

## OPTIMASI WAKTU INKUBASI PRODUKSI PROTEASE DAN AMILASE ISOLAT BAKTERI ASAL TERASI IKAN TERI *Stolephorus* sp.

### OPTIMIZATION OF INCUBATION TIME IN THE PRODUCTION OF PROTEASE AND AMYLASE BY BACTERIAL ISOLATES OF ANCHOVY *Stolephorus* sp. PASTE ORIGIN

Yulia Oktavia<sup>1\*</sup>, Shanti Dwita Lestari<sup>2</sup>, Susi Lestari<sup>2</sup>, Herpandi<sup>2</sup>, dan Miftahul Jannah<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Program Studi Teknologi Hasil Perikanan, FIKP-UMRAH, Tanjungpinang

<sup>2</sup>Program Studi Teknologi Hasil Perikanan, FP- UNSRI, Indralaya

<sup>3</sup>Alumni Program Studi Teknologi Hasil Perikanan, FP-UNSRI, Indralaya

\*E-mail: [shanti.dwita@gmail.com](mailto:shanti.dwita@gmail.com)

#### ABSTRACT

The purpose of this research was to know the optimization of incubation time in the production of protease and amylase by bacterial isolates of anchovy *Stolephorus* sp. paste origin. This research was conducted in two stages, namely the growth of bacterial isolates measurement and determination the optimum time production of the enzyme protease and amylase. Testing conducted include the test proteases and amylase enzyme activity and protein levels of each of these enzymes. The data will be analyzed test results are descriptive. There are 4 bacterial isolates, where 2 isolates, which is a protease-producing bacteria isolates that is P2 and P4, and 2 isolates, which is the amylase-producing bacteria that is A2 and A4. The activity of the protease optimum occurs at to-36 hours to isolate P2 of 0.073 U/mL with a specific activity of 1.632 U/mg and isolates P4 that is 0.057 U/mL with a specific activity of 4.91 U/mg. Whereas amylase activity, optimum occurs at to-36 hours for A2 isolates of 0.360 U/mL with a specific activity of 7.73 U/mg and activity of amylase optimum on A4 isolates of 0.239 U/mL with a specific activity of 5.224 U/mg.

**Keywords:** amylase, anchovy paste, enzyme, microbial, protease

#### ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk menentukan waktu optimum produksi enzim protease dan amilase isolat bakteri asal terasi ikan teri *Stolephorus* sp. Penelitian ini dilakukan dalam dua tahap yaitu pengukuran pertumbuhan isolat bakteri dan penentuan waktu optimum produksi enzim protease dan amilase. Pengujian yang dilakukan meliputi uji aktivitas enzim protease dan amilase dan kadar protein dari tiap-tiap enzim tersebut. Data hasil pengujian dianalisis secara deskriptif. Ada 4 isolat bakteri, 2 isolat merupakan bakteri penghasil protease yaitu isolat P2 dan P4, dan 2 isolat yang merupakan bakteri penghasil amilase yaitu A2 dan A4. Aktivitas protease optimum terjadi pada jam ke-36 untuk isolat P2 sebesar 0,073 U/mL dengan aktivitas spesifik sebesar 1,632 U/mg dan isolat P4 yaitu 0,057 U/mL dengan aktivitas spesifik 4,91 U/mg. Aktivitas amilase optimum terjadi pada jam ke-36 untuk isolat A2 sebesar 0,360 U/mL dengan aktivitas spesifik sebesar 7,73 U/mg dan aktivitas amilase optimum pada isolat A4 sebesar 0,239 U/mL dengan aktivitas spesifik 5,24 U/mg.

