatan 3000 rpm selama 15 menit pada suhu 4°C. Dengan teknik ini, sel akan mengendap oleh adanya gaya gravitasi sedangkan enzim tetap terdapat pada supernatan. Supernatan sebagai sampel diuji aktivitas protease dan kadar proteinnya.

Pengukuran aktivitas protease

Aktivitas protease diukur dengan metode Bergmeyer *et al.* (1983) dengan menggunakan substrat kasein Hammerstein 2% (b/v). Prosedur pengujian aktivitas protease adalah: mereaksikan 0,2 ml enzim dengan 1 ml substrat kasein Hammerstein dan 1 ml bufer. Campuran reaksi diinkubasi pada suhu 37 °C selama 10 menit, kemudian ditambahkan 0,2 M TCA. Selanjutnya larutan diinkubasi kembali pada suhu 37 °C selama 10 menit, dilanjutkan dengan sentrifugasi pada kecepatan 5000 rpm 10 menit. Dari campuran hasil sentrifugasi diambil supernatan dan ditambahkan ke dalam tabung reaksi yang berisi Na₂CO₃ 0,4 M kemudian ditambahkan pereaksi folin Ciocalteu (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.

Pengukuran kadar protein

Kadar protein ditentukan dengan metode Bradford (1976) menggunakan *Bovine Serum Albumin* (BSA) Fraction V sebagai standar protein. Sebanyak 100 mg BSA ditimbang dan ditambahkan 25 ml aquades. Larutan kemudian dikocok pelan-pelan, setelah larut, diencerkan sampai 50 ml. Konsentrasi akhir larutan stok untuk standar ini adalah 2 mg/ml. Kemudian sederetan larutan standar dibuat dengan menggunakan larutan stok di atas. Langkah selanjutnya adalah memipet masing-masing larutan sampel dalam tiap tabung sebanyak 0,1 ml dan sebanyak 5 ml pereaksi Bradford ditambahkan ke dalam masing-masing tabung reaksi. Blanko dibuat dengan cara mencampurkan 0,1 ml dan direaksikan dengan 5 ml pereaksi Bradford. Setelah sekitar 5 menit, masing-masing campuran reaksi diukur absorbansinya pada $\lambda = 595$ nm.

Karakterisasi protease

Uji karakterisasi protease yang meliputi pengaruh pH (6,5; 7; 7,5; 8; 8,5; 9), pengaruh suhu (30; 40; 50; 60; 70 °C), ion logam (NaCl; KCl; MnCl₂; ZnCl₂ dan FeCl₂) dan inhibitor spesifik

(EDTA) dilakukan menggunakan buffer Tris-HCl. Konsentrasi ion logam dan inhibitor spesifik yang digunakan masing-masing adalah 1 dan 5 mM.

Penentuan berat molekul

Penentuan berat molekul dilakukan menggunakan SDS PAGE (Laemmli 1970) dan zimogram (Choi *et al.*, 2001). Pada metode SDS PAGE, pewarnaan dilakukan dengan *silver staining* yaitu : gel direndam dalam larutan fiksasi (25% metanol dan 12% asam asetat) selama 1 jam kemudian direndam dalam 50% etanol selama 20 menit, kemudian diganti dengan 30% etanol selama 2 x 20 menit, larutannya diganti dengan *enhancer* kemudian dicuci dengan akuadestilata, setelah dicuci ditambahkan larutan silver nitrat selama 30 menit kemudian dicuci lagi dengan akuadestilata 2 x 20 detik dan ditambahkan larutan campuran Na₂CO₃ dan formaldehida dan terakhir dengan larutan fiksasi. Prosedur zimogram adalah: gel akrilamid 8% dikopolimerisasi dengan substrat kasein 2%, selanjutnya gel dilakukan elektroforesis, gel direndam dengan Triton X-100 2,5% selama 1 jam dan dilakukan inkubasi dalam buffer Tris-Cl 10 mM, pH 8 selama 24 jam. Setelah diinkubasi gel diwarnai dengan pewarna comassie brilliant blue R-250.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Sifat proteolitik isolasi bakteri penghasil protease

Pada proses isolasi didapatkan 31 isolat, yang kemudian diuji indeks proteolitiknya. Aktivitas proteolitik dari bakteri rawa yang ditumbuhkan pada media SMA terlihat dari adanya areal bening di sekitar koloni yang terbentuk. Indeks proteolitik bakteri dari tanah (lumpur) rawa Indralaya yang mempunyai nilai lebih besar dari 1 dipilih untuk dianalisis aktivitas proteasenya (Tabel 1).

