

Isolasi dan Penapisan Bakteri Penghasil Kitinase dan Protease yang Bersimbiosis dengan Spons *Drasmodon sp* dari Teluk Manado, Sulawesi Utara

(Isolation and Screening the Symbiont Bacteria of the Sponge *Drasmodon sp* from Manado Bay, North Sulawesi that Producing Chitinase and Protease)

Sindiy C. Br. Sembiring¹, Veibe Warouw², Stenly Wullur², Robert A. Bara², Meiske Salaki², Elvy L. Ginting^{2*}

¹Program Studi Ilmu Kelautan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Sam Ratulangi Manado-Sulawesi Utara, Indonesia.

²Staf Pengajar Pada Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Sam Ratulangi Manado-Sulawesi Utara, Indonesia.

*Corresponding Author: like.ginting@unsrat.ac.id

Abstract

Enzymes are important in the technology industry and hydrolytic enzymes, such as chitinase and protease are commonly used for it. Various types of microorganisms such as bacteria can produce hydrolytic enzymes. Sponge-associated bacteria are excellent sources of extracellular hydrolytic enzymes because the surface and internal spaces of sponges are richer in nutrients. The aim of this study was to isolate and screen the bacteria of the sponge *Drasmodon sp* symbiotic from Manado Bay, North Sulawesi that producing chitinase and protease. Symbiont bacteria were grown in Zobell 1226 E medium with a dilution of 10⁻⁴. Bacterial isolation was carried out based on the morphological characteristics of the colony. Chitinase and protease activity was carried out by growing each bacterial isolate in chitin and protein media at 36°C for 48 hours. Chitinase and protease activities were indicated by the formation of a clear zone around the bacterial colony, however, the clear zone for chitinase activity was observed after pouring the Lugol's solution. Based on this study, 8 isolates bacteria of the symbiotic spongy *Drasmodon sp* from Manado Bay, North Sulawesi were isolated based on morphological characteristics. The colony of the bacteria is generally white with an irregular shape. Four isolates, namely 1, 2, 3, and 8 had chitinase activity with chitinolytic indexes were 1.7; 1.5; 1.4, and 1.3, respectively. Six isolates, namely 1, 2, 3, 4, 5, and 6 had protease activity with proteolytic indexes were 1.4; 1.8; 3.1; 1.3; 1.8; and 2.5, respectively.

Keywords: Bacteria; Chitinolytic; Proteolytic; Symbiont; Sponge

Abstrak

Enzim menempati posisi penting dalam bidang teknologi dan industri. Enzim yang banyak digunakan dalam bidang industri adalah enzim hidrolase. Enzim dapat diisolasi dari berbagai jenis mikroorganisme seperti bakteri. Bakteri yang berasosiasi dengan spons merupakan sumber enzim hidrolitik ekstraseluler yang sangat baik karena permukaan dan ruang internal spons lebih kaya nutrisi. Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi dan menguji aktivitas kitinase dan protease bakteri simbiosis spons *Drasmodon sp* dari Teluk Manado. Bakteri simbiosis spons ditumbuhkan dalam media *Zobell 1226 E* pada pengenceran 10⁻⁴. Isolasi bakteri dilaksanakan berdasarkan karakteristik morfologi. Aktivitas kitinase dan protease dilaksanakan dengan menumbuhkan setiap isolat bakteri dalam media kitin dan protein pada suhu 36°C selama 48 jam. Aktivitas kitinase dan protease ditandai dengan terbentuknya zona bening di sekitar koloni bakteri yang mana untuk kitinase diamati setelah diberi larutan lugol. Berdasarkan penelitian ini, 8 isolat bakteri simbiosis spons *Drasmodon sp* dari Teluk Manado, Sulawesi Utara berhasil diisolasi berdasarkan karakteristik morfologi. Isolat bakteri umumnya berwarna putih dengan bentuk ireguler. Empat isolat yakni 1, 2, 3, dan 8 memiliki aktivitas kitinase dan enam isolat yakni 1, 2, 3, 4, 5, dan 6 yang memiliki aktivitas protease. Indeks kitinolitik dari masing-masing keempat isolat bakteri secara berturut turut adalah 1,7; 1,5; 1,4; dan 1,3 dengan kategori bernilai rendah dan indeks proteolitik adalah 1,4; 1,8; 3,1; 1,3; 1,8; dan 2,5 dengan kategori bernilai rendah sampai tinggi.

