



Isolasi dan Identifikasi Molekuler Bakteri Proteolitik *Staphylococcus warneri* Strain IRLV2 pada Udang Putih (*Litopenaeus vannemei*) Berdasarkan Sekuen Gen 16S rRNA

Isolation and Identification of Proteolytic Staphylococcus warneri Strain IRLV2 In White Shrimps (*Litopenaeus vannemei*) Rusip Based on 16S rRNA Gene Sequence

Hillary Nurul Islami¹, Ayu Rahmawati Sulistyaningtyas², Sri Darmawati³,
Stalis Norma Ethica³

¹Program Studi D-IV Teknologi Laboratorium Medik Fakultas Ilmu Keperawatan dan Kesehatan Universitas Muhammadiyah Semarang

²Program Studi D-III Teknologi Laboratorium Medik Fakultas Ilmu Keperawatan dan Kesehatan Universitas Muhammadiyah Semarang

³Magister Sains Program Studi Fakultas Ilmu Keperawatan dan Kesehatan Universitas Muhammadiyah Semarang

Corresponding author: nurulislamihillary@gmail.com

Riwayat Artikel: Dikirim; Diterima; Diterbitkan

Abstrak

Penjualan enzim protease mencapai 60% dari penjualan total enzim di dunia. Di Indonesia, kebutuhan enzim protease dalam bidang industri masih mengandalkan pada produksi impor. Kebutuhan enzim protease dapat dipenuhi dengan memproduksi enzim yaitu mengoptimalkan sumber daya hayati yang melimpah. Rusip udang putih adalah makanan khas Belitung mengandung protein yang cukup tinggi dari udang putih yaitu 20,9 g dan biasanya produk perikanan menghasilkan enzim protease. Fermentasi rusip udang putih dilakukan selama 48 jam untuk memaksimalkan aktivitas enzim protease dengan mencampurkan 25% garam non iodium dan 10% gula aren. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui bakteri yang dapat menghasilkan enzim protease dari sampel rusip udang putih berdasarkan analisis molekuler. Uji aktivitas enzim menggunakan media SMA dengan hasil zona bening yang terbentuk berdiameter 11 mm. Metode isolasi DNA yang digunakan pada penelitian ini adalah metode chelex. Hasil Sekuensing gen 16S rRNA isolat bakteri proteolitik yang diperoleh menunjukkan kemiripan 100% dengan *Staphylococcus warneri*. Dapat disimpulkan bahwa bakteri penghasil enzim protease yang diisolasi dari sampel rusip udang putih pasca fermentasi 2 hari pada penelitian ini adalah *Staphylococcus warneri* IRLV2 (Indonesian Rusip *Litopenaeus vannemei* Day-2)

Kata kunci : Enzim protease, *Staphylococcus warneri*, rusip udang putih, Gen 16S rRNA

Abstract

The sale of protease enzymes reaches 60% of the total sales of enzymes in the world. In Indonesia, the need for protease enzymes in the industrial sector still relies on imported production. Protease enzyme needs can be met by producing enzymes that optimize the abundant biological resources. White shrimp Rusip is a typical food of Belitung containing high protein from white shrimp which is 20.9 g and usually fishery products produce enzyme protease. White shrimp rusip fermentation was carried out for 48 hours to maximize the activity of the protease enzyme by mixing 25% non-iodized salt and 10% palm sugar. This study aims to determine the bacteria that can produce protease enzymes from white shrimp rusip samples based on molecular analysis. Enzyme activity testing using SMA media with the results of a clear zone formed 11 mm in diameter. The DNA isolation method used in this study is the chelex method. Results of 16S rRNA gene sequencing obtained from proteolytic bacteria isolates showed 100% similarity with *Staphylococcus warneri*. It can be concluded that the bacteria producing protease enzyme isolated from rusip samples of white shrimp after 2 days fermentation in this study was *Staphylococcus warneri* IRLV2 (Indonesian Rusip *Litopenaeus vannemei* Day-2)

Keywords: Protease enzyme, *Staphylococcus warneri*, rusip, white shrimp, 16S rRNA gene



PENDAHULUAN

Protease adalah salah satu kelompok enzim yang sering digunakan pada bidang industri. Protease dapat diisolasi dari berbagai organisme seperti hewan, bakteri, tanaman dan jamur (Fatoni, 2008). Kemajuan dalam bidang bioteknologi mendorong penggunaan enzim protease dalam berbagai produk yang menguntungkan (Naiola *et al*, 2002). Enzim protease dalam bidang kesehatan digunakan sebagai terapi untuk pengobatan tumor, radang, kelainan darah dan pengendalian kekebalan tubuh (Soeka, 2011).

