



## **Pemekatan Ekstrak Kasar Protease *Bacillus Megaterium* Tr-10 Dengan Metode Pengendapan Amonium Sulfat**

**Vivi Mulya Harum<sup>1\*</sup>, Salma Afifah<sup>2</sup>, Suharti Suharti<sup>2</sup>, Norman Yoshi Haryono<sup>2</sup>, dan Evi Susanti\***

<sup>1)</sup> Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Negeri Malang, Jl. Semarang No. 5 Malang 65154, Indonesia

<sup>2)</sup> Prodi Bioteknologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Negeri Malang, Jl. Semarang No. 5 Malang 65154, Indonesia

e-mail: [\\*evi.susanti.fmipa@um.ac.id](mailto:evi.susanti.fmipa@um.ac.id)

### **Abstrak**

Protease merupakan enzim yang dapat memecah ikatan peptida menghasilkan asam amino dan peptida sederhana. Protease merupakan enzim yang penting bagi industri seperti produksi kolagen. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh kejenuhan ammonium sulfat pada pemekatan ekstrak kasar protease dari *B. megaterium* TR-10 dengan pengendapan ammonium sulfat. Tahapan dalam penelitian ini yaitu: 1) Pembuatan Media dan Reagen, 2) Peremajaan protease dari isolat *Bacillus megaterium* TR-10, (3) Produksi ekstrak kasar protease isolat TR-10, (4) Pemekatan ekstrak kasar protease menggunakan metode pengendapan amonium sulfat, (5) Pengujian aktivitas spesifik ekstrak kasar protease isolat TR-10 dengan metode anson, dan (6) Penentuan Homogenitas sebelum dan sesudah pengendapan. Pemekatan protease dari *B. megaterium* TR-10 menggunakan metode pengendapan ammonium sulfat pada tingkat kejenuhan 0-40%, 40-60% dan 60-100% belum dapat mengendapkan secara signifikan, kecuali pada tingkat kejenuhan 40-60%. Pada tingkat kejenuhan 0-40% protein tidak dapat mengendap, tingkat kejenuhan 40-60% protease dapat terendapkan dengan nilai aktivitas spesifik enzim protease sebesar 2,930 U/mg, sedangkan pada tingkat kejenuhan 60-100% protein mengendap tetapi nilai aktivitas spesifik protease nol. Uji homogenitas protease pada fraksi 40-60% mengindikasikan bahwa pada fraksi tersebut kontaminan lain dapat dipisahkan, walaupun demikian, belum memenuhi syarat untuk digunakan sebagai metode pemekatan ekstrak kasar protease *B. megaterium* TR-10.

**Kata kunci:** Pemekatan, ekstrak kasar protease, SDS-PAGE, homogenitas

### **1. Pendahuluan**

Protease merupakan enzim yang fungsinya menghidrolisis ikatan peptide protein menjadi polipeptida sederhana dan asam amino [1]. Protease dapat diisolasi dari mikroba, tumbuhan dan hewan. Isolasi dari bakteri lebih banyak dilakukan karena waktu pertumbuhannya cepat, kondisi pertumbuhannya lebih mudah diatur dan biaya oprasionalnya lebih murah [2]. Bakteri yang menghasilkan protease disebut bakteri proteolitik.

Penelitian sebelumnya berhasil memperoleh 15 isolat proteolitik dari terasi sidoarjo. Isolat *Bacillus megterarium* TR-10 merupakan isolat terpilih yang memiliki indeks protease 3.0, menghasilkan ekstrak kasar protease dengan sumber nitrogen pepton [3], limbah cair tahu [4], kacang hijau dan kecambah kedelai [5], serta tidak pathogen [6]. Novitasari menyatakan bahwa isolat ini dapat menghasilkan ekstrak kasar protease aktivitas sebesar 7,426 U/mL melalui metode sebagai berikut: sebanyak 20 mL starter inoculum dalam medium nutrient broth, diinokulasi dalam 100 mL media produksi yang mengandung limbah cair tahu dengan kadar protein 115 mg/L dan pH 7, diinkubasi selama 43 jam pada suhu 37oC [4]. Berdasarkan hal