Kata kunci: Bakteri; Kitinolitik; Proteolitik; Simbiosis; Spons

PENDAHULUAN

Enzim adalah kelompok protein yang berperan penting dalam aktivitas biologi.

Enzim berfungsi sebagai katalisator yang dapat mengatur reaksi tertentu sehingga dalam keadaan normal tidak terjadi

penyimpangan hasil reaksi. Karena enzim mengkatalisator reaksi-reaksi tanpa mengubah struktur reaksi tersebut sehingga enzim biasa disebut biokatalisator (Rachmawaty dan Madihah, 2013). Perkembangan enzim sudah semakin pesat dan menempati posisi penting dalam bidang teknologi dan industri. Kesadaran masyarakat terhadap masalah lingkungan yang semakin tinggi serta adanya inisiatif dari para ahli menjadikan teknologi enzim sebagai salah satu alternatif untuk menggantikan berbagai proses kimiawi dalam bidang industri seperti industri tekstil, detergen, bahan pangan dan minuman, bahan kimia, obat-obatan dan industri kulit (Muchtadi, dkk. 1992). Saat ini enzim yang banyak digunakan untuk diaplikasikan secara umum dalam bidang industri adalah kelompok enzim hidrolase.

Enzim hidrolase adalah sekumpulan enzim yang menguraikan suatu zat dengan pertolongan air. Disebut hidrolase karena enzim ini menghidrolisis molekul-molekul besar menjadi komponen-komponen kecil yang dapat digunakan. Berdasarkan substrat yang diuraikan, enzim hidrolase dibagi atas kelompok kecil yaitu enzim karbohidrase, esterase, kitinase dan protease (Suberata, t.t.).

Kitinase adalah enzim ekstraseluler yang dihasilkan oleh bakteri kitinolitik yang berperan penting dalam menghidrolisis kitin. Kitinase dapat menghidrolisis kitin secara acak pada ikatan glikosidiknya (Nasran, dkk. 2003). Peranan kitinase sangat luas di berbagai bidang. Dalam bidang kesehatan, ekstrak kasar kitinase yang diproduksi oleh *Myrothecium verrucaria* dapat mematikan larva nyamuk dengan cara merusak struktur eksoskeleton *Aedes aegypti* (Gooday, 1999). Fungsi lain digunakan dalam penguraian bertingkat untuk menghasilkan kitosan yang sangat berguna sebagai bahan dasar dalam pembuatan membran dialisa darah (Toharisman, 2007). Sedangkan Protease adalah enzim yang mengkatalisis pemutusan ikatan peptida pada protein. Protease dibutuhkan secara fisiologi untuk kehidupan organisme pada tumbuhan, hewan maupun mikroorganisme. Protease tidak hanya berperan dalam proses

metabolisme seluler, namun juga dapat diaplikasikan dalam bidang industri. Enzim ini adalah salah satu enzim skala industri dengan tingkat penjualan hingga 60% dari total penjualan enzim di dunia. Aplikasi enzim protease di antaranya pada industri pembuatan detergen, industri penyamakan kulit, bahan aditif pada industri pangan, dan zat terapeutik pada bidang farmasi (Gupta, dkk. 2002; Rao, dkk. 1998).

Enzim umumnya diisolasi dari berbagai jenis mikroorganisme. Mikroorganisme dapat menghasilkan enzim dalam jumlah dan jenis yang bervariasi, waktu produksinya lebih cepat serta mudah dikontrol. Salah satu mikroorganisme yang menghasilkan enzim adalah bakteri. Bakteri adalah sekelompok organisme hidup dalam jumlah sangat banyak yang dapat ditemukan di hampir semua tempat, baik di tanah, air maupun udara, bahkan di dalam tubuh manusia dan bersimbiosis dengan organisme lain maupun sebagai agen parasit. Pertumbuhan bakteri banyak dijumpai hidup dengan cara berasosiasi dengan berbagai organisme laut benthik, salah satunya adalah spons (Abubakar, dkk. 2011).

Spons mengandung komponen metabolik primer dan sekunder yang mengandung zat aktif komponen kimia tertentu dan potensial sebagai bahan baku obat dan kosmetik. Senyawa metabolik yang dikandung spons dapat berpotensi untuk mereduksi sifat toksik beberapa jenis hidrokarbon. Bakteri yang berasosiasi dengan spons merupakan sumber enzim hidrolitik ekstraseluler yang sangat baik karena permukaan dan ruang internal spons lebih kaya nutrisi (Feby dan Nair, 2010). Mikroorganisme pendegradasi pada umumnya mampu mendegradasi kitin dan protein serta memiliki aktivitas kitinolitik dan proteolitik. Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi dan menguji aktivitas kitinase dan protease bakteri simbiosis spons *Dracopis sp* dari Teluk Manado, Sulawesi Utara.

