

Isolation of proteolytic bacteria from preserved skin in the warehouse of Politeknik ATK Yogyakarta

Isolasi Bakteri Proteolitik dari Gudang Penyimpanan Kulit Politeknik ATK Yogyakarta

Atiqa Rahmawati¹, Ragil Yuliatmo^{1*}, R.L.M Satrio Ari Wibowo¹, Dwi Wulandari¹

¹ Department of Leather Processing Technology, Politeknik ATK Yogyakarta, 55188, Special District of Yogyakarta, Indonesia

* Corresponding author : ragilyuliatmo@atk.ac.id

Abstract

Animal skin naturally contains various types of microorganisms. Microorganisms found in animal skins are able to reproduce quickly because animal skins contain a source of nutrients, high water content, pH and appropriate temperature in the tanning environment. Preserved skin in the Politeknik ATK Yogyakarta warehouse has accumulated due to the Covid-19 pandemic and it was unresolved problem. Utilization of preserved skin that has accumulated by isolating the bacteria found on the skin. One of the bacteria found on the skin is proteolytic bacteria, where proteolytic bacteria can produce protease enzymes. Protease enzymes have an important role in the eco-friendly tanning process. The purpose of this study was to isolate proteolytic bacteria that produce protease enzymes from piles of cow, goat and sheep skins that had been stored by the salting method for one year in the storage warehouse. The isolation process will be carried out on nutrient agar media and selective media, while the bacterial activity test in degrading protein is indicated by the presence of a halo zone. The results obtained from the study of isolation of proteolytic bacteria from the skin at the Politeknik ATK Yogyakarta Warehouse, showed that there was proteolytic activity which was indicated by the formation of a clear zone on the bacterial isolates taken from the salt preserved skin at the Politeknik ATK Yogyakarta Warehouse. The results of bacterial isolates that had a fairly wide clear zone were isolates A, C, D, E, and O. While isolate L did not show proteolytic activity. Optimal conditions for proteolytic propagation are at pH 7 and a maximum incubation time of 48 hours

Keyword: Bacteria on the skin; Bacterial isolation; Proteolytic; protease.

Intisari

Kulit hewan secara alami mengandung berbagai macam tipe mikroorganisme. Mikroorganisme yang terdapat pada kulit hewan mampu berkembang biak dengan cepat dikarenakan pada kulit hewan terdapat sumber nutrisi, berkadar air tinggi, pH dan suhu yang sesuai di lingkungan penyamakan. Kulit awetan di gudang

penyimpanan kulit Politeknik ATK yang menumpuk akibat Pandemi Covid-19 menjadi masalah yang belum terselesaikan. Pemanfaatan kulit awetan yang menumpuk dengan cara mengisolasi bakteri yang terdapat pada kulit tersebut. Salah satu bakteri yang terdapat pada kulit yaitu bakteri proteolitik, dimana bakteri proteolitik dapat menghasilkan enzim protease. Enzim protease mempunyai peranan penting dalam proses penyamakan kulit yang ramah lingkungan. Tujuan dari penelitian ini yaitu mengisolasi bakteri proteolitik penghasil enzim protease dari tumpukan kulit sapi, kambing dan domba yang telah tersimpan dengan metode penggaraman selama satu tahun di gudang penyimpanan Politeknik ATK Yogyakarta. Proses isolasi akan dilakukan pada media nutrisi agar dan media selektif, sedangkan uji Aktivitas bakteri dalam mendegradasi protein ditunjukkan dengan adanya zona halo. Hasil yang didapatkan dari penelitian isolasi bakteri proteolitik dari kulit di Gudang Politeknik ATK Yogyakarta yaitu terdapat aktivitas proteolitik yang ditandai dengan terbentuknya zona bening pada isolat bakteri yang diambil dari kulit awetan garam di gudang Politeknik ATK. Hasil isolat bakteri yang mempunyai zona bening cukup luas yaitu pada isolat A,C, D,E, dan O. Sedangkan isolat L tidak menunjukkan aktivitas proteolitik. Kondisi optimal perkembangbiakkan proteolitik yaitu pada pH 7 dan waktu inkubasi maksimal 48 jam

Keyword: Bakteri pada kulit; Isolasi bakteri; Proteolitik; Protease.

