

ISOLASI BAKTERI PENGHASIL ENZIM PROTEASE BACILLUS THURINGIENSIS IRODI PADA ONCOM MERAH PASCA FERMENTASI 24 JAM

Radna Safitri¹, Sakti Imam Muchlissin², Ana Hidayati Mukaromah¹, Sri Darmawati¹,
Stalis Norma Ethica³

¹Program Studi D4 Analisis Kesehatan Fakultas Ilmu Keperawatan dan Kesehatan Universitas Muhammadiyah Semarang, Indonesia.

Email: radnasafitri@gmail.com, ciciekdarma@unimus.ac.id

²Fakultas Perikanan dan Kelautan Universitas Diponegoro, Semarang, Indonesia

Email: muchlissin@outlook.com

³Program Studi D3 Analisis Kesehatan, Fakultas Ilmu Keperawatan dan Kesehatan (FIKKES), Universitas Muhammadiyah Semarang, Indonesia

Email: ana_hidayati@unimus.ac.id, norma@unimus.ac.id

Abstract

The need for protease enzymes in Indonesia and the world continues to increase, requiring new protease sources. Bacteria are beneficial sources of protease because they are easy to obtain and rapidly multiply. Bacterial identification could be done molecularly through analysis of the 16S rRNA gene. This study aimed to obtain an isolate of protease-producing bacterium from 24-h post-fermented red oncom and to identify the obtained bacterial strain molecularly by 16S rRNA gene sequence. The protease production test on bacteria found in red oncom sample was done using a selective medium, Skim Milk Agar (SMA). DNA genomes of proteolytic bacterial cells were extracted by Promega KIT. The amplifying process of 16S rRNA gene using the Polymerase Chain Reaction (PCR) method. The amplified DNA were analyzed using the BLAST program. The results of the research found 8 isolate of bacterias. The most unique isolate was IROD1.3. It has significant proteolytic activity based on the ability to produce clear zone of protease on SMA medium with a diameter of 85,00 mm. Isolate IROD1.3 was identified molecularly as Bacillus thuringiensis with similarity of 96% to the sequence of 16S rRNA gene Bacillus thuringiensis strain TERI SID4 (Genbank access code: KX822158.1).

Keywords: Protease, 16S ribosomal RNA gene, red oncom, proteolytic bacterium

1. PENDAHULUAN

Saat ini bidang industri mengalami perkembangan pesat karena pemanfaatan enzim di berbagai bidang. Salah satu enzim yang sering digunakan dibidang industri dan kesehatan adalah enzim protease yang merupakan enzim golongan hidrolase yang memecah protein menjadi molekul yang lebih sederhana. Protease berfungsi menghidrolisis ikatan peptida menjadi oligopeptida dan asam amino (Maziah, 2009). Protease dalam bidang industri digunakan sebagai bahan pembuatan makanan, industri farmasi dan untuk proses bioremediasi (Nascimento dan Martin, 2006).

Kebutuhan enzim protease di Indonesia semakin meningkat, namun Indonesia belum mampu memproduksi enzim tersebut dalam skala besar dan masih mengimpor dari negara lain (Meliawati, 2016). Untuk itu diperlukan sumber protease baru yang berasal dari bakteri karena mudah diproduksi, berbiaya rendah dan waktu produksi pendek.

Salah satu cara mendapatkan enzim protease dari bakteri yaitu dengan melakukan isolasi bakteri proteolitik (Puspitasari dkk., 2009). Uji aktivitas penghasilan protease dapat dilihat

menggunakan media *Skim Milk Agar* (Putri, 2012). Isolasi bakteri proteolitik dilakukan pada sampel oncom merah karena oncom merah memiliki protein yang sangat tinggi dan diperkirakan pada terdapat bakteri pengkonsumsi protein yang menghasilkan enzim pendeградasi protein, yaitu protease (Sastraatmajaya, 2002).