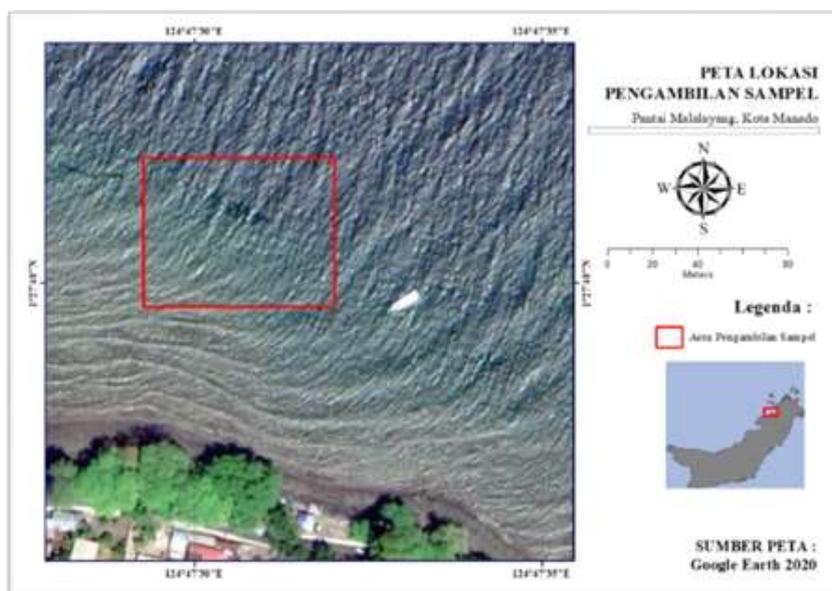
METODOLOGI PENELITIAN

Pengambilan sampel

Sampel spons diambil di Teluk Manado, Kecamatan Malalayang, Sulawesi

Utara (Gambar. 1). Pengambilan sampel spons dilakukan dengan cara snorkeling. Spons dipotong langsung dari substratnya dengan menggunakan pisau setelah itu langsung dimasukkan ke dalam botol steril yang telah disiapkan terlebih dahulu yang

mana botol tersebut telah berisi air laut steril. Sampel spons langsung dibawa ke Laboratorium Biologi Molekuler Dan Farmasitika Laut Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Sam Ratulangi Manado untuk segera dianalisis lebih lanjut.



Gambar 1. Peta Lokasi Pengambilan Sampel.

Media Pertumbuhan Bakteri

Media kultur bakteri yaitu media *Zobell 12216 E* dengan komposisi: Air laut 47,5 ml, Peptone 0,13 gr, Yeast Estrac 0,03 gr, Agar 0,01 gr, Kaldu Spons 2,5 ml. Semua bahan media *Zobell 12216 E* di masukkan ke dalam erlenmeyer dan di larutkan menggunakan *magnetic steerer*. Selanjutnya di sterilisasi menggunakan *autoclave* pada suhu 121°C selama 15 menit. Setelah disterilisasi, media dituang ke dalam cawan *petri* steril secara merata dan media didinginkan hingga sampai mengeras, lalu di bungkus sisi cawan *petri* dengan *plastic wrapp*.

Pengenceran

Pengenceran dilakukan untuk mendapatkan koloni bakteri bebas (tunggal). Tahapan pelaksanaan pengenceran adalah: timbang spons dengan berat 0,5 gr, bilas dengan air laut steril sebanyak dua kali, gerus dalam 9 ml air laut steril dalam tube. Selanjutnya 1 ml sampel tersebut dimasukkan ke dalam 9 ml air laut steril pada tabung reaksi dan

dihomogenisasikan menggunakan *vorteks*. Selanjutnya diambil 1 ml dan dimasukkan ke dalam tabung berisi 9 ml air laut steril. Dilaksanakan hal yang sama sampai dengan tabung keempat.