Pendahuluan

Kulit hewan secara alami mengandung berbagai macam tipe mikroorganisme. Mikroorganisme yang terdapat dalam kulit hewan dapat berupa mikroorganisme yang hidup alami atau mikroorganisme yang didapat dari lingkungan. Mikroorganisme yang terdapat pada kulit hewan mampu berkembang biak dengan cepat dikarenakan pada kulit hewan terdapat sumber nutrisi, berkadar air tinggi, pH dan suhu yang sesuai di lingkungan penyamakan. Umumnya mikroorganisme dapat diisolasi dari kulit mentah, kulit setelah proses pengawetan, dan kulit yang telah melalui berbagai tahap proses penyamakan kulit [1]. Kulit merupakan media yang sangat baik untuk pertumbuhan mikrobial khususnya jamur. Jamur memiliki kemampuan untuk mengeluarkan enzim protease, pepsin, dan renin. Beberapa jenis jamur yang dapat diisolasi dari kulit setengah jadi yaitu *Aspergillus terreus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus fumigatus*, *Penicillium batasanum*, *Penicillium citrinum*, *Altemia spp.* dan *Cladosporium spp.* [2]. Beberapa cara untuk menangani tumbuhnya jamur pada kulit mentah di gudang penyimpanan yaitu dengan cara penggaraman, ataupun menggunakan cara mengvakumkan kulit [3]. Akan tetapi kulit yang telah diawetkan masih dapat ditumbuhi oleh bakteri maupun jamur, dikarenakan suhu dan lama penyimpanan. Pandemi Covid -19 yang berlangsung hampir 2 tahun menyebabkan kulit awetan yang berada di Gudang TUK membusuk sehingga menyebabkan bau yang tidak sedap.

Pemanfaatan kulit awetan yang menumpuk dan hampir membusuk di Gudang TUK yaitu salah satunya dengan cara mengisolasi mikrobial yang terdapat pada kulit tersebut. Salah satu bakteri yang terdapat pada kulit yaitu bakteri proteolitik, dimana bakteri proteolitik dapat menghasilkan enzim protease. Enzim protease

mempunyai peranan penting dalam berbagai fungsi biologi dimulai dari tingkat sel, organ hingga organisme yang dinamakan sebagai reaksi metabolik dan fungsi regulator [4] selain itu protease juga bermanfaat dalam industri pengolahan pangan seperti susu, roti dan sebagai pelunak daging (Harun et al. 2018). Selain itu protease sangat berperan penting dalam proses penyamakan kulit yang ramah lingkungan, dikarenakan protease dapat mengurangi limbah kimia seperti H₂S, amonia dan lemak [5].

Dari permasalahan di atas, tujuan dari penelitian ini yaitu mengisolasi bakteri proteolitik penghasil enzim protease dari tumpukan kulit sapi, kambing dan domba yang telah tersimpan dengan metode penggaraman selama satu tahun di gudang penyimpanan Politeknik ATK Yogyakarta. Diharapkan isolasi bakteri proteolitik yang dilakukan dapat menjadi salah satu alternatif pemanfaatan kulit yang disimpan dalam gudang penyimpanan Politeknik ATK Yogyakarta.

Metode Penelitian

Alat dan Bahan

Peralatan yang digunakan yaitu neraca analitik, desikator, autoklaf, incubator, laminar enkas, *shaker*, Bunsen, jarum ose dan peralatan gelas. Bahan yang digunakan yaitu beef extract, yeast extract, peptone extract, NaCl, Nutrient agar, Skim Milk Agar, aquadest.