Isolasi dan identifikasi molekular bakteri penghasil protease dilakukan untuk mendapatkan informasi genetik bakteri. Analisis yang digunakan untuk mengidentifikasi bakteri penghasil protease yaitu analisis PCR 16S rRNA. Keunggulan PCR dalam hal kecepatan, spesifisitas dan sensitifitasnya dalam mendeteksi suatu mikroorganisme menjadikan PCR sebagai “*method of choice*” (Koesharyani dkk., 2003).

Berdasarkan penelitian yang dilakukan Afifah (2014) mengenai protease fibrinolitik dari mikroba pangan fermentasi oncom merah dan tempe gembus diketahui bahwa 43 isolat menunjukkan aktivitas proteolitik pada media *Skim Milk Agar* (SMA). Isolat tersebut teridentifikasi sebagai *Bacillus licheniformis* (99,9%) dan *Bacillus pumilus* (97%) (Afifah, 2014).

Penelitian mengenai protease ekstraseluler pada fermentasi oncom pernah dilaporkan namun umumnya pada produk oncom yang masih segar. Isolasi bakteri penghasil protease pada oncom merah pasca fermentasi 24 jam belum pernah dilaporkan. Berdasarkan hal tersebut maka penting untuk dilakukan penelitian mengenai isolasi bakteri penghasil enzim protease pada oncom merah pasca fermentasi 24 jam dan identifikasi molekular bakteri berbasis gen 16S rRNA.

2. KAJIAN LITERATUR

Bakteri adalah kelompok mikroorganisme bersel tunggal dengan konfigurasi selular prokariotik (tidak memiliki inti). Bakteri sebagai makhluk hidup memiliki informasi genetik berupa DNA tetapi tidak terlokalisasi dalam tempat khusus (nukleus) dan tidak ada membran inti. DNA pada bakteri berbentuk sirkuler, panjang dan biasa disebut nukleoid. DNA bakteri tidak mempunyai intron dan hanya tersusun atas ekson saja. Bakteri juga memiliki DNA ekstrakromosomal yang tergabung menjadi plasmid yang berbentuk kecil dan sirkuler (Jawetz, 2004).

Berdasarkan peranannya dalam memproduksi enzim, terdapat bakteri yang disebut sebagai proteolitik. Bakteri proteolitik adalah bakteri yang mampu memproduksi enzim protease ekstraseluler, yaitu enzim pemecah protein yang diproduksi didalam sel kemudian dilepaskan keluar dari sel (Abraham, 1993). Pada umumnya bakteri proteolitik adalah bakteri dari genus *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Proteus*, *Streptobacillus*, dan *Staphylococcus*.

Identifikasi bakteri proteolitik secara mikrobiologi dilakukan dengan cara mengidentifikasi koloni bakteri penghasil protease dengan menggunakan analisis fenotip yang meliputi pengamatan morfologi dan pewarnaan gram. Pengamatan morfologi bakteri penghasil protease dapat dilakukan dengan menumbuhkan bakteri pada medium non selektif *Nutrient Agar* (NA). Morfologi yang dapat diamati secara makroskopis meliputi warna koloni, bentuk, tepi, elevasi, ukuran, dan konsistensi (Putri, 2012). Bakteri juga dapat dilihat jenis dan bentuknya secara mikroskopis melalui pewarnaan gram. Pada pewarnaan gram akan diketahui bakteri tergolong dalam gram negatif atau gram positif.

Identifikasi morfologi bakteri penghasil protease dapat dilihat dengan cara mengisolasi bakteri menggunakan media *Skim Milk Agar* (SMA). SMA merupakan media yang terdiri dari PCA steril dan susu skim. Susu skim digunakan sebagai sumber substrat. Selain itu susu skim juga mengandung protein tinggi sekitar 3,7% dan lemak 0,1%. Susu skim mengandung kasein yang dapat dipecah oleh mikroorganisme proteolitik menjadi senyawa nitrogen terlarut sehingga pada koloni dikelilingi area bening. Timbulnya zona bening dengan diameter 12 mm menandakan adanya bakteri protease yang dapat menghidrolisis protein.