Tabel 1. Hasil uji proteolitik bakteri dari tanah rawa

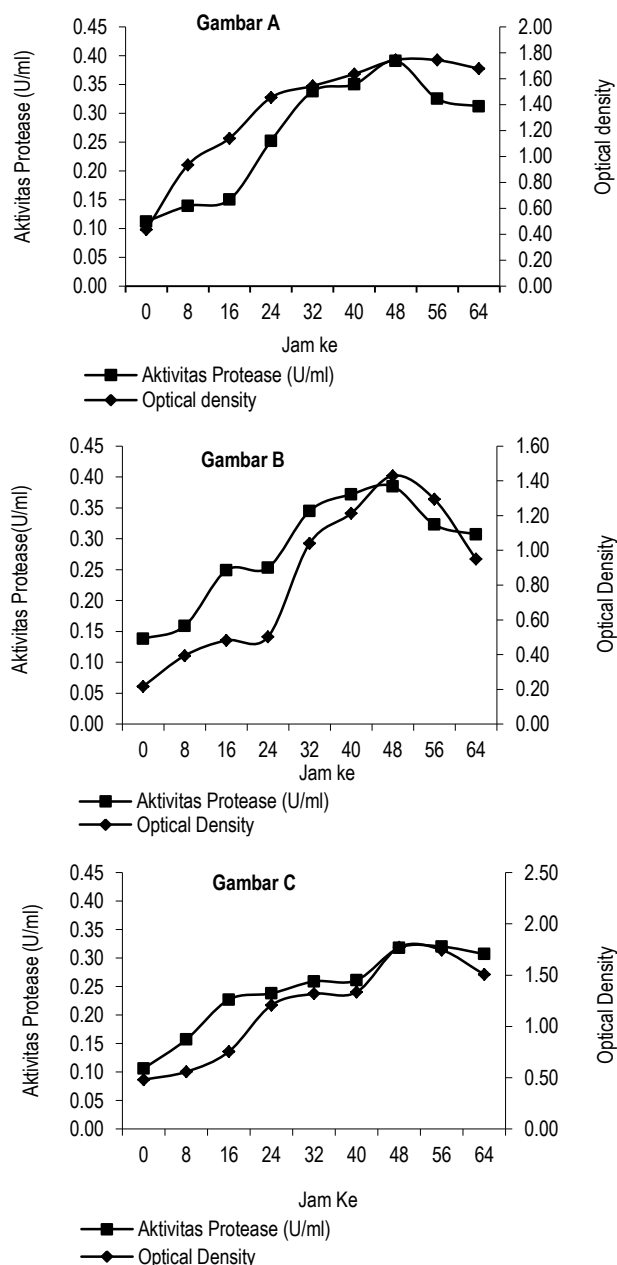
Isolat	Indeks proteolitik
T1S1	1,1
T3S3	1,5
T3S2	2,0

Waktu optimum produksi protease

Hasil waktu optimum produksi protease dari isolat bakteri tanah rawa ini dapat dilihat pada Gambar 1.

Produksi protease dari bakteri air rawa memiliki waktu produksi optimum untuk isolat T1S1 dan T3S2 adalah 48 jam dan untuk isolat T3S3 adalah 56 jam pada suhu 37 °C. Protease isolat T1S1 memiliki aktivitas tertinggi (0,391 U/ml) setelah diinkubasi selama 48 jam dalam media LB, protease diproduksi seiring dengan pertumbuhan sel dan mencapai aktivitas tertinggi pada fase stasioner.

Gambar 1 menunjukkan bahwa protease isolat T3S2 memiliki aktivitas tertinggi (0,385 U/ml) setelah diinkubasi selama 48 jam pada suhu 37°C, protease diproduksi pada fase menjelang penurunan sel bakteri. Untuk protease isolat T3S3 memiliki waktu produksi optimum selama 56 jam pada 37 °C dengan aktivitas tertinggi 0,320 U/ml.



