

ISOLASI DAN IDENTIFIKASI MOLEKULER BAKTERI PENGHASIL ENZIM PROTEASE *PSEUDOMONAS STUTZERI* ISTD4 DARI TEMPE GEMBUS PASCA FERMENTASI 1 HARI

Wa Ode Inayatul¹, Sakti Imam Muchlissin², Ana Hidayati Mukaromah¹, Sri Darmawati¹,
Stalis Norma Ethica³

¹Program Studi D4 Analisis Kesehatan Fakultas Ilmu Keperawatan dan Kesehatan UNIMUS
Email: wdinayatul@gmail.com, ciciekdarma@unimus.ac.id

²Fakultas Perikanan dan Kelautan Universitas Diponegoro, Semarang
Email: muchlissin@outlook.com

³Program Studi D3 Analisis Kesehatan, Fakultas Ilmu Keperawatan dan Kesehatan, UNIMUS
Email: ana_hidayati@unimus.ac.id, norma@unimus.ac.id

Abstract

*Proteases are a group of enzymes that play an important role in biochemical reactions, which use protein breakdown. Protease is among the main enzymes used in industry, whose commercial value reaches 60% of total enzymes worldwide. This study aimed to isolate protease-producing bacteria found on tempe gembus after 1-day post-fermentation and to identify the bacterial isolate obtained based on the analysis of its 16S rRNA gene. Isolation and purification process was done using Nutrient Agar media with spread technique. The protease production test was carried out on skim milk agar medium. The molecular identification process was performed by analyzing the sequence of 16S rRNA gene fragment of bacteria amplified using both forward primer F (F:5'-AGAGTTGATCCTGGCTCAG-3'), and reverse primer R (R:5'-GGTACCTTGTTACGACTT-3') by Polymerase Chain Reaction (PCR) method. The amplified DNA from PCR was then sequenced. From the isolation process a bacterial strain that has a proteolytic activity based on observation of clear zone area with a diameter of 85 mm was obtained. From sequence alignment results using BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) the fragment of 16S rRNA gene of strain ISTD1.4 obtained has a similarity level of 98% with the fragment of 16S ribosomal RNA gene of the bacterium *Pseudomonas stutzeri* strain E141. In conclusion, strain ISTD1.4 is a potential protease-producing bacterium and is identified as *Pseudomonas stutzeri* ISTD4.*

Keywords: Bacterial isolation, molecular identification, proteolytic bacteria, 16S rRNA gene

1. PENDAHULUAN

Enzim protease diperlukan oleh semua makhluk hidup karena bersifat esensial dalam metabolisme protein. Peran protease dalam tubuh antara lain membantu pencernaan protein dalam makanan, menggunakan kembali protein-protein intraseluler, koagulasi sel darah, dan aktivasi berbagai jenis protein, enzim, hormon, serta neurotransmiter (Baehaki dan Rinto, 2011).

Protease adalah enzim yang berperan penting dalam reaksi biokatalis yang menyebabkan pemecahan protein. Protease merupakan salah satu enzim dalam bidang industri yang nilai komersialnya mencapai 60% dari total penjualan enzim seluruh dunia. Enzim protease dapat dihasilkan oleh tanaman, hewan maupun mikroorganisme seperti bakteri (Fatonidkk., 2008).

Media *Skim Milk Agar* (SMA) merupakan media yang mengandung kasein. Kasein merupakan protein utama susu, suatu makromolekul yang tersusun atas sub unit asam amino yang dihubungkan dengan ikatan peptide. Kasein tersebut berfungsi sebagai substrat bagi enzim protease (Fatonidkk.,2008).

Tempe gembus merupakan pangan fermentasi asli dari Indonesia. Tempe gembus dibuat dari bahan dasar ampas tahu melalui proses fermentasi oleh mikroorganisme yang sama yang digunakan pada pembuatan tempe kedelai, yaitu *Rhizopus* sp. Komposisi zat gizi tempe gembus mirip dengan tempe kedelai meskipun kadarnya lebih kecil (Sulchan dan Endang 2007).

Karena tempe gembus merupakan produk fermentasi yang mengandung protein, maka sangat dimungkinkan bakteri yang terdapat pada tempe gembus merupakan penghasil protease. Protease disekresi oleh bakteri untuk mencerna. Enzim protease bernilai komersial, sehingga perlu ditemukan sumber-sumber penghasil enzim protease, salah satunya bakteri yang terdapat pada tempe gembus.