Identifikasi bakteri yang lebih spesifik dapat dilakukan dengan identifikasi molekuler menggunakan molekul 16S rRNA metode PCR karena molekul ini bersifat ubikuitus dengan fungsi yang identik pada seluruh organisme. Gen 16S rRNA dapat digunakan untuk mengklasifikasikan bakteri berdasarkan hubungan kekerabatan bakteri (Darmawati, S; dkk, 2014). Gen 16S ribosomal RNA (16S rRNA) memiliki daerah yang *conserved* (lestari) sehingga tepat digunakan dalam *Polymerase Chain Reaction* (PCR) dan analisis sekuensing untuk menentukan taksonomi, filogeni dan keanekaragaman antar spesies (Rinanda, 2011).

Gen 16S rRNA juga memiliki *hypervariable region* yang merupakan ciri khas dari mikroorganisme. Molekul 16S rRNA ini merupakan jenis RNA yang terlibat dalam produksi protein. Primer yang digunakan dalam identifikasi bakteri menggunakan PCR 16S rRNA ini yaitu primer 27F (5' AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG 3') dan 1492R (5' GGT TAC CTT GTT ACG ACT T 3'). Kedua primer ini biasa digunakan untuk identifikasi gen 16S rRNA bakteri (Panajung, 2014; Ethica dkk., 2013; 2014; 2018).

3. METODE PENELITIAN

Jenis penelitian ini termasuk penelitian deskriptif. Tempat penelitian dilaksanakan di Laboratorium Oseanografi Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan (FPIK) Universitas Diponegoro, Semarang. Penelitian ini dilaksanakan pada bulan April-Juli 2018. Variabel yang diamati adalah bakteri proteolitik yang diisolasi dari oncom merah pasca fermentasi 24 jam. Populasi penelitian ini adalah oncom merah yang dijual dipasar tradisional kota Semarang. Sampel penelitian ini adalah oncom merah pasca fermentasi 24 jam dan dilakukan pengenceran pada preparasi sampel. Teknik pengumpulan data yang dilakukan pada penelitian ini adalah menggunakan data primer yang disajikan dalam bentuk narasi dan tabulasi.

Teknik analisis pada penelitian ini adalah sampel oncom segar yang dibeli dipasar tradisional difermentasi kembali selama 24 jam. Sampel ditimbang sebanyak 1 g lalu dihaluskan. Langkah selanjutnya adalah menyiapkan 11 tabung reaksi steril yang diisi dengan NaCl fisiologis masing-masing sebanyak 9 ml dan diberi label tabung reaksi tanpa pengenceran (induk), pengenceran 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} , 10^{-10} lalu diinokulasikan pada media nutrient agar (NA). Setelah inkubasi 24 jam pada suhu 37°C diamati morfologi koloni dan pewarnaan Gram. Isolat bakteri lalu dipurifikasi menggunakan media selektif NA sebanyak 3 kali atau hingga didapatkan satu jenis koloni murni yang konsisten dan tidak bercampur dengan koloni bakteri lain.

Hasil isolat terpilih diuji penghasiian protease menggunakan media Skim Milk Agar dan diukur zona beningnya menggunakan jangka sorong. Isolat bakteri kemudian diekstraksi menggunakan 20% Chelex 100. Bahan Bakteri yang ada dalam media BHI kemudian diambil sebanyak 50 μl lalu dimasukkan dalam tabung mikrotube yang berisi 100 μl ddH₂O dan 1 ml saponin 0,5% dalam PBS 1x kemudian didiamkan semalaman (suhu 4°C). Campuran yang sudah diinkubasi kemudian disentrifuse 12000 rpm selama 10 menit lalu buang supernatannya. Setelah itu, 1 ml *Phosphate Buffer Lysis* dimasukkan ke campuran tersebut lalu disentrifugasi kembali selama 5 menit dengan kecepatan 12000 rpm. Supernatannya dibuang lalu ditambahkan 100 ml ddH₂O dan 50 ml 20% Chelex 100 kemudian campuran di vortex. Setelah itu campuran tersebut direbus selama 10 menit dan divortex kembali selama 5 menit. Campuran kemudian disentrifuse selama 10 menit dengan kecepatan 12000 rpm. Supernatan dipindahkan kedalam mikrotub steril baru dan disimpan dalam suhu -20°C . Ini merupakan stok DNA untuk dilanjutkan ke tahap kuantifikasi DNA (Ayuningrum, 2016).