**Kata kunci:** amilase, enzim, mikroba, protease, terasi teri

## I. PENDAHULUAN

Mikroorganisme banyak dimanfaatkan sebagai sumber penghasil enzim komersial dikarenakan sifat fisika dan biokimianya serta kultivasi yang mudah untuk dimanipulasi (Rodarte *et al.*, 2011). Penggunaan enzim dalam bioteknologi

modern semakin berkembang secara cepat, terutama enzim protease dan amilase. Enzim protease dan amilase telah banyak digunakan dalam bidang industri pangan, farmasi dan industri kimia lainnya. Menurut Uddin *et al.* (2014), enzim protease banyak dimanfaatkan dalam bidang bioteknologi untuk memproduksi asam amino dan peptida dari substrat

bermolekul tinggi atau dalam industri kulit, penggunaan dalam pengolahan air limbah, tekstil, obat-obatan, kosmetik, industri pengolahan kulit dan peternakan unggas. Menurut de Souza *et al.* (2010), enzim amilase yang dihasilkan dari mikroba dapat dimanfaatkan pada industri tekstil, kertas, deterjen, konversi pati, dan produksi bahan bakar etanol. Enzim yang digunakan untuk aplikasi industri dan bioteknologi umumnya berasal dari mikroorganisme seperti bakteri, fungi dan jamur.

Mikroorganisme adalah sumber enzim yang paling banyak digunakan dibandingkan dengan tanaman dan hewan. Mikroorganisme sebagai sumber enzim lebih menguntungkan karena pertumbuhannya cepat, dapat tumbuh pada substrat yang murah, lebih mudah ditingkatkan hasilnya melalui pengaturan kondisi pertumbuhan dan rekayasa genetik. Adrio dan Demain (2014) menyatakan bahwa pemilihan mikroorganisme sebagai produsen enzim karena mikroorganisme mampu dijadikan solusi akan tingginya permintaan enzim yang menuntut adanya produksi yang berkelanjutan.

Adanya mikroorganisme yang unggul merupakan salah satu faktor penting dalam usaha produksi enzim. Mikroorganisme yang digunakan untuk memproduksi enzim yaitu bakteri amilolitik dan proteolitik yang telah diisolasi dari terasi ikan teri *Stolephorus* sp. Menurut Arfarita dan Chukeatirote (2015), Terasi adalah pasta padat hasil fermentasi udang dan ikan yang biasanya difermentasi dalam kondisi kadar garam tinggi.

Enzim-enzim yang berperan dalam perombakan terasi secara garis besar tergolong pada jenis proteolitik, amilolitik dan lipolitik. Enzim yang berasal dari mikroba maupun enzim alami pada bahan baku akan merombak makromolekul seperti pati, protein dan lemak menjadi senyawa yang lebih sederhana. Enzim protease berfungsi mengubah protein menjadi asam amino, amilase mengubah pati menjadi maltosa, dan lipase mengubah lemak menjadi asam lemak dan gliserol (Kim *et al.*, 2011).

Penelitian aktivitas enzim protease dan amilase dari terasi ikan teri perlu dilakukan untuk mengetahui waktu optimum produksi enzim dan pengujian aktivitas enzim yang dihasilkan oleh mikroba asal terasi ikan teri *Stolephorus* sp. Penelitian ini bertujuan untuk menentukan waktu optimasi optimum produksi enzim protease dan amilase yang berasal dari mikroba sampel terasi ikan teri *Stolephorus* sp.

## II. METODE PENELITIAN

### 2.1. Tempat dan Waktu

Penelitian ini dilaksanakan di laboratorium Teknologi Hasil Perikanan, Fakultas Pertanian, Universitas Sriwijaya dan laboratorium Kimia, laboratorium Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Sriwijaya. Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Februari sampai dengan April 2017.

### 2.2. Alat dan Bahan

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi erlenmeyer, tabung reaksi, labu takar, cawan petri, gelas ukur, beker glass, mikro pipet, *laminar flow*, jarum ose, spektrofotometer *UV-vis*, *shaker*, inkubator dan sentrifugasi.