Polymerase Chain Reaction (PCR), merupakan suatu proses sintesis enzimatik untuk melipat gandakan suatu sekuens nukleotida tertentu secara in vitro. Analisis gen 16S rRNA adalah salah satu analisis gen yang telah dikarakterisasi dengan baik sehingga digunakan dalam identifikasi mikroorganisme (Darmawati dkk.,2012; 2014; 2015).

2. KAJIAN LITERATUR

Tempe gembus terbuat dari ampas tahu, dan memiliki tekstur yang lembut dan berwarna putih. Tempe gembus merupakan pangan fermentasi pada pembuatan tempe kedelai, yaitu *Rhizopus* sp. Komposisi zat gizi tempe gembus mirip dengan tempe kedelai meskipun kadarnya lebih kecil, dan memiliki kandungan serat yang dapat mempengaruhi kadar lipid dalam darah (Sulchan & Endang 2007).

Bakteri proteolitik adalah bakteri yang memproduksi enzim protease ekstraseluler, yaitu enzim pemecah protein yang diproduksi di dalam sel kemudian dilepaskan keluar dari sel. Semua bakteri mempunyai enzim protease di dalam sel, tetapi tidak semua mempunyai enzim protease ekstraseluler.

Enzim protease disebut juga peptidase atau proteinase, yang merupakan enzim golongan hidrolase yang akan memecah protein menjadi molekul yang lebih sederhana. Enzim ini diperlukan oleh semua makhluk hidup karena bersifat esensial dalam metabolisme protein. Perannya dalam tubuh antara lain, membantu pencernaan protein dalam makanan, menggunakan kembali protein-protein intra seluler, dan koagulasi sel darah.

Morfologi bakteri dapat dibedakan menjadi dua yaitu, morfologi makroskopik dan mikroskopik. Secara makroskopik dilakukan pengamatan karakteristik koloni berdasarkan pada plate agar (bentuk koloni, ukuran, elevasi, warna, permukaan, dan konsistensi), sedangkan secara mikroskopik dilakukan pengamatan struktur sel bakteri.

Uji biokimia merupakan salah satu uji yang digunakan untuk menentukan spesies bakteri melalui sifat-sifat fisiologinya. Uji biokimia yang biasanya digunakan dalam kegiatan identifikasi bakteri yaitu uji MR-VP, uji gula-gula, uji SIM, uji TSIA, uji Indol, dan uji Simmons citrate.

Saat ini dikembangkan metode identifikasi berbasis molekuler yang lebih cepat dengan tingkat sensitivitas dan spesifisitas yang tinggi, yaitu dengan analisis sekuensing gen rRNA. Gen pengkode RNA ribosomal (rRNA) adalah gen yang paling lestari (*conserved*). Posisi sekuens rDNA dari tiap organisme yang secara genetik berkorelasi umumnya adalah sama. Setiap organisme yang memiliki jarak kekerabatan tertentu dapat disejajarkan, sehingga lebih mudah untuk menentukan perbedaan dalam sekuens yang menjadi ciri khas organisme tersebut. Gen pengkode rRNA digunakan untuk menentukan taksonomi, filogeni (hubungan

evolusi) serta memperkirakan jarak keragaman antar spesies (*rates of species divergence*) bakteri. Perbandingan sekuens rDNA dapat menunjukkan hubungan evolusi antar organisme.

Reaksi Polimerase Berantai atau dikenal sebagai *Polymerase Chain Reaction* (PCR), merupakan suatu proses sintesis enzimatis untuk melipatgandakan suatu sekuens nukleotida tertentu secara *in vitro*. Metode ini dikembangkan pertama kali oleh Kary B. Mullis pada tahun 1985. Metode ini sekarang telah banyak digunakan untuk berbagai macam manipulasi dan analisis genetik. Pada awal perkembangannya metode ini hanya digunakan untuk melipatgandakan molekul DNA, tetapi kemudian dikembangkan lebih lanjut sehingga dapat digunakan pula untuk melipatgandakan dan melakukan kuantitas molekul mRNA (Handoyo & Rudiretna, 2009).

Proses PCR terdiri dari tiga tahapan, yaitu denaturasi DNA templat, penempelan (*annealing*) primer, dan polimerisasi (*extension*) rantai DNA. Denaturasi merupakan proses pemisahan utas ganda DNA menjadi dua utas tunggal DNA yang menjadi cetakan (templat) sebagai tempat penempelan primer dan tempat kerja DNA polimerase, dengan pemanasan singkat pada suhu 90-95°C selama beberapa menit.