Tingkat penjualan enzim protease mencapai 60% dari penjualan total enzim di dunia (Yuniati, 2015). Kebutuhan enzim protease semakin meningkat di Indonesia, namun kebutuhan tersebut masih bergantung pada produksi impor. Ketergantungan impor enzim protease dapat diatasi dengan memproduksi enzim protease yaitu mengoptimalkan pemanfaatan sumber daya hayati yang dimiliki oleh Indonesia (Putri, 2012). Sumber enzim yang paling banyak digunakan adalah mikroorganisme dibandingkan dengan tanaman dan hewan. Sebagai sumber enzim, mikroorganisme memiliki kelebihan yaitu pertumbuhannya cepat dan dapat tumbuh pada substrat yang murah namun mikroorganisme rentan akan kontaminasi. Peluang untuk mendapatkan mikroorganisme yang berpotensi sebagai penghasil enzim didukung dengan tingginya keanekaragaman hayati di Indonesia (Akhdiya, 2003). Isolasi bakteri penghasil enzim protease dapat dilakukan pada sampel makanan hasil fermentasi yang kaya akan protein salah satunya yaitu rusip.

Fermentasi adalah upaya untuk mengawetkan makanan yang sederhana dan murah. Keunggulan dari produk fermentasi ada pada rasa yang unik dan meningkatkan nilai ekonomi. Rusip merupakan makanan tradisional khas Bangka Belitung yang terbuat dari ikan teri atau udang, garam non iodium dan gula aren. Garam non iodium yang tercampur berfungsi sebagai pengawet dan dapat menyerap kandungan air pada udang namun garam non iodium bersifat tidak membunuh mikroba yang tumbuh pada saat proses fermentasi. Selain itu, pembuatan rusip menggunakan udang putih atau *Litopenaeus vannamei* yang digemari masyarakat dan dapat menjadi sumber protein. Protein yang terkandung dalam udang putih yaitu sebanyak 20,3 Gram dan using sebagai salah satu produk perikanan yang biasanya menghasilkan enzim protease (Purba, 2012; Yuktika *et al*, 2017; Berliana, 2018 dan Ibrahim, T *et al*, 2014). Aktivitas enzim protease optimum pada waktu fermentasi 48 jam. Waktu yang tepat akan menghasilkan enzim protease yang maksimum (Soeka *et al*, 2011). *Nutrient agar* (NA) adalah media yang dapat digunakan dalam isolasi bakteri untuk mendapatkan isolat murni atau koloni tunggal. Sedangkan *skim milk agar* (SMA) digunakan untuk uji aktivitas proteolitik bakteri penghasil protease dengan isolasi bakteri (Lestari *et al.*, 2018; Safitri *et al.*, 2018; Pamaya *et al.*, 2018).

Polymerase Chain Reaction (PCR) merupakan perubahan pada aspek biologi molekuler di seluruh dunia. PCR adalah teknik yang melibatkan beberapa tahap yang diulang (siklus) (Hadoyo, 2001) Analisis yang digunakan untuk identifikasi bakteri proteolitik penghasil enzim protease menggunakan metode PCR dengan gen 16S rRNA. Gen 16S rRNA terdapat pada semua bakteri dan gen ini bisa mengklasifikasikan berdasarkan kekerabatan bakteri (Darmawati, 2014; Aris, 2013). Teknologi ini memiliki keunggulan dalam hal kecepatan, sensitifitas dan spesifitas yang tinggi dalam melipatgandakan kopi DNA maupun dalam mendeteksi suatu mikroorganisme menjadikan PCR sebagai "*method of choice*" (Budiarto, 2015; Safitri *et al.*, 2018; Ethica *et al.*, 2013).