Metode

Pembuatan Media

- a. Pembuatan media nutrien broth yaitu menimbang 1 gram beef extract, 2 gram yeast extract, 5 gram peptone extract, 5 gram NaCl, kemudian dilarutkan dalam aquadest 1000 ml. Diaduk sampai homogen, kemudian pH diatur pada pH 7 - 8. Setelah itu media dipanaskan hingga mendidih dan disterilkan di dalam autoklaf selama 15 menit (kondisi operasi T = 121 °C dan P = 2 atm) [6]
- b. Pembuatan Nutrient Agar (NA), menimbang 20 gram NA dan dilarutkan dalam aquadest 1000 ml. Kemudian media didihkan dengan menggunakan hotplate. Media yang telah didihkan disterilisasi dengan menggunakan autoklaf selama 15 menit (kondisi operasi T = 121 °C dan P = 2 atm) (merck microbiology manual, 2008).
- c. Pembuatan Skim Milk Agar (SMA), Pembuatan Skim milk agar sebanyak 100 ml. Langkah pertama yaitu menimbang NA sebesar 2 gram, kemudian dilarutkan dalam aquadest 50 ml. NA didihkan menggunakan hotplate dan disterilkan menggunakan autoklaf selama 15 menit (kondisi operasi T = 121 °C dan P = 2 atm). Langkah kedua yaitu menimbang skim milk sebanyak 1,5 gram (1 - 2 % dari volume media) dan dilarutkan dalam 50 ml aquadest hangat. Kemudian skim milk disterilisasi selama 10 menit (kondisi operasi T = 80 °C). NA dan skim milk yang telah disterilkan dicampurkan (pada keadaan hangat) secara aseptis di laminar enkas.

Pengambilan Sampel dan Inokulasi Bakteri

Metode pengambilan sampel didasarkan oleh Ogino et al., (2008) yang dimodifikasi. Sampel diambil dari kulit sapi, kambing, domba, ikan pari, dan biawak

yang telah tersimpan dengan metode penggaraman selama 1 tahun di gudang penyimpanan Politeknik ATK Yogyakarta. Masing – masing kulit diambil sebanyak 1 ose, dilarutkan dalam 10 ml media Nutrien Broth yang telah disterilkan. Inokulasi media kultur bakteri di media agar yaitu dengan mengambil sampel dari kultur dan dibiakkan pada media agar dengan dua metode yaitu metode streak plate dan spread plate. Pada tahapan ini kultur yang digunakan yaitu hanya kultur kulit sapi, sedangkan untuk kultur kulit yang lainnya akan dilaksanakan pada penelitian selanjutnya. Sebelum dilakukan pengembangbiakkan bakteri dengan menggunakan metode streak plate dan spread plate, sampel terlebih dahulu diencerkan 10 kali sampai 100.000 kali. Sehingga diperoleh kultur dengan berbagai variabel pengenceran yaitu 10x, 100x, 1000x, 10.000x, dan 100.000x. Tujuan dari pengenceran yaitu agar pertumbuhan bakteri tidak terlalu padat sehingga dapat diamati dengan mata telanjang dan dapat dilakukan perhitungan koloni bakteri [7]. Setelah sampel kultur diencerkan, selanjutnya kultur akan dibiakkan pada media nutrisi agar (NA) dengan metode spread plate dan streak plate. Dari beberapa variabel pengenceran yang dilakukan pada kultur, faktor pengencer yang memberikan hasil yang baik, seperti pertumbuhan bakteri masih terkontrol dan dapat dilihat dengan mata telanjang serta tidak terlalu padat yaitu pada biakan kultur pengenceran 1000x menggunakan metode streak plate dan spread plate, serta pada pengenceran 10.000x menggunakan metode spread plate. inkubasi dilakukan pada suhu 30°C selama 3 hari dengan menggunakan shaker incubator.

Penumbuhan Bakteri di Media Nutrien Agar

Pada penelitian ini digunakan kultur sapi saja, untuk kultur yang lain dilaksanakan pada penelitian selanjutnya. Penumbuhan bakteri di media nutrient agar, diawali dengan melakukan pengenceran pada kultur. Kultur yang berasal dari media isolasi diambil sebanyak 1 ml kemudian diencerkan sampai dengan seri pengenceran 10^{-1} - 10^{-5} menggunakan aquades steril. Dari pengenceran tersebut kultur ditanam pada media agar (nutrient agar) dengan metode streak plate (cawan gores) dan spread plate (metode apus). Isolat didiamkan pada suhu 30°C selama 2x24 jam.

Penumbuhan Bakteri di Media Selektif

Sebelum melakukan inokulasi pada media *skim milk agar*, isolat bakteri yang telah di inokulasi pada media nutrient agar (NA) diperkaya (*enrichment*) terlebih dahulu di media yang sama (NA) dengan metode streak plate dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 48 jam.