Sekuensing DNA atau pengurutan DNA adalah proses atau teknik penentuan urutan basa nukleotida pada suatu molekul DNA. Urutan tersebut dikenal sebagai sekuens DNA, yang merupakan informasi paling mendasar suatu gen atau genom karena mengandung instruksi yang dibutuhkan untuk pembentukan tubuh makhluk hidup. Sekuensing DNA dapat dimanfaatkan untuk menentukan identitas maupun fungsi gen atau fragmen DNA lainnya dengan cara membandingkan sekuensnya dengan sekuens DNA lain yang sudah diketahui.

Langkah analisis sekuensing dimulai dengan mengisolasi DNA dari kultur bakteri, baik kultur padat maupun cair. DNA yang diperoleh akan dijadikan sebagai cetakan dalam tahap amplifikasi dengan PCR. Primer yang digunakan dalam PCR adalah primer 16S rRNA yang bersifat universal berukuran sekitar 1500 pb, sehingga dapat mengamplifikasi daerah 16S rRNA dari seluruh bakteri. Produk PCR dimurnikan terlebih dahulu dengan menggunakan kit komersial untuk menghilangkan sisa-sisa primer serta fragmen nukleotida (Darmawati dkk., 2014).

3. METODE PENELITIAN

Jenis penelitian yang digunakan merupakan analisis deskriptif. Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Tropis Marine Biotechnology Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Diponegoro pada tanggal April s/d Mei 2018. Variable penelitian ini adalah tempe gembus pasca fermentasi 1 hari.

Objek penelitian ini adalah bakteri penghasil enzim protease yang terdapat pada tempe gembus pasca fermentasi 1 hari.

Teknik pengumpulan data yang digunakan dalam penelitian ini merupakan data primer dan data yang diperoleh ditabulasikan kemudian disajikan dalam bentuk narasi deskriptif.

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah cawan petri, mikropipet, *incubator*, *hot plate*, timbangan analitik, tabung reaksi, rak tabung, tabung konikal, erlenmeyer, gelas ukur, spiritus, ose, vortex (ThermoMixer TM205), *mikrotube*, sentrifugator, *waterbath*, mikrowave, cetakan gel agarosa, sisir, alat elektroforesis, *powersupply*, UV transiluminator, *thermocycler* (mesin PCR), elektroforesis *chamber*, Peralatan lain yang digunakan antara lain aluminium foil, lemari pendingin, alat tulis, dan kamera digital.

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah Media *Brain Heart Infusion Broth* (BHI, Oxoid), media *Brain Heart Infusion Agar* (BHIA, Oxoid), *Nutrient Agar Plate* (NAP, Oxoid), gentian violet, Gram iodine, alkohol asam, safranin 1%, *Skim Milk Agar* (MSA) (Sigma Aldrich, USA), NaCl fisiologis, *aquadest* steril, *buffer lysis*, Chelex 100 Rein (Biorad), etanol 75% ddH₂O, Primer 27 F dan 1492 R, *Phospat Buffer Saline* (PBS), Marker 1500 bp, dan gel agarosa 1%.

Untuk keperluan isolasi bakteri, sampel diencerkan dengan NaCl fisiologis dengan label tanpa pengenceran, 10^{-1} – 10^{-10} . Langkah pertama semua tabung diisi dengan NaCl fisiologis sebanyak 9 ml. kemudian pada tabung tanpa pengenceran ditambahkan sampel sebanyak 1 gram lalu homogenkan dengan cara divortex. Dari tabung tanpa pengenceran dipipet 1 ml lalu masukkan ke tabung 10^{-1} . Lakukan langkah ini hingga pengenceran 10^{-10} . Untuk isolasi bakteri dipilih tabung tanpa pengenceran, tabung 10^{-5} – 10^{-10} untuk ditanam pada media nutrient agar lalu diinokubasi selama 24 jam pada suhu 37°C . Pada hari berikutnya dilakukan pengamatan morfologi koloni dan pewarnaan gram. Selanjutnya dilakukan pemurnian koloni bakteri hingga diperoleh beberapa isolat murni dengan kultur bakteri yang spesifik. Bentuk koloni yang ada diidentifikasi secara morfologi.

Koloni murni yang didapat diuji enzim proteasenya pada media *skim milk agar* dengan cara dotting menggunakan kertas *watt man* dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Terbentuknya zona bening diamati pada koloni. Zona bening merupakan respon dari bakteri penghasil protease dengan diameter 12 mm.