Hasil isolasi DNA genom bakteri diukur kemurniannya menggunakan spektrofotometer Nanodrop pada panjang gelombang 260/280. DNA hasil isolasi kemudian diamplifikasi menggunakan metode PCR. Reaksi PCR dibuat dalam volume total 25 µl. Komponen reaksi PCR terdiri atas masing-masing Go Taq Green Master Promega (12,5 µl), primer 27 F (1 µl), Primer 1492 R (1 µl), template DNA (1 µl), dan ddH₂O (9,5 µl). Tahap awal dalam proses PCR dengan alat *thermal cycler* adalah denaturasi awal yang memerlukan suhu tinggi yaitu 95 °C selama 1 menit lalu 95 °C selama 30 detik sebanyak 30 siklus, annealing dengan suhu 52 °C selama 1 menit, ekstensi awal pada suhu 72 °C selama 1 menit, ekstensi akhir pada suhu 72 °C selama 7 menit dan tahap cooling down pada suhu 4 °C. Proses siklus amplifikasi ini terjadi selama 30 kali (Ethica, 2018).

Hasil amplifikasi PCR divisualisasikan pada gel elektroforesis. Penentuan urutan DNA murni (sekuensing) dilakukan dengan mengirimkan DNA hasil purifikasi dari produk PCR ke PT. Genetika Science Indonesia dan Ist Base DNA *Sequencing*, Malaysia. Bioedit software MEGA 7.0 digunakan untuk analisis data kasar hasil sekuensing dan selanjutnya data yang telah diolah dicocokkan dengan data di *gene bank* menggunakan alat *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) pada *website National Center for Biotechnology Information, National Institute for Health*(NCBI), USA <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/> yang akan menunjukkan kekerabatan spesies tersebut tersebut secara genetik (*phylogenetic tree*) (Panajung, 2014).

4. HASIL PENELITIAN

Gambaran umum sampel oncom merah segar berwarna orange, memiliki tekstur kering dan memiliki bau khas oncom sedangkan oncom pasca fermentasi 24 jam berwarna orange kecoklatan, memiliki tekstur kering dan memiliki bau lebih menyengat. Hasil isolasi bakteri sampel oncom merah pasca fermentasi 24 jam ditemukan 8 isolat berbeda dan dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Karakteristik Morfologi Isolat Bakteri

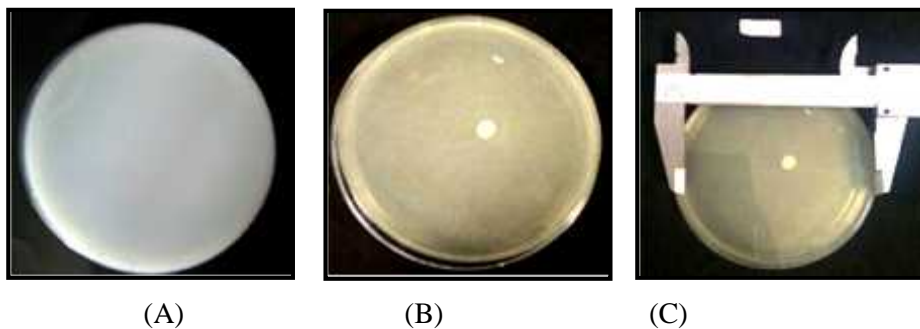
Kode	Bentuk	Warna	Ukuran	Tepi	Elevasi	Konsistensi
IROD1.1	Bulat	Putih	Kecil	Rata/licin	Cembung	Berlendir
IROD1.2	Bergerigi	Kuning	Besar	Tidak rata	Cembung	Kering
IROD1.3	Bergerigi	Putih	Besar	Tidak rata	Cembung	Berlendir
IROD1.4	Berserabut	Putih	Besar	Tidak rata	Cembung	Kering
IROD1.5	Bulat	Transparan	Kecil	Rata/licin	Cembung	Kering
IROD1.6	Bulat	Kuning	Besar	Rata/licin	Cembung	Berlendir
IROD1.7	Bulat	Putih	Kecil	Rata/licin	Cembung	Berlendir
IROD1.8	Bulat	Putih	Kecil	Rata/licin	Cembung	Kering