METODE

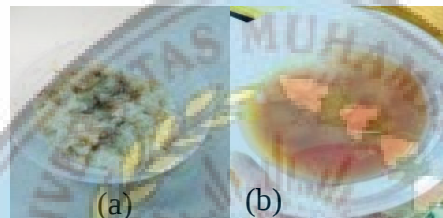
Penelitian ini dilakukan dengan menggunakan analisis deskriptif eksperimen untuk

mendapatkan data yang diperlukan dengan objek penelitian yaitu bakteri penghasil enzim protease yang terdapat pada rusip udang putih pasca fermentasi 48 jam. Penelitian dilakukan di Laboratorium Terpadu Universitas Diponegoro pada bulan Mei sampai September 2019.

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah cawan petri disposable, mikropipet, inkubator, autoklaf, oven, hot plate, tabung reaksi, erlenmeyer, rak tabung, gelas ukur, lampu spiritus, ose jarum, ose bulat, neraca analitik, mikrotube, waterbath, vortex, termal cyler, chamber, speser, comb, power supply, ultraviolet transilluminator. Bahan yang dibutuhkan dalam penelitian ini adalah rusip udang putih, NaCl fisiologis, ddH₂O, kapas, tisu, plastik dan plastik wrap, aluminium foil, kertas label, media *Nutrien Agar*, BHI, media *Skim Milk Agar*, aquades, *My taq red mix*, unisafe acid stain, TE Buffer, PBS, DNA template (isolat DNA genom /total), PCR Master Mix (Promega), Primer Forward 27F 16S rRNA, Primer Reverse 1492R 16S rRNA, gel agarose, Loading dye, Larutan Tris Borat EDTA.

HASIL

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah rusip udang putih pasca fermentasi 48 jam. Dapat dilihat pada gambar 1.



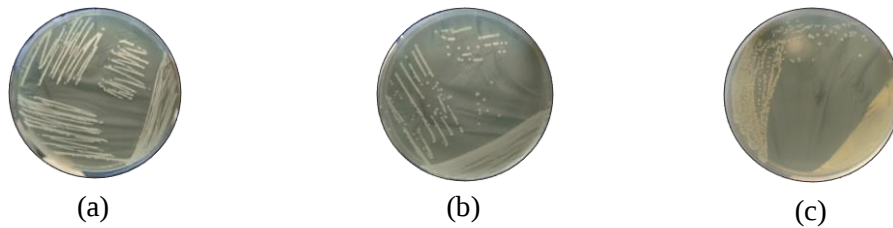
Gambar 1. Gambaran sampel penelitian (a) rusip udang putih sebelum fermentasi 48 jam (b) rusip udang putih setelah fermentasi 48 jam.

Proses isolasi diawali dengan pengenceran bertingkat seperti pada Gambar 2. Pengenceran dimulai dari 10^0 - 10^{-5} .



Gambar 2. Proses Pengenceran

Pada proses isolasi didapatkan 3 koloni bakteri dari rusip udang putih pasca fermentasi 48 jam dengan morfologi koloni yang berbeda. Morfologi masing-masing koloni dapat dilihat pada Gambar 3.



Gambar 3. Hasil purifikasi 3 koloni, Isolat bakteri IRLV2.A (a) Isolat bakteri IRLV2.B (b) dan Isolat Bakteri IRLV2.C (c) dari sampel rusip udang putih fermentasi 48 jam

Keterangan:

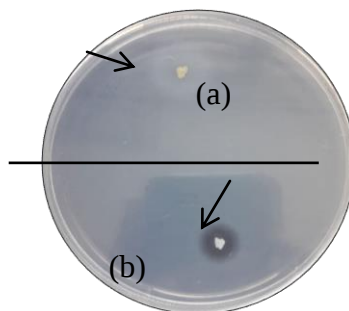
IRLV2.A (Koloni Putih Kecil)	IRLV2.B (Koloni Kuning)	IRLV2.C (Koloni Putih Besar)
Bentuk : Bulat	Bentuk : Bulat	Bentuk : Bulat
Warna : Putih	Warna : Kuning	Warna : Putih
Elevasi : Flat/datar	Elevasi : Flat/datar	Elevasi : Flat/datar
Tepi : Utuh	Tepi : Utuh	Tepi : Utuh
Sifat : Kering	Sifat : Kering	Sifat : Kering
Konsistensi : Smooth	Konsistensi : Smooth	Konsistensi : Smooth
Ukuran : Kecil	Ukuran : Sedang	Ukuran : Besar

Tiga isolat bakteri yang terpisah pada media NA diidentifikasi dengan menggunakan metode Gram dan diamati di bawah mikroskop untuk mengetahui warna dan susunan pada seriap preparat dari proses purifikasi murni. Hasil pewarnaan dan pengamatan dapat pada Gambar 4.