Bahan yang digunakan antara lain isolat bakteri P2, P4, A2, dan A4 yang diisolasi dari terasi ikan teri, media SMA (*Skim Milk Agar*), NA (*Nutrient Agar*), kasein 2%, bufer fosfat pH 7, TCA, aquadest, tripton 1%, NaCl 1%, yeast, *Comassie Brilliant Blue* R-250, Asam Ortophospat, fenol, NaOH, Natrium Kalium Tartat, pepton, Pati, Gum Arab, CaCl<sub>2</sub>, DNS (3,5 Dinitrosalicylic Acid), glukosa, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, Pereaksi Folin Ciocalteu, SA (*Starch Agar*), akuabides, NaOH, HCl 6N, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0,01%, dan CaCl<sub>2</sub> 0,03%.

### 2.3. Prosedur Penelitian

Penelitian ini dilakukan dalam dua tahap yaitu pengukuran pertumbuhan isolat bakteri dan penentuan waktu optimum

produksi enzim protease dan amilase. Pengujian yang dilakukan meliputi uji aktivitas enzim protease dan amilase serta kadar protein dari tiap-tiap enzim tersebut. Data hasil pengujian dianalisis secara deskriptif.

#### 2.4. Penentuan Pertumbuhan dan Waktu Optimum Produksi Enzim

Pertumbuhan dan waktu optimum produksi enzim protease dan amilase ditentukan berdasarkan pengukuran OD (*Optical Density*) dan selanjutnya dilakukan pengukuran aktivitas tiap-tiap enzim pada jam ke-12, 24, 36, 48, dan 60. Ekstraksi enzim dilakukan dengan sentrifugasi kultur cair. Supernatan hasil sentrifugasi dianggap sebagai enzim kasar, kemudian diuji aktivitas dan kadar proteinnya.

#### 2.5. Penentuan Pertumbuhan dan Waktu Optimum Produksi Protease

Kultur murni isolat dari media NA masing-masing berumur 24 jam dipindahkan ke media *Luria Bertani Broth* (LB) sebanyak 1 loop. Produksi protease menggunakan media LB sebanyak 250 mL dan dilakukan pada suhu 37°C. Pengambilan sampel dilakukan setiap 12 jam selama 60 jam. Ekstraksi enzim protease dilakukan dengan cara sentrifugasi media pertumbuhan bakteri dengan kecepatan 3.000 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.

#### 2.6. Penentuan Pertumbuhan dan Waktu Optimum Produksi Amilolitik

Proses fermentasi  $\alpha$ -amilase dilakukan dengan membuat medium fermentasi dengan komposisi (g/L); 6,0 pepton; 0,5 MgSO<sub>4</sub>, 7H<sub>2</sub>O dan 1,0 pati soluble. Medium dimasukkan ke dalam tabung reaksi sebanyak 10 mL kemudian ditambahkan kalsium

klorida (CaCl<sub>2</sub>) 0,03% b/v. Inokulasi medium dilakukan dengan memasukkan inokulum sebanyak 10% (v/v). Inkubasi dilakukan pada suhu kamar 28 °C selama 12, 24, 36, 48 dan 60 jam pada shaker portable kecepatan 120 rpm. Media produksi disentrifugasi dengan kecepatan 4.000 rpm selama 10 menit. Sel akan mengendap oleh adanya gaya gravitasi sedangkan enzim tetap terdapat pada supernatan. Supernatan sebagai sampel diuji aktivitas protease dan kadar proteinnya.

#### 2.7. Parameter Pengujian dan Analisis Data

Parameter yang diuji pada penelitian ini meliputi pengukuran aktivitas protease (Bergmeyer *et al.*, 1983), pengukuran aktivitas amilase (Miller, 1959), dan pengukuran konsentrasi protein (Bradford, 1976).