Metode isolasi DNA genom bakteri menggunakan *Promega kit*, yang dijelaskan sebagai berikut: Bahan bakteri yang ada dalam media bakteri diambil sebanyak 50 μl lalu dimasukkan ke 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. Pellet yang terdapat disupernatan dasar tabung mikrotube dipindahkan kedalam *microtube* kemudian dilarutkan dalam *aquadest* steril sebanyak 50 μl dan simpan dalam suhu -20°C . Ini merupakan stok DNA untuk dilanjutkan ke tahap kuantifikasi DNA.

Langkah purifikasi DNA hasil isolasi hanya dilakukan apabila rasio DNA kurang dari 1.8 untuk memisahkan kontaminan berupa protein dari ekstrak DNA. Purifikasi dilakukan dengan cara memasukkan isolate DNA hasil ekstraksi ke dalam kolom spin yang telah diberi 25 mg silika gel dan kemudian disentrifus pada 12000 rpm selama 1 menit. Hasil purifikasi siap digunakan dalam proses selanjutnya yaitu amplifikasi DNA menggunakan PCR. Kemudian dilanjutkan ke tahap uji elektroforesis.

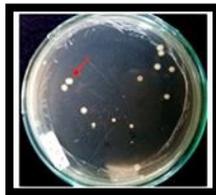
Amplifikasi gen pengkode 16S rRNA dilakukan dengan Polymerase Chain Reaction (PCR) untuk mendapatkan sekuen gen 16S rRNA yang akan digunakan sebagai bahan sekuensing untuk menentukan jenis bakteri. Komponen reaksi PCR : *nuclease free water* (9,5 μl), *promega master mix*, *primer forward* dan *primer reverse* (1 μl), dan DNA template (1 μl). Pengaturan program PCR : Denaturasi, Annealing, Elongasi, final elongasi. Hasil amplifikasi di sekuensing. Hasil sekuensing DNA dianalisis menggunakan perangkat bionformatik, kemudian diolah dengan software mega 7 dan dicocokkan dengan data di www.ncbi.nih.gov melalui program BLAST (*Basic Local Aligment Search Tool*) pada NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) untuk menentukan jenis dari isolate tersebut dari database Genbank yang ada.

4. HASIL PENELITIAN

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui bakteri penghasil enzim protease pada tempe gembus pasca fermentasi 1 hari dengan analisis gen 16S rRNA. Penelitian ini dimulai dengan sterilisasi alat dan bahan. Sterilisasi dilakukan dengan 2 cara, yaitu sterilisasi uap dengan menggunakan autoklaf dan sterilisasi kering dengan menggunakan oven. Sterilisasi dengan

autoklaf dilakukan dengan menyimpan alat atau medium yang akan digunakan di dalam autoklaf, lalu autoklaf dinyalakan hingga mencapai temperatur 121°C, lalu dibiarkan selama 15 menit pada tempertaur tersebut untuk membunuh mikroorganisme kontaminan yang kemungkinan didapat mengkontaminasi alat ataupun medium.

Kemudian dilanjutkan dengan preparasi dan pengenceran suspensi sampel 10^{-1} - 10^{-10} . Suspensi hasil pengenceran yang dipilih untuk ditanam pada media NA hanya sampel pada tabung tanpa pengenceran dan pengenceran 10^{-6} - 10^{-10} . Setelah pengamatan morfologi koloni, dilanjutkan dengan pewarnaan Gram yang dibaca pada mikroskop cahaya untuk melihat jenis bakteri gram positif atau gram negatif. Dari hasil pemurnian di dapatkan 11 koloni bakteri yang murni dengan kode isolat ISTD1, ISTD2, ISTD3, ISTD4, ISTD5, ISTD6, ISTD7, ISTD8, ISTD9, ISTD10, ISTD11. Dari ke 11 koloni dipilih satu koloni bakteri dengan kode isolat ISTD4 dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Hasil Isolasi Koloni bakteri ISTD.4

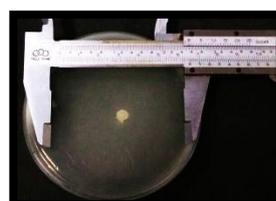
Hasil pewarnaan Gram dari 11 isolat bakteri, isolat bakteri dengan kode ISTD1, ISTD2, ISTD3, ISTD8 termasuk kokus Gram-Positif, ISTD4, ISTD7, ISTD10 termasuk bakteri basil Gram-Negatif, dan kode isolat ISTD8, ISTD9, ISTD11 merupakan kokus Gram-Positif. Dari ke 11 koloni di atas dipilih salah satu bentuk koloni yang unik untuk dilanjutkan ke tahap molekuler dengan kode ISTD4