tersebut, Isolat *Bacillus megaterium* TR-10 memiliki potensi yang tinggi untuk dijadikan sumber enzim protease. Sayangnya belum dilakukan pemekatan untuk meningkatkan stabilitas penyimpanan. Ekstrak kasar enzim umumnya mengandung konsentrasi enzim yang rendah dan mudah mengalami degradasi dan denaturasi. Informasi mengenai pemekatan enzim sangat penting diketahui khususnya pada enzim yang akan digunakan untuk industri.

Metode pemekatan yang paling umum dilakukan dan sederhana adalah dengan menggunakan metode pengendapan amonium sulfat karena memiliki tingkat kelarutan tinggi, harga relatif murah, dan tersedia bahan murninya [7]. Berkaitan dengan hal tersebut maka perlu dilakukan penelitian mengenai "Pemekatan Ekstrak Kasar Protease *Bacillus megaterium* TR-10 Dengan Metode Pengendapan Amonium Sulfat" yang diharapkan dapat mengetahui pengaruh kejenuhan ammonium sulfat pada pemekatan ekstrak kasar protease dari *B. megaterium* dengan pengendapan ammonium sulfat dan homogenitas protein.

## **2. Metode**

### **2.1. Bahan Percobaan**

Bahan-bahan yang digunakan pada penelitian ini berderajat p.a, yaitu: Bactopepton, bactoagar, kasein, tris base, natrium bikarbonat ( $\text{NaHCO}_3$ ), asamklorida (HCl), Barium Klorida ( $\text{BaCl}_2$ ), amonium sulfat  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , EDTA, natrium klorida (NaCl), natrium hidroksida (NaOH), natrium karbonat ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ), folin ciocalteu, glukosa, magnesium sulfat heksahidrat ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ), kalium dihidrogen fosfat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ), besi (II) sulfat heksahidrat ( $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ), natrium dihidrogen fosfat ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ), disodium hidrogen fosfat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ), tirosin, Bovine serum albumin (BSA), asam trikloroasetat (TCA), tembaga (II) sulfat pentahidrat ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ), natrium sitrat ( $\text{Na}_2\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ), acrylamide, Tris-HCl pH 8,8 1,5 M, Tris-HCL pH 6,8 0.5 M, SDS 10%, N,N,N',N'-tetramethylethylene-diamine (TEMED), Ammonium persulfate 10%, Laemmli sample buffer,  $\beta$ -mercaptoethanol, Running Buffer Tris-Glycine-SDS, dan marker protein. Bahan-bahan yang berderajat teknis, yaitu: isolate *Bacillus megaterium* TR-10, susu skim, akuades, spiritus, alkohol 70%.

### **2.2. Alat Percobaan**

Alat yang digunakan pada penelitian ini meliputi peralatan gelas dan non gelas. Peralatan gelas yang digunakan adalah berupa tabung reaksi, gelas ukur, gelas kimia, labu ukur, Erlenmeyer, gelas arloji, spatula, batang pengaduk, dan cawan petri. Peralatan non gelas adalah berupa alat SDS-PAGE, kuvet, microtube, blue tip, yellow tip, kawat ose ujung lingkaran, kantong dialisis, kapas, korek api, kertas coklat, pH meter, hot plate, indikator universal, mikropipet, neraca analitik, oven, inkubator, laminar air flow, magnetic stirrer, autoklaf, shaking waterbath, incubator shaker, vortex, lemari es, sentrifuse, dan spektrofotometer UV-VIS.