Isolasi Bakteri

Sampel hasil pengenceran 10^{-2} – 10^{-4} selanjutnya disebarkan pada media *Zobell 12216 E* dengan cara meneteskan suspensi bakteri di atas media sebanyak 0,2ml menggunakan mikropipet kemudian disebarkan menggunakan *L-glass*. Selanjutnya diinkubasi pada suhu 37°C selama 48 jam. Mengamati pertumbuhan bakteri berdasarkan karakteristik morfologi meliputi bentuk, warna, elevasi, dan tepian.

Preparasi media kitin dan media protease

Pembuatan kitin

Kitin diperoleh dari limbah cangkang udang di Pasar Bersehati. Pertama-tama cangkang udang dicuci bersih dan dikeringkan. Selanjutnya dilakukan tahap proses ekstraksi kitin yaitu (Arif, *dkk.*2013): pertama tahap deproteinase, tahap

deproteinase menggunakan bahan NaOH dan Aquades dengan perbandingan 1:10 dan dicampurkan dengan cangkang udang. Dipanaskan selama 1 jam pada suhu 90°C kemudian dibiarkan selama 24 jam, setelah itu dinetralkan dengan aquades sampai pH menjadi 7. Kedua adalah tahap demineralisasi, tahap demineralisasi menggunakan bahan HCl dan Aquades dengan perbandingan 1:7 dicampurkan dengan cangkang udang yang telah dinetralkan. Dipanaskan selama 1 jam pada suhu 90°C kemudian dibiarkan selama 24 jam, setelah itu dinetralkan dengan aquades sampai pH menjadi 7. Kemudian cangkang udang dikeringkan di bawah sinar matahari sampai menjadi kitin.

Pembuatan koloidal kitin

Koloidal kitin diperoleh dengan cara mengekstrak kitin menjadi koloidal menurut metode Arnorld dan Salomon (1986). Dalam metode ini kitin sebanyak 20 gr dilarutkan dalam 400 ml HCl pekat, didiamkan selama 24 jam dalam keadaan tertutup, kemudian disaring menggunakan *glass-wool* dan diambil filtratnya, filtrat ditambah 200 ml aquades sampai pH 7, larutan disentrifus dengan kecepatan 8000 rpm selama 20 menit, endapan yang terbentuk adalah koloidal kitin yang siap digunakan, endapan berwarna putih kecoklatan.

Pembuatan media kitin

Pembuatan media kitin dilakukan dengan melarutkan 2 gr koloidal kitin, 2 gr agar dan 1 gr NB dalam 100 ml air laut steril. Kemudian dilarutkan di atas hot plate sampai mendidih dan di *autoclave* selama ± 15 menit pada suhu 121°C. Selanjutnya media dituangkan ke dalam cawan *petri* yang telah steril secara merata dan ditunggu hingga mengeras. Setelah itu dibungkus menggunakan *plastic wrap* dan diinkubasi selama 24 jam untuk memastikan media tidak terkontaminasi.

Pembuatan media Protein

Pembuatan media protein dengan menyiapkan aquades 100 ml, agar 2 gr, susu skim *milk* 2 gr, dan NB 1 gr. Bahan-bahan tersebut dimasukkan ke dalam Erlenmeyer berukuran 250 ml dan ditutup menggunakan kapas dan aluminium *foil*, setelah itu dipanaskan di atas *hot plate* dan diaduk menggunakan *magnetic stirrer* sampai media larut. Kemudian media disterilisasi menggunakan *autoclave* selama ± 15 menit pada suhu 121°C. Setelah disterilisasi, secara aseptik media dituang ke dalam cawan *petri* steril secara merata, kemudian dibiarkan mengeras. Setelah mengeras dan dingin, dibungkus menggunakan *plastic wrap* dan diinkubasi selama 24 jam untuk memastikan tidak terkontaminasi.

Penentuan bakteri penghasil kitinase dan protease

Bakteri yang telah ditumbuhkan pada media *Zobell 12216 E* di totol menggunakan tusuk gigi steril diatas media kitin dan media protein, selanjutnya di inkubasi pada suhu 36°C selama 2 X 24 jam. Dilakukan pengamatan aktivitas kitinase dengan meneteskan larutan lugol disekitar koloni bakteri untuk melihat terbentuknya zona bening disekitar koloni bakteri yang tumbuh. Sedangkan pengamatan aktivitas protease, dengan melihat terbentuknya zona bening disekitar koloni bakteri tanpa meneteskan larutan lugol.