Tabel 1. Pewarnaan Gram Isolat Bakteri

No	Kode Sampel	Karakteristik Koloni Bakteri
1	ISTD1	Kokus Gram-positif
2	ISTD2	Kokus Gram-positif
3	ISTD3	Kokus Gram-positif
4	ISTD4	Basil Gram-negatif
5	ISTD5	Basil Gram-positif
6	ISTD6	Kokus Gram-positif
7	ISTD7	Basil Gram-negatif
8	ISTD8	Kokus Gram-positif
9	ISTD9	Basil Gram-positif
10	ISTD10	Basil Gram-negatif
11	ISTD11	Basil Gram-positif

Pada penelitian ini dilakukan purifikasi koloni bakteri pada sampel ISTD4. Purifikasi ini bertujuan untuk mendapatkan koloni murni bakteri yang tidak bercampur dengan koloni bakteri lain. Purifikasi ini dilakukan sebanyak tiga kali hingga diperoleh koloni bakteri murni yang mengandung sel-sel bakteri dengan bentuk yang seragam.

Bakteri berbentuk batang Gram-negatif yang diperoleh kemudian diuji kemampuannya dalam menghasilkan proteasenya menggunakan media seleksi agar susu skim. Pada penelitian ini, isolat ISTD4 mampu menghasilkan protease yang ditandai dengan adanya zona bening sebesar 85,00 mm. Jika bakteri menghasilkan zona bening lebih dari 12,00 mm berarti bakteri tersebut mempunyai kemampuan menghasilkan enzim protease yang relatif cukup besar.



(a) (b)
Gambar 2. Hasil uji penghasilan enzim protease (a) isolat bakteri pada medium SMA awal (b) Pembacaan zona bening protease yang dihasilkan bakteri pada media SMA.

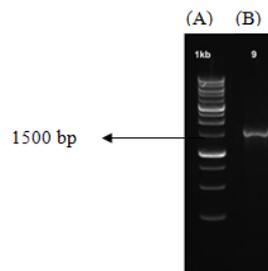
Untuk mengetahui konsentrasi DNA genom bakteri penghasil protease isolat ISTD4 hasil ekstraksi maka dilakukan uji kualitas dan kuantitas DNA menggunakan spektrofotometer. Pada penelitian ini diperoleh konsentrasi DNA genom yaitu 2.06 ng/μL. Dari hasil ini diketahui bahwa konsentrasi DNA melebihi batas standar yaitu 1,8-2,0 nm/μL. Hal ini kemungkinan besar disebabkan adanya kontaminasi etanol.

Hasil pengukuran kualitas dan kuantitas DNA Genom dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Hasil pengukuran konsentrasi DNA genom Bakteri

No	Kode Sampel	260/280	Unit
1	Blangko	1.53	ng/μl
2	ISTD4	2.06	ng/μl

DNA genomik yang telah diisolasi dan diekstraksi dari isolat kemudian digunakan sebagai templat atau cetakan untuk mengamplifikasi gen 16S rRNA dengan metode PCR menggunakan primer universal untuk gen 16S rRNA primer 27F: 5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3' dan primer 1492R 5'-GGTTACSTTGTACGACTT-3'. Proses amplifikasi ini diharapkan dapat mengamplifikasi gen 16S rRNA yang biasanya berukuran sepanjang 1500 bp (Ethicadkk., 2013, 2018). Hasil amplifikasi dilakukan elektroforesis dengan agarosa dan divisualisasi dengan sinar UV. Untuk melihat spesies bakteri, maka hasil amplifikasi dilakukan proses sekuensing (Rinanda, 2011; Ethica dkk., 2014, 2017).