Gambar 4. Hasil Pewarnaan Gram Koloni Bakteri (a) IRLV2.A (b) IRLV2.B (c) IRLV2.C

Isolat bakteri yang telah dipilih untuk uji kemampuan dalam mengasilkkan enzim protease untuk megetahui bakteri yang dipilih menghasilkan enzim protease atau tidak. Hasil uji produksi enzim dapat dilihat pada Gambar 5.



Gambar 13. Hasil Uji Produksi Enzim (a) Bakteri IRLV2.B yang tidak membentuk zona

bening (b) Bakteri IRLV2.A yang membentuk zona bening

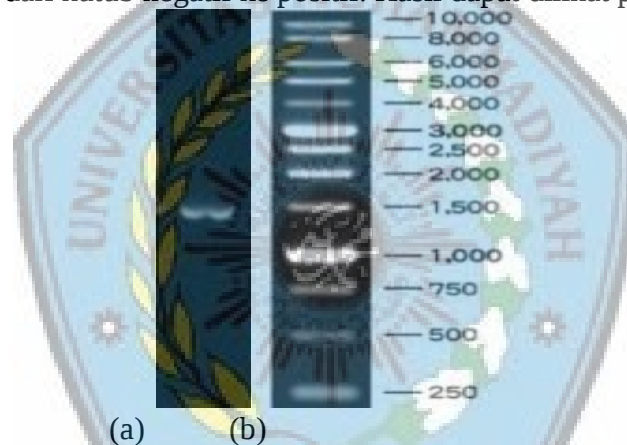
Berdasarkan gambar (a) Bakteri IRLV2.B tidak menghasilkan zona bening yang artinya koloni IRLV2.B tidak dapat menghasilkan enzim protease. Sedangkan gambar (b) menghasilkan zona bening yang artinya koloni pada sampel menghasilkan enzim protease. Zona bening yang dihasilkan diukur menggunakan jangka sorong untuk mengetahui diameter yang dihasilkan bakteri (Sabrina *et al.*, 2018; Sabrina *et al.*, 2018). Diameter yang dihasilkan pada sampel kode cawan petri IRLV2A adalah 11 mm.

Berdasarkan hasil uji kuantifikasi Absorbansi DNA yang diperoleh dari sampel IRLV2A pada penelitian ini didapatkan konsentrasi DNA dengan nilai 1,82 ng/µl maka hasil tersebut sudah dinyatakan murni. Hasil uji kuantifikasi ekstrak DNA dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Hasil Kuantifikasi Absorbansi DNA

Sampel ID	Konsentrasi Asam Nukleat	260/280	260/230
H2	9,4 ng	1,82	0,42

Hasil amplifikasi divisualisasikan menggunakan Gel Elektroforesis untuk melihat perpindahan molekul dari kutub negatif ke positif. Hasil dapat dilihat pada Gambar 6.



Gambar 6. Hasil Amplifikasi Gen 16S rRNA (a) Sampel (b) Marker

Berdasarkan Gambar 6 (a) merupakan sampel yang memiliki kesjajaran dengan (b) sebagai marker dengan ukuran 1500 bp yang artinya amplifikasi dinyatakan berhasil. Uji sekuensing dilakukan untuk menentukan urutan nukleotida pada fragmen DNA yang terdeteksi dari hasil visualisasi DNA menggunakan mesin sekuensing DNA otomatis. Penentuan urutan DNA dilakukan oleh jasa komersial *Genetika Science* Indonesia yang kemudian diurutkan kembali dengan software DNA BASER lalu dicocokkan dengan menggunakan BLAST untuk mengetahui kemiripan bakteri. BLAST dapat diakses di (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Sekuens yang diperoleh dapat dilihat di lampiran 2. Urutan basa yang diperoleh lalu di cocokkan dengan menggunakan BLAST memiliki kemiripan 100% dengan *Staphylococcus warneri* dari isolat IRLV2A. Sehingga isolat diberi nama IRLV2 IRLV2A (Rusip *Litopeaneus vannemei* hari ke 2).