Isolat bakteri dari media nutrient agar diinokulasi ke dalam media selektif proteolitik yang berisi media Skim Milk Agar, kemudian diinkubasikan pada suhu 30°C selama 24 sampai 72 jam. Dilakukan beberapa kali inokulasi isolat bakteri ke media Skim Milk Agar hingga diperoleh isolat murni bakteri.

Uji Awal Aktivitas Bakteri Proteolitik

Aktivitas bakteri dalam mendegradasi protein ditunjukkan dengan adanya zona halo (lingkaran jernih) di sekitar koloni. Untuk mengetahui indeks proteolitik isolat bakteri dilakukan metode titik.

Hasil dan Pembahasan

Isolasi bakteri dari kulit sapi di Gudang Kulit Politeknik ATK Yogyakarta

Kulit garaman yang berada di Gudang Politeknik ATK Yogyakarta yaitu seperti pada Gambar 1. Beberapa kulit yang terdapat di gudang yaitu kulit sapi, kambing, domba, ikan pari, dan biawak. Kulit – kulit tersebut merupakan kulit garaman yang hampir busuk karena kulit ini tidak digunakan untuk proses penyamakan. Kondisi kulit garaman yang terdapat pada Gudang mayoritas sudah kering dan mempunyai bau tidak sedap. Salah satu pemanfaatan dari kulit yang berada di Gudang Poltek ATK yaitu dengan mengisolasi bakteri yang terdapat pada kulit tersebut dengan cara mengambil sampel dari kulit untuk dijadikan kultur yang menghasilkan bakteri proteolitik, yang selanjutnya dari bakteri proteolitik lebih lanjut dapat menghasilkan enzim protease.



Gambar 1. Kulit awetan yang berada di gudang Politeknik ATK Yogyakarta

Sampel diambil dari setiap kulit sebanyak satu sampai tiga ose dan dimasukkan dalam media nutrient broth yang telah disterilkan. Kemudian kultur diinkubasi menggunakan shaker selama 48 jam. Penggunaan media berupa nutrient broth (NB) dikarenakan mayoritas media kultur yang digunakan yaitu media yang kaya akan nutrisi, dan nutrient broth merupakan salah satu media yang kaya akan nutrisi sehingga mikroorganisme dapat tumbuh dengan memakan nutrisi tersebut. Selain nutrient beberapa faktor yang mempengaruhi pertumbuhan dalam kultur bakteri yaitu pH dan suhu inkubasi [8]. Pada penelitian ini pH NB yang digunakan yaitu pada pH 7 – 8 dan suhu proses inkubasi pada suhu kamar 28 – 30 °C. Dimana kondisi optimal pada pertumbuhan proteolitik yaitu pada pH 7 – 9 dan suhu 20 – 60 °C [9]. Hasil dari proses inkubasi yaitu kultur bakteri akan menjadi keruh sebagai tanda mikroorganisme tumbuh. Dari kultur tersebut kemudian akan dibiakkan pada media agar dan media selektif.

Inokulasi dan Isolasi Kultur Bakteri pada Media Nutrient Agar (NA)

Inokulasi media kultur bakteri di media agar yaitu dengan mengambil sampel dari kultur dan dibiakkan pada media agar dengan dua metode yaitu metode streak plate dan spread plate. Dari tahapan ini diperoleh 16 isolat dari kultur sapi dari dua metode. Hasil dan morfologi isolat bakteri yang dihasilkan dapat dilihat pada Tabel 1. Pada Tabel 1. dapat dilihat bahwa hasil inokulasi diberikan kode – kode dari A sampai Q (16 koloni). Hasil pengamatan yang dilakukan, secara garis besar terbentuk koloni pada kultur tersebut, akan tetapi terdapat juga kelompok koloni yang tidak diinginkan, seperti koloni dengan kode inokulasi B dan K yang membentuk koloni berupa bintik – bintik putih, serta kode inokulasi J yang membentuk koloni berwarna kekuningan.