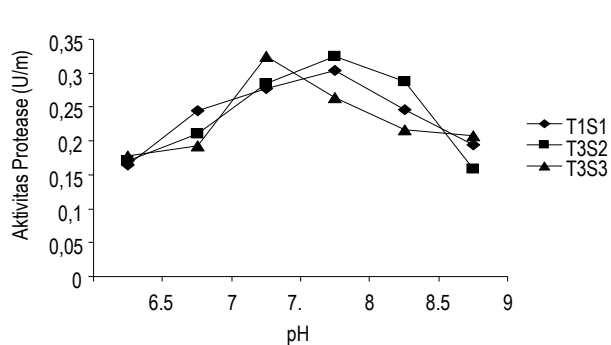
Gambar 1. Waktu produksi optimum protease dari isolat bakteri tanah rawa (A= isolat T1S1, B=T3S2 dan C=T3S3)

Penelitian lain pada produksi protease bakteri didapatkan bakteri dengan waktu produksi protease optimum yang sama dengan protease isolat T1S1 dan T3S2 (48 jam) adalah *Bacillus subtilis* PE-11 (Adinarayana *et al.*, 2003) dan *Bacillus licheniformis* Lbbl-11 (Olajuyigbe, Ajele, 2008).

Karakter ekstrak kasar protease

Pengaruh pH

Profil aktivitas pH dari suatu enzim menggambarkan pH pada saat gugus pemberi atau penerima proton yang penting pada sisi katalitik enzim berada dalam tingkat ionisasi yang diinginkan. Gambar 2 memperlihatkan pH optimum aktivitas protease isolat bakteri tanah rawa.



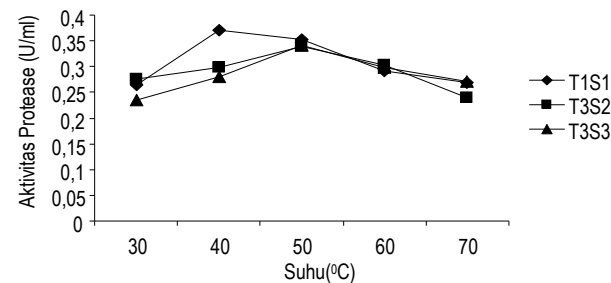
Gambar 2. Pengaruh pH pada aktivitas protease dari isolat bakteri tanah rawa

Protease dari isolat T1S1 dan T2S3 memiliki pH optimum 8 sedangkan isolat T3S3 memiliki pH optimum 7,5. Vazquez *et al.* (2008) melaporkan protease *Pseudoalteromonas* sp strain P96-47 yang berasal dari laut Antartik memiliki pH optimum 7 - 9. Protease dari bakteri laut *Alteromonas* sp strain O-7 memiliki pH optimum 10 (Miyamoto *et al.*, 2002). Protease bakteri *Pseudomonas aeruginosa* memiliki pH yang sama dengan isolat T1S1 dan T3S2 yaitu pada pH 8 (Baehaki *et al.*, 2008). Diperkirakan perubahan keaktifan enzim diakibatkan oleh 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 ekstrim, enzim dapat mengalami denaturasi akibat gangguan terhadap berbagai interaksi non kovalen yang menjaga kestabilan struktur 3 dimensi enzim (Hames, Hooper, 2000).

Pengaruh suhu

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 lebih lanjut akan menyebabkan aktivitas enzim menurun. Pengaruh suhu terhadap aktivitas protease dari isolat bakteri tanah rawa terdapat pada Gambar 3.



Gambar 3. Pengaruh suhu pada aktivitas protease dari isolat bakteri tanah rawa

Suhu optimum protease isolat T1S1 dan T3S3 adalah 50°C, sedangkan isolat T2S3 memiliki suhu optimum 40°C. Hasil tersebut menunjukkan bahwa protease yang berasal dari isolat T1S1 dan T3S3 bersifat tahan panas sehingga dapat

diaplikasikan pada proses produksi yang menggunakan suhu 50°C. Penelitian protease bakteri lain menunjukkan bakteri yang berasal dari perairan memiliki suhu optimum yang tinggi, yaitu protease bakteri laut *Alteromonas* sp strain O7 memiliki suhu optimum 60°C (Miyamoto *et al.*, 2002), protease *Chromohalobacter* memiliki suhu optimum 75 °C (Vidyasagar *et al.*, 2009), dan protease *Pseudoalteromonas* sp strain P96-47 dari laut Artartik yang memiliki suhu optimum 45°C (Vazquez *et al.*, 2008).

Gambar 3 menunjukkan aktivitas protease semakin meningkat dengan bertambahnya suhu sampai suhu optimum tercapai, setelah itu kenaikan lebih lanjut akan menyebabkan aktivitas protease menurun. Pada suhu yang lebih rendah dari suhu optimum, aktivitas enzim juga rendah, hal ini disebabkan rendahnya energi aktivasi yang tersedia.