### **2.3. Prosedur Peremajaan Isolat *Bacillus megaterium* TR-10**

Stok gliserol isolat *B. megaterium* TR-10 diambil menggunakan micropipet, selanjutnya di spread pada media susu skim agar (SSA). Hasil peremajaan di streak dengan kawat ose sebelum digunakan dibakar dengan pembakar spiritus hingga berwarna merah, diambil 1 ose biakan isolat TR-10, dengan cara diambil koloni putih kecil kemudian digoreskan pada media SSA dengan Teknik  $\frac{3}{4}$  kuadran. Dilakukan di ruang steril yaitu laminar air flow secara aseptik. Selanjutnya, cawan petri di wrap dan di inkubasi dalam posisi terbalik selama 24 jam dengan suhu 37 oC. Setelah diperoleh biakan isolat dilakukan uji pewarnaan gram untuk mengetahui isolat tersebut murni.

#### **2.4. Prosedur Produksi Ekstrak Kasar Protease Isolat Bacillus megaterium TR-10**

Produksi ekstrak kasar isolat *Bacillus megaterium* TR-10 merujuk penelitian Rahayu yang menggunakan sumber nitrogen berupa susu skim. Isolat bakteri diinokulasikan satu ose isolat kedia produksi susu skim pH 7 diinkubasi pada suhu 37 oC, kecepatan 100 rpm selama 72 jam. Kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm pada suhu 4 oC selama 10 menit, sehingga diperoleh endapan (pellet) dan supernatan. Supernatan inilah yang merupakan ekstrak kasar enzim protease isolat *Bacillus Megaterium* TR-10.

#### **2.5. Prosedur Pembuatan Kurva Standar Tirosin dengan menggunakan Metode Anson**

Kurva standar tirosin dibuat dengan cara membuat serial larutan standar tirosin berbagai konsentrasi antara lain: 0, 10, 30, 50, 70, 90, dan 110 dari stok larutan tirosin 200 ppm. Masing-masing ditambah 2,5 mL Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0,5 M dan 1 mL Folin-ciocalteu. Selanjutnya larutan diinkubasi selama 30 menit pada suhu kamar dalam ruang gelap. Larutan diukur absorbansinya pada Panjang gelombang 660nm. Data yang diperoleh dibuat kurva hubungan antara kadar tirosin dan absorbansinya.

#### **2.6. Prosedur Pembuatan Kurva Standar Protein**

Dibuat serial larutan protein standar berbagai konsentrasi dari stok larutan BSA (Bovine Serum Albumin) 200 ppm antara lain: 0, 20, 40, 60, 80, dan 100. Masing-masing ditambahkan 5 mL larutan Biuret, divortex dan diinkubasi pada suhu kamar selama 10 menit. Kemudian ditambah 0,5 mL Folin-ciocalteu, diinkubasi pada suhu kamar selama 20 menit. Diukur absorbansinya pada Panjang gelombang 750 nm. Selanjutnya dibuat kurva hubungan antara standar protein dengan sumbu x konsentarsi larutan BSA dan sumbu y absorbansi.

#### **2.7. Prosedur Pengujian Aktivitas Enzim Protease Bacillus megaterium TR 10**

Uji aktifitas dilakukan dengan cara mengambil 0,2 mL sampel dimasukkan dalam tabung reaksi. Kemudian ditambahkan 0,5 mL kasein sebagai substrat. Larutan diinkubasi pada suhu 40oC selama 20 menit. Reaksi dihentikan dengan penambahan 1 mL TCA 10% dan dijaga pada suhu ruang selama 10 menit. Larutan disentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm selama 10 menit pada suhu 4oC. Supernatan yang diperoleh ditambah 2,5 mL Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0,5 M dan 1 mL reagen Folin-ciocalteu. Selanjutnya larutan diinkubasi selama 30 menit pada suhu kamar dalam ruangan gelap. Larutan diukur absorbansinya pada Panjang gelombang 660 nm dengan blanko menggunakan sampel aquades. Dilakukan hal yang sama pada control negatif, tetapi penambahan TCA 10% dilakukan diawal setelah penambahan ekstrak kasar enzim.