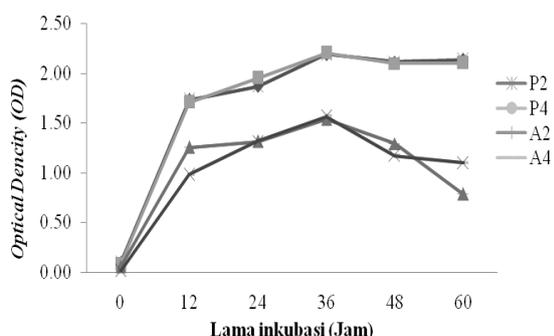
### III. HASIL DAN PEMBAHASAN

#### 3.1. Pertumbuhan Isolat Bakteri Penghasil Enzim Protease dan Amilase

Pertumbuhan pada bakteri didefinisikan sebagai pertambahan berat (jumlah) sel karena berat sel relatif sama dengan siklus sel. Pertumbuhan bakteri dapat dilihat dari kerapatan biomasanya. Ketika bakteri bertambah jumlahnya atau semakin besar ukurannya dalam biakan cair, terjadi peningkatan kekeruhan dalam biakan. Pengukuran pertumbuhan bakteri dapat dilakukan dengan 2 metode, yaitu metode secara langsung, menghitung sel dengan menggunakan haemositometer untuk mengukur pertumbuhan bakteri pada tanah, air, makanan dan lain-lain. Metode tidak langsung dapat dilakukan dengan cara mengamati kekeruhan dan melihat absorbansi sel menggunakan alat spektrofotometer. Menurut Zufahair *et al.* (2016), fase pertumbuhan dapat diukur dari kekeruhan bakteri pada media broth (*Optical density*) pada panjang gelombang 600 nm.

Ada empat isolat bakteri yang digunakan dalam penelitian ini yaitu isolat

bakteri P2 dan P4 yang merupakan isolat bakteri penghasil enzim protease, sedangkan isolat bakteri A2 dan A4 yang merupakan isolat penghasil enzim amilase. Hasil dari pengukuran pertumbuhan bakteri penghasil protease dan amilase dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Pertumbuhan isolat bakteri penghasil enzim protease (P2 dan P4) dan amilase (A2 dan A4).

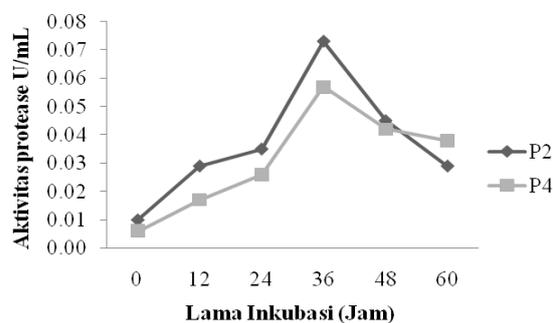
Berdasarkan hasil penelitian yang ditampilkan pada Gambar 1. menunjukkan bahwa keempat isolat bakteri mengalami fase adaptasi dimulai antara jam ke-0 sampai jam ke-12 yang ditandai oleh pertumbuhan bakteri yang masih sedikit karena bakteri masih beradaptasi dengan lingkungan barunya. Fase adaptasi (fase lag) merupakan suatu periode saat sel beradaptasi pada lingkungan baru dan menyiapkan untuk pertumbuhan reproduksi, biasanya dengan mensintesis komponen sel baru.

Fase logaritmik terjadi di antara jam ke-12 hingga jam ke-36 yaitu fase terjadinya peningkatan jumlah bakteri. Hal ini ditunjukkan dengan kenaikan OD pada bakteri protease yaitu 1,731-2,114 untuk isolat bakteri P2 dan 1,708-2,097 untuk isolat P4. Nilai OD bakteri amilase yaitu 1,2841,292 untuk isolat bakteri A2 dan 0,978-1,170 untuk isolat A4. Ini disebabkan pembelahan bakteri yang meningkat karena telah beradaptasi dengan lingkungannya serta nutrisi yang terdapat di dalam medium mencukupi bagi bakteri. Menurut Reiny (2012), fase logaritmik menggambarkan sel

membelah diri dengan laju yang konstan, masa menjadi dua kali lipat dengan laju sama dan aktivitas metabolisme konstan. Setiap mikroorganisme memiliki waktu produksi enzim yang berbeda-beda tergantung dari jenis mikroorganisme tersebut. Berdasarkan penelitian Suganthi *et al.* (2013), *Bacillus licheniformis* memiliki waktu optimum untuk memproduksi enzim protease yaitu pada jam ke-24.