Energi tersebut dibutuhkan untuk menciptakan kondisi tingkat kompleks aktif, baik dari molekul enzim maupun dari molekul substrat. 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 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.

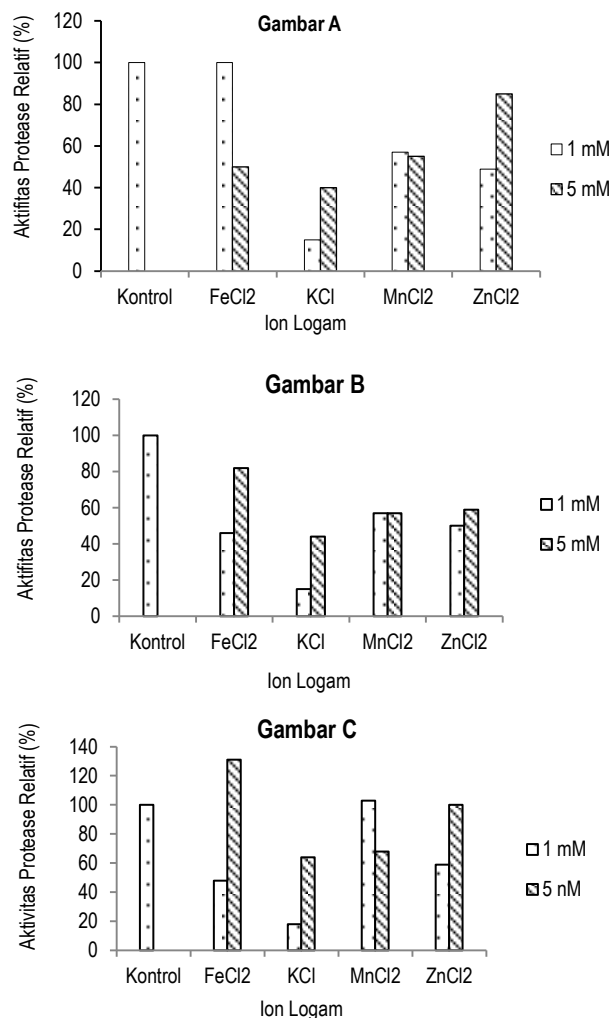
Denaturasi menyebabkan struktur lipatan enzim membuka pada bagian permukaannya sehingga sisi aktif enzim berubah dan mengakibatkan terjadi penurunan aktivitas enzim (Hames, Hooper, 2000).

Pengaruh ion logam dan inhibitor spesifik

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 4 memperlihatkan pengaruh ion logam terhadap aktivitas protease isolat bakteri tanah rawa.

Semua ion logam yang ditambahkan berfungsi inhibitor kecuali Fe^{2+} (5 mM) sebagai aktivator terhadap protease T3S3 (Gambar 4C). Sebagian besar ion logam yang ditambahkan dapat menghambat aktivitas protease. Adanya 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). Dari pengaruh ion logam terhadap aktivitas protease hanya ion logam Fe^{2+} (5 mM) sebagai aktivator terhadap protease T3S3.



Gambar 4. Pengaruh ion logam pada protease dari isolat bakteri tanah rawa (A= isolat T1S1, B=T3S2 dan C=T3S3)

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. Pada konsentrasi tertentu ion logam tertentu dapat bertindak sebagai inhibitor, tetapi dapat juga bertindak sebagai aktivator pada konsentrasi lain (Richardson, Hyslop, 1985).

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. Adapun pengaruh inhibitor spesifik EDTA pada protease isolat bakteri tanah rawa terdapat pada Tabel 2.

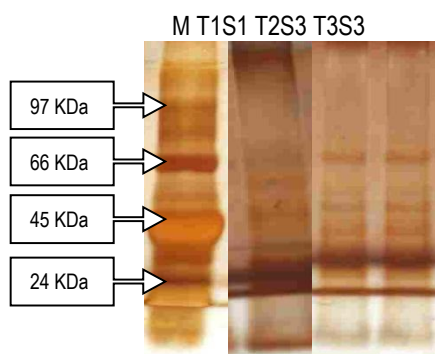
Tabel 2. Pengaruh inhibitor spesifik pada protease isolat bakteri tanah rawa

Jenis bakteri	Aktivitas residu (%)	
	EDTA (mM)	
	1	5
Kontrol	100	100
Isolat T1S1	16,4	10,2
Isolat T3S2	19,8	0
Isolat T3S3	22,9	0