Koloni bakteri yang ditemukan pada isolasi bakteri pada sampel oncom merah pasca fermentasi 24 jam diidentifikasi karakteristik dan jenisnya berdasarkan pewarnaan Gram. Hasil pewarnaan Gram koloni bakteri dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Karakteristik koloni bakteri pada pewarnaan Gram isolat IROD1.3 sampel oncom merah pasca fermentasi 24 jam

Kode	Karakteristik Koloni
IROD1.1	Basil Gram-Positif
IROD1.2	Kokus Gram-Positif
IROD1.3	Streptobasil Gram-Positif
IROD1.4	Basil Gram-Positif
IROD1.5	Basil Gram-Negatif
IROD1.6	Basil Gram-Positif
IROD1.7	Basil Gram-Positif
IROD1.8	Diplococcus Gram-Positif

Dari hasil isolasi dan pewarnaan Gram bakteri, maka dipilih satu koloni bakteri yang unik yaitu koloni IROD1.3 yang merupakan bakteri Gram-positif streptokokus (batang berderet) untuk dilakukan uji enzimatik penghasil enzim protease. Hasil uji enzimatik penghasilan protease sampel IROD1.3 dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Hasil uji enzimatik protease pada *Skim Milk Agar* Isolat IROD1.3 sampel oncom merah pasca fermentasi 24 jam. A. Media sebelum kultivasi bakteri B. Pengamatan zona bening di sekeliling koloni bakteri C. Pengukuran diameter zona bening proteolitik.

Berdasarkan Gambar 1, diketahui bahwa koloni bakteri IROD1.3 mampu mendegradasi protein yang berada dalam media susu skim sehingga menimbulkan zona bening. Diameter zona bening diukur menggunakan jangka sorong. Diameter zona bening yang terukur sebesar 85,00 mm. Penelitian Borla dkk. (2010) dan Ethica dkk. (2018) menyatakan timbulnya zona bening dengan diameter 12 mm atau lebih disekitar media menandakan adanya bakteri yang dapat menghidrolisis protein melalui produksi enzim protease. Isolasi atau ekstraksi DNA genom bakteri menggunakan chelex 100. Hasil ekstraksi ini selanjutnya dilakukan pengukuran kemurnian ekstrak DNA menggunakan spektrofotometer nanodrop pada panjang gelombang 260 dan 280 (Tabel 3).

Tabel 3. Uji kemurnian ekstrak DNA genom Sampel IROD1.3

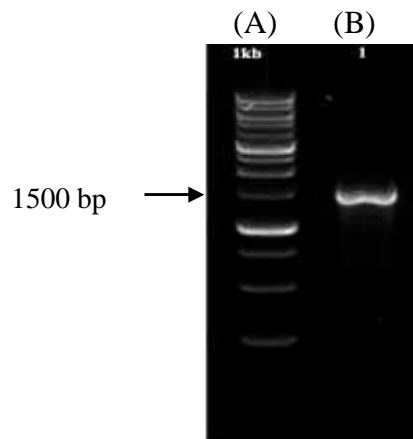
Kode Sampel	A260	A280	260/280
IROD1.3	2,156 ng/ μ l	0,905 ng/ μ l	2,38

Uji kemurnian ekstrak DNA dilakukan dengan menggunakan spektrofotometer Nanodrop pada panjang gelombang 260 dan 280 nm. Nilai maksimal DNA dapat diserap dengan panjang gelombang 260 nm sedangkan nilai maksimal residu protein atau fenol dapat

diserap pada panjang gelombang 280 nm. DNA dikatakan murni jika memiliki rasio OD_{260/280} antara 1,8 sampai 2,0 ng/μl (Fatchiyah dkk., 2011).