Gambar 2. Elektroforesis PCR DNA (A) Marker (B) DNA Sampel

Hasil proses sekuensing yang dilakukan oleh pihak ketiga yaitu 1st BASE Malaysia adalah berupa urutan nukleotida gen 16S rRNA. Analisis BLAST dilakukan terhadap urutan nukleotida gen 16S rRNA secara online melalui <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>. Hasil BLAST menunjukkan tingkat kesamaan urutan nukleotida gen 16S rRNA isolat yang diperoleh dengan urutan nukleotida gen 16S rRNA bakteri yang telah terdaftar di GenBank. Dari hasil pensejajaran, diketahui fragmen gen 16S rRNA strain ISTD1.4 yang diperoleh memiliki tingkat kemiripan 98% dengan fragmen gen 16S ribosomal RNA isolat bakteri *Pseudomonas stutzeri* strain E141 (Genbank kode akses: MG725953. 1). Dengan demikian strain ISTD1.4 dapat dinyatakan sebagai bakteri *Pseudomonas stutzeri* ISTD-1 (ISTD = Indonesian Soybean Tempeh Day-1).

Berdasarkan kajian pustaka, bakteri *Pseudomonas stutzeri* adalah bakteri Gram-negatif, berbentuk batang, dan memiliki flagel kutub tunggal. Bakteri ini berukuran 1-3 μm , berdiameter 0,5 μm . Bakteri ini banyak ditemukan di tanah dan tumbuh pada berbagai macam karbohidrat termasuk pati, pektin, dan maltosa dan juga mengandung enzim amylase. *Pseudomonas stutzeri* disebut juga sebagai *dinitrifiers* karena bakteri ini mampu merubah nitrat menjadi gas nitrogen. *Pseudomonas stutzeri* tidak bersifat patogen pada manusia.

Berdasarkan hasil penelitian dan data literatur yang diperoleh, dapat dikatakan bahwa strain ISTD-1 merupakan strain bakteri yang potensial sebagai sumber protease. Karena merupakan spesies bakteri *Pseudomonas stutzeri* yang tergolong nonpatogen, maka pemanfaatan strain ISTD-4 sebagai penghasil protease untuk skala yang lebih besar menarik.

Dalam pengujian penghasil enzim protease, hasil yang diperoleh yaitu adanya zona bening disekitar media dengan diameter 85,00 mm yang menandakan adanya bakteri protease yang dapat menghidrolisis protein.

5. SIMPULAN

Berdasarkan hasil isolasi dan purifikasi diperoleh 11 isolat koloni dengan koloni dipilih satu berbeda-beda dan dari 11 koloni dipilih satu koloni bakteri yang unik dengan aktivitas proteolitik yang ditunjukkan adanya zona bening pada media *Skim Milk Agar* dengan diameter 85,00 mm.

Berdasarkan hasil analisis molekuler berbasis sekuens gen 16S rRNA, isolate ISTD4 teridentifikasi sebagai *Pseudomonas stutzeri* strain E141 (Genbank kode akses: MG725953.1). Dengan demikian strain ISTD1.4 dapat dinyatakan sebagai bakteri *Pseudomonas stutzeri* ISTD-1 (ISTD = *Indonesian Soybean Tempeh Day-1*).

6. REFERENSI

- Baehaki, A dan Rinto. 2011. Karakteristik Protease dari Isolat Bakteri Asal Tumbuhan Rawa dari Indralaya. Jurnal. Program Studi Teknologi Hasil Perikanan, Fakultas Pertanian Universitas Sriwijaya. Palembang.
- 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.
- Darmawati, S., Sembiring, L., Asmara, W. and Artama, W.T., 2015. Identifikasi bakteri batang Gram-negatif pada darah widal positif berdasarkan karakter fenotipik.
- 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).
- Darmo Handoyo & Ari Rudiretna, 2009. Prinsip Umum dan Pelaksanaan Polymerase Chain Reaction (PCR). Pusat Studi Bioteknologi. Universitas Surabaya.
- Dewi, R.S. & Aziz, S., 2011. Isolasi *Rhizopus oligosporus* pada beberapa inokulum tempe di Kabupaten Banyumas. Molekul.
- 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.28-253.
- 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, UniversitasGadjahMada).
- Ethica, S.N., Oedjijono, O., Semiarti, E., Widada, J. and Raharjo, T.J., 2018. Genotypic and Phenotypic Characterization Of *Alcali genes javaensis* Jg3 Potential AS An Effective Biodegrader. *Biotropia-The Southeast Asian Journal of Tropical Biology*, 25(1), pp.1-10.
- 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.
- Fatoni, A. Z. dan Puji, L. 2008. Isolasi dan Karakterisasi Protease Ekstraseluler dari Bakteri dalam Air Tahu. *Jurnal Natur Indonesia*.
- Sulchan M, Endang NW. 2007. Nilai gizi dan komposisi asam amino tempe. *Maj Kedokt Indon*.