DISKUSI

Proses isolasi bakteri dimulai dari pengambilan sampel rusip udang putih yang diencerkan dengan aquades steril dengan pengenceran bertingkat. Suspensi yang dihasilkan kemudian ditanam di media NA yang bertujuan untuk memisahkan koloni agar tidak



bertumpuk dan memudahkan untuk mengamati morfologinya (Lestari, 2018).

Menurut Putri (2012) Pengamatan morfologi koloni bakteri secara makroskopis meliputi warna, bentuk, sifat, elevasi, konsistensi, ukuran dan margin. Berdasarkan hasil penelitian didapat 3 koloni terpisah dengan morfologi yang berbeda. Perbedaan ketiganya dapat dilihat dari warna dan ukuran. Terdapat 1 koloni berwarna kuning dan 2 koloni berwarna putih dengan ukuran yang besar sebanyak 1 koloni dan ukuran yang kecil sebanyak 2 koloni. Semua koloni memiliki bentuk yang bulat, elevasi datar, bersifat kering dan konsistensi yang *smooth*.

Koloni yang terpisah diberi kode IRLV2A, IRLV2B dan IRLV2C. Koloni tersebut di purifikasi sampai murni dan diamati morfologi secara visual menggunakan mikroskop dengan perbesaran objektif 100X. Koloni yang dibuat preparat sebelumnya sudah diwarnai dengan pewarnaan Gram untuk mengetahui bentuk dan kelompok Gram-negatif atau -positif. Pada penelitian ini diambil 1 koloni yang berbeda dengan kode IRLV2A yang merupakan Gram-positif susunan seperti anggur (Fitri dan Yasmin, 2011).

Setelah melakukan isolasi, identifikasi dan purifikasi, selanjutnya dilakukan uji produksi enzim dengan koloni murni terpilih. Menurut Putri (2012); Safitri (2018); Suhartono dan Artika (2017) media SMA yang mengandung kasein berfungsi untuk melihat kemampuan enzim protease. Bakteri penghasil enzim protease ditandai dengan terbentuknya zona bening karena adanya pemecahan molekul protein pada susu skim yang ditambahkan ke dalam media. Berdasarkan hasil uji produksi enzim protease yang diinkubasi selama 24 jam didapat hasil diameter zona bening bakteri 11 mm yang menunjukkan bahwa bakteri IRLV2 menghasilkan enzim protease.

Tahap selanjutnya yaitu isolasi DNA genom dengan metode chelex (Ethica dan Raharjo, 2014; Ayuningrum, 2016). Hasil isolasi DNA genom diuji kuantifikasi absorbansinya menggunakan nanodrop spektrofotometer dengan panjang gelombang OD₂₆₀ dan OD₂₈₀ nilai murni 1,8-2,0. Rasio yang dihasilkan menunjukkan bahwa bakteri IRLV2A murni dengan nilai kemurnian 1,82 karena kuantifikasi DNA target sangat mempengaruhi reaksi amplifikasi dan dapat menghambat kerja enzim DNA polimerase (Fatchiyah *et al.*, 2011).

Hasil ekstrak DNA genom diamplifikasi dengan metode PCR berdasarkan Gen 16S rRNA. Campuran komponen PCR meliputi *My Taq Red Mix*, *Primer forward*, *Primer Reverse*, ddH₂O. Tahapan PCR dimulai dari pra denaturasi dengan suhu 95°C, denaturasi pada suhu 95°C, Anneling pada suhu 55°C, ekstensi pada suhu 72°C, *final elongasi* pada suhu 72°C dan yang terakhir *Cooling down* pada suhu 4°C (Ethica dan Raharjo, 2014; Inayatul *et al.*, 2018)

Hasil Amplifikasi PCR divisualisasikan menggunakan gel agarose 1%. Hasil amplifikasi menggunakan Gen 16S rRNA menunjukkan pita 1500 bp sejajar dengan sampel IRLV2 (Gambar 13). Menurut Rinanda (2011) Gen 16S rRNA yang digunakan dapat mengamplifikasi seluruh bakteri dengan ukuran 1500 bp. Berdasarkan hasil yang telah didapat, terbentuknya pita tanpa adanya *smear* menunjukkan bahwa hasil amplifikasi dan penggunaan primer sudah tepat.