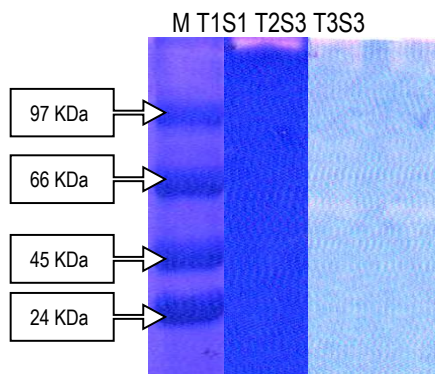
Tabel 2 menunjukkan EDTA (1 dan 5 mM) dapat menghambat protease dari isolat bakteri tanah rawa hal ini dimungkinkan karena EDTA mengkelat logam-logam yang berperan penting menjaga stabilitas serta logam yang berperan sebagai kofaktor enzim protease. Hal ini juga diperkuat dengan pemberian ion logam yang menunjukkan dengan pemberian ion logam dapat mempengaruhi aktivitas protease. Karena protease dari bakteri tanah rawa ini dipengaruhi oleh ion logam dan dihambat oleh EDTA, protease ini digolongkan sebagai metaloprotease. Protease bakteri lain dari perairan yang termasuk metaloprotease adalah *Aeromonas hydrophilla* (Baehaki *et al.*, 2004) dan *Alteromonas* sp O-7 (Miyamoto *et al.*, 2002).

Berat molekul dengan SDS PAGE dan Zimogram

Penentuan berat molekul dilakukan dengan teknik SDS-PAGE (*Sodium dodesil sulfat-Poliakrilamide gel elektroforesis*) dan Zimogram merupakan metode yang sudah digunakan secara luas. Hasil SDS-PAGE dan Zimogram protease isolat bakteri tanah rawa dapat dilihat pada Gambar 5.



Gambar A



Gambar B

Gambar 5. Hasil SDSPAGE dan Zimogram protease isolat bakteri tanah rawa (M=marker, A=SDS-PAGE, B=Zimogram)

Analisis SDS-PAGE pada protease ekstrak kasar didapatkan protease isolat T1S1 memiliki 7 pita dengan berat molekul 19-127 kD, isolat T3S2 memiliki 9 pita dengan berat molekul antara 18 kD sampai dengan 119 kD dan isolat T3S3 memiliki 8 pita dengan berat molekul 18 kD sampai dengan 119 kD. Analisis zimogram pada protease ekstrak kasar didapatkan protease isolat T1S1 memiliki 1 pita dengan berat molekul 121 kD, isolat T3S2 memiliki 3 pita dengan berat molekul masing-masing 51, 71 dan 119 kD dan isolat T3S3 juga memiliki 3 pita dengan berat molekul masing-masing 49, 70 dan 116 kD. Bakteri TPS-2 yang diisolasi dari kawah Tangkupan Perahu memiliki 2 pita dengan berat molekul 80 kD dan 45 kD (Wahyuntari *et al.*, 2000). Berat molekul dari metaloprotease dari bakteri *Alteromonas* sp strain O-7 adalah 56 kD (Miyamoto *et al.*, 2002) dan metaloprotease dari *Helicobacter pylori* memiliki berat molekul yang tinggi yaitu 200 kD (Windle dan Kelleher, 1997).

KESIMPULAN

Protease isolat T1S1 dan T3S2 memiliki waktu produksi optimum protease adalah 48 jam, sedangkan waktu produksi optimum protease isolat T3S3 adalah 56 jam. pH optimum protease isolat T1S1 dan T3S2 adalah 8, sedangkan T3S3 adalah 7,5. Suhu optimum protease T1S1 adalah 40 °C sedangkan isolat T3S2 dan T3S3 adalah 50 °C. Pengaruh ion logam terhadap aktivitas protease menunjukkan semua ion logam yang yang ditambahkan berfungsi inhibitor kecuali Fe^{2+} (5 mM) terhadap protease isolat T3S3. Karena dipengaruhi ion logam maka protease digolongkan metaloprotease. EDTA dapat menghambat protease isolat bakteri tanah rawa ini sehingga memperkuat hasil pengaruh ion logam bahwa protease isolat bakteri tanah rawa termasuk metaloprotease. Analisis SDS-PAGE pada protease ekstrak kasar didapatkan protease isolat T1S1 memiliki 7 pita dengan berat molekul 19-127 kD, isolat T3S2 memiliki 9 pita dengan berat molekul antara 18 - 119 kD dan isolat T3S3 memiliki 8 pita dengan berat molekul 18 - 119 kD. Analisis Zimogram pada protease ekstrak kasar didapatkan protease isolat T1S1 memiliki 1 pita dengan berat molekul 121 kD, isolat T3S2 memiliki 3 pita dengan berat molekul 51, 71 dan 119 kD dan isolat T3S3 juga memiliki 3 pita dengan berat molekul 49, 70 dan 116 kD.