Besarnya kemampuan bakteri dalam menghasilkan kitinase dan protease dapat ditandai dengan indeks kitinolitik dan proteolitik. Indeks kitinolitik dan indeks proteolitik ialah perbandingan antar diameter zona bening dengan diameter koloni untuk mendapatkan isolat potensial (Dewi, 2008). Menurut Suryadi dkk, (2013), rumus indeks kitinolitik dan indeks proteolitik adalah sebagai berikut:

$$IK = \frac{D.Zona Bening}{D.Koloni}$$

$$IP = \frac{D.Zona Bening}{D.Koloni}$$

Keterangan : IK : Indeks Kitinolitik
IP : Indeks Proteolitik
D : Diameter

HASIL DAN PEMBAHASAN

Isolasi bakteri dilaksanakan berdasarkan warna, ukuran, elevasi, margin, dan bentuk koloninya dengan menggunakan acuan pada (Leboffe, 2012). Setiap isolat bakteri yang ditumbuhkan kembali pada media *Zobell 12216 E*

dengan teknik goresan kuadran berhasil dilakukan (Tabel. 1). Berdasarkan karakteristik morfologinya, diperoleh 8 isolat bakteri simbiosis spons *Drasmodon sp.* koloni bakteri umumnya berwarna putih, margin setiap isolat berbeda-beda dan bentuk koloni pada umumnya tidak beraturan.

Tabel 1. Karakteristik isolat bakteri dari spons *Drasmodon sp*

Karakteristik Koloni				
Kode Isolat	Bentuk	Warna	Tepian	Elevasi
Isolat 1	Tidak beraturan	Putih	Tidak beraturan	Cembung
Isolat 2	Bulat beraturan	Putih	Rata	Cembung
Isolat 3	Tidak beraturan	Putih	berlekung	Rata
Isolat 4	Bercabang seperti akar	Putih	Bercabang seperti akar	Rata
Isolat 5	Berfilamen	Putih	Berfilamen	Rata
Isolat 6	Bulat beraturan	Putih	Rata	Rata
Isolat 7	Tidak beraturan	Putih	Tidak beraturan	Rata
Isolat 8	Bercabang seperti akar	Putih	Bercabang seperti akar	Flat

Berdasarkan hasil uji aktivitas kitinase diperoleh 4 isolat yang memiliki kemampuan mendegradasi kitin yaitu isolat 1, 2, 3, dan 8 yang ditandai dengan adanya zona bening (ZB) disekitar koloni bakteri (Gambar 2). Menurut Gohel, *dkk.* (2006), aktivitas kitinase secara kualitatif ditentukan oleh adanya zona bening disekitar koloni bakteri yang tumbuh pada medium agar kitin. Adanya zona bening di sekitar koloni bakteri setelah waktu inkubasi tertentu, membuktikan bahwa bakteri tersebut mampu memproduksi kitinase (Park, *dkk.* 2000). Terbentuknya zona bening disekitar koloni bakteri menunjukkan adanya produksi enzim ekstraseluler (Dewi, 2008; Nuniek, *dkk.* 2009). Enzim ekstraseluler merupakan enzim yang dihasilkan didalam sel, tetapi dikeluarkan ke media tumbuhnya (Tsuji, 1999 dalam Haedar, *dkk.* 2017).

Berdasarkan indeks kitinolitik dari keempat isolat bakteri yang positif menghasilkan kitinase disajikan pada Tabel 2. Indeks kitinolitik bernilai tinggi apabila lebih dari 2 (> 2), sedangkan dinyatakan bernilai rendah apabila kurang dari 2 (< 2) (Haliza, W. dan M.T. Suhartono, 2012). Berdasarkan Tabel 2, terlihat bahwa isolat 1, 2, 3, dan 8 memiliki indeks kitinolitik yang rendah. Hasil di bawah menunjukkan bahwa berdasarkan indeks kitinolitik, kitinase yang dihasilkan bakteri simbiosis spons *Drasmodon sp* dari Teluk Manado, Kecamatan Malalayang, Sulawesi Utara adalah rendah dibandingkan bakteri kitinolitik dari limbah udang yang diteliti oleh Setia dan Suharjono (2015) dengan indeks kitinolitik secara berturut-turut sebesar 2,069 dan 2,084. Indeks kitinolitik menunjukkan kemampuan degradasi bakteri terhadap kitin. Semakin banyak

enzim yang dihasilkan maka zona bening juga akan semakin luas karena kitin yang terdegradasi semakin banyak (Suryani, 2013).