Tabel 1. Hasil dan morfologi isolat bakteri

No	Sampel kultur	Kode inokulasi	Metode	Keterangan
1	Sapi (2) pengenceran 10^{-3}	A	Streak Plate	Koloni bakteri berbentuk bulat utuh
2		B		Koloni bakteri berwarna putih berbayang dan bergaris tegas
3		K		Koloni bakteri berupa bintik – bintik berwarna putih dan berbayang
4	Sapi (1) pengenceran 10^{-3}	C		Koloni bakteri berbentuk lonjong, berwarna putih
5		D		Koloni bakteri berwarna putih tegas dan berlubang
6		E		Koloni bakteri berupa bintik – bintik warna putih dan kecil
7	Sapi (1) pengenceran 10^{-3}	F	Spread plate	Koloni berbentuk bulat ditengah dan berbayang
8		G		Koloni berbentuk lonjong ditengah berbayang
9		H		Koloni berbentuk bintik – bintik kecil
10	Sapi (2) pengenceran 10^{-3}	L	Spread plate	Koloni berbentuk kecil dan berwarna kuning-putih
11		M		Koloni berbentuk lebih besar berwarna kuning putih
12	Sapi (1) pengenceran 10^{-4}	I	Spread plate	Koloni terbentuk di tengah dan merata
13		J		Koloni berwarna kekuning – kuningan
14	Sapi (2) pengenceran 10^{-4}	O	Spread plate	Koloni berbentuk bulat kecil bergandeng
15		P		Koloni berbentuk bulat besar di tengah
16		Q		Berbentuk koloni kecil – kecil

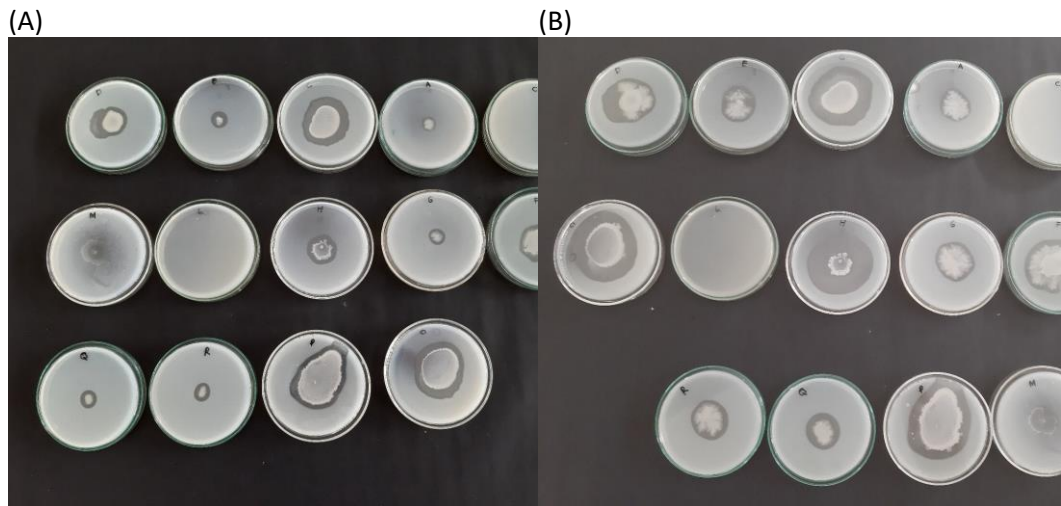
Keterangan (1) : Pengambilan sampel pertama (2) : pengambilan sampel kedua pada kultur yg sama (duplo)

Inokulasi Kultur Bakteri pada Media Selektif (*Skim Milk Agar*)

Pengembangbiakkan kultur bakteri pada media selektif yaitu dengan mengembangbiakkan pada media skim milk agar. Skim milk agar digunakan untuk menguji kemampuan proteolitik dari suatu bakteri. Sifat proteolitik ditunjukkan dengan adanya zona bening di sekitar koloni bakteri sebagai hasil pemutusan ikatan peptida protein menjadi peptida yang lebih kecil [10].