UCAPAN TERIMAKASIH

Peneliti berterima kasih kepada Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi Depdiknas yang telah membiayai penelitian ini melalui program Hibah Bersaing XVI tahun 2008.

DAFTAR PUSTAKA

Adinarayana K, Sllaiah P, Prasad DS. 2003. Production and partial characterization of thermostable serine alkaline protease from a newly isolated *Bacillus subtilis* PE-11. AAPS Pharm Sci., Tech 4:E56-64.

- Baehaki A, Suhartono MT, Palupi NS, Nurhayati T. 2008. Purifikasi dan karakterisasi protease dari bakteri patogen *Pseudomonas aeruginosa*. J Teknol dan Industri Pangan, 19(1): 80-86.
- Baehaki A, Suhartono MT, Nurhayati T. 2004. Karakterisasi Protease dari bakteri patogen ikan *Aeromonas hydrophilla*. Buletin Teknol Hasil Perikanan 8(2):60-72.
- Bergmeyer HU, Bergmeyer J, Graßl M. 1983. Methods of Enzymatic Analysis. Ed.ke-2. Weinheim : Verlag Chemie.
- 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.
- Choi NS, Yoon KS, Lee JY, Han KY, Kim SH. 2001. Comparison of three substrates (casein, fibrin, and gelatin) in zymographic gel. J Biochim Mol Biol 34:531-536.
- Hames BD, Hooper NM. 2000. Biochemistry: The Instant Notes. Ed.ke-2. Hongkong:Springer-Verlag.
- Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural protein during the assembly of the heat of bacteriophage T4. Nature, 227:680-685.
- Miyamoto K, Tsujibo H, Nukui E, Itoh H, Kaidzu Y, Inamori Y. 2002. Isolation and characterization of the genes encoding two metalloproteases (MprI and MprII) from a marine bacterium, *Alteromonas* sp. strain O-7. Biosci Biotechnol Biochem 66(2):416-21.
- Muchtadi D, Palupi NS, Astawan M. 1996. Enzim dalam Industri Pangan. Bogor: PAU Pangan dan Gizi IPB.
- Olajuyigbe FM, Ajele JO. 2008. Some properties of extracellular protease from *Bacillus licheniformis* Lbbl-1 isolated from 'iru', a traditionally fermented African locust bean condiment. Glob. J Biotechnol Biochem 3 (1): 42-46.
- Rao MM, Tanksale AM, Gatge MS, Desphande VV. 1998. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. Microbiol And Mol Biol Rev 62(3):597-635.
- Richardson T, Hyslop DB. 1985. Enzyme. Dalam: Fennema, O.R (Ed). Food Chemistry. New York: Mac Kerel Bekker.
- Suhartono MT. 1989. Enzim dan Bioteknologi. Bogor: Pusat Antar Universitas Bioteknologi IPB-Depdikbud.
- Suhartono MT. 2000. Pemahaman Karakteristik Biokimia Enzim Protease dalam Menunjang Industri Berbasis Bioteknologi. Buku Orasi Ilmiah Guru Besar Ilmu Dasar-Dasar Biokimia Dasar. Fateta IPB. Bogor.
- Vázquez SC, Hernández E, Cormack WPM. 2008. Extracellular proteases from the Antarctic marine *Pseudoalteromonas* sp. P96-47 strain. Revista Argentina de Microbiologia 40:63-71.
- Vidvasagar M, Prokash S, Mahajan V, Shouche YS, Screemulu K. 2009. Purification and Characterization of an extreme halothermophilic protease from a halophilic bacterium *Chromohalobacter* sp TVSP101. Braz. J Microbiol 40(1).
- Wahyuntari B, Suhartono MT, Pyun Y. 2000. Properties of extracellular protease from an extreme thermophilic microorganism isolated from Tangkupan Prahua crater. Hayati 7(1): 6-10.
- Ward OP, Rao MB, Kulkarni A. 2009. Proteases production. Appl. Microbiol. Industrial 495-511.
- Windle HJ, Kelleher D. 1997. Identification and characterization of a metalloprotease activity from *Helicobacter pylori*. Infect Immun 65(8): 3132 - 3137.