Hasil amplifikasi selanjutnya dikirim ke *Genetika Science* Indonesia untuk mengurutkan basa nitrogen. Hasil sekuensing diurutkan kembali menggunakan software DNA BASER kemudian dicocokkan dengan *genk bank* yang di akses dari NCBI. Diketahui bahwa bakteri IRLV2 memiliki kemiripan 100% yang artinya kemiripan dengan data yang terdapat pada sekuens database besar 97-100% dinyatakan sebagai hasil yang signifikan, sementara kemiripan sebesar 92-96% dinyatakan sebagai hasil yang cukup, sedangkan hasil kemiripan kurang dari 91% dinyatakan sebagai hasil yang tidak signifikan untuk menyatakan bahwa sekuens yang kita miliki adalah spesies yang terdapat di dalam database GenBank.



Identifikasi secara molekuler jauh lebih disarankan karena memiliki hasil yang lebih akurat (Bhattacharjee *et al.*, (2012); Widyadnyana, *et al.*, 2015). *Staphylococcus warneri* merupakan bakteri Gram-positif. Fatoni (2012) mengatakan bahwa salah satu mikroorganisme yang menghasilkan enzim protease ekstraseluler adalah *Staphylococcus* sp. Hasil penelitian ini adalah ditemukannya bakteri penghasil enzim protease *S. warneri* strain IRLV2 ((*Indonesian* Rusip *Litopeaneus vannemei* Day-2) pada rusip udang putih. Dengan demikian penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi mengenai bakteri yang dapat menjadi sumber protease baru.

KESIMPULAN

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, dapat disimpulkan bahwa hasil seleksi bakteri penghasil protease terbaik adalah isolat IRLV2A yang memiliki kemiripan 100% dengan *Staphylococcus warneri* sehingga diberi nama *S.warneri* IRLV2.

DAFTAR PUSTAKA

- Akhdiya, A. 2003. *Isolasi Bakteri Penghasil Enzim Protease Alkalin Termotabil*.
- Arifiani, N. and Ethica, S.N., 2018, November. Isolasi Bakteri Penghasil Lipase dan Protease yang Berpotensi sebagai Agen Bioremediasi dari Limbah Biomedis Cair Puskesmas Halmahera Kota Semarang. In *Prosiding Seminar Nasional Mahasiswa Unimus* (Vol. 1).
- Berliyana, M. F. 2018. *Isolasi dan Uji Antibakter Isolat Penghasil Protease dari Terasi Produksi daerah Lamung*. UNILA. Lampung
- Bhattacharjee, M. J., Laskar, B. A., Dhar, B., Ghosh, S.K. 2012. *Identification and Re-evaluation of Freshwater Catfishes through DNA Barcoding*.
- Budiarto, B. R. 2015. *Polymerase Chain Reaction (PCR); Perkembangan dan Perannya dalam Diagnostik Kesehatan*. LIPI. Bogor
- Buletin Plasma Nutfah. Bogor
- Darmawati, S., Sembiring, L., Asmara, W., Artama, W.T. and Kawaichi, M., 2014. Phylogenetic relationship of Gram Negative Bacteria of Enterobacteriaceae Family in the Positive Widal Blood Cultures based on 16S rRNA Gene Sequences. *Indonesian Journal of Biotechnology*, 19(1), pp.64-70.
- Ethica, S.N., 2014. *Detection of genes involved in glycerol metabolism of Alcaligenes sp. JG3* (Doctoral dissertation, Universitas Gadjah Mada).
- Ethica, S.N., Hammi, M.K., Lestari, P., Semiarti, E., Widada, J. and Raharjo, T.J., 2013. Amplification of *Azospirillum* sp. JG3 glpD gene fragment using degenerate primers generated by web-based tools. *The Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 3(3), p.231.
- Fatoni, A., Zufahair, Lestasi, A. 2008. *Isolasi dan Karakterisasi Protease Ekstraseluler dari Bakteri dalam Limbah Cair Tahu*. Unsoed. Jawa tengah
- Handoyo, D., Rudiretna, A. 2001. *Prinsip Umum dan Pelaksanaan Polymerase Chain Reaction*. Universitas Surabaya
- Ibrahim, T *et al.* 2011. *Analisa E.coli pada Udang putih (Litopeaneus vannemei) Segar Pasca Pencucian Bertahap dalam Proses Pengolahan Udang Beku di PT XX Kota Gorontalo*. Universitas Negeri Gorontalo. Gorontalo
- Inayatul, W.O., Muchlisin, S.I., Mukaromah, A.H., Darmawati, S. and Ethica, S.N., 2018. Isolasi Dan Identifikasi Molekuler Bakteri Penghasil Enzim Protease *Pseudomonas* Stutzeri ISTD4 dari Tempe Gembus Pasca Fermentasi 1 Hari. In *Prosiding Seminar Nasional & Internasional* (Vol. 1, No. 1).