#### **2.8. Prosedur Penentuan Kadar Protein dengan Metode Lowry**

Sebanyak 0,5 mL sampel dimasukkan dalam tabung reaksi, ditambah 2,5 mL larutan biuret, kemudian divortex, dan diinkubasi pada suhu kamar selama 10 menit. Selanjutnya ditambah 0,25 mL Folin-ciocalteu, diinkubasi pada suhu kamar selama 20 menit. Kemudian diukur absorbansinya pada Panjang gelombang 750 nm. Untuk blanko sampel diganti aquades. Kadar protease didapat dari selisih absorbansi sampel dan absorbansi control yang selanjutnya diplotkan pada persamaan kurva standar protein.

## **2.9. Prosedur Pemekatan Ekstrak Kasar menggunakan Metode Pengendapan Amonium Sulfat**

Konsentrasi amonium sulfat yang digunakan dalam pengendapan enzim protease isolate *Bacillus megaterium* TR-10, tingkat konsentrasi dicoba antara lain 0-40%, 40-60%, dan 60-100%. Amonium sulfat ditambahkan sedikit demi sedikit kedalam 20mL ekstrak kasar protease sambil diaduk dengan stirrer sampai mencapai konsentrasi yang diinginkan. Suhu dijaga tetap dingin dengan cara meletakkan es disekelilingnya. Setelah semua garam ammonium sulfat tercampur homogen  $\pm$  2 jam. Endapan enzim dipisahkan dengan cara sentrifugasi pada suhu 4°C kecepatan 12.500 rpm selama 20 menit. Endapan yang terbentuk setelah disentrifugasi dilarutkan dalam buffer fosfat 0.01 M pada pH optimum enzim protease yaitu 7. Dilakukan hal yang sama hingga tingkat konsentrasi 60-100%. Larutan enzim hasil pengendapan dilakukan dialisis. Selanjutnya diukur aktivitas protease dan kadar proteinnya.

## **2.10. Prosedur Dialisis Enzim Protease**

Preparasi membran selofan yang telah di potong 15 cm, direndam dalam larutan EDTA 1 mM dalam 2 % NaHCO<sub>3</sub> selama 10 menit. Selanjutnya membran direndam aquades 10 menit sebanyak 2 kali. Setiap endapan dilarutkan pada buffer fosfat 0,01 M, kemudian dimasukkan kedalam membran selofan dan diikat dilanjutkan dialisis dengan merendam dalam buffer fosfat 0,005 M dalam penangas es dengan suhu 4°C selama 24 jam dengan penggantian beberapa kali buffer fosfat dan di stirrer kecepatan 125 rpm [8].

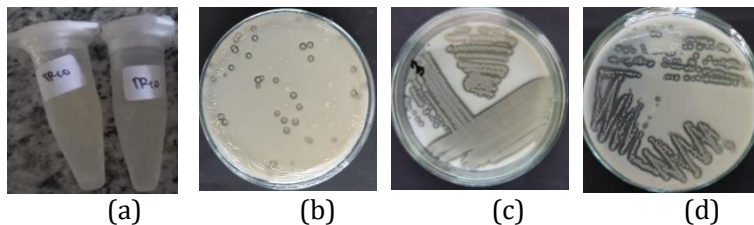
Dialisis dikatakan selesai dengan melakukan pengamatan uji sulfat pada larutan buffer fosfat dengan menambahkan 1 mL HCl 0,1 M dan 3 tetes BaCl<sub>2</sub> 0,1 M jika terdapat endapan putih dialisis dilanjutkan [8].