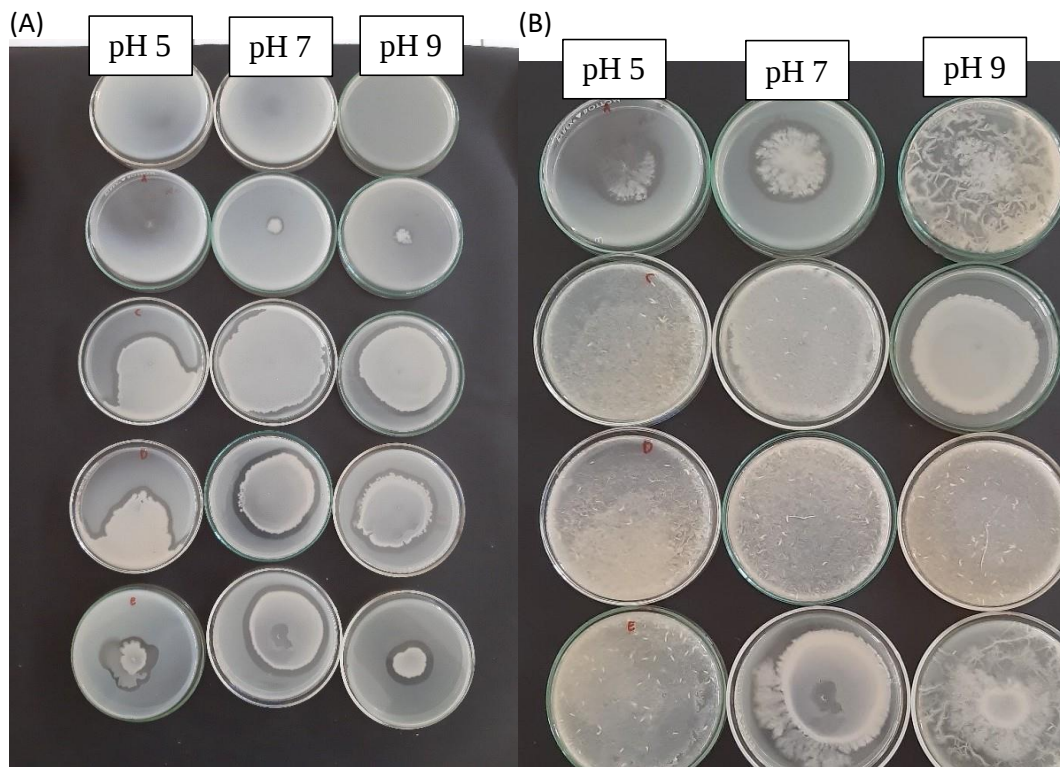
Dari isolat pada *nutrient* agar yang berjumlah 16, diambil 13 isolat dikarenakan ada beberapa isolat yang terkontaminasi dan tidak membentuk sebuah koloni. Isolat yang terpilih akan diinokulasi kembali pada media selektif, skim milk agar. Ketigabelas isolat yang diambil yaitu dengan kode A,C,D,E,F,G,H,L,M,O,P,Q,R. Hasil penelitian isolat bakteri yang membentuk zona bening dapat dilihat pada Gambar 3. Terbentuknya zona bening dikarenakan hidrolisis protein yang terdapat pada media susu skim, protein pada media susu skim dihidrolisis oleh enzim ekstraseluler menjadi asam amino yang digunakan langsung oleh sel sebagai sumber nutrisi [11]. Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Hesti, dkk. menyakatan hal yang serupa. Kasein yang terdapat dalam susu skim merupakan protein susu yang terdiri dari fosfoprotein yang berikatan dengan kalsium membentuk garam kalsium kalseinat sehingga mempunyai warna putih. Kemudian enzim protease yang dihasilkan oleh bakteri menyebabkan kasein terhidrolisis menjadi asam amino yang larut sehingga warna putih akan menghilang dan terbentuk zona bening disekitar koloni bakteri [10]. Sehingga dengan terbentuknya zona bening pada isolat dapat dikatakan bahwa isolat bakteri yang diisolasi dari kulit sapi garaman mempunyai aktivitas proteolitik.