### 3.2. Waktu Optimum Produksi Enzim Protease

Optimasi waktu produksi enzim protease dilakukan dengan mengukur aktivitas enzim protease tersebut pada selang waktu tertentu. Selang waktu yang digunakan dalam pengukuran aktivitas sama dengan waktu pengujian pertumbuhan bakteri yaitu jam ke-12, 24, 36, 48, dan 60. Hasil optimasi waktu produksi enzim dapat dilihat pada Gambar 2.



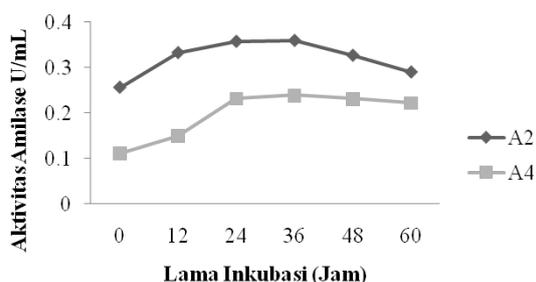
Gambar 2. Optimasi waktu produksi enzim protease.

Gambar 2 menunjukkan bahwa aktivitas protease optimum terjadi pada jam ke-36 dengan nilai aktivitas isolat bakteri P2 yaitu 0,073 U/mL dan isolat bakteri P4 yaitu 0,057 U/mL. Berdasarkan penelitian Pant *et al.* (2015), produksi protease asal *Bacillus subtilis* mengalami peningkatan dari jam ke-0 hingga jam ke-36 dengan aktivitas optimum yaitu 243,28 U/mL. Substrat yang digunakan untuk mengukur aktivitas protease yaitu kasein. Aktivitas enzim protease merupakan kemampuan enzim dalam menghidrolisis

substrat kasein sehingga memutuskan rantai-rantai polipeptida pada kasein. Substrat kasein tersebut akan terurai menjadi peptida dan asam amino. Besarnya aktivitas protease ditentukan berdasarkan jumlah tirosin yang dihasilkan dalam menghidrolisis kasein. Aktivitas enzim diproduksi seiring dengan pertumbuhan sel dan mencapai aktivitas tertinggi menjelang fase stasioner atau diakhir fase eksponensial. Hal ini terjadi karena adanya penumpukan hasil metabolit yang digunakan untuk pertumbuhan bakteri. Menurut Alnahdi (2012), kondisi optimum untuk memproduksi enzim protease terjadi pada akhir fase eksponensial.

### 3.3. Optimasi Waktu Produksi Enzim Amilase

Amilase merupakan enzim yang sangat penting dalam industri pati untuk menghidrolisis polisakarida menjadi gula sederhana (Gupta *et al.*, 2003). Aktivitas amilase diukur menggunakan pati sebagai substrat. Pati merupakan sumber karbon yang baik untuk menginduksi produksi enzim amilase. Aktivitas amilase diukur berdasarkan konsentrasi glukosa yang dihasilkan oleh amilase dalam menghidrolisis pati. Hasil optimasi produksi enzim amilase dapat dilihat pada Gambar 3.



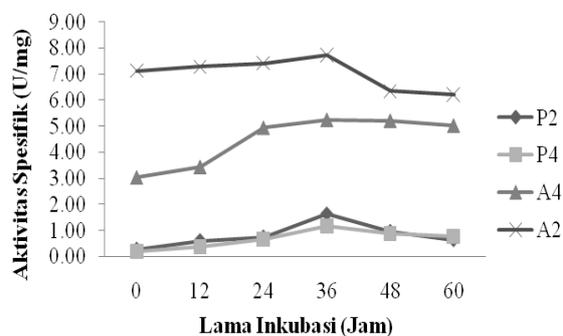
Gambar 3. Optimasi waktu produksi enzim amilase.

Gambar 3 menunjukkan bahwa aktivitas optimum amilase baik isolat A2 dan A4 terjadi pada jam ke-36. Seiring dengan waktu pertumbuhan bahwa pada jam ke-36 diduga merupakan awal fase stasioner.