Berdasarkan Tabel 3 hasil uji kemurnian DNA pada panjang gelombang 260/280 adalah 2,38 ng/μl. Hasil uji kuantitas ini lebih besar dari rasio yang ditentukan yaitu antara 1,8-2,0 ng/μl, hal ini kemungkinan disebabkan oleh adanya sisa-sisa etanol atau kandungan metabolit sekunder bakteri yang diekstrak. Uji kuantitas DNA yang melebihi batas rasio kemungkinan juga disebabkan oleh prinsip alat yang berbeda, oleh karena itu harus dilanjutkan pada visualisasi gel elektroforesis (Sambrook dan Russel, 2001).

Amplifikasi DNA atau perbanyakan untai DNA dilakukan dengan metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR) 16S rRNA menggunakan primer 27F dan 1492R. Jumlah amplifikasi fragmen DNA pada PCR konvensional divisualisasikan dan kualitasnya diketahui dengan menggunakan gel elektroforesis (Ethica dkk., 2017). Hasil gel elektroforesis sampel IROD1.3 dapat dilihat pada Gambar 2.



Gambar 2. Hasil Amplifikasi Fragmen 16S rRNA isolat IROD1.3(A) Marker, (B) Sampel IROD1.3.

Isolasi DNA yang baik ditunjukkan dengan pita DNA yang tebal dan tampak sedikit atau tidak ada sama sekali smear pada gel jika divisualisasikan pada sinar ultra violet. Pita DNA pada penelitian ini berada pada ukuran 1500 bp sesuai dengan perbandingan menggunakan marker DNA. Besarnya ukuran ini sesuai dengan ukuran yang diharapkan dari gen-gen 16S rRNA bakteri yaitu 1500 bp (Yuwono, 2009).

Hasil amplifikasi PCR dikirim ke PT. Genetika *Science* Indonesia dan *1st Base DNA Sequencing*, Malaysia untuk disekuensing. Pembuatan konsensus dilakukan pada sekuen forward dan reverse gen 16S rRNA dengan program *software* MEGA 7.0. Hasil sekuensing DNA bakteri dianalisis dan dicocokkan dengan data yang tersedia di *Gen bank Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) pada NCBI (*National Center for Biotechnology Information, National Institute for Health*), USA dan diperoleh informasi bahwa sekuen DNA bakteri isolat IROD1.3 mempunyai kemiripan 98% dengan fragmen gen 16S ribosomal RNA isolat bakteri *Bacillus thuringiensis* strain TERI SID4 (Genbank kode akses: KX822158.1). Dengan demikian isolat IROD1.3 diberi nama *Bacillus thuringiensis* IROD1 (IROD1= Indonesian *Red Oncom Day*-1).

Bakteri *Bacillus thuringiensis* merupakan bakteri gram positif yang berbentuk batang yang pertama kali ditemukan sebagai patogen pada ngengat (flour moth) dari provinsi Thuringia, Jerman pada tahun 1991. Keberadaan bakteri *Bacillus thuringiensis* dalam makanan produk fermentasi seperti oncom merah disebabkan karena bakteri ini tidak hanya bersifat aerob namun juga bersifat anaerob fakultatif dimana bakteri ini dapat tumbuh pada lingkungan yang mengandung sedikit oksigen atau sama sekali tidak ada oksigen.

Untuk mendapatkan energi pada kondisi lingkungan yang kurang atau tidak ada oksigen, bakteri ini melakukan proses fermentasi. Oleh karena itu bakteri *Bacillus thuringiensis* termasuk kedalam bakteri fermentatif (Adawyah, 2007).