Kitinase merupakan salah satu enzim yang menarik untuk diisolasi karena kemampuannya untuk menghidrolisis kitin menjadi turunan kitin yang sangat banyak manfaatnya. Salah satu aplikasi kitinase dalam bidang bioteknologi adalah sebagai biokontrol. *Serratia plymuthica* C48 yang diisolasi dari tanah berpotensi sebagai agensia biokontrol yang mampu menekan pertumbuhan jamur *Verticillium dahlia*. (Herdyastuti, dkk. 2009).

Sejalan dengan penelitian sebelumnya, Tito (2014) berhasil mengisolasi bakteri kitinolitik yang terdapat pada cangkang lobster air tawar (*Cherax quadricarinatus*) yang teridentifikasi *Aeromonas sp.*, *Bacillus sp* dan *Pseudomonas sp.* Ketiga bakteri yang teridentifikasi tersebut memiliki kemampuan untuk mendegradasi kitin.

Hasil uji aktivitas protease menunjukkan bahwa dari delapan isolat bakteri simbiosis spons, 6 (enam) isolat bakteri memiliki aktivitas protease dengan kode isolat 1, 2, 3, 4, 5, dan 6 dan 2 (dua) isolat bakteri yang tidak memiliki aktivitas proteolitik dengan kode isolat 7 dan 8. Aktivitas proteolitik ditunjukkan dengan adanya zona bening (ZB) disekitar koloni bakteri (Gambar 3).

Dari hasil perhitungan indeks proteolitik dinyatakan bahwa isolat bakteri 3 adalah isolat bakteri yang memiliki nilai indeks proteolitik yang tinggi yakni 3,14 dan isolat bakteri 4 memiliki nilai indeks

proteolitik yang rendah yakni 1,3 (Tabel 3). Zona bening yang terbentuk menjadi indikator bahwa bakteri merupakan penghasil protease karena mampu merombak protein dalam media skim milk menjadi peptida-peptida dan asam amino yang larut. Skim *milk* dipilih sebagai media karena kandungan lemak pada susu *Full cream* (Rusdwitasari dan Wikandari, 2014).

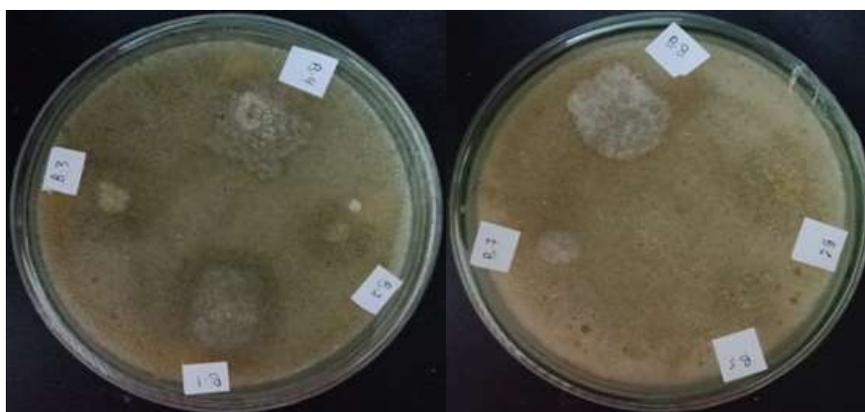
Sejalan dengan penelitian sebelumnya, Rizaldi dkk. (2018) berhasil mengisolasi bakteri simbiosis dari lamun yang teridentifikasi sebagai *Staphylococcus sp.*, *Plesiomonas shigelloides*, *Bacillus sp.*, *Pseudomonas sp.* keempat bakteri tersebut terbukti memiliki aktivitas proteolitik. Lakshmi dkk. (2014) menyatakan bahwa indeks proteolitik pada media agar dapat digunakan untuk menentukan kemampuan dalam menghasilkan enzim protease. Akan tetapi indeks proteolitik hanya menentukan kemampuan dalam menghasilkan enzim protease tapi tidak bisa digunakan untuk menentukan besar kemampuan dalam menghasilkan enzim protease (Ningthoujam dan Kshetri, 2010; Zilda dkk, 2012). Shanmughapriya, dkk (2008) pada penelitiannya melaporkan bahwa aktivitas protease adalah yang paling tinggi dari bakteri simbiosis spons *Fasciospongia cavernosa* yang diambil dari Semenanjung Pantai Timur India. Bakteri yang mampu mensekresikan enzim protease memiliki kemampuan menghidrolisis senyawa-senyawa bersifat protein menjadi oligopeptida, peptida rantai pendek, dan asam amino (Setyati dan Subagyo, 2012).