Aktivitas amilase yang dihasilkan oleh isolat bakteri A2 yaitu 0,36 U/mL dan isolat bakteri A4 yaitu 0,239 U/mL. Pada jam ke-48 hingga jam ke-60 terjadi penurunan aktivitas enzim yang disebabkan oleh persediaan nutrisi pada media berkurang sehingga bakteri tidak bisa mensekresikan enzim lagi. Menurut Haq *et al.* (2010), penurunan aktivitas amilase disebabkan adanya penumpukan sisa metabolisme bakteri dan juga terjadinya penurunan nutrisi pada media.

### 3.4. Konsentrasi Protein dan Aktivitas Spesifik

Aktivitas spesifik ditentukan oleh dua faktor yaitu aktivitas enzim dan kadar protein enzim tersebut. Aktivitas spesifik enzim diperoleh dengan membandingkan unit aktivitas enzim dengan kadar protein dari tiap-tiap enzim. Aktivitas spesifik menyatakan jumlah unit enzim per mg protein atau besarnya aktivitas enzim per jumlah protein yang terkandung dalam campuran enzim yang diuji. Hasil aktivitas spesifik protease dan amilase dapat dilihat pada Gambar 4.



Gambar 4. Aktivitas spesifik enzim protease (P2 dan P4) dan amilase (A2 dan A4).

Berdasarkan Gambar 4. menunjukkan bahwa aktivitas spesifik protease tertinggi isolat P2 dan P4 terjadi pada jam ke-36. Aktivitas spesifik isolat P2 sebesar 1,632 U/mg dengan kadar protein 0,044 mg/mL dan isolat P4 sebesar 1,160 U/mg dengan kadar protein 0,049 mg/mL.

Aktivitas spesifik amilase tertinggi isolat A2 dan A4 terjadi pada jam ke-36. Aktivitas enzim dan kadar protein diproduksi seiring dengan pertumbuhan sel dan mencapai aktivitas tertinggi menjelang fase stasioner. Aktivitas spesifik isolat A2 sebesar 7,741 U/mg dengan kadar protein 0,046 mg/mL dan isolat A4 sebesar 5,244 U/mg dengan kadar protein 0,045 mg/mL.

#### IV. KESIMPULAN

Aktivitas optimum protease pada jam ke-36 untuk isolat P2 sebesar 0,073 U/mL dengan aktivitas spesifik sebesar 1,632 U/mg dan isolat P4 yaitu 0,057 U/mL dengan aktivitas spesifik 1,160 U/mg. Sedangkan, aktivitas optimum amilase terjadi pada jam ke-36 untuk isolat A2 sebesar 0,36 U/mL dengan aktivitas spesifik sebesar 7,741 U/mg dan aktivitas amilase optimum pada isolat A4 sebesar 0,239 U/mL dengan aktivitas spesifik 5,224 U/mg.

#### UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada DIPA Universitas Sriwijaya melalui Program Penelitian Sains Teknologi dan Seni Universitas Sriwijaya atas nama Ketua Peneliti Yulia Oktavia, S.Pi., M.Si. dengan judul Isolasi Bakteri Penghasil Enzim Protease, Amilase, dan Lipase dari Terasi Ikan Teri *Stolephorus* sp. (No 989/UN9.3.1/PP/2017).

#### DAFTAR PUSTAKA

Adrio, J.L. and A.L. Demain. 2014. Microbial enzymes: Tool for biotechnological process. *Biomolecules*, 4:117-139. <https://doi.org/10.3390/biom4010117>.  
Alnahdi, H.S. 2012. Isolation and screening of extracellular proteases produced by new isolated *Bacillus* sp. *J. of Applied Pharmaceutical Science*, 2(09):071-074. <http://dx.doi.org/10.20546/ijcmas.2016.510.022>.