Bakteri *Bacillus thuringiensis* pada saat sporulasi, tubuhnya akan membentuk protein *cry*. Protein inilah awal mula bakteri ini menghasilkan enzim protease sehingga tergolong dalam bakteri proteolitik. Seperti penelitian yang telah dilakukan oleh Rachmawati (2013) mengenai Karakterisasi Biokimia dan Uji Aktivitas Protease pada *Bacillus thuringiensis* dari Tanah Naungan di Lingkungan Universitas Lampung, diketahui bahwa bakteri *Bacillus thuringiensis* positif menghasilkan enzim protease karena bakteri ini dapat mendegradasi protein yang terdapat pada media *Skim Milk Agar* sehingga menghasilkan zona bening.

Penelitian diatas membuktikan bahwa bakteri *Bacillus thuringiensis* merupakan sumber protease yang baik. Bakteri *Bacillus thuringiensis* IROD1 telah teridentifikasi secara molekuler dan menunjukkan sifat sebagai penghasil protease. Dengan demikian diharapkan strain IROD1 dapat dimanfaatkan dalam skala yang lebih besar sebagai sumber protease.

5. SIMPULAN

Hasil isolasi bakteri pada media *nutrient agar* ditemukan 8 isolat bakteri berbeda yaitu IROD1.1, IROD1.2, IROD1.3, IROD1.4, IROD1.5, IROD1.6, IROD1.7, IROD1.8. Isolat bakteri terunik yang dipilih yaitu IROD1.3 kemudian diberi label IROD1. Isolat IROD1 dan memiliki aktivitas protease yang ditandai dengan zona bening berdiameter 85,00 mm di sekeliling koloni bakteri pada media *Skim Milk Agar* SMA). Hasil uji identifikasi molekuler, isolat IROD1 teridentifikasi sebagai *Bacillus thuringiensis* strain TERI SID4 (Genbank kode akses: KX82158.1) dengan kemiripan sebesar 98%.

Saran pada penelitian ini yaitu Pada uji penghasilan enzim protease sebaiknya menggunakan media SMA yang kering untuk meminimalkan kontaminasi media. Selain itu perlu dilakukan uji aktivitas enzim protease secara kuantitatif menggunakan spektrofotometer. Berdasarkan hasil uji proteolitik, bakteri *Bacillus thuringiensis* pada oncom merah pasca fermentasi dapat diproduksi dalam skala besar dan berpotensi untuk dimanfaatkan di berbagai bidang industri.

6. REFERENSI

- Abraham, A.G., G. Antoni L., dan A.C. Anon. 1993. Proteolytic Activity of *Lactobacillus Bulgaricus* Grown in Milk. *Journal of Dairy Science*. La Plata, Argentina.
- Adawyah, R. 2007. *Pengolahan dan Pengawetan Ikan*. Bumi Aksara. Jakarta.
- Afifah, Diana Nur. 2014. Protease Fibrinolitik dari Pangan Fermentasi Oncom Merah dan Tempe Gembus. Disertasi. Sekolah Pasca Sarjana Institut Pertanian Bogor. Bogor
- Ayuningrum, D. 2016. Isolation and characterisation and Antagonistic Activity of Bacteria Symbionts Hardcoral *Pavona* sp. Isolated from Panjang Island, Jepara Against Infectious Multi-Drug Resistant (MDR) Bacteria. *Journal 2nd International Conference on Tropical and Coastal Region Eco Development*.
- Borla OP, Davidovich LA, Roura SI. 2010. Isolation and Characterization of Proteolytic Microorganisms from Fresh and Fermented Cabbage. *LWT-Food Science and Technology* 43(2):298-301.
- Darmawati, S., Sembiring, L., Asmara, W. and Artama, W.T., 2012. Keanekaragaman Spesies Bakteri pada Kultur Darah Widal Positif Asal Kota Semarang Berdasarkan Karakter Fenotipik. In *Prosiding Seminar Biologi* (Vol. 9, No. 1).