Gambar 2. Isolat bakteri yang memiliki aktivitas kitinase

Tabel 2. Indeks kitinolitik bakteri dari spons *Drasmodon sp*

Kode Isolat Bakteri	D.Zona Bening	D. Koloni	Hasil
Isolat 1	2,4	1,4	1,71
Isolat 2	1,5	1	1,5
Isolat 3	3	2,1	1,42
Isolat 4	-	1	-
Isolat 5	-	1,4	-
Isolat 6	-	1,2	-
Isolat 7	-	1,2	-
Isolat 8	2	1,5	1,33



Gambar 3. Isolat bakteri yang memiliki aktivitas protease

Tabel 3. Indeks proteolitik isolat bakteri dari spons *Drasmodon sp*

Kode Isolat Bakteri	D.Zona Bening	D. Koloni	Hasil
Isolat 1	3,1	2,1	1,47
Isolat 2	1,5	0,8	1,87
Isolat 3	2,2	0,7	3,14
Isolat 4	2,6	2	1,3
Isolat 5	0,9	0,5	1,8
Isolat 6	2,3	0,9	2,5
Isolat 7	-	1,1	-
Isolat 8	-	2,4	-

KESIMPULAN

Sebanyak 8 isolat bakteri berhasil diisolasi dari spons *Drasmodon sp* asal Teluk Manado, Sulawesi Utara. Isolat bakteri 1, 2, 3, dan 8 memiliki aktivitas kitinase dengan indeks kitinolitik 1,71; 1,5; 1,42 dan 1,33 dengan kategori bernilai sedang. Isolat bakteri 1, 2, 3, 4, 5, dan 6

memiliki aktivitas protease dengan indeks proteolitik 1,47; 1,87; 3,14; 1,3; 1,8 dan 2,5 dengan kategori bernilai sedang-tinggi.

DAFTAR PUSTAKA

Abubakar, H., Wahyudi A.T., dan Yuhana. M. 2011. Skrining Bakteri yang Berasosiasi dengan Spons Jaspis sp.

- Sebagai Senyawa Anti Mikroba, *Jurnal Ilmu Kelautan*, 16 (1): 32-40.
- Arif, A.R., Ischaidar., Hasnah Natsir, dan Seniwati Dali. 2013. Isolasi Kitin Dari Limbah Udang Putih (*Penaeus merguensis*) Secara Enzimatis. Seminar Nasional Kimia. Universitas Hasanuddin.
- Arnold, L. D., dan Solomon, N. A. 1986. *Manual Industrial Microbiology*, American Society for Microbiology, Washington, D. C.
- Dewi, I.M. 2008. Isolasi Bakteri dan Uji Aktivitas Kitinase Termofilik Kasar dari Sumber Air Panas Tinggi Raja, Simalungun Sumatera Utara. Tesis Program Pasca Sarjana. Universitas Sumatera Utara. Medan.
- Feby, A. and Nair S. 2010. Sponge associated bacteria of Lakshadweep coral reefs, India: resource for extracellular hydrolytic enzymes. *Adv. Biosci. Biotechnol.* 1: 330-336.
- Gohel, V., A Singh, M Vimal, P. Ashwini., dan HS. Cahpar. 2006. Bioprospecting and Antifungal Potential of Chitinolytic Microorganisms. *African j. Biotech.* 5(2): 54-72.
- Gooday, G.W. 1999. Physiology of Microbial Degradation of Chitin and Chitosan Biodegradation. 1(2-3):177-190.
- Haedar, N., Natsir, H., Fahrudin., Aryanti, W. 2017. Produksi dan Karakterisasi Enzim Kitinase dari Bakteri Kitinolitik Asal Kerang Anadara Granosa. Departemen Biologi Fakultas MIPA Universitas Hasanuddin Makasar. 8 (15) 14-21.
- Haliza W. dan Suhartono M.T. 2012. Karakteristik Kitinase dari Mikrobia. *Buletin Teknologi Pascapanen Pertanian* 8:1.
- Herdyastuti N, Raharjo T.J, Mudasir, dan Matsjeh S. 2009. Chitinase and Chitinolytic Mikroorganism: Isolation, Characterization and Potential. *J. Chem.* 9:1, 36-47.
- Lakshmi, B.K.M., Ratnasri, P.V., Devi, K.A., Hemalatha, K.P.J. 2014. Screening, optimization of producing and partial characterization of alkaline protease from haloalkaliphilic *Bacillus* sp. *IJRET: International Journal of Research in Engineering and Technology* 3(2): 435–443.
- Leboffe, M.J dan B.E. Pierce. 2012. *Brief Microbiology. Laboratory Theory & Application* 2nd Edition. Englewood: Morton Publishing.
- Muchtadi, S., Nurleni dan Made, 1992, Enzim dalam Industri Pangan, Skripsi, Departemen Biokimia Fakultas Matematika Dan Ilmu Pengetahuan Alam Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Nasran, S., Ariyani, F., Indriati, N. 2003. Produksi kitinase dan kitin diasetilase dari *Vibrio harveyi*. *Jurnal Penelitian Perikanan Indonesia.* 9(5):33-38.
- Park, SH., J. Lee, dan HK. Lee. 2000. Purification and Characterization of Chitinase from A Marine Bacterium, *Vibrio* sp. 98CJ11027. *J. Microbiol.* 38(4):224-229.
- Rachmawaty dan Madihah, 2013. Potensi Perlakuan Awal Limbah Kulit Udang Untuk Produksi Enzim Kitinase Oleh *Trichoderma Virens* Pada Fermentasi Substrat Padat. *Jurnal Bionature.* Vol (14)1: 33- 36.
- Rao, M.B., Tanksale, A.M., Ghatge, M.S., dan Deshpande, V.V. 1998. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews.* 62:597-635.
- Rizaldi R, Woro H.S, dan Sudarno. 2018. Isolation and Characterization Proteolytic Bacteria which is Associated with Sea Grass (*Enhalus acoroides*) in Bama Beach, Baluran National Park, Situbondo, East Java. *JIPK.* Volume 10 No 1.
- Rusdwitasari, Y.N. dan Wikandari, P.R. 2014. Aktivitas Bakteri Proteolitik yang Diisolasi dari Sumber Air Panas Singgahan, Tuban. *UNESSA Journal of Chemistry* Vol.3(3).