## **2.11. Prosedur Penentuan Homogenitas Protein dengan SDS-PAGE**

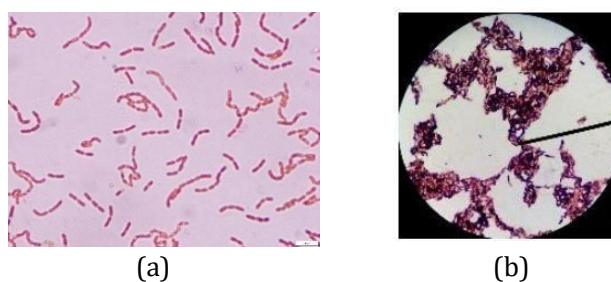
Sampel berupa enzim setengah murni dipindahkan ke dalam tube berukuran 2 mL. Sampel diambil dan ditambahkan sampel buffer perbandingan 1:1. Sampel yang telah ditambah dengan sampel buffer kemudian dipanaskan dalam hot plate pada suhu 70-90°C selama 3-5 menit. Kemudian, sampel dimasukkan ke dalam gel SDS-poliakrilamida dengan konsentrasi separation gel 12% dan stacking gel 4%. Gel elektroforesis dijalankan pada 150 V menggunakan buffer elektroforesis 1x hingga pewarna mencapai bagian bawah gel sekitar 55 menit. Setelah elektroforesis, gel dikeluarkan dari pelat elektroforesis, kemudian ditempatkan dalam wadah. Pewarnaan gel dengan menggunakan 20 mL larutan pewarna Coomassie gel selama 2 jam pada suhu kamar. Destaining gel dilakukan dengan larutan destaining Coomassie gel selama minimal 1 jam sampai pita biru terlihat jelas. Proses staining dan destaining dilakukan dengan pengocokan wadah menggunakan shaker. Selanjutnya diamati dan dianalisis homogenitas protein.

### 3. Hasil dan Pembahasan

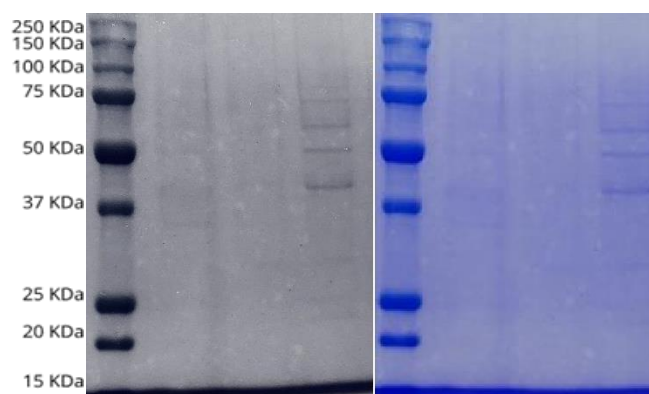
#### 3.1. Gambar dan Tabel



Gambar 1. Isolat *Bacillus Megaterium* TR-10 (a). Stok gliserol, (b). Hasil spread pada media Susu skim agar (SSA), (c). Isolat induk, dan (d) Hasil Peremajaan



Gambar 2. Hasil Pewarnaan Gram Isolat *B. megaterium* TR-10 (a). hasil peremajaan dan (b). hasil isolasi penelitian Chusniyah



Gambar 3. Hasil SDS-PAGE dari (a) dokumentasi setelah diperjelas, dan (b) dokumentasi asli. marker protein (line 1), ekstrak kasar (line 2), pengendapan 40-60% (line 3), dan pengendapan 60-100% (line 4).