- Darmawati, S. L., Sembiring, W., Asmara, W.T., Artama, M., Kawaichi. 2014. Phylogenetic Relationship of Gram Negatif Bacteria of *Enterobacteriaceae* Family in the Positive Widal Blood Cultures Based on 16S rRNA Genes Sequences. *Ind.J.of Biotechno*, 19 (1):64-70
- Ethica, S.N., Oedjijono, O., Semiarti, E., Widada, J. and Raharjo, T.J., 2018. Genotypic and Phenotypic Characterization of *Alcaligenes Javaensis* JG3 Potential AS An Effective Biodegrader. *BIOTROPIA-The Southeast Asian Journal of Tropical Biology*, 25(1), pp.1-10.
- 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.
- Ethica, S.N., Nataningtyas, D.R., Lestari, P., Istini, I., Semiarti, E., Widada, J. and Raharjo, T.J., 2013. Comparative evaluation of conventional versus rapid methods for amplifiable genomic DNA isolation of cultured *Azospirillum* sp. JG3. *Indonesian Journal of Chemistry*, 13(3), pp.248-253.
- Ethica, S.N. and Raharjo, T.J., 2014. *Detection of genes involved in glycerol metabolism of Alcaligenes sp. JG3 (Doctoral dissertation, Universitas Gadjah Mada)*.
- Ethica, S.N., Semiarti, E., Widada, J., Oedjijono, O. and Joko Raharjo, T., 2017. Characterization of moaC and a nontarget gene fragments of food-borne pathogen *Alcaligenes* sp. JG3 using degenerate colony and arbitrary PCRs. *Journal of Food Safety*, 37(4), p.e12345.2
- Fatchiyah, Estri, L. A., Sri, W., dan Sri, R. 2011. *Biologi Molekular Prinsip Dasar Analisis*. Erlangga. Jakarta
- Jawetz, Melnick dan Adelberg, S., 2004. *Mikrobiologi Kedokteran., ED 23*. Penerbit buku kedokteran EGC. Jakarta. Hal 23-235
- Koesharyani, dkk., 2003. Prosedur PCR untuk Diagnosa Cepat Penyakit Bercak Udang Putih pada Udang. *Balai Budidaya Perairan Laut, Air payau dan Tawar, IKP*, Jawa Barat.
- Melliawati, dkk. 2016. Seleksi dan Identifikasi Bakteri Endofit Potensial Penghasil Enzim Protease dari Taman Nasional Gunung Halimun. *Pusat Penelitian Bioteknologi, LIPI*
- Nascimento, W.C.A. and Martins, M.L.L., 2006, Studies on Stability of Protease from *Bacillus* sp. and Its Compatibility with Commercial Detergent, *Brazilia, Microbiol*, 37: 307-311.
- Panajung, dkk. 2014. Identifikasi 16S rRNA dan Uji Zimografi Bakteri Asal Pantai Papuma Penghasil Enzim Fibrinolitik Sebagai Anti Arterotrombosis. *Jurnal Fakultas Farmasi Jurusan FMIPA Biologi*. Universitas Jember.
- Putri, Yunita Silvia., 2012. Skrining dan Uji Aktivitas Enzim Protease Bakteri dari Limbah Rumah Pematangan Hewan. *Skripsi*. Universitas Airlangga.
- Rachmawati, S.N.E. 2013. *Karakterisasi Biokimia dan Uji Aktivitas Protease Bacillus thuringiensis dari Tanah Naungan di Universitas Lampung*. Skripsi Biologi Fakultas FMIPA. Universitas Lampung, Lampung.
- Rinanda, Tristia., 2011. Analisis 16S rRNA di Bidang Mikrobiologi. *Jurnal Fakultas Kedokteran Universitas Syiah Kuala, Aceh*.
- Sambrook J, Russell D (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd edn. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sastraatmadja DD, Tomita F, Kasai T. 2002. *Production of High-Quality Oncom, a Traditional Indonesian Fermented Food, by the Inoculation With Selected Mold Strains In the Form of Pure Culture and Solid Inoculum*. *J. Grad. Sch. Agr. Hokkaido Univ* 70:111-127.
- Yuwono, T. 2009. *Biologi molekuler*. Erlangga. Jakarta