- Setia, I.N. dan Suharjono. 2015. Diversitas dan Uji Potensi Bakteri Kitinolitik dari Limbah Udang. *Jurnal Biotropika*. Vol 3 No 2.
- Setyati, W. A. dan Subagiyo. 2012. Isolasi dan Seleksi Bakteri Penghasil Enzim Ekstraseluler (Proteolitik, Amilolitik, Lipolitik, dan Selulolitik) yang berasal dari Sedimen Kawasan Mangrove. *Jurnal Ilmu Kelautan.*, 17(3): 164-168.
- Shanmughapriya, S., J. Krishnaveni, Joseph S., R. Gandhimathi, M. Arunkumar, T. Thangavelu, G. S. Kiran, K. Natarajaseenivasan. Optimization of extracellular thermotolerant alkaline protease produced by marine *Roseobacter* sp. (MMD040). *Biopro. Biosyst. Eng.*, 31:427–433.
- Suberata, I. Wayan. "Metabolisme Mikroba". simdos.unud.ac.id
- Suryadi, Y., T. P. Priyatno, M. Samudra, D. N. Susilowati, N. Lawati dan E. Kustaman. 2013. *J. Agro Biogen*. 9(2):77-84.
- Suryani, W.O. 2013. Isolasi dan Identifikasi Mikroorganisme Kitinolitik Asal Limbah Cairan Rumen Sapi Serta Optimasi Produksi Enzim Kitinase. *Jurnal Progres Kimia Sains*. 3(1).
- Tito, I.M. 2014. Isolasi dan Identifikasi Bakteri Kitinolitik yang Terdapat Pada Cangkang Lobster Air Tawar (*Cherax quadricarinatus*). ADLN Perpustakaan Universitas Airlangga.
- Toharisman, A., Suhartono, M. T., Barth, M. S., Hwang, J. K., and Pyun, Y. R. 2007. Purification and characterization of a thermostable chitinase from *Bacillus licheniformes* Mb-2. *World Journal Microbiology Biotechnology*. 21(5):733-738.
- Zilda, D.S., Harmayani, E., Widada, J., Asmara, W., Irianto, H.E., Patantis, G., Fawzya, Y.N. 2012. Screening of thermostable protease producing microorganisms isolated from Indonesia Hotspring. *Squalen* 7(3): 105–114.