Pada Gambar 3. dapat dilihat isolat dengan menggunakan skim milk agar setelah diinkubasi selama 24 jam. Dari hasil pengamatan terdapat beberapa isolat yang tidak membentuk zona bening, diantaranya yaitu isolat L dan M. Sedangkan isolat yang menghasilkan zona bening paling besar yaitu pada isolat A,C, D,E, dan O. Gambar 3 juga menunjukkan hasil inkubasi isolat bakteri setelah 48 jam. Dari hasil pengamatan isolat L tetap tidak membentuk zona bening, sedangkan untuk isolat M membentuk zona bening, sehingga dapat dikatakan aktivitas proteolitik pada isolat M tumbuh setelah 24 jam. Isolat C,O, dan P menunjukkan pertambahan luas pada zona bening. Bertambahnya zona bening menunjukkan bahwa aktivitas proteolitik masih berkembang selama 48 jam. Sedangkan pada waktu inkubasi selama 72 jam, aktivitas proteolitik mulai terkontaminasi, dan luasan zona bening tidak bertambah apabila dibandingkan dengan zona bening pada waktu inkubasi 48 jam. Sehingga dapat disimpulkan bahwa aktivitas proteolitik akan optimal pada waktu inkubasi 48 jam, setelah itu memungkinkan bakteri mengalami kematian sehingga zona bening tidak bertambah. Berdasarkan beberapa penelitian yang telah dilakukan aktivitas protease menunjukkan keadaan optimum pada waktu 24 jam [12], literatur lain menyebutkan aktivitas protease optimum pada waktu 36 jam [13]. Pada penelitian ini pada waktu 48 jam memang terjadi perluasan zona bening pada beberapa isolat, akan tetapi ada beberapa isolat pula yang mulai terkontaminasi.



Gambar 2. Inokulasi kultur bakteri pada skim milk agar selama (A) 24 jam, (B) 48 jam

Isolasi kultur bakteri pada media selektif menghasilkan beberapa isolat yang mempunyai zona bening cukup luas, yaitu isolat A, C,D, E. Dari keempat isolat ini akan dinokulasi kembali dengan variasi pH. Variasi pH yang digunakan yaitu pada pH 5, 7 dan 9. Isolat diinkubasi selama 24 sampai 72 jam. Hasil isolat dapat dilihat pada Gambar 4. Pada Gambar 4(a) dapat dilihat, pada pH 5 isolat A tidak membentuk zona bening, sedangkan pada isolat C dan D terbentuk sedikit zona bening yang tidak merata. Pada pH 7, isolat A dan C membentuk sedikit zona bening, sedangkan isolat D dan E membentuk zona bening yang merata yang cukup besar. Pada pH 9, isolat A dan C terbentuk sangat tipis zona bening, sedangkan isolat D dan E terbentuk zona bening yang cukup merata. Sehingga pH yang menghasilkan zona bening cukup besar yaitu pada pH 7. hal ini sejalan dengan penelitian Fitriana [12] yang menyebutkan bahwa pH optimum pada aktivitas proteolitik yaitu berkisar pada pH 5 sampai pH 7. Apabila kondisi pH tidak optimal maka reaksi kerja enzim yang dihasilkan dapat mempengaruhi laju pertumbuhan bakteri. Pada Gambar 4(b) isolat yang diinkubasi selama 72 jam terlihat banyak terjadi kontaminasi. pH, lama waktu inkubasi, dan kondisi lingkungan sangat mempengaruhi aktivitas proteolitik dari isolat.



Gambar 3. Isolat bakteri pada skim milk agar pada pH 5, 7, dan 9 dengan waktu inkubasi (A) 24 jam, (B) 72 jam

Kesimpulan

Sampel bakteri yang didapatkan dari kulit awet garaman di gudang Politeknik ATK Yogyakarta terdapat aktivitas proteolitik yang ditandai dengan terbentuknya zona bening pada isolat bakteri yang diambil dari kulit awetan garam di gudang Politeknik ATK. Hasil isolat bakteri yang mempunyai zona bening cukup luas yaitu pada isolat A,C, D,E, dan O. Sedangkan isolat L tidak menunjukkan aktivitas proteolitik. Kondisi optimal perkebangbiakkan proteolitik yaitu pada pH7, suhu 30 °C dan waktu inkubasi maksimal 48 jam.