Arfarita, N. dan E. Chukeatirote. 2015. Characterization of protease-producing bacteria isolated from terasi. *J. of Biological Researches*, 21(1):18-23. <http://dx.doi.org/10.23869/bphjbr.21.1.20155>.  
Bergmeyer, H.U., J. Bergmeyer, and M. GraPl. 1983. *Methods of Enzymatic Analysis*. 2<sup>nd</sup> ed. Weinheim : Verlag Chemie. <https://doi.org/10.1002/star.19850370111>.  
Bradford, M. 1976. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle dye binding. *Analytical of Biochemistry*, 72: 248-254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3).  
de Souza, P.M. and P.O. Magalhães, 2010. Application of microbial  $\alpha$ -amylase in industry\_A review. *Braz J. Microbiol.*, 41(4):850-861. <http://dx.doi.org/10.1590/S1517-83822010000400004>.  
Gupta, R., P. Gigras, H. Mohapatra, V.K. Goswami, and B. Chauhan. 2003. Microbial  $\alpha$ -amylases: a biotechnological perspective. *Process Biochem.* 38:1599-1616. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(03\)00053-0](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(03)00053-0).  
Haq, H., M.A. Ashaf, and J. Qadeer. 2010. Pearl millet, a source of  $\alpha$ -amylase production by *Bacillus licheniformis*. *Bioresour. Technol.*, 96:1201-1204. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2004.09.012>.  
Kim, W., S. Bae, K. Park, S. Lee, W. Choi, S. Han, dan Y. Koh. 2011. Biochemical characterization of digestive enzymes in the black soldier fly, *Hermetia illucens* (Diptera: Stratiomyidae). *J. of Asia Pacific Entomology*, 14(1):11-14. <http://dx.doi.org/10.20546/ijcmas.2016.510.022>.  
Miller GL. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.*, 31: 426-428.

- <http://dx.doi.org/10.1021/ac60147a030>.
- Pant, G., A. Prakash, J.V.P. Pavani, S. Bera, G.V.N.S. Deviram, A. Kumar, M. Panchpuri, and R.G. Prasuna. 2015. Production, optimization and partial purification of protease from *Bacillus subtilis*. *JTUSCI.*, 9(1):50-55. <https://doi.org/10.1016/j.jtusci.2014.04.010>.
- Reiny, S.S. 2012. Potensi *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4796 sebagai biopreservatif pada rebusan daging ikan tongkol. *J. IJAS.*, 2(2):604–613. <https://doi.org/10.24198/ijas.v2i2.2734.g2370>.
- Rodarte, M.P., D.R. Dias, D.M. Vilela, and R.F. Schwan. 2011. Proteolytic activities of bacteria, yeasts and filamentous fungi isolated from coffee fruit (*Coffea arabica* L.). *Actasciagron*, 33(3):457-464. <http://dx.doi.org/10.4025/actasciagron.v33i3.6734>.
- Suganthi, C., A. Margeswari, S. Karthikeyan, M. Anbalagan, A. Sivakumar, K.M. Gothandam. 2013. Screening and optimization of protease production from a halotolerant *Bacillus licheniformis* isolated from saltern sediments. *J. of Genetic Engineering and Biotechnology*, 11(1)47-52. <https://doi.org/10.1016/j.jgeb.2013.02.002>.
- Uddin, Md.E., P. Maitra, H. Md. Faruquee, and Md. F. Alam. 2014. Isolation and characterization of proteases enzyme from locally isolated *Bacillus* sp. *American J. of Life Sciences*, 2(6): 338-344. <https://doi.org/10.11648/j.ajls.20140206.12>.
- Zusfahair, D. R. Ningsih, D. Kartika, and A. Fatoni. 2016. Amylase from *Bacillus thuringiensis* isolated from tapioca waste: isolation, partial purification and characterization. *Malaysian J. of Fundamental and Applied Sciences*, 12(1):22-27. <http://dx.doi.org/10.11113/mjfas.v12n1.404>.
- Diterima : 07 Desember 2017  
 Direview : 09 Januari 2018  
 Disetujui : 29 November 2018