Tabel 1. Aktivitas Ekstrak Kasar Protease Isolat *Bacillus Megaterium* TR-10

No	Waktu Produksi Ekstrak Kasar Protease dari Isolat TR-10	Aktivitas Enzim (U/mL)
1.	11 Juli 2022	2,422
2.	25 Juli 2022	1,083
3.	25 Juli 2022	1,006

Tabel 2. Data pemekatan

Tahapan	Volume Sampel (mL)	Kadar protein (mg/L)	Protein total (mg)	Aktivitas Enzim (U/mL)	Aktivitas total (U)	Aktivitas spesifik (U/mg)	Yield (%)	Purification Factor
Awal	100 mL	147,956	14,796	2,422	242,2	16,369	100	1
0-40%	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
40-60%	7 mL	49,179	0,344	0,144	1,008	2,930	0,416	0,179
60-100%	9 mL	69,178	0,623	0	ND	ND	ND	ND
Sisa Fraksi	80 mL	44.400	3,552	0	ND	ND	ND	ND

### 3.1.2 Pemekatan Menggunakan Metode Pengendapan Amonium Sulfat

Ekstrak kasar protease yang diperoleh dari proses produksi selama 72 jam digunakan dalam tahap pemekatan menggunakan metode pengendapan amonium sulfat. Metode ini menggunakan tingkat kejenuhan 0-40%, 40-60%, dan 60-100% yang diharapkan dapat mengendapkan protease target dengan sedikit pengotor pada tingkat kejenuhan tertentu, karena protein memiliki tingkat kelarutan yang berbeda.

Ekstrak kasar protease yang dijenuhkan dengan amonium sulfat pada persen saturasi 0-40% tidak tampak endapannya, sedangkan pada tingkat kejenuhan 40-60% dan 60-100% tampak adanya protein yang mengendap ditandai dengan keruhnya ekstrak kasar protease. Data yang diperoleh pada pemekatan ekstrak kasar protease dengan menggunakan metode pengendapan amonium sulfat dapat dilihat pada Tabel 2.

Berdasarkan data tersebut kejenuhan 0-40% tidak dapat mengendapkan protease yang ada dalam ekstrak kasar protease sehingga tidak bisa dianalisis lebih lanjut. Protein total meningkat seiring bertambahnya konsentrasi amonium sulfat, pada tingkat kejenuhan 40-60% dan 60-100%. Hal ini dikarenakan semakin banyak jumlah ion garam yang mengikat air maka semakin banyak protein yang terendapkan. Tetapi total protein sisa fraksi cukup tinggi, Hal tersebut mengindikasikan protein dalam ekstrak kasar yang terendapkan oleh amonium sulfat sedikit. Kemungkinan karena protein tersebut memiliki permukaan yang hidrofilik sehingga sulit mengendap.

Data aktivitas spesifik enzim tidak diikuti dengan meningkatnya protein total. Nilai aktivitas spesifik tertinggi yakni pada tingkat kejenuhan 40-60% sebesar 2,930 U/mg, hal ini menunjukkan bahwa enzim protease dapat terendapkan pada kejenuhan tersebut, walaupun protein total lebih rendah dari tingkat kejenuhan 60-100%. Hal tersebut kemungkinan enzim protease lebih mudah terendapkan pada tingkat kejenuhan 40-60%. Pendapat tersebut dikuatkan dengan data homogenitas protein melalui SDS-PAGE, yang menunjukkan tingkat kepekatan enzim target yaitu enzim protease dari isolat B. *Megaterium* TR-10. Suatu protein ditandai dengan adanya pita-pita berwarna biru dengan latar tidak berwarna pada linanya. Berikut adalah hasil SDS-PAGE pada penelitian ini pada Gambar 2.

Berdasarkan hasil SDS-PAGE pada ekstrak kasar, tingkat kejenuhan 40-60%, serta pada tingkat kejenuhan 60-100% menunjukkan bahwa homogenitas protein tidak dipengaruhi jumlah protein. Tetapi dipengaruhi oleh aktivitas spesifik enzim dari data tersebut tingkat kejenuhan 40-60% lebih homogen dari tingkat kejenuhan 60-100%. Perbedaan pita yang dihasilkan mungkin dikarenakan metode, dan kondisi pemekatan yang berbeda. Selain itu kemungkinan enzim mengalami denaturasi selama proses pemekatan.