Daftar Pustaka

- [1] A. Lama, anthony dale Covington, M. Bates, and P. Antunes, "methods of isolation and identification of pathogenic and potential pathogenic bacteria from skins and tannery effluents," vol. 75901, no. c, p. 75901, 2013.
- [2] R. O. Oruko, J. O. Odiyo, and J. N. Edokpayi, "The Role of Leather Microbes in Human Health," *Role of Microbes in Human Health and Diseases*, 2019, doi: 10.5772/intechopen.81125.
- [3] Z. R. Stromberg *et al.*, "Effect of Aerobic Bacteria on Hides," vol. 9, no. March, pp. 1–7, 2006.
- [4] M. Asril and S. S. Leksikowati, "Isolasi dan Seleksi Bakteri Proteolitik Asal Limbah Cair Tahu Sebagai Dasar Penentuan Agen Pembuatan Biofertilizer," *Elkawanie*, vol. 5, no. 2, p. 86, 2019, doi: 10.22373/ekw.v5i2.4356.

- [5] S. Pawiroharsono, "Penerapan Enzim Untuk Penyamakan Kulit Ramah Lingkungan," *Jurnal Teknologi Lingkungan*, vol. 9, no. 1, pp. 51–58, 2011, doi: 10.29122/jtl.v9i1.443.
- [6] P. L. Sari, "PEMBUATAN MEDIA PERTUMBUHAN BAKTERI DENGAN MENGGUNAKAN UMBI UBI JALAR CILEMBU (IPOMOEA BATATAS (L.) LAM) UNTUK BAKTERI *Lactobacillus acidophilus*, *Salmonella typhii* DAN *Escherichia coli*," 2019.
- [7] S. R. Vartoukian, R. M. Palmer, and W. G. Wade, "Strategies for culture of 'unculturable' bacteria," *FEMS Microbiology Letters*, vol. 309, no. 1, pp. 1–7, 2010, doi: 10.1111/j.1574-6968.2010.02000.x.
- [8] N. Arfarita, "ISOLASI DAN IDENTIFIKASI BAKTERI PENGHASIL PROTEASE YANG DISKRINING DARI TERASI," vol. 5, no. 3, pp. 119–122, 2015.
- [9] F. Fatmawati, F. M. Warganegara, and M. Puspasari, "Identifikasi Bakteri Potensial Penghasil Enzim Amilase, Selulase, Xilanase Dan Lipase Pada Fase Termofilik Kompos Manur Sapi," *Jurnal Kesehatan Bakti Tunas Husada: Jurnal Ilmu-ilmu Keperawatan, Analis Kesehatan dan Farmasi*, vol. 16, no. 1, p. 69, 2016, doi: 10.36465/jkbth.v16i1.168.
- [10] H. N. Choirunnisa, R. Y. Sari, U. S. Hastuti, and A. W. Witjoro, "Identifikasi dan Uji Kemampuan Hidrolisis pada Bakteri Amilolitik dan Proteolitik yang Diisolasi dari Wadi, Makanan Khas Kalimantan Tengah," *Bionature*, vol. 18, no. 2, pp. 99–109, 2018, doi: 10.35580/bionature.v18i2.6138.
- [11] A. Hutahaeen, "Isolasi dan Uji Aktivitas Alkaline Protease Bakteri dari Mata Air Soda Parbubu Tarutung Sumatera Utara," 2018.
- [12] N. Fitriana *et al.*, "Aktivitas Proteolitik pada Enzim Protease dari Bakteri Rhizosphere Tanaman Kedelai (*Glycine max* L.) di Trenggalek The Proteolytic Activity on Protease Enzymes from Soybean Plant Rhizosphere (*Glycine max* L.) in Trenggalek," vol. 11, no. 1, pp. 144–152, 2022, [Online]. Available: <https://journal.unesa.ac.id/index.php/lenterabio/index>
- [13] Y. Oktavia, S. D. Lestari, S. Lestari, . Herpandi, and M. Jannah, "OPTIMASI WAKTU INKUBASI PRODUKSI PROTEASE DAN AMILASE ISOLAT BAKTERI ASAL TERASI IKAN TERI *Stolephorus* sp.," *Jurnal Ilmu dan Teknologi Kelautan Tropis*, vol. 10, no. 3, pp. 719–725, Dec. 2018, doi: 10.29244/jitkt.v10i3.18840.