- Lestari, D.A., Muchlissin, S.I., Mukaromah, A.H., Darmawati, S., Ethica, S.N., 2018. *Isolasi Bakteri Penghasil Enzim Protease Bacillus Megaterium IROD3 Dari Oncom Merah Pasca Fermentasi 72 Jam*. Universitas Muhammadiyah Semarang. Semarang
- Naiola, E., Widhyastuti, N. 2002. *Isolasi, Seleksi Dan Opttmasi Produksi Protease Daribeberapaisolat Bakteri*. LIPI. Bogor
- Purba, C. Y. 2012. *Performa Pertumbuhan, Kelulushidupan, Dan Kandungan Nutrisi Larva Udang Vanamei (Litopenaeus Vannamei) Melalui Pemberian Pakan Artemia Produk Lokal Yang Diperkaya Dengan Sel Diatom*. Undip. Semarang
- Putri, Yunita Silvia., 2012. *Skrining dan Uji Aktivitas Enzim Protease Bakteri dari Limbah Rumah Pemotongan Hewan*. Skripsi. Universitas Airlangga
- Sabrina, A.N. and Ethica, S.N., 2018, November. *Potensi Bakteri Indigen Penghasil Enzim Protease dan Lipase sebagai Agen Bioremediasi Limbah Biomedis Puskesmas Tlogosari Kulon*. In *Prosiding Seminar Nasional Mahasiswa Unimus*(Vol. 1).
- Safitri, R., Muchlissin, S.I., Mukaromah, A.H., Darmawati, S., Ethica, S.N., 2018. *Isolasi Bakteri Penghasil Enzim Protease Bacillus Thuringiensis IROD1 Dari Oncom Merah Pasca Fermentasi 24 Jam*. Universitas Muhammadiyah Semarang. Semarang
- Soeka,Y.S., Rahayu, S.H., Setianingrum, N., Naiola, E. 2011. *Kemampuan Bacillus Licheniformis Dalam Memproduksi Enzim Protease Yang Bersifat Alkalin Dan Termofilik*. LIPI. Bogor
- Suhubawa, L dan Ustadi. 2014. *Teknologi Pengawetan dan Pengolahan Hasil Perikanan*. UGM. Yogyakarta.
- Widyadnyana, D. G., Sukrama, I. D., &Suardana, I.W. 2015. *Identifikasi Bakteri asam Laktat zisolat 9A dari Kolon Sapi Bali sebagai Probiotik melalui Analisis Gen 16S rRNA*.
- Yuktika, S., Sutiyanti, E., Dhewi, E.S., Martika, S. D., Sa'diyah, R. D. 2017. *Pengaruh Variasi Konsentrasi Garam Terhadap Kualitas Fermentasi Udang*. UNS. Surabaya
- Yuniati, R., Nugroho, T.T., Pusfita, F. 2015. *Uji Aktivitas Enzim Protease dari Isolat Bacillus sp. Galur Lokal Riau*. JOM FMIPA. Pekanbaru.