#### 4. Kesimpulan

Pemekatan protease dari *B. megaterium* TR-10 menggunakan metode pengendapan ammonium sulfat belum dapat mengendapkan secara signifikan, kecuali pada tingkat kejenuhan 40-60%. Pada tingkat kejenuhan 0-40% protein tidak dapat mengendap, tingkat kejenuhan 40-60% protease dapat terendapkan dengan nilai aktivitas spesifik enzim protease sebesar 2,930 U/mg, sedangkan pada tingkat kejenuhan 60-100% protein mengendap tetapi nilai aktivitas spesifik protease nol. Homogenitas protease pada fraksi 40-60% mengindikasikan pada fraksi tersebut sebagian protein kontaminan lain dapat dipisahkan, tetapi tidak dapat meningkatkan nilai aktivitas spesifik proteasenya sehingga tidak memenuhi syarat untuk digunakan sebagai metode pemekatan ekstrak kasar protease *B. megaterium* TR-10.

#### Daftar Rujukan

- [1] Alnahdi, H. S. (2012). Isolation and screening of extracellular proteases produced by new isolated bacillus sp. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 2(9), 71-74.
- [2] Hashmi, S., Iqbal, S., Ahmed, I., dan Janjua, H. A. (2022). Production, Optimization, and Partial Purification of Alkali-Thermotolerant Proteases from Newly Isolated *Bacillus subtilis* S1 and *Bacillus amyloliquefaciens* KSM12. *Processes*, 10(6).
- [3] Chusniyah, N. (2013). Isolasi Bakteri Penghasil protease dari Terasi Sidoarjo untuk Isolasi kolagen dari Sisik Ikan Bandeng. *Prosiding*, 5(54).
- [4] Novitasari, D. P., Suharti, S., & Susanti, E. (2021). Optimization Production of Crude Extract of Protease from *Bacillus megaterium* TR-10 as Efforts to Support Halal Collagen Production Process. *Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Negeri Malang*.
- [5] Maylanda. (2019). Pengaruh Sumber Nitrogen dan pH Medium Terhadap Produktivitas Ekstrak Kasar Protease Isolat Bakteri TR-10. *Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Negeri Malang*.
- [6] Fitria, N. (2019). Isolat TR-10: Uji Patogenesis dan Optimasi Suhu serta Waktu Inkubasi Protease dalam Mengisolasi Kolagen dari Sisik Ikan Bandeng. *Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Negeri Malang*.

- [7] Duong-Ly, K. C., & Gabelli, S. B. (2019). Salting out of proteins using ammonium sulfate precipitation. *Methods in Enzymology*, 541(7), 85-94. doi: 10.1016/B978-0-12-420119-4.00007-0.
- [8] Wardani, A. K., & Nindita, L. O. (2012). Purifikasi Dan Karakterisasi Protease Dari Bakteri Hasil Isolasi Dari Whey Tahu (Purification and Characterization of Protease from Protease-producing Bacteria Isolated from Tofu Whey). *Jurnal Teknologi Pertanian*, 13(3), 149-156.
- [9] Yusmaniar, Wardiyah, & Nida, K. (2017). *Mikrobiologi Parasitologi*. Pusdik SDM Kesehatan, Jakarta Selatan.
- [10] Soeka, Y. S., & Sulistian. (2017). Karakterisasi Enzim Protease Dari Bakteri *Stenotrophomonas Sp.* Asal Gunung Bromo, Jawa Timur [Characterization of Protease Enzymes of *Stenotrophomonas sp.* Bacteria from Bromo Mountain, East Java]. *Jurnal Ilmu-Ilmu Hayati*, 16(2), 203-211.
- [11] Rahayu, M., & Susanti, E. (2017). Optimasi Jenis Dan Kadar Sumber Nitrogen Serta pH Medium Untuk Produksi Protease Dari Isolat HTcUM 6.2.2 Dari Tauco Surabaya. *Jurnal Kimia Riset*, 2(2